

Таблиця 2. АТФ-азна активність мембран еритроцитів щурів при впливі ультразвуку різних інтенсивностей

Показник	Активність АТФ-ази, нмоль Р _i /хв на 1 мг білка (M±m)		
	Контроль; n=10		
Загальна АТФ-аза	49,8±0,7		
Mg ²⁺ -АТФ-аза	37,4±0,5		
Na ⁺ ,K ⁺ -АТФ-аза	12,4±0,3		
	ультразвук, інтенсивність		
	0,1 Вт/см ² ; n=10	0,3 Вт/см ² ; n=9	0,5 Вт/см ² ; n=10
Загальна АТФ-аза	70,4±0,8*	86,5±0,8*	30,8±0,7*
Mg ²⁺ -АТФ-аза	52,6±0,4*	65,6±0,7*	23,6±0,3*
Na ⁺ ,K ⁺ -АТФ-аза	18,2±0,2*	20,1±0,3*	6,9±0,1*

* – достовірна різниця досліджуваних величин відносно групи тварин з вдаванням озвучуванням при p>0,95.

2. Ультразвук впливає на процеси перекисного окиснення ліпідів, а також активність основних антиоксидантних ферментів в залежності від інтенсивності. Застосування ультразвуку з інтенсивністю 0,2 Вт/см² призводить до зниження вмісту МДА в крові дослідних тварин. Активність СОД та каталази при такому впливі не змінюється. Під впливом ультразвуку з інтенсивністю 0,3 Вт/см² та 0,5 Вт/см² не спостерігається достовірних змін досліджених показників. При застосуванні УЗ з інтенсивністю 1,0 Вт/см² відмічається посилення перекисного окиснення ліпідів, що проявляється в підвищенні вмісту МДА та змінах активності СОД і каталази.

3. Ультразвук з інтенсивностями 0,1–0,3 Вт/см² прояв-

ляє біологічну ефективність при відсутності негативних деструктивних змін.

1. Nyborg W.L. // Ultrasound in Med. Biol. – 2001. – Vol. 27. – N 3. – P. 301–333. 2. Misik V., Riesz P. // Ann. NY Acad. Sci. – 2000. – Vol. 899. – P. 335–348. 3. Kondo T., Kodaira T., Kano E. // Free Radical Res. Commun. – 1993. – Vol. 19. – S. 193–200. 4. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д. // Биохимия. – 1984. – Т. 49. – N. 7. – С. 1089–1094. 5. Болдырев А.А. Введение в биомембранологию. Современные методы исследования. – М.: Наука, 1977. – С. 179–180. 6. Porter N.A., Nixon L. // Biochem. Biophys. Acta – 1976. – Vol. 441. – P. 506–512. 7. Дубинина Е.Е., Сальникова Л.А., Ефимова Л.Ф. // Лабораторное дело. – 1983. – N. 10. – С. 30–33. 8. Корольюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Т. // Лабораторное дело. – 1988. – N. 1. – С. 16–18. 9. Lowry Q.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randall R.I. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 193. – P. 265–275.

Надійшла до редколегії 26.03.07

УДК: 591.463.1+612.616.2:612.014.48

Д. Ватліцов, асп., А. Клепко, канд. біол. наук,
К. Андрейченко, студ., С. Андрейченко, д-р біол. наук

КІЛЬКІСНІ ЗАКОНОМІРНОСТІ РОЗВИТКУ КЛІТИННОЇ ЗАГИБЕЛІ В ГАММА-ОПРОМІНЕНИХ СПЕРМАТОЗОЇДАХ ЩУРІВ

Вивчали вплив іонізуючої радіації на рухливість сперматозоїдів, розвиток в них апоптозу та некрозу. Встановлено кількісні закономірності апоптичної та некротичної морталізації сперматозоїдів після опромінення в діапазоні доз 1–100 Гр, а також дозові залежності, що характеризують кількісні зміни в субпопуляціях сперматозоїдів на різних стадіях апоптозу.

The impact of ionizing irradiation on spermatozoa motility as well as apoptosis and necrosis development in male gametes have been studied. The quantitative regulations of apoptic and necrotic mortalization of spermatozoa in the dose range 1–100 Gy were elucidated. Apart from this, dose dependences of quantitative changes in subpopulation of spermatozoa on different stages of apoptosis were found out.

