

УДК 616-001.28:504.054: 612.616:591.147+612.018

А. В. Клепко✉, О. А. Мотрина, О. С. Ватліцова, К. С. Андрейченко, С. А. Пчеловська,  
С. В. Андрейченко, Л. В. Горбань

*Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, вул. Мельникова, 53, Київ 04050, Україна*

## **ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ДОВГОТРИВАЛОГО ГАММА-ОПРОМІНЕННЯ МАЛОЇ ПОТУЖНОСТІ НА РОЗВИТОК ЛАБОРАТОРНИХ ЩУРІВ ТА ЇХ СПЕРМОУТВОРЕННЯ**

**Мета:** вивчити вплив довготривалого гамма-опромінення з малою потужністю дози ( $13 \times 10^{-6}$  сГр/с) на розвиток лабораторних щурів, їхніх статевих органів, а також на кількісні показники спермоутворення і кінетичні характеристики сперматозоїдів.

**Матеріали та методи:** досліди проводили на лабораторних білих щурах віком 2,5 місяця. Тварин опромінювали на установці “Еталон” з гамма-полем Co-60 в дозах 0,1–1,0 Гр. У декапітованих тварин вилучали тестикули, епідидиміси та вентральну простату. На лабораторних вагах визначали середню масу тварин та їх статевих органів для кожної експозиційної дози опромінення. Кількість сперматозоїдів в епідидимісах та тестикулах визначали за допомогою фазово-контрастної мікроскопії після проведення гомогенізації тканини в фізіологічному розчині, що містив також Тритон X-100 і  $\text{NaN}_3$ . Кінетичні характеристики сперматозоїдів аналізували за допомогою фотозйомки при температурі 37°C.

**Результати:** встановлено, що довготривале гамма-опромінення не позначається на масі як тіла тварин, так і їхніх епідидимісів. Однак помічено зменшення маси тестикул при дозах 0,1; 0,3; 0,6 та 1,0 Гр, а також збільшення маси простати при дозі 1,0 Гр. У опроміненних тварин зменшувались загальна кількість сперматозоїдів в ячках і денна продукція сперматозоїдів. Відмічено збільшення прямолінійної та криволінійної швидкості сперматозоїдів, а також частоти їх хвостових коливань.

**Висновок:** довготривале тотальне гамма-опромінення малої потужності лише в деякій мірі позначається на розвитку статевих органів лабораторних щурів – тестикулах і простаті, а також проявляється в незначному пригніченні спермоутворення і зростанні кінетичних характеристик сперматозоїдів.

**Ключові слова:** довготривале опромінення, низька потужність, спермоутворення, криволінійна та прямолінійна швидкість, тестикулярний індекс.

*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2015. Вип. 20. С. 500–509.*

✉ Клепко Алла Володимирівна, e-mail: kallav@mail.ru

A. V. Klepko✉, O. A. Motrina, O. S. Vatlitsova, K. S. Andreichenko, S. A. Pchelovska,  
S. V. Andreychenko, L. V. Gorban

State Institution “National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, 53, Melnykov str., Kyiv, 04050, Ukraine

## Impact peculiarities of long-term gamma-irradiation with low-dose rate on the development of laboratory rats and their sperm production

**Objective:** To study the influence of long-term gamma-irradiation with low dose rate ( $13 \times 10^{-6}$  cGy/s) on the body, testes and ventral prostate development of laboratory rats, as well as quantitative parameters of sperm production along with kinetic characteristics of spermatozoa.

**Materials and methods:** The experiments were performed on laboratory white rats of 2.5 months in age. Animals were irradiated in gamma-field of “Ethalon” device in a dose range 0.1–1.0 Gy. Testicles, epididymides, ventral prostate were retrieved from decapitated animal, each organ weight being determined for every exposure dose. Sperm quantities in testicles and epididymides were identified with aid of phase-contrast microscopy after tissue homogenization in saline containing Triton X-100 and  $\text{NaN}_3$ . Kinetic characteristics of spermatozoa were analyzed by video recording at 37°C.

**Results:** The long-term gamma-irradiation with low dose rate was shown to cause no effect on the dynamics of animal weight and weight of epididymides changes. However the testes weight was noticed to diminish at doses 0.1, 0.3, 0.6 and 1.0 Gy, the latter dose being stimulative for the ventral prostate growth and weight accumulation. Total sperm quantities in testicles and epididymides along with daily sperm production declined in gamma-irradiated rats compared to control. However curvilinear and straight line spermatozoid velocity as well as the frequency of tail oscillations tended to increase.

**Conclusions:** Long-term gamma-irradiation of the rat whole body with low dose rate just insignificantly affects the development of testes and ventral prostate. Apart from this, radiation effects showed up in sperm production slight suppression, from the on hand, and sperm velocity along with tail oscillations intensification, from the other hand.

**Key words:** long-term irradiation, low dose rate, sperm production, curvilinear and straight line velocity, testicular index.

*Problems of radiation medicine and radiobiology. 2015;20:500-509.*

### ВСТУП

Багаторічні дослідження дії гострого рентгенівського та гамма-опромінення на різні види тварин встановили значні відмінності в радіочутливості у різних типів чоловічих статевих клітин, котрі за цим показником можуть на один або декілька порядків відрізнятись між собою. Так, В-сперматогонії гинуть після опромінення в дозі 1 Гр, тоді як стовбурові Ас-сперматогонії витримують дози в 10 Гр і дещо більше, а сперматозоїди здатні зберігати рухливість навіть після опромінення у дозах 100–1000 Гр [1–3].

