

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЛИФЕРАЦИИ И АПОПТОЗА ГАМЕТ САМЦОВ КРЫС ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Демяшкин Г. А.^{1,2}

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), г. Москва, Россия.

²Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал «НМИЦ радиологии», Обнинск, Россия.

Для корреспонденции: Демяшкин Григорий Александрович, кандидат медицинских наук; e-mail: dr.dga@mail.ru

For correspondence: Grigory A. Demyashkin, PhD, e-mail: dr.dga@mail.ru

Information about authors:

Demyashkin G. A., <https://orcid.org/0000-0001-8447-2600>

РЕЗЮМЕ

На долю «мужского фактора» приходится половина причин бездетности среди супружеских пар, для понимания этиопатогенетических механизмов данных нарушений сперматогенеза необходимо создание моделей на животных, в том числе с применением облучения. Кроме того, в клинической практике с успехом применяются методы лучевой терапии при лечении злокачественных новообразований. Учитывая рост количества злокачественных новообразований яичка необходимо усовершенствовать существующие методы и разрабатывать новые.

Цель исследования: молекулярно-биологическая оценка пролиферации и апоптоза гамет крыс-самцов после облучения электронами дозами 2 Гр, 8 Гр и 12 Гр.

Материал и методы. Самцы Wistar (220±20 г; 9 – 10 недель; n=40) были случайным образом поделены на контрольную (I; n=10) и опытные (II – IV; n=10 в каждой) группы в зависимости от дозы однократного прицельного облучения электронами тазового сегмента в проекции семенников: II – 2 Гр, III – 8 Гр, IV – 12 Гр, которые были изучены иммуногистохимическим методом с использованием антител к Ki-67, каспазе-3, Bcl-2 и p53

Результаты. Через неделю после облучения 2 Гр, 8 Гр и 12 Гр обнаружили увеличение уровня терминальной фазы апоптоза – каспазы-3 (25.0±0.1, 55.0±0.2 и 74.0±0.1 соответственно) и снижение маркера пролиферации Ki-67 (18.0±0.1, 8.0±0.3 и 2.0±0.1 соответственно) на фоне снижения степени маркирования антиапоптотического Bcl-2 (27.0±0.7, 15.5±0.7 и 7.0±0.2 соответственно) и повышения проапоптотического p53 факторов (33.0±0.1, 83.0±0.1 и 67.0±0.2 соответственно).

Заключение. В семеннике однократное облучение электронами приводит к резкому сдвигу пролиферативно-апоптотического баланса в сторону гибели половых клеток, в первую очередь сперматогоний.

Ключевые слова: сперматогенез, облучение, пролиферация, апоптоз, «NOVAC-11».

IMMUNOPHENOTYPICAL FEATURES OF THE LIFE CYCLE OF GAMETS IN MALE RATS AFTER LOCAL IRRADIATION

Demyashkin G. A.^{1,2}

¹I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

²Medical Radiological Scientific Center named after A.F. Tsyba – branch of the National Medical Research Center of Radiology, Obninsk, Russia

SUMMARY

The “male factor” accounts for half of the causes of childlessness among married couples; in order to understand the etiopathogenetic mechanisms of these spermatogenesis disorders, it is necessary to create animal models, including with the use of radiation. In addition, in clinical practice, the methods of radiation therapy are successfully used in the treatment of malignant neoplasms. Given the increase in the number of testicular malignant neoplasms, it is necessary to improve existing methods and develop new ones.

Aim of the study: molecular biological assessment of the proliferation and apoptosis of gametes in male rats after electron irradiation with doses of 2 Gy, 8 Gy and 12 Gy.

Material and methods. Wistar males (220 ± 20 g; 9 – 10 weeks; n = 40) were randomly divided into control (I; n=10) and experimental (II – IV; n=10 in each) group depending on the dose of a single sighting irradiation with electrons of the pelvic segment in the projection of the testes: II – 2 Gy, III – 8 Gy, IV – 12 Gy, which were studied by immunohistochemical method using antibodies to Ki-67, caspase-3, Bcl-2 and p53

Results. A week after irradiation with 2 Gy, 8 Gy, and 12 Gy, an increase in the level of the terminal phase of apoptosis, caspase-3 (25.0±0.1, 55.0±0.2 and 74.0±0.1, respectively), and a decrease in the proliferation marker Ki-67 (18.0±0.1, 8.0±0.3 and 2.0±0.1, respectively), a decrease of degree of antiapoptotic Bcl-2 (27.0±0.7, 15.5±0.7, and 7.0±0.2, respectively) and an increase of proapoptotic p53 (33.0±0.1, 83.0±0.1, and 67.0±0.2, respectively) factors.

