

## Морфологическая характеристика сперматогенеза у крыс после прицельного облучения разными дозами электронов

Г.А. Демяшкин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФGAOY BO Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, Россия

*Введение.* Одной из современных проблем человечества является развитие мужского бесплодия. По последним оценкам, от данного заболевания страдают 186 миллионов человек в мире, а его распространенность увеличивается по мере взросления. Данные литературы по влиянию лучевой терапии на мужскую репродуктивную систему неоднозначны. За последнее десятилетие научно-технический прогресс определенно ускорил развитие методов лучевой терапии, и в связи с появлением новых аппаратов возникает необходимость тщательного подбора новых режимов дозирования. Цель исследования – морфологическая оценка сперматогенеза после прицельного облучения разными дозами электронов (экспериментальное исследование).

*Материалы и методы.* Крыс породы Вистар (n=70) однократно подвергали прицельному ионизирующему облучению на импульсном ускорителе электронов NOVAC 11 дозами 2 Гр, 4 Гр, 6 Гр, 8 Гр, 10 Гр и 12 Гр и через неделю оценивали сперматогенез при помощи метода световой микроскопии.

*Результаты.* В образцах крыс опытных групп выявили уменьшение количества половых клеток, признаки дегенеративных изменений и лизиса сперматид и сперматозоидов, а также появление интенсивных пикнотичных ядер у первичных сперматоцитов, резкое снижение количества сперматогоний, клеток Сертоли и Лейдига без изменения их структуры. Наиболее глубокое поражение канальцев, вплоть до аплазии сперматогенного эпителия и обширной вакуолизации, наблюдали в группах облучения 8–12 Гр.

*Заключение.* В семенниках прослеживаются дозозависимые прогрессирующие патоморфологические изменения гистоархитектоники, уменьшение количества сперматогоний и других половых клеток уже на 7-е сутки после облучения импульсным ускорителем электронов NOVAC 11.

**Ключевые слова:** облучение электронами, мужское бесплодие, сперматогенез, семенные шары

**Для корреспонденции:** Григорий Александрович Демяшкин. E-mail: dr.dga@mail.ru

**Для цитирования:** Демяшкин Г.А. Морфологическая характеристика сперматогенеза у крыс после прицельного облучения разными дозами электронов. Клини. эксп. морфология. 2021;10(2):40–49. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.40-49.

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках государственного бюджетного финансирования.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 30.11.2020. Получена после рецензирования 26.01.2021. Принята в печать 11.02.2021.

## Morphological features of spermatogenesis in rats after targeted irradiation with electrons of variable doses

G.A. Demyashkin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

<sup>2</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University), Moscow, Russia

*Introduction.* Today, a primary concern of humanity is male infertility. Recent figures suggest that the disease affects 186 million people worldwide, and its prevalence increases as men get older. In literature the radiation therapy effect on the male reproductive system is debated. Over the past decade, scientific and technological progress has definitely accelerated the development of the radiation therapy methods, and as new devices have emerged, there is a need to carefully select new dosing regimens. The aim of the experimental study was to evaluate morphological spermatogenesis indicators after targeted irradiation with electrons of variable doses.

*Materials and methods.* Wistar rats (n=70) were once subjected to targeted ionizing irradiation on a pulsed electron accelerator NOVAC 11 with doses of 2 Gy, 4 Gy, 6 Gy, 8 Gy, 10 Gy, and 12 Gy, and a week later spermatogenesis was assessed with light microscopy.

*Results.* In the experimental groups, we revealed a decrease in the number of germ cells; signs of degenerative changes and lysis of spermatids and spermatozoa; the appearance of intense pyknotic nuclei in primary spermatocytes; and a sharp decrease in the number of spermatogonia and Sertoli and Leydig cells without change in their structure. In the irradiation groups of 8–12 Gy, there was the deepest damage to the tubules, up to spermatogenic epithelium aplasia, and extensive vacuolization.

*Conclusion.* In the testes, we observed dose-dependent progressive pathological changes in tissue structure as well as a decrease in the number of spermatogonia and other germ cells on day 7 after irradiation with a pulsed electron accelerator NOVAC 11.