Показано, що важливим чинником, котрий зумовлює реакцію статевих клітин на радіацію та їх виживання, є потужність дози. Зі зменшенням потужності дози радіочутливість сперматогоніїв та мутабільність маркерних локусів їх геному, як виявилось, теж зменшується [4, 5], що має вказувати на суттєву активацію молекулярної і субклітинної репарації, а також на прискорення клітинної репопуляції.

У попередніх роботах [6–8] нами було досліджено дію іонізуючої радіації на спермоутворення у кролів

### INTRODUCTION

In investigations which were held during several last years of acute roentgen- and gamma-irradiation on different strains of animals significant differences in radio sensitivity of different types of man's germ cells were established, and according to this radio-sensitivity these cells may differ one from another by several times. So, В-spermatogonia die after irradiation with dose 1 Gy, but stem Аs-spermatogonia endure doses 10 Gy and more, and spermatozoa can keep motility even after irradiation in doses of 100–1000 Gy [1–3].

It was shown, that important factor, which determines germ cell reaction on radiation and their survival is dose rate. With decrease of dose rate radio sensitivity of spermatogonia and the mutability of marker loci of their genome, as it was found, also drop [4, 5], that may point out on significant activation of molecular and sub-cell repair and on acceleration of cell repopulation too.

At previous works [6–8] we studied influence of ionizing radiation on sperm production in rabbits

та щурів, а також встановлено кінетичні характеристики їхніх сперматозоїдів як при опроміненні гамет, так і після тотального опромінення тварин. У цих дослідях опромінення здійснювалось при потужності дози в 0,2 Гр/с ( $\gamma$ -промені) та 0,28 або 0,58 сГр/с (рентгенівські промені).

### МЕТА

Мета дослідження полягала у вивченні впливу довготривалого гамма-опромінення з малою потужністю дози ( $13 \times 10^{-6}$  сГр/с) на розвиток лабораторних щурів, їхніх статевих органів, а також на кількісні показники спермоутворення та кінетичні характеристики сперматозоїдів.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводили на лабораторних білих щурах. 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. Хронічне опромінення здійснювали гамма-променями  $^{60}\text{Co}$  на установці "Еталон" Інституту ядерних досліджень НАН України цілодобово з потужністю дози 0,72 сГр/доба (0,0008 рад/хв). Для уникнення будь-якого опромінення тварин контрольної групи використовували спеціальний захисний екран зі свинцю.

Експерименти здійснено у відповідності до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Після накопичення дози до 0,1; 0,3; 0,6 та 1 Гр, що відбулось за 14, 42, 84 та 145 діб, відповідно, відбирали по 6 тварин разом з чотирма контрольними щурами, їх зважували, а потім декапітували за допомогою гільйотини під легким ефірним наркозом. З відпрепарованих тварин отримували тестикули, епідидиміси та вентральну простату, котрі згодом зважували і використовували в подальших експериментах. Тестикулярний індекс (ТІ) визначали шляхом поділу середньої ваги тестикули на масу тіла.

Визначення кількості спермів у тестикулах проводили за методикою [9, 10]. Згідно з протоколом, декапсульовані тестикули спочатку подрібнювали, а потім гомогенізували 2 хв на максимальній швидкості лабораторних блендерів у суміші, що складалась з 150 мМ NaCl, 3,8 мМ  $\text{NaN}_3$  та 0,05 % Тритону X-100 (v/v). Тестикулярний гомогенат зберігали при 5°C одну добу. Протягом цього періоду проводили підрахунок голівок сперматид, що залишились у розчині. Доведено, що лише сперматиди 17–19 стадій сперміогенезу, котрі спостерігаються протягом IV–VIII

and rats. In addition, we established kinetic characteristics of their spermatozoa either in direct radiation effect on gametes or after total irradiation of animal body. In that investigations irradiation was made with dose rate 0.2 Gy/sec ( $\gamma$ -rays) and 0.28 or 0.58 cGy/sec (X-rays).

### OBJECTIVE

Research aimed in studying the influence of long-term gamma-irradiation with low dose rate ( $13 \times 10^{-6}$  cGy/s) on the body, testes and ventral prostate, development of laboratory rats, as well as quantitative parameters of sperm production along with kinetic characteristics of spermatozoa.

### MATERIALS AND METHODS

Investigations were made on white laboratory rats. Animals were maintained on artificial light (12 hour day / 12 hour night) on usual food formula, which consisted from dry food and water ad libitum. Chronic irradiation was made by gamma rays of  $^{60}\text{Co}$  through whole day in the dose rate 0.72 cGy/day 0.0008 (rad/min) on device "Etalon" in the Institute for Nuclear Research of Academy of Sciences of Ukraine. To avoid any irradiation of control rats special protective lead shield was used.

Experiments were performed in accordance to European Union convention on protection of vertebral animals which are used for scientific purposes.

After accumulation of doses 0.1, 0.3, 0.6 and 1 Gy, that happend after 14, 42, 84 and 145 days, respectively, animals were taken off in amount 6 animals from every experimental and control group, then weighed and decapitated with the help of guillotine under light ether narcosis. Testis, epididymices and ventral prostate were received from dissected animals and then were used in the consecutive experiments. Testicular index (TI) was calculated through dividing of mean weight of testicula on body weight.

Sperm number in testicules was detected by procedure [9, 10]. According to protocol, decapsulated testicules first were chopped, then homogenized for 2 min. at laboratory blenders on maximal speed in solution mixture containing 150 mMol NaCl, 3.8 mMol  $\text{NaN}_3$  and 0.05% Tryton X-100 (v/v). Testicular homogenate was stored over whole day at 5°C. During this period number of spermatozoid heads which had remained in solution was counted. It was proved that only spermatids of 17–19 spermiogenesis stages, which are

стадій циклу сперматогенного епітелію, здатні протистояти не тільки руйнівній силі турбулентних потоків, що виникають при швидкому обертанні блендерів у водному середовищі, але й солюбілізації мембран Тритоном X-100.