Conclusion. In the testis, a single irradiation with electrons leads to a sharp shift in the proliferative-apoptotic balance towards the death of germ cells, primarily spermatogonia.

Key words: spermatogenesis, radiation, proliferation, apoptosis, «NOVAC-11».

На долю мужского бесплодия приходится половина причин бездетности среди супружеских пар [1; 2; 3], для понимания этиопатогенетических механизмов данных нарушений сперматогенеза необходимо создание моделей на животных, в том числе с применением облучения [4]. Кроме того, в клинической практике с успехом применяются методы лучевой терапии при лечении злокачественных новообразований. Учитывая рост количества злокачественных новообразований яичка необходимо усовершенствовать существующие методы и разрабатывать новые.

Семенник является одним из наиболее радиочувствительных органов уже при дозе облучения от 0,1 Гр и выше [5; 6]. При этом, в первую очередь наблюдается нарушение пролиферации и апоптоза половых клеток, в сторону их гибели через повреждение ДНК и окислительный стресс [7; 8]. Кроме того, апоптоз, возникающий в результате окислительного стресса, который усиливается под действием ионизирующего излучения, подавляет сперматогенез. Однако, некоторые авторы говорят о способности сперматогоний типа А выживать после лучевой терапии [9]. Уровни Ki-67, каспазы-3, Vcl-2 и p53 – важных маркеров клеточного цикла изменяются под действием облучения [9; 10]. В то же время, отсутствуют комплексные данные этих изменений в зависимости от вида, направленности и дозирования облучения в зависимости от используемого аппарата.

Результаты исследований свидетельствуют о более агрессивном воздействии прицельной радиации в сравнении с общим облучением, однако они не дают конкретный ответ на вопросы: как быстро происходит апоптоз мужских гамет, на каких стадиях сперматогенеза они наиболее уязвимы и как долго сохраняются эти патоморфологические признаки.

Именно поэтому подбор оптимальных доз излучения, их своевременная корректировка и нивелирование токсичности данной терапии – это ключевые моменты, которые влияют на оптимизацию лечения и становится все более важной задачей современной онкологии.

Цель исследования: молекулярно-биологическая оценка пролиферации и апоптоза гамет крыс-самцов после облучения электронами дозами 2 Гр, 8 Гр и 12 Гр.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Экспериментальное морфологическое исследование проводили на базах Сеченовского университета и Экспериментального сектора Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба.

Животные для исследования in vivo. Самцов крыс Wistar (220±20 г; 9–10 недель; n=40) содержали в виварии при контролируемой температуре (22°C) и световом периоде (12L:12D) со свободным доступом к воде и крысиному корму. Крысы случайным образом были разделены на контрольную (I; n=10) и опытные (II–IV; n=10 в каждой) группы в зависимости от дозы однократного прицельного облучения электронами (импульсным ускорителем «NOVAC-11») тазового сегмента в проекции семенников: II – 2 Гр, III – 8 Гр, IV – 12 Гр. С животными обращались с соблюдением всех асептических мер предосторожности. Все манипуляции осуществлялись согласно «Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ЕЭС, Страсбург, 1985), «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (ЕЭС, Страсбург, 1986), Хельсинской декларации и Руководствам по проведению медико-биологических исследований по уходу и использованию лабораторных животных (ILAR, DELS), а также одобрены Локальным этическим комитетом.

Ионизирующее излучение (IR).

Животных подвергали локальному облучению тазового сегмента в дозе 8 Гр (мощность дозы 1 Гр/мин, энергия 10 МэВ и частота 9 Гц, размер поля – Ø 100 мм) с использованием линейного акселератора («NOVAC-11», Радиологическое отделение экспериментального корпуса МРНЦ имени А.Ф. Цыба, г. Обнинск, Россия). Данная установка позволяет получить пучок электронов с энергиями 4, 6, 8, 10 МэВ; пучок возможно отколимировать до Ø 30-100 мм с шагом по 10 мм; частоту бенчей в пучке можно регулировать от 1 до 24 Гц с шагом по 1 Гц. Мощность дозы была откалибрована с помощью физической дозиметрии группой радиационной безопасности в рамках требований стандартной калибровки в соответствии с Агентством по регулированию атомной энергии России. Животные всех групп (I–IV) выводили из эксперимента путем введения высоких доз анестетика (50 мг/мл пропофол, 50 мг/мл лидокаина гидрохлорид). Сроки умерщвления – на 84 сутки после облучения в соответствии с продолжительностью двух циклов сперматогенеза крыс (по 42 суток каждый). После плановой эвтаназии у крыс были изъяты семенники.