**Keywords:** electron irradiation, male infertility, spermatogenesis, seminal globs

**Corresponding author:** Grigory A. Demyashkin. E-mail: dr.dga@mail.ru

**For citation:** Demyashkin G.A. Morphological features of spermatogenesis in rats after targeted irradiation with electrons of variable doses. *Clin. exp. morphology.* 2021;10(2):40–49. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.40-49 (In Russ.).

**Funding.** The study was carried out within the framework of state budget funding.

**Conflict of interest.** The author declares no conflict of interest.

**Received** 30.11.2020. **Received in revised form** 26.01.2021. **Accepted** 11.02.2021.

Одна из современных проблем человечества – развитие мужского бесплодия. По последним оценкам, от данного заболевания страдают 186 миллионов человек в мире, а его распространенность увеличивается по мере взросления [1, 2]. Кроме того, мужское бесплодие является причиной более чем половины всех случаев бездетности в мире [3]. Полиэтиологичность этой нозологии, сложность патогенеза, а также функциональное взаимодействие яичка с другими регуляторными внутриорганными системами создают большие трудности в разработке адекватных методов лечения [4].

Среди факторов риска мужского бесплодия особое внимание следует уделить радиоактивному воздействию. Люди, находящиеся в зонах радионуклидного загрязнения вблизи объектов атомной промышленности или переживающие последствия прошлых техногенных катастроф, могут подвергаться внешнему облучению в разных дозах.

В клинической практике с успехом применяются методы лучевой терапии при лечении злокачественных новообразований. Злокачественное поражение органов репродуктивной системы занимает лидирующие позиции в структуре онкологической смертности. На рак яичек приходится 1% злокачественных новообразований (ЗНО) у мужчин. Однако, несмотря на небольшой процент, в 2018 году было зарегистрировано 9310 новых случаев, из-за чего рак яичек остается самой распространенной солидной опухолью у мужчин в возрасте 20–34 лет [5].

Возвращаясь к упоминавшейся ранее лучевой терапии, следует сказать, что она в последние годы получила наиболее широкое распространение среди способов лечения ЗНО яичек. Ее применение возможно как внешне (дистанционная лучевая терапия), так и внутренне (брахитерапия).

В дистанционной лучевой терапии применяются следующие установки: кобальтовые аппараты, подводящие гамма-излучение высокой энергии, линейные ускорители электронов, производящие как высокоэнер-

гетическое тормозное излучение, так и прямое облучение электронами, а также установки с более редким излучением, таким как ионное, протонное и нейтронное [6]. Преимуществом прицельной радиотерапии является минимизация риска повреждения соседних органов при использовании максимально возможной облучающей дозы. Поскольку показатели эффективности лучевой терапии высоки, для пациентов обычно ожидается благоприятный прогноз и увеличение продолжительности жизни.

Тем не менее с внедрением новых диагностических и лечебных методов рентгенологии и радиологии встает вопрос об их безопасности. Применение лучевой терапии влечет за собой негативные последствия для организма человека [7], поэтому подбор оптимальных доз излучения, их своевременная корректировка и нивелирование токсичности данной терапии – ключевые моменты, которые влияют на оптимизацию лечения и становятся все более важными задачами современной онкологии.

Данные литературы по влиянию лучевой терапии на мужскую репродуктивную систему неоднозначны. С одной стороны, лучевая терапия (ЛТ) доказанно влечет за собой риск возникновения бесплодия [8]. С другой стороны, известно, что сперматогонии типа А иногда выживают после ЛТ, что позволяет в конечном счете наблюдать восстановление сперматогенеза [9].

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

Несмотря на многочисленные теории и предположения по данным вопросам, все существующие экспериментальные модели нуждаются в усовершенствовании. За последнее десятилетие научно-технический прогресс определенно ускорил развитие методов лучевой тера-

пии, и в связи с появлением новых аппаратов возникает необходимость тщательного подбора новых режимов дозирования, а значит, моделирование нарушений сперматогенеза у лабораторных животных с использованием минимальных доз радиации является ключевой задачей для подробного изучения данной проблемы.

Цель исследования – морфологическая оценка сперматогенеза после прицельного облучения разными дозами электронов (экспериментальное исследование).

### Материалы и методы

Экспериментальное исследование проводили на базе Медицинского радиологического научного центра имени А.Ф. Цыба.