Загальну кількість резистентних до гомогенізації сперматид визначали за допомогою камери Горяєва та фазово-контрастної мікроскопії. Загальну кількість сперматозоїдів у епідидимісі визначали аналогічним чином після його гомогенізації у фізіологічному розчині разом з  $\text{NaN}_3$  та Тритоном X-100.

Денну продукцію сперматозоїдів яєчком підраховували шляхом поділу загальної кількості турбулентнорезистентних спермій у тестикулі на тривалість їх знаходження там, котра дорівнює для щурів 6,1 доби [11]. Аналіз кінетичних характеристик сперматозоїдів здійснювали відповідно до методики [12]. За протоколом, з другого епідидиміса під невеликим тиском витискали каудальні сперматозоїди у поживне водне середовище з температурою  $37^\circ\text{C}$ , котре містило розчин Хему (Sigma) та бікарбонат натрію у кількості 9,8 та 1,2 г/л, відповідно.

Спостереження за рухливими сперматозоїдами здійснювали за допомогою фазово-контрастного мікроскопа "NU" (Карл-Цейсс, Німеччина), оснащеного відеокамерою та термостатованою платформою з температурою у  $37^\circ\text{C}$ . Відеозапис проводили в режимі 50 кадрів/с протягом 2–5 хв при тривалості експозиції кожного обраного поля зору в 10 с. У препараті аналізували не менше 200 сперматозоїдів, для котрих визначали криволінійну швидкість (КШ), прямолінійну швидкість (ПШ) та частоту хвостових коливань (ЧХК).

Статистичну обробку даних проводили за допомогою дисперсійного аналізу "ANOVA" та тесту Стюдента з поправкою Бонфероні [13]. Розбіжності між середніми величинами вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ . Дані представлені у вигляді середніх значень з довірчими інтервалами, що дорівнюють подвійній стандартній похибці ( $\pm \text{SE}$ ).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Проведені дослідження показали, що довготривале гамма-опромінення в дозах 0,1–1 Гр ніяким чином не впливало на зміни маси тіла в період опромінення, оскільки цей показник залишався на контрольному рівні всі 145 днів експерименту (рис. 1). З цього приводу слід зауважити, що й за умов гострого локального опромінення тестикул щурів незначні відмінності у масі тіла між дослідними та контрольними тваринами з'являлись лише при значно більших дозах опромі-

observed during IV–VIII stages of spermatogenic epithelium cycle can resist not only destroying power of turbulent flows which has appeared during fast rotation of blenders in water media, but the solubilization of membranes by Triton X-100 too.

Total number of resistant to homogenization spermatids was detected with the help of Goryayev chamber and phase-contrast microscopy Total number of spermatozoa in epididymis was determined in similar way after homogenization of the latter in saline containing  $\text{NaN}_3$  and Triton X-100.

Daily spermatozoa production by testis was calculated through dividing total number of turbulent-resistant sperms in testicula on the duration of their presence there, which for rats is equal to 6.1 days [11]. Analysis of spermatozoid kinetic characteristics was made according to method [12]. According to protocol, from the second epididymis caudal spermatozoa were pushed into culturing medium by small pressure at  $37^\circ\text{C}$ , which was made up by adding bidistilled water Hem solution (Sigma) and sodium bicarbonate in amounts 9.8 g/L and 1.2 g/L, respectively.

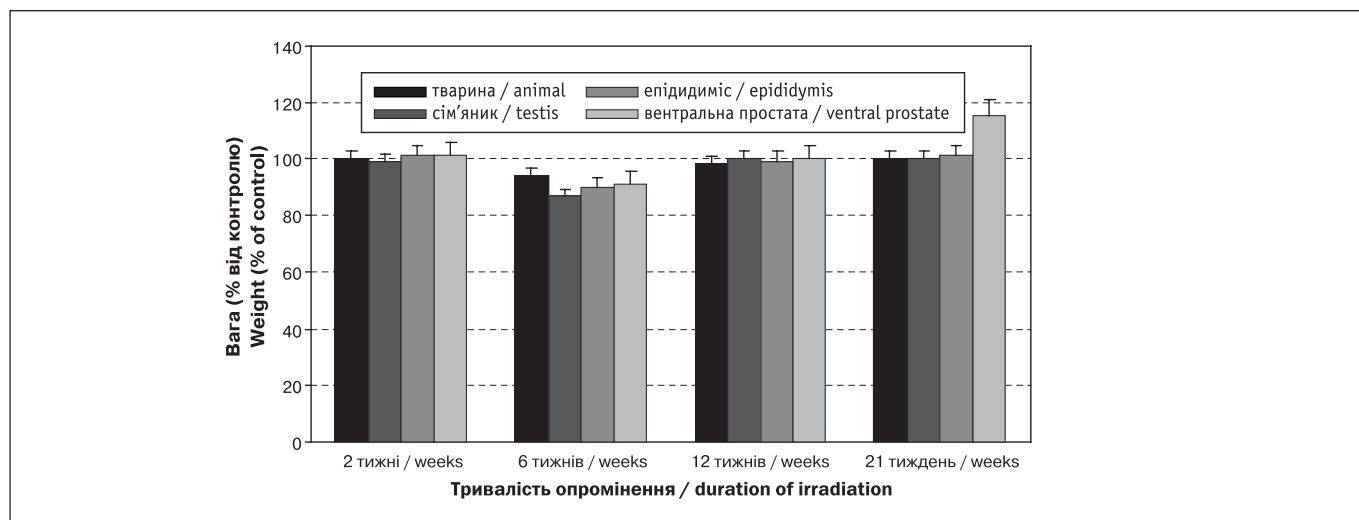
Observations of motile spermatozoa were done by phase-contrast microscope "NU" (Carl-Zeiss, Germany), equipped with video-camera and thermostatic platform maintaining the temperature  $37^\circ\text{C}$ . Video-recording was made in regime 50 cadres/sec during 2–5 min with exposition duration of every chosen field of observation for 10 sec. In preparations not less than 200 spermatozoa were analyzed, to define curvilinear velocity (CLV), straight line velocity (SLV) and frequency of tail oscillations (FTO).