Швидкий розвиток атомної енергетики, безумовно, несе в собі небезпеку непередбаченого опромінення персоналу атомних об'єктів та населення близьких територій іонізуючою радіацією, яскравим прикладом чого є аварія на ЧАЕС. При радіаційному впливі на живий організм репродуктивна система може зазнавати відчутних змін. В цьому зв'язку особливий інтерес викликає вивчення різних етапів розвитку радіаційного синдрому в сперматозоїдах, які відіграють роль клітин, що зберігають та переносять генетичну інформацію при відтворенні потомства [1, 2]. Показано, що іонізуюча радіація викликає пошкодження тканин і, в той же час, сприяє індукції програмованої клітинної загибелі – апоптозу, котрий, відповідно до сучасних уявлень, є основним механізмом, що регулює природне відмирання клітин в тканинах живого організму. Тому будь-яка стимуляція апоптозу обов'язково буде сполучена зі суттєвим зменшенням початкового пулу нормально функціонуючих клітин в загальній популяції [3–5].

Основною метою досліджень було вивчення загальних тенденцій іммобілізації та морталізації сперматозоїдів при дії різних доз іонізуючої радіації, а також визначення кількісних аспектів пострадіаційного перерозподілу сперматозоїдів по різних стадіях програмованої клітинної загибелі.

Матеріали та методи. Дослідження проводились на білих безпородних статевозрілих щурах-самцях масою 250–300 г розведення місцевого віварію. Після декапітації тва-

рин під слабким ефірним наркозом видаляли сім'яні придатки (епідідіміси) та поміщали їх в ізотонічний розчин хлориду натрію. Згодом епідідіміси опромінювали γ-променями ⁶⁰Co на установці "Дослідник" з потужністю дози 1,9 сГр/с в діапазоні доз 1–100 Гр. Залишки тканин епідідімісів відокремлювали шляхом фільтрування за допомогою нейлонового фільтру з діаметром пор 100 мкм.

З метою тестування рухливості сперматозоїдів краплю приготовленої суспензії переносили на предметне скельце термостатованого столика з температурою 37 °C і спостерігали під мікроскопом МБІ-15 на збільшенні х 600.

Кількісне вивчення різних стадій клітинної загибелі в популяції сперматозоїдів проводили на лазерному проточному цитометрі PAS фірми Partec (Германія) при вхідній напрузі лазера 200 мВ та довжині хвилі 488 нм. Для роботи на проточному цитометрі використовували набір "Annexine V apoptosis detection kit I" фірми BD Bioscience (США). Ідентифікацію мічених анексіном V-ФІТЦ (флуоросцеїн ізотіоніонат) та пропідія йодідом (ПІЙ) сперматозоїдів проводили за допомогою зеленого та червоного світлодетекторів, відповідно [6, 7]. Експериментальні дані обробляли за допомогою програми FlowMax (Partec, Германія).

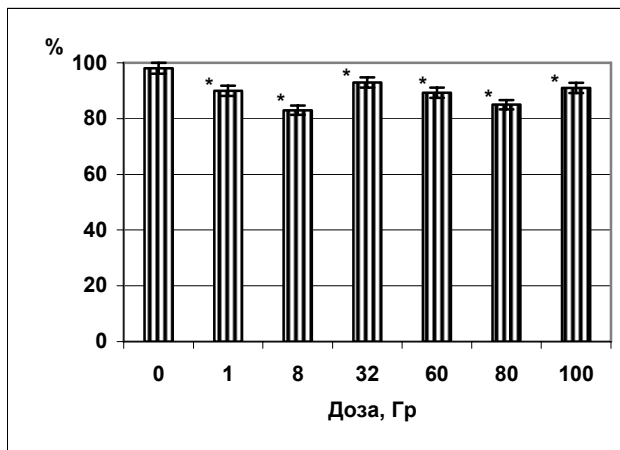
Нормально функціонуючі клітини ідентифікували як анексіні V-ФІТЦ(-)/ПІЙ(-). Клітини, що знаходилися на ранній стадії апоптозу, визначали як анексіні V-ФІТЦ(+)/ПІЙ(-), а клітини на пізній стадії апоптозу чи ті, що загинули в результаті апоптозу визначали як ане-

ксін V-ФІТЦ(+)/ПІЙ(+). Анексін V-ФІТЦ(-)/ПІЙ(+) вважали мертвими клітинами, що загинули в результаті некрозу.

Кількість сперматозоїдів, що загинули в результаті апоптозу, визначали шляхом обчислення різниці між загальним числом нерухомих сперматозоїдів та тих, що загинули в результаті некрозу. Статистичну обробку

експериментальних даних проводили за загальновідомою методикою [8].