Животные для исследования *in vivo*. Самцов крыс Вистар (масса  $220 \pm 20$  граммов; возраст 9–10 недель;  $n=70$ ) содержали в виварии при контролируемой температуре ( $+22^\circ\text{C}$ ) и световом периоде (12L:12D) со свободным доступом к воде и стандартному корму. Крысы случайным образом были разделены на контрольную (I;  $n=10$ ) и опытные (II–VII;  $n=10$  в каждой) группы в зависимости от дозы однократного прицельного облучения электронами тазового сегмента в проекции семенников: II – 2 Гр, III – 4 Гр, IV – 6 Гр, V – 8 Гр, VI – 10 Гр и VII – 12 Гр.

Все манипуляции осуществляли 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), Руководствам по проведению медико-биологических исследований по уходу и использованию лабораторных животных (ILAR, DELS), Правилам лабораторной практики и приказу Минздрава России № 199н от 01.04.2016 «Об утверждении правил лабораторной практики». Исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 043 от 11.08.2020 г.

Облучение проводили в отделе радиационной биофизики МРНЦ им. А.Ф. Цыба на импульсном ускорителе электронов NOVAC 11 (Sordina IORT Technologies, Италия). Данная установка позволяет получить пучок электронов с энергией 4, 6, 8, 10 МэВ; пучок возможно отколмировать до  $\varnothing 30\text{--}100$  мм с шагом по 10 мм; частоту бенчей в пучке можно регулировать от 1 до 24 Гц с шагом по 1 Гц. Исходя из представленных требований, для облучения были выбраны энергия 10 МэВ и частота 9 Гц, размер поля –  $\varnothing 100$  мм. Согласно проведенным дозиметрическим исследованиям, пучок электронов с такой энергией проникает на глубину не более 50 мм в водно-эквивалентном материале (рис. 1 А). Данный выбор позволяет гарантированно провести облучение зоны интереса требуемой дозой, а поле  $\varnothing 100$  мм дает возможность уменьшить паразитную дозу на соседние ткани.

Перед облучением крысам опытных групп однократно вводили кетамин (50 мг/кг, внутримышечно) и ксилазин (5 мг/кг, внутривентриально). Крыс под анестезией помещали на предметный стол по одной, в положении лежа на спине, с расставленными в стороны лапами, чтобы в зону облучения попадали семенники, а легкие и сердце оставались в зоне радиационной тени (рис. 1 В). Тубус подводили к облучаемой области таким образом, чтобы его срез находился не выше 2 мм от кожи, а сам тубус был перпендикулярен ее плоскости.

Животных всех групп (I–VII) через 7 дней выводили из эксперимента путем введения высоких доз анестетика. После плановой эвтаназии у крыс были изъяты семенники согласно дизайну эксперимента.

**Морфологический блок.** После извлечения оценивали внешний вид семенников и состояние паренхимы на разрезе (кровенаполнение, воспалительные изменения, атрофия и т.д.), взвешивали (масса в граммах и отношение массы семенников к массе тела) и измеряли. Затем семенники нарезали параллельно сагиттальной плоскости через каждые 2 мм, фиксировали в растворе Буэна, после проводки (аппарат гистологической проводки тканей, Leica Biosystems, Германия) заливали

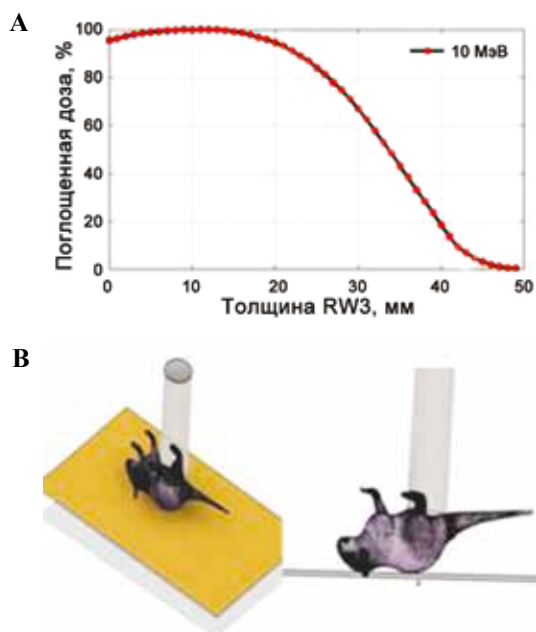


Рис. 1. Методика облучения крыс.