Statistic data processing was held by disperses analysis "ANOVA" and Student's test with Bonferroni correction [13]. Differences between mean values were considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Data are presented as mean values with confidence intervals which are equal to double standard error ( $\pm \text{SE}$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

Our studies showed that long-lasting gamma-irradiation in doses 0.1–1 Gy had no effect on body weight changes in irradiation period, because this parameter remained on control level all 145 days of experiment (Fig. 1). If taking this into account it should be mentioned that even in conditions of acute local irradiation of rat's testicles insignificant differences in body mass between experimental and control animals appeared only in much higher





**Рисунок 1.** Вплив гамма-радіації довготривалої дії з малою потужністю дози на розвиток лабораторних щурів та їх статевих органів

**Figure 1.** Effect of long-term gamma-irradiation with low dose rate on the development of laboratory rats and their sexual organs

нення, зокрема 15–20 Гр [14], тоді як за умов довготривалого тотального опромінення щурів з потужністю дози на порядок вищою (7–12 сГр/доба) ніж та, що використовувалась в наших експериментах (0,72 сГр/доба), розвиток тварин за критерієм маси тіла відбувався в експерименті та контролі однаково [15].

Нами відмічено уповільнення росту тестикул, причому якщо при дозі у 0,1 Гр через 2 тижні експерименту маса тестикул експериментальних тварин відрізнялась від контролю лише на 6 %, то згодом при накопиченні дози у 0,3; 0,6 та 1 Гр ця різниця зросла до 13, 10 та 9 %, відповідно.

Зменшення маси тестикулярної паренхіми є типовим явищем при гострому опроміненні, однак за умов довготривалого опромінення цей показник суттєво залежить від потужності дози. Саме тому в експериментах Еріксона [5] на щурах радіорезистентної породи Sprague-Dawley із застосуванням потужності дози за величиною близької до тієї, що використовувалась у наших експериментах (1 сГр/доба), зміни маси тестикул відбувались майже аналогічним чином, тоді як у дослідях Пінона-Латайладе і співавт. [15] з потужністю дози 7–12 сГр/доба відмінності у масі тестикулярної паренхіми були значно більш вираженими, причому після 70 діб опромінення маса тестикул дослідних тварин була майже в 3 рази меншою, ніж у контролі. Цікаво, що при гострому опроміненні в дозі 9 Гр з потужністю дози в 5 сГр/с маса тестикул у післярадіаційний період поступово зменшилась з 90 % контролю в перший тиждень до 40 % контролю на 26-й тиждень [16].

Довготривале гамма-опромінення, що було застосоване в наших експериментах, ніяким чином не позна-

exposure doses, e.g. 15–20 Gy [14], and animal development was equal in control and experiment according to weight criterion in conditions of long-lasting total irradiation of rats with dose rate about 10 fold higher (7–12 cGy/day) than that one used in our experiments (0.72 cGy/day) [15].

We noticed retardation of testicule growth. At that at a dose 0.1 Gy within 2 weeks of experiment, testicular mass of experimental animals differed from control for 6% only, but after with consequent dose accumulation 0.3, 0.6 and 1 Gy – this differences changed from 13% to 10% and then 9%, respectively.

Lowering of testicular parenchyma mass is typical in acute irradiation, but in conditions of long-term irradiation this parameter significantly depends on dose rate. Due to this in Erickson experiments [5] on rats of radio-resistant strain Sprague-Dawley, where dose rate similar to our experiments was used (1 cGy/day), changes of testicular weight went on the same way, however in investigations of Pinon-Lataillade et al. [15] with dose rate 7–12 cGy/day differences in testicular parenchyma weight were much more pronounced, and after 70 day irradiation testicular weight of experimental animals was three times less than in control. It is interesting that in acute irradiation with dose 9 Gy and dose rate 5 cGy/sec testicular weight subsequently decreased in post-irradiation period reaching 90% of control in a week and 40% of control on 26<sup>th</sup> week [16].

Long-term gamma-irradiation in our experiments had no effect on epididymis weight (Fig. 1).

чилося на масі епідидимісів (див. рис. 1). На відміну від даних [15], отриманих в дослідах з довготривалим опроміненням шурів Sprague-Dawley з потужністю дози 7 та 12 сГр/добу, де помітна різниця у масі епідидимісів між дослідними та контрольними тваринами почала з'являтися вже на 60-ту добу експерименту і досягла максимального значення на 90-ту добу після накопичення дози в 6,3 та 10,8 Гр, відповідно. При цьому перевищення маси епідидимісів у контролі порівняно з дослідом становило 60 % для 6,3 Гр та 105 % для 10,8 Гр. Варто зазначити, що при гострому гамма-опроміненні з потужністю дози 5 сГр/с шурів тієї ж породи спостерігалось перевищення в 2 рази маси епідидимісів у контролі порівняно з дослідними тваринами вже на 17-ту добу пострадіаційного періоду [16].