Морфологический блок.

После извлечения оценивали внешний вид семенников, состояние паренхимы на разрезе, фиксировали в растворе Буэна, приготавливали парафиновые блоки, а затем срезы, которые

окрашивали гематоксилином и эозином согласно стандартной методике.

Иммуногистохимический анализ (ИГХ) проводили после депарафинизации и регидратации парафиновых срезов по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистоштейнере Bond-Max («Leica», Германия). Первичные кроличьи моноклональные антитела к: Ki-67 (clone SP6; RTU), каспазе-3 (clone ab2302, 1:300), Bcl-2 (clone E17; RTU) и p53 (clone SP5; RTU); вторичные – универсальные антитела («Cell Marque», США). Для каждого маркера выполняли контрольные исследования с целью исключения псевдоположительных и псевдонегативных результатов. Ядра клеток докрасивали гематоксилином Майера; срезы промывали под проточной водой; дегидратировали и заключали в бальзам.

Оценку результатов иммуногистохимических реакций по распределению окрашивания проводили по 3-балльной системе с подсчетом количества иммунопозитивных клеток в 10 случайно отобранных полях зрения при увеличении $\times 400$ (в %): «-» – отсутствие, «+» – слабая (5 – 25% клеток, 1 балл), «++» – умеренная (25 – 50% клеток, 2 балла), «+++» – выраженная ($\geq 51\%$ клеток, 3 балла).

Статистический анализ.

Полученные в результате подсчета данные обрабатывали с использованием компьютерной программы SPSS 12.00 for Windows statistical software package (IBM Analytics, США). При статистической обработке для оценки достоверности различий средних значений между группами использовались следующие непараметрические критерии U-критерий Манна–Уитни, со значимостью $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфологический количественный анализ и тестикулярная оценка. В срезах семенников контрольной группы наблюдали нормальную гистоархитектонику с физиологическим сперма-

тогенезом; оценка по Johnsen – $10 \pm 0,82$ балла. В образцах опытных групп выявили уменьшение количества половых клеток, признаки дегенеративных изменений и лизиса сперматид и сперматозоидов, а также появление интенсивных пикнотичных ядер у первичных сперматоцитов. Сперматогенный эпителий сморщен, в межканальцевом пространстве – интерстициальный отек и стаз в просветах кровеносных сосудов. Наиболее глубокое поражение канальцев, вплоть до аплазии сперматогенного эпителия и обширной вакуолизации наблюдали в группах облучения 8 Гр (оценка по Johnsen – 5.0 ± 0.1) и 12 Гр (оценка по Johnsen – 3.0 ± 1.1) по сравнению с дозой воздействия 2 Гр (оценка по Johnsen – 8.0 ± 0.4). Прогрессировали деструкция и сморщивание канальцев, аплазия эпителия и его вакуолизация.

Иммуногистохимический анализ. Во всех исследуемых группах отмечали положительные ИГХ-реакции на Ki-67, каспазу-3, Bcl-2 и p53, но степень их выраженности коррелировала с дозой облучения и говорит об изменении пролиферативно-апоптотического баланса, наиболее показательными которые были в группах облучения меньшей (2 Гр), пограничной (8 Гр) и наибольшей (12 Гр) дозами (табл. 1, рис. 1).

Ki-67-положительная реакция в половых клетках, преимущественно в единичных сперматогониях в группе облучения 2 Гр была в 1,5 раза меньше чем в образцах контроля, а также прослеживалась тенденция к уменьшению степени окрашивания в зависимости от дозы. В микропрепаратах наблюдали умеренное маркирование количества гамет в группах облучения, особенно в 8 Гр и 12 Гр интенсивность окрашивания увеличилась в 2,0 и более раза по сравнению с контрольной группой. Максимальную интенсивность иммуномечения демонстрировали первичные сперматоциты.