Результати досліджень та їх обговорення. При дослідженні іммобілізації сперматозоїдів було встановлено, що в діапазоні доз гамма-опромінення 1-100 Гр рухливість гамет змінювалась хвилюподібно, утворюючи чіткий мінімум при 8 Гр та максимуми при 32 і 100 Гр (рис.).



* – достовірні зміни відносно контролю при $p \leq 0,05$

Рис. Кількісна оцінка рухливості сперматозоїдів після опромінення гамма-радіацією в діапазоні 1–100 Гр

Значна втрата рухливості при дозі 8 Гр поєднувалась з появою мертвих сперматозоїдів, що загинули в результаті розвитку в них як апоптозу, так і некрозу, хоча внесок апоптозу в загибель сперматозоїдів був майже в 2 рази більший, ніж некрозу (табл.).

Зі зростанням дози опромінення спостерігалось поступове вирівнювання вказаної диспропорції, причому при дозі 80 Гр внесок обох компонентів в реалізацію

вказаного феномену стає майже рівним. Однак, вже при дозі 100 Гр знову виявлено відновлення диспропорції. При цьому необхідно звернути увагу, що у вивченому діапазоні доз мертвих сперматозоїдів було виявлено не більше 20% від всієї популяції клітин. Крім мертвих сперматозоїдів були також виявлені клітини на пізній та ранній стадіях апоптозу.

Таблиця. Кількісні характеристики різних субпопуляцій сперматозоїдів в загальній популяції чоловічих гамет в залежності від дози γ -радіації

Доза, Гр	нормально функціонуючі клітини, %	клітини на ранній стадії апоптозу, %	клітини на пізній стадії апоптозу, %	мертві клітини (апоптоз), %	мертві клітини (некроз), %
0	94,16	2,73	1,11	1,21	0,79
1	75,69	10,03	6,55	4,28	3,45
8	69,89	9,66	0,55	13,55	6,35
32	78,62	13,92	5,19	0,65	1,62
60	76,55	7,14	0,98	9,78	5,55
80	76,54	6,01	1,94	9,45	6,06
100	77,91	9,66	6,1	2,94	3,39

Як з'ясувалось, найбільшу кількість сперматозоїдів на пізній стадії апоптозу було виявлено при опроміненні в дозі 8 Гр. В той же час, різке зростання кількості чоловічих гамет на ранній стадії апоптозу мало місце лише при дозі 32 Гр і дорівнювало 13%. При порівнянні з контролем це число зросло майже в 6,5 рази.

Нашими дослідженнями вдалося також показати, що після опромінення епідімісів іонізуючою радіацією в діапазоні доз 1–100 Гр обов'язково залишається не менше 60% клітин, котрі повністю зберігають свою рухливість та притаманні їм життєві функції.

Висновки. Отримані дані сприяють отриманню об'єктивної інформації про дозові закономірності розвитку апоптозу та некрозу в чоловічих гаметах при дії γ -радіації шляхом моделювання процесів радіаційного ураження на сперматозоїдах лабораторних тварин.

1. Pandey K.K., Patchell M.R. Genetic transformation in chicken by the use of irradiated male gametes // Mol. Gen. Genet. – 1982. – N. 3. – P. 295–300.
2. Braham C.F. The production of parthenogenetic mammalian embryos and their use in biological research // Biol. Rev. – 1974. – N 4. – P. 399–422.
3. Ricci G., Perticarari S., Fragonas E. et. al Apoptosis in human sperm: its correlation with semen quality and the presence of leukocytes // Human Reproduction. – 2002. – P. 2665–2672.
4. Barroso G., Taylor S., Morshedi M. et. al Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm subpopulations // Fertility and Sterility. – 2006. – N 1. – P. 149–154.
5. Martin G., Sabido O., Durand Ph., Levy R. Phosphatidylserine externalization in human sperm induced by calcium ionophore A23187: relationship with apoptosis, membrane scrambling and the acrosome reaction // Human Reproduction. – 2005. – N 12. – P. 3459–3468.
6. Annexin V-FITC apoptosis detection kit I // Technical data sheet. – BD Bioscience. – 2002. – 3 p.
7. Apoptosis: Applied Reagents and Technologies // Instruction Manual. – BD Bioscience. – 1998. – 2nd ed. – 99 p.
8. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Вища школа. – 1973. – 320 с.

Надійшла до редколегії 26.03.07