Одночасно нами помічено деяке зростання маси вентральної простати при опроміненні в дозі 1 Гр. Аналогічно, при гострому опроміненні рентгенівськими променями з потужністю дози 2,4 Гр/хв, або 4 сГр/с, також спостерігалось деяке збільшення маси простати на 24-й тиждень післярадіаційного періоду, а при дозі в 2 Гр маса простати залишалась на рівні контролю. Застосування більш високих доз, навпаки, зумовлювало зменшення ваги простати.

Зменшення ваги тестикул за умов довготривалого гамма-опромінення позначалось на величині тестикулярного індексу, котрий для дослідних тварин порівняно з контролем зменшився приблизно на 8-12 %, оскільки маса їх тіла при всіх експозиційних дозах не відрізнялась від контролю. У дослідних тварин також дещо зменшилась загальна кількість сперматозоїдів як в яєчках, так і в епідидимісах, що проявилось у пригніченні денної продукції сперматозоїдів яєчком. Однак ці відмінності не набули статистично достовірної значущості (табл. 1).

In contrast, in experiments with long-lasting irradiation of Sprague-Dawley rats with dose rate 7 and 12 cGy/day [15] notable difference between weight of epididymises of experimental and control animals began to appear on the 60<sup>th</sup> day of experiment and reached maximum on 90<sup>th</sup> day after accumulation a radiation doses 6.3 Gy and 10.8 Gy, respectively. Furthermore, weight of epididymices in controls exceeded that of experimental ones by 60% for 6.3 Gy and 105% for 10.8 Gy. It is noteworthy that in acute irradiation of rats of the same strain by gamma-rays with dose rate 5 cGy/sec two-fold weight exceed for control epididymices was registered already on the 17<sup>th</sup> day of post-irradiation period [16].

Simultaneously we found slight ventral prostate weight increase of irradiation dose 1 Gy. Similarly, in acute roentgen irradiation with dose rate 2.4 Gy/min., or 4 cGy/sec, some prostate weight extra growth was observed on 24th week of post-irradiation period, though at dose 2 Gy prostate weight remained on the control level. In contrast, use of higher doses led to decrease of prostate weight.

Testicular weight drop during long-term gamma-irradiation influenced value of testicular index, which decreased in experimental animals by 8-12% in comparison to controls, because in the former case body weight did not differ from control at all exposure doses. Total number of spermatozoa in testis of experimental animals also slightly dropped as well as in epididymices that manifested in suppressing daily spermatozoa production by testis. However, these differences did not reach significant level (Table 1).

**Таблиця 1**

**Вплив довготривалого гамма-опромінення з малою потужністю дози на сперматогенез та утворення сперматозоїдів**

**Table 1**

**Effect of long-term gamma-irradiation with low dose rate on spermatogenesis and spermatozoa production**

Параметр / parameter	Група \ group	Тривалість опромінення, тижні / duration of irradiation, weeks			
		2	6	12	21
Тестикулярний індекс, $\times 10^3$ Testicular index, $\times 10^3$	контроль / control	4,03 $\pm$ 0,11	4,19 $\pm$ 0,12	4,31 $\pm$ 0,14	4,02 $\pm$ 0,12
	дослід / experiment	3,72 $\pm$ 0,09	3,74 $\pm$ 0,10	3,78 $\pm$ 0,11	3,64 $\pm$ 0,09
Загальна кількість сперматозоїдів в яєчку, млн Total number of spermatozoa in testis (mln.)	контроль / control	214,4 $\pm$ 20,5	230,2 $\pm$ 19,8	265 $\pm$ 26,8	295,3 $\pm$ 37,4
	дослід / experiment	200,6 $\pm$ 15,4	205,7 $\pm$ 20,2	237,6 $\pm$ 27,5	272,3 $\pm$ 36,7
Денна продукція сперматозоїдів тестикулами, млн Testicular daily production of spermatozoa (mln.)	контроль / control	35,11 $\pm$ 3,4	37,7 $\pm$ 3,2	43,4 $\pm$ 4,4	48,4 $\pm$ 6,1
	дослід / experiment	32,9 $\pm$ 2,5	33,7 $\pm$ 3,3	39,0 $\pm$ 4,5	44,6 $\pm$ 6,0
Кількість сперматозоїдів в епідидимісі, млн Spermatozoa number in epididymis (mln.)	контроль / control	272,6 $\pm$ 24,4	288,7 $\pm$ 32,4	310,1 $\pm$ 28,5	345,8 $\pm$ 34,8
	дослід / experiment	253,7 $\pm$ 19,9	269,1 $\pm$ 25,3	305,8 $\pm$ 29,5	344,2 $\pm$ 37,3

**Таблиця 2**

**Вплив довготривалого гамма-опромінення на кінетичні характеристики епідидимальних сперматозоїдів**

**Table 2**

**Effect of long-time gamma-irradiation with low dose rate on kinetic characteristics of epididymal spermatozoa**

Параметр / parameter	Група \ group	Тривалість опромінення, тижні / duration of irradiation, weeks			
		2	6	12	21
Криволінійна швидкість, мкм/с Curvilinear velocity, $\mu\text{m}/\text{sec}$	контроль / control	487 $\pm$ 18	490 $\pm$ 5	502 $\pm$ 11	500 $\pm$ 152
	дослід / experiment	491 $\pm$ 16	493 $\pm$ 7	501 $\pm$ 8	508 $\pm$ 11
Прямолінійна швидкість, мкм/с Straight line velocity, $\mu\text{m}/\text{sec}$	контроль / control	118 $\pm$ 3	121 $\pm$ 6	125 $\pm$ 3	121 $\pm$ 7
	дослід / experiment	117 $\pm$ 5	127 $\pm$ 8	132 $\pm$ 4	130 $\pm$ 5
Частота хвостових коливань, Гц Frequency of tail oscillations, Hz	контроль / control	26,3 $\pm$ 0,2	28,5 $\pm$ 0,2	27,4 $\pm$ 0,5	28,1 $\pm$ 0,4
	дослід / experiment	27,2 $\pm$ 0,4	29,1 $\pm$ 0,3	31,5 $\pm$ 0,3*	30,2 $\pm$ 0,3*

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

Note. \* – statistically significant differences with control ( $p \leq 0,05$ ).