Экспрессия белка готовности к апоптозу p53 в сперматогенном эпителии опытных групп (преимущественно сперматогонии и спермато-

Таблица 1

Сравнительная характеристика доли ИГХ-позитивных клеток в семенных канальцах после облучения электронами (%), при $p < 0.05$.

Доза облучения, Гр	Ki-67	caspase-3	Bcl-2	p53
Контроль	49.0 ± 0.2	20.0 ± 0.3	41.0 ± 0.1	15.0 ± 0.5
2	18.0 ± 0.1^a	25.0 ± 0.1^a	27.0 ± 0.7^a	33.0 ± 0.1^a
8	8.0 ± 0.3^b	55.0 ± 0.2^b	15.5 ± 0.7^b	67.0 ± 0.2^b
12	2.0 ± 0.1^c	74.0 ± 0.1^c	7.0 ± 0.2^c	83.0 ± 0.1^c

Примечание: ^a $p < 0.05$ (2 Гр и контроль), ^b $p < 0.05$ (8 Гр и контроль), ^c $p < 0.05$ (12 Гр и контроль)

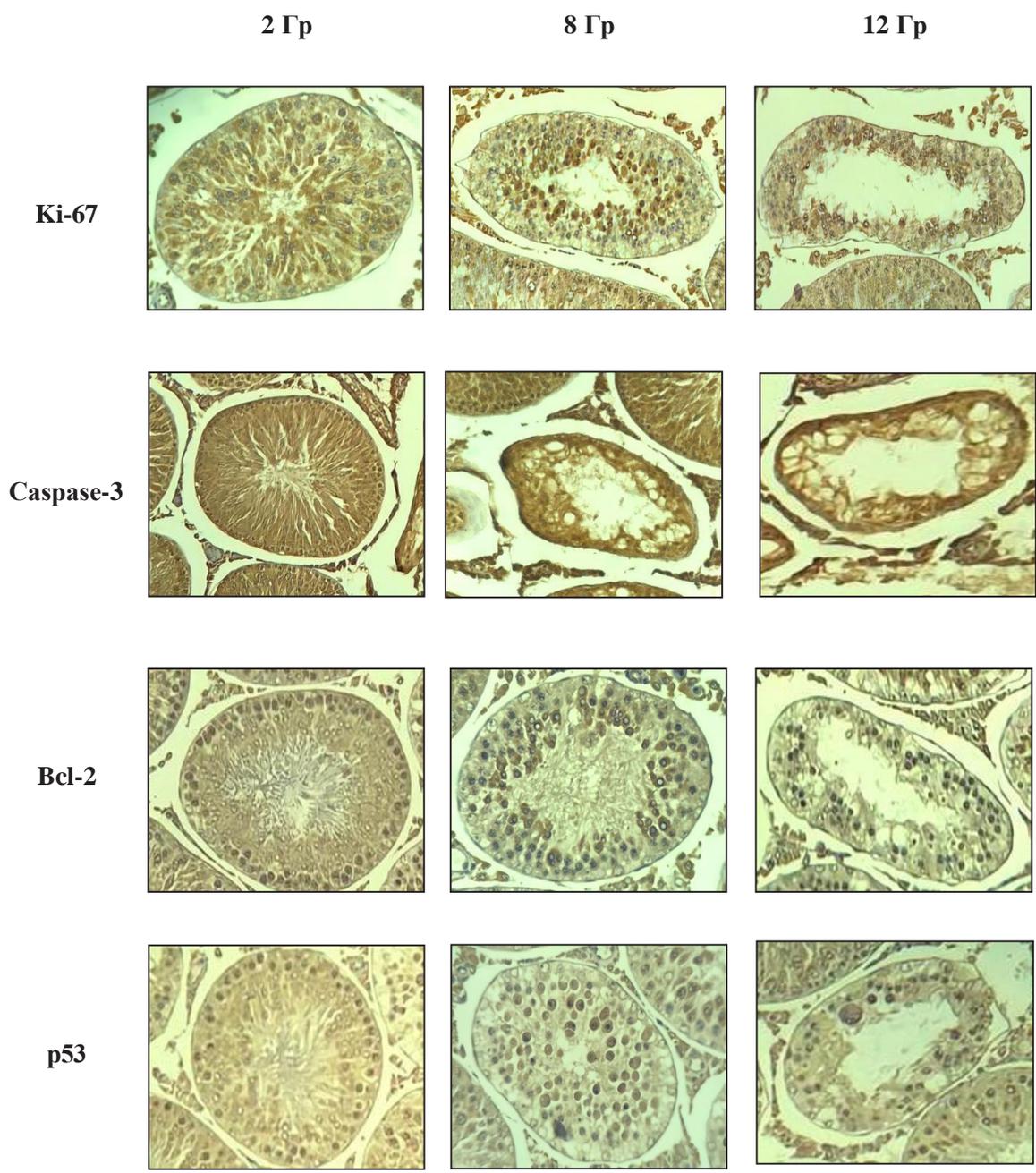


Рис.1. Семенные каналцы крыс при различных дозах облучения. Иммуногистохимические реакции, докрасивание - гематоксилином, увелич. x400.

циты I-го типа) была в 2,0 – 5,0 раз выше, чем в контрольной. В то же время, маркер антиапоптотической активности (Bcl-2) показал слабое окрашивание половых клеток в микропрепаратах семенников разных доз облучения, в том числе и семенных шаров в отличие от образцов I-ой группы.

Также мы наблюдали умеренное увеличение количества гамет, проявляющих положительную ИГХ-реакцию на каспазу-3, в группах облучения, интенсивность которой повышалась в зависимости от дозы, что свидетельствует об уходе данных клеток в апоптоз.

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее экспериментальное исследование посвящено изучению влияния локального облучения электронами на жизненный цикл мужских гамет в эксперименте на семенниках крыс, для дальнейшей разработки способов защиты данного радиочувствительного органа.

Согласно обнаруженной морфологической картине после локального облучения импульсным ускорителем электронов «NOVAC-11» при дозах 2 Гр, 8 Гр и 12 Гр через неделю происходит снижение количество половых клеток,

преимущественно сперматогоний, что частично согласуется с данными других авторов [11; 12; 13]. В своем исследовании Marzban et al. наблюдали уменьшение количества половых клеток и истончение сперматогенного эпителия, а также снижение количества клеток Лейдига при общем облучении 2 Гр [14]. В тоже время, нами были обнаружены пикнотические изменения в сперматогониях и первичных сперматоцитах, стойкие явления в кровеносных сосудах и отек интерстициальной ткани, которые усиливались с повышением дозы. Механизмы воздействия ионизирующего излучения на ткани еще до конца не изучены, многие исследователи говорят о преобладающей роли окислительного стресса как причину перекисного окисления липидов сопровождаемого повышением уровня специфического маркера – МДА [15], что было показано, в частности, при облучении всего тела в дозе 5 Гр [16].