А – изменение поглощенной дозы по глубине водно-эквивалентного материала при облучении электронами с энергией 10 МэВ на ускорителе NOVAC 11, В – модель расположения крысы при облучении на ускорителе электронов NOVAC 11

Fig. 1. Irradiation technique in a rat model.

А – change in the absorbed dose by the depth of water-equivalent material when irradiated by electrons with an energy of 10 MeV at the NOVAC 11 accelerator, В – model of the rat location when irradiated at the NOVAC 11 electron accelerator

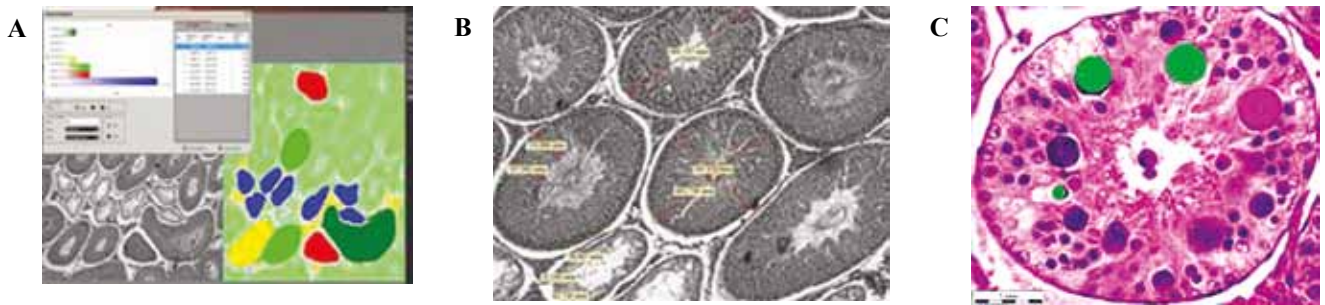


Рис. 2. Морфометрические данные семенников с использованием программного обеспечения для обработки и анализа изображений Leica Application Suite (LAS).

А, В – сравнительные измерения семенных канальцев, С – измерение семенных шаров.

Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 100$

Fig. 2. Morphometric data of testes using Leica Application Suite (LAS) image processing and analysis software.

А, В – comparative measurements of seminal tubules, С – measurement of seminal globules, H&E stain,  $\times 100$

в парафиновые блоки, из которых готовили серийные срезы (толщина 2 мкм), депарафинировали, дегидратировали и окрашивали гематоксилином и эозином для гистологического исследования.

Морфологический и морфометрический анализ проводили в 10 случайно выбранных полях зрения микроскопа при  $\times 100$  и  $\times 400$  в четырех случайных срезах с каждого образца, перемещая предметные стекла с равными интервалами вдоль осей X и Y, с использованием полуавтоматического анализатора изображения. Цифровые изображения гистологических срезов для морфометрических исследований получали с помощью системы видеомикроскопии (микроскоп Leica DM3000, Германия; камера DFC450 C; компьютер Platrun LG), а морфометрические данные – с использованием программного обеспечения для обработки и анализа изображений Leica Application Suite (LAS) Version 4.9.0 (рис. 2 А–С). В каждом из полей рассчитывали следующие параметры: площадь и диаметр извитых семенных канальцев, высота сперматогенного эпителия (калибровочной решеткой и линейным измерительным зондом), подсчет клеток сперматогенного эпителия в одном извитом семенном канальце, клеток Сертоли и Лейдига.

Сперматогенный цикл крыс, включающий в себя 14 последовательных стадий и характеризующийся определенным количеством половых клеток в сочетании с фазой развития сперматид, оценивали по методике Клермонта с соавторами [10]. При этом гаметы идентифицировали по месту расположения в той или иной клеточной ассоциации и хорошо изученным цитологическим параметрам ядер (диаметр, характер распределения хроматина и хромосом).

Оценку сперматогенного эпителия проводили с использованием критериев С. Джонсона [11]: 10 баллов – физиологический сперматогенез; 9 – дезорганизация сперматогенного эпителия, много поздних сперматид; 8 – сперматозоидов в семенном канальце  $\leq 5$ , единичные поздние сперматиды; 7 – сперматозоиды и поздние сперматиды отсутствуют, много ранних сперматид;