У таблиці 2 наведені кінетичні характеристики епідидимальних сперматозоїдів. Для досліджених тварин відмічено деяке зростання криволінійної швидкості сперматозоїдів порівняно з контролем при опроміненні в дозах 0,3 та 1 Гр, тоді як для дози в 0,6 Гр цей показник був майже таким, як у контролі, а при 0,1 Гр навіть менше.

Натомість, величина прямолінійної швидкості сперматозоїдів показала поступове зростання порівняно з контролем при збільшенні дози опромінення з 0,3 до 1 Гр. Водночас виявлено, що частота хвостових коливань сперматозоїдів дослідних тварин перевищувала за величиною цей показник у контрольних тварин при всіх експозиційних дозах, а при опроміненні в дозах 0,6 та 1 Гр – на статистично достовірному рівні.

В цьому зв'язку слід відзначити, що гормезисні ефекти спостерігались також при хронічному опроміненні собак протягом 6 років, що відобразилось у прискореній проліферації А-сперматогоніїв [17]. У той же час посилення кінетичної активності сперматозоїдів за таких умов помічено не було [18].

Таким чином, проведені експерименти в умовах довготривалого гамма-опромінення з малою потужністю дози лабораторних щурів виявили відсутність будь-якого ефекту радіації на приріст загальної маси тіла та епідидимісів, хоча дія гамма-опромінення на тестикули мала пригнічуючий характер, а на простату справляла стимулюючий ефект. Крім того, встановлено зростання частоти хвостових коливань сперматозоїдів, тоді як середні значення їх криволінійної та прямолінійної швидкості збільшувались, але не на статистично достовірному рівні. Отримані радіобіологічні факти дозволяють стверджувати, що зменшення потужності дози при опроміненні тварин і чоловічих статевих клітин спричиняє

Kinetic characteristics of epididymal spermatozoa are presented in Table 2. Some elevation of curvilinear velocity was noticed for experimental animals in comparison with control at irradiation doses 0.3 and 1 Gy, but for dose 0.6 Gy this parameter was similar to control, and at 0.1 Gy even a little lower.

In contrast, straight line velocity of spermatozoa showed subsequent surge compared to control while exposure doses elevating from 0.3 Gy to 1 Gy. At the same time it was revealed that frequency of spermatozoa tail oscillations in experimental animals exceeded this value in controls at all exposure doses, and at 0.6 Gy and 1 Gy – on statistically significant level.

In this connection it should be mentioned that hormesis effects were observed also in chronic irradiation of dogs during 6 years that was manifested in elevated proliferation of their A-spermatogonia [17]. At the same time there was no up-regulation of kinetic spermatozoid activity under such conditions [18].

Thus, experiments with long-term irradiation of laboratory rats by gamma-rays with low dose rate revealed absence of any radiation-induced effect on surplus of total body and epididymis mass. However, gamma-irradiation had suppressive effect on testicles, but stimulation effect – on prostate. Besides, an increase of frequency of spermatozoa tail oscillations was found, and mean values of curvilinear and straight line spermatozoid velocity elevated but not significantly. Of course, our data allow postulating that dose rate diminishing at irradiation of animals and human germ cells is directly associated with weakening of opposite reaction – response from

прямо залежне послаблення зворотної реакції – відповіді з боку об'єкта-мішені. Це може вказувати на зменшення радіочутливості та, відповідно, зростання резистентності об'єкта-мішені до зовнішнього опромінення. На можливість існування такого феномену при дії рідкоіонізуючих випромінювань в малих дозах вказують результати досліджень з мікро-арею (micro-array) фібробластів людини, які показали, що малі дози радіації індукують експресію окремих генних кластерів, які відповідають за окислювальне фосфорилування та регуляцію апоптозу [19].

Підсумовуючи вищенаведене, варто також зауважити, що для того, щоб уникнути будь-якої невизначеності у трактовці експериментальних даних, всі дослідження як з гострого, так і довготривалого опромінення при різних потужностях дози слід проводити на одній конкретно обраній лінії лабораторних тварин, оскільки результати останніх років прямим чином вказують на існування суттєвих відмінностей як в радіочутливості, так і реалізації фізіологічних функцій за умов опромінення тварин різних порід та ліній одного виду [20].

## ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що довготривале гамма-опромінення лабораторних білих щурів з малою потужністю дози (0,72 сГр/доба) не викликає помітних змін у масі тіла та епідидимісів, тоді як зменшення середньої маси тестикул разом зі збільшенням середньої маси простати відбувається не на статистично достовірному рівні.
2. Зменшення маси тестикулярної паренхіми при всіх експозиційних дозах (0,1–1 Гр) довготривалого опромінення зумовлює деяке уповільнення загальної продукції сперматозоїдів яєчком, що негативно впливає як на добове спермоутворення, так і на запаси сперматозоїдів у епідидимісах.
3. При довготривалому опроміненні лабораторних щурів з малою потужністю дози спостерігається посилення поступальної рухливості опромінених сперматозоїдів та збільшення швидкості їх пересування у просторі. Помітно зростає частота хвостових коливань сперматозоїдів, котра виявила статистично достовірні розбіжності порівняно з контролем.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Erikson B.H. Effect of  $^{60}\text{Co}$  gamma-radiation on the stem and differentiating spermatogonia of the postpubertal rat / B.H. Erikson // Radiat. Res. – 1976. – Vol. 68. – 433–448.
2. Oakberg E.F. Mammalian gametogenesis and species comparisons in radiation response of the gonads / E.F. Oakberg // Effects of Radiation on

target object. This may suggest a lowering of radiosensitivity and, respectively, a growth of radioresistance of target object for external radiation effect. On possibility of such phenomenon in conditions of irradiation by low-doses of gamma-radiation point out results of investigations with micro-array of human fibroblasts, where it was shown that small radiation doses induce expression of separate gene clusters, which are responsible for oxidative phosphorylation and apoptosis regulation [19].

Summarizing all mentioned above, it is necessary to say that in order to avoid any uncertainty in experimental data explanation, all experiments either with acute, or with long-term irradiation at different dose rates should be performed on one specially chosen strain of laboratory animals, because the results of recent years directly suggest the existence of essential differences either in level of radio-sensitivity, or in degree of physiologic functions realization in conditions of irradiation of animals of different strains and breeds of one species [20].

## CONCLUSIONS

1. Our experiments showed that long-term gamma-irradiation of white laboratory rats with low exposure dose 0.72 cGy/day does not lead to noticeable changes in body and epididymis weight, whereas decrease of testicular mean weight together with growth of mean weight of prostate takes place at not statistically significant level.
2. Drop of testicular parenchyma weight at all exposure doses (0.1–1.0 Gy) of long-term irradiation leads to retardation of total testicular spermatozoa production that negatively influences either daily sperm production, or resources of spermatozoa in epididymis.
3. In conditions of long-term irradiation of laboratory rats with low dose rate, elevation of straight line velocity of irradiated spermatozoa and up-regulation of their movement in space are observed. Moreover, frequency of spermatozoid tail oscillations increases, and statistically significant differences with control were found for this parameter.

## REFERENCES

1. Erikson B.H. Effect of  $^{60}\text{Co}$  gamma-radiation on the stem and differentiating spermatogonia of the postpubertal rat. Radiat Res. 1976;68(3):433-448.
2. Oakberg E.F. Mammalian gametogenesis and species comparisons in radiation response of the gonads. In: Effects of Radiation