При иммуногистохимической оценки маркеров пролиферации и апоптоза, а также про- и антиапоптотических факторов клеточного цикла гамет было выявлено увеличение активности каспазы-3, демонстрирующее прямую зависимость с повышением дозы облучения по сравнению с контрольной группой. Каспаза-3 – важнейший белок терминальной стадии апоптоза, количество которого возрастает после воздействия ионизирующего излучения [15; 17], а белок Ki-67 является маркером размножения клеток, уровень которого понижается и приводит к регрессу пролиферации, что было обнаружено в нашем исследовании, особенно на сублетальных дозах [10]. Более вероятно, что воздействие ионизирующего излучения на половые клетки самцов приводит к активации внутреннего пути апоптоза и увеличению экспрессии апоптотических белков в каскаде клеточной гибели, что отчетливо прослеживается в группе при дозе 12 Гр. Минимизация неблагоприятных исходов усиливающегося окислительного стресса при апоптозе является одним из преимуществ локального облучения в отличие от общего радиоактивного воздействия.

Исходя из полученных данных, для снижения рисков развития и профилактики нарушений сперматогенеза, после облучения в онкологической практике, необходима разработка лекарственных веществ или других методов, обладающих антиапоптотическим, антиоксидантным или комбинаторным действием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В семеннике однократное облучение электронами (импульсный ускоритель «NOVAC-11») приводит к резкому сдвигу пролиферативно-

апоптотического баланса в сторону гибели половых клеток, в первую очередь сперматогоний, о чем свидетельствуют значения ИГХ-реакций: увеличение уровня терминальной фазы апоптоза – каспазы-3 и снижение маркера пролиферации Ki-67 на фоне снижения степени маркирования антиапоптотического Bcl-2 и повышения проапоптотического p53 факторов. При этом глубина и степень данных изменений усиливается с повышением дозы (2 Гр, 8 Гр, 12 Гр).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCE

1. Kumar N., Singh A. K. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *J Hum Reprod Sci.* 2015;8(4):191-196. doi:10.4103/0974-1208.170370.
2. Chalyi M. E., Akhvlediani N. D., Kharchilava R. R. Male infertility. *Urologiia.* 2017;(S2):4-19. (In Russ.).
3. Demyashkin G. A. Apoptosis in seminiferous tubules of human in normal and in idiopathic infertility. *Tsitologiya.* 2018;60:208-218. (In Russ.) doi:10.31116/tsitol.2018.03.07.
4. Dehghani F., Sotoude N., Bordbar H., Panjeshahin M., Karbalay-Doust S. The use of platelet-rich plasma (PRP) to improve structural impairment of rat testis induced by busulfan, Platelets, 2018. doi: 10.1080/09537104.2018.1478400.
5. Khan S., Adhikari J. S., Rizvi M. A. Radioprotective potential of melatonin against 60Co γ -ray-induced testicular injury in male C57BL/6 mice. *J Biomed Sci.* 2015;22: 61. doi:10.1186/s12929-015-0156-9.
6. Dergilev A. A., Palyga G. F., Chibisova O. F., Ivanov V. L., Panfilova V. V., Zhavoronkov L.P. Radiation and spermatogenesis: experimental estimation of radiation effect at doses below castrate level on ontogenesis. *Radiation and Risk.* 2012;21(4):51–60.
7. Gao S., Zhao Z., Wu R., Zeng Y., Zhang Z., Miao J., Yuan . Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves radiation-induced heart injury through DNA damage repair in rat model. *Radiat Environ Biophys.* 2017;56:63–77.
8. Ghobadi A., Shirazi A., Najafi M., Kahkesh M. H., Rezapoor S. Melatonin ameliorates radiation-induced oxidative stress at targeted and nontargeted lung tissue. *J Med Phys.* 2017;42:241–244.
9. Bing S. J., Kim M. J., Ahn G., Im J., Kim D. S., Ha D., Cho J., Kim A., Jee Y. Acidic polysaccharide of Panax ginseng regulates the mitochondria/caspase-dependent apoptotic pathway in radiation-induced damage to the jejunum in mice. *Acta Histochem.* 2014;116:514–521.
10. Demyashkin G. A., Proliferation and apoptosis of male germ cells in the seminiferous epithelium in normal and nonobstructive

- azoospermia. *Crimea Journal of Experimental and Clinical Medicine* 2016;7(2):19-32. (In Russ.).
1. Naeimi R. A., Talebpour Amiri F., Khalatbary A. R., Ghasemi A., Zargari M., Ghesemi M., Hosseinimehr S. J. Atorvastatin mitigates testicular injuries induced by ionizing radiation in mice. *Reprod Toxicol.* 2017;72:115–121.
 2. Ji H. J., Wang D. M., Wu Y. P. Wuzi Yanzong pill, a Chinese polyherbal formula, alleviates testicular damage in mice induced by ionizing radiation. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16:1–7.
 3. Ahmed M. M., Ibrahim Z. S., Alkafafy M., El-Shazly S. A. L-Carnitine protects against testicular dysfunction caused by gamma irradiation in mice. *Acta Histochem.* 2014;116:1046–1055.
 4. Geramizadeh B., Marzban M., Churg A. (2016). Role of immunohistochemistry in the diagnosis of solitary fibrous tumor, a review. *Iran J Pathol.* 11:195–203
 5. Topcu A., Mercantepe F., Rakici S., Tumkaya L., Avni H. An investigation of the effects of N-acetylcysteine on radiotherapy-induced testicular injury in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol;* 2018. doi:10.1007/s00210-018-1581-6.
 6. Aktoz T., Caloglu M., Yurut-Caloglu Vet. Histopathological and biochemical comparisons of the protective effects of amifostine and l-carnitine against radiation-induced acute testicular toxicity in rats. *Andrologia.* 2017;49:1–7.
 7. El-Missiry M. A., Othman A.I., El-Sawy M. R., Lebede M. F. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3 gallate (EGCG) on radiation-induced damage and apoptosis in the rat hippocampus. *Int J Radiat Biol.* 2018;0:1–27.