- Meiotic Systems. – Vienna : International Atomic Energy Agency, 1968. – P. 3–15.
3. Дослідження впливу гамма-опромінення на рухову функцію сперматозоїдів / І. М. Андрусішина, Н. Є. Нурищенко, Н. В. Мехед [та ін.] // Фізика живого. – 1996. – Т. 4, № 1. – С. 28–36.
  4. Russell W.L. Mutation frequencies in male mice and the estimation of generic hazards of radiation in men / W. L. Russell, E. M. Kelly // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – Vol. 79. – P. 542–544.
  5. 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.
  6. Вплив тотального гамма-опромінення тварин на функціональні характеристики сперматозоїдів / В. М. Пушкаренко, О. С. Петрова, Д. В. Ватліцов [та ін.] // Фізика живого. – 2007. – Т. 15, № 2. – С. 77–83.
  7. Кондратова, Ю.А. Вплив іонізуючої радіації на вміст альфа-токоферолу та карні тину в сім'яній рідині кролів / Ю. А. Кондратова, А. В. Клепко, С. В. Андрейченко // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2012. – Т. 7, № 1. – С. 72–80.
  8. Andreychenko S. Mechanisms of motility loss by spermatozoa under ionizing irradiation / S. Andreychenko, A. Klepko, N. Nurischenko // Proceeding of the International Symposium "Biological Motility: Fundamental and Applied Science". – Pushchino : Foton-Vek, 2012. – P. 17–20.
  9. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey / R. P. Amann, L. Johnson, D. L. Thompson, B. W. Pickett // Biol. Reprod. – 1976. – Vol. 15. – P. 586–592.
  10. Blazak W. F. Application of testicular sperm head counts in the assessment of male reproductive toxicity / W. F. Blazak, K. A. Treinen, P. E. Juniewicz // Methods in Toxicology / eds. R.E. Chapin, J.J. Heindel. – San Diego : Academic Press, 1993. – Vol. 3. – Pt. A. Male Reproductive Toxicology. – P. 86–94.
  11. Lebovitz R. M. Acute, whole-body microwave exposure and testicular function of rats / R. M. Lebovitz, L. Johnson // Bioelectromagnetics. – 1987. – Vol. 8. – P. 37–43.
  12. Makinta M. J. Radiation exposure exerts its adverse effects on sperm maturation through estrogen-induced hypothalamohypophyseal axis inhibition in rats / M. J. Makinta, J. M. Brinders, K. A. Smith // African Zoology. – 2005. – Vol. 40, No 2. – P. 243–251.
  13. Bland M. An introduction to medical statistics / M. Bland. – 3<sup>rd</sup> ed. – Oxford : Oxford Univ. Press, 2007. – 405 p.
  14. Delic J. I. Dose and time relationships in the endocrine response of the irradiated adult rat testis / J. I. Delic, J. H. Hendry, I. D. Morris, S. M. Shalet // J. Androl. – 1986. – Vol. 7, No 1. – P. 32–41.
  15. Influence of germ cells upon Sertoli cells during continuous low-dose rate gamma-irradiation of adult rats / G. Pinon-Lataillade, J. F. Velez de la Calle, M. C. Viguier-Martinez [et al.] // Mol. Cell. Endocrinol. – 1988. – Vol. 58. – P. 51–63.
  16. Effect of an acute exposure of rat testes to gamma rays on germ cells and on Sertoli and Leydig cell functions / G. Pinon-Lataillade, M. C. Viguier-Martinez, A. M. Touzalin [et al.] // Reprod. Nutr. Dev. – 1991. – Vol. 31. – P. 617–629.
  - on Meiotic Systems. Vienna: International Atomic Energy Agency; 1968. p. 3-15.
  3. Andrusishyna IM, Nuryschenko NE, Mehed NV, Andrejchenko SV. [Analysis of gamma-irradiation influence on moving characteristics of spermatozoa]. Physics of alive. 1996;4(1):28-36. Ukrainian.
  4. Russell WL, Kelly EM. Mutation frequencies in male mice and the estimation of generic hazards of radiation in men. Proc Natl Acad Sci USA. 1982 Jan;79(2):542-544.
  5. Erikson BH. Effect of continuous gamma-radiation on the stem and differentiating spermatogonia of the adult rat. Mutat Res. 1978 Oct;52(1):117-128.
  6. Pushkarenko VM, Petrova OS, Vatlitsov DV, Klepko AV, Andrejchenko SV. [Impact of rat total gamma-irradiation on spermatozoa functional characteristics]. Physics of alive. 2007;15(2):77-83. Ukrainian.
  7. Kondratova JuA, Klepko AV, Andrejchenko SV. [Effect of ionizing radiation on the carnitine and alfa-tocopherol content in rabbit seminal plasma]. General physiology and pathophysiology. 2012;7(1):72-80. Ukrainian.
  8. Andreychenko S, Klepko A, Nurischenko N. Mechanisms of motility loss by spermatozoa under ionizing irradiation. In: Proceeding of the International Symposium "Biological Motility: Fundamental and Applied Science". Pushchino: Foton-Vek; 2012. p. 17-20.
  9. Amann RP, Johnson L, Thompson DL, Pickett BW. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. Biol Reprod. 1976 Dec;15(5):586-592.
  10. Blazak WF, Treinen KA, Juniewicz PE. Application of testicular sperm head counts in the assessment of male reproductive toxicity. In: Methods in Toxicology. Vol. 3, Pt. A. RE Chapin, JJ Heindel, editors. Male Reproductive Toxicology. San Diego, California: Academic Press; 1993. p. 86-94.
  11. Lebovitz RM, Johnson L. Acute, whole-body microwave exposure and testicular function of rats. Bioelectromagnetics. 1987;8:37-43.
  12. Makinta MJ, Brinders JM, Smith KM. Radiation exposure exerts its adverse effects on sperm maturation through estrogen-induced hypothalamohypophyseal axis inhibition in rats. Afr Zool. 2005;40(2):243-51.
  13. Bland M. An introduction to medical statistics. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Oxford Univ. Press; 2007. 405 p.
  14. Delic JI, Hendry JH, Morris ID, Shalet SM. Dose and time relationships in the endocrine response of the irradiated adult rat testis. J Androl. 1986 Jan-Feb;7(1):32-41.
  15. Pinon-Lataillade G, Velez de la Calle JF, Viguier-Martinez MC, Garnier DH, Folliot R, Maas J, Jegou B. Influence of germ cells upon Sertoli cells during continuous low-dose rate gamma-irradiation of adult rats. Mol Cell Endocrinol. 1988 Jul;58(1):51-63.
  16. Pinon-Lataillade G, Viguier-Martinez CM, Touzalin AM, Maas J,

17. Кондратенко В. Г. Действие малых доз радиации на сперматогенез / В. Г. Кондратенко, Л. Ф. Ганзенко // Радиобиология. – 1975. – Т. XV, Вып. 6. – С. 861–865.
18. Федорова Н. Л. Оценка функциональной активности семенников собак при хроническом  $\gamma$ -облучении в течении шести лет / Н. Л. Федорова // Радиобиология. – 1976. – Т. XVI, Вып. 5. – С. 727–731.
19. Kalanxhi E. Genome-wide analysis of human fibroblasts in response to gamma radiation and the radiation-induced bystander effect / E. Kalanxhi, J. Dahle // Radiat. Res. – 2012. – Vol. 177. – P. 35–43.
20. Differences in radiation sensitivity of recovery of spermatogenesis between rat strains / M. Abuelhija, C. C. Weng, G. Shetty, M.L. Meistrich // Toxicol. Sci. – 2012. – Vol. 126, No 2. – P. 545–553.
- Jegou B. Effect of an acute exposure of rat testes to gamma rays on germ cells and on Sertoli and Leydig cell functions. Reprod Nutr Dev. 1991;31(6):617-29.
17. Kondratenko VG, Ganzenko LF. [Impact of ionizing radiation low doses on spermatogenesis]. Radiobiology. 1975;XV(6):861-5. Russian.
18. Fjedorova NL. [Analysis of dog testis functional activities at chronic  $\gamma$ -irradiation during six years]. Radiobiology. 1976;XVI(5):727-31. Russian.
19. Kalanxhi E, Dahle J. Genome-wide analysis of human fibroblasts in response to gamma radiation and the radiation-induced bystander. Radiat Res. 2012 Jan;177(1):35-43.
20. Abuelhija M, Weng CC, Shetty G, Meistrich ML. Differences in radiation sensitivity of recovery of spermatogenesis between rat strains. Toxicol Sci. 2012 Apr;126(2):545-53.

*Стаття надійшла до редакції 27.08.2015*

*Received: 27.08.2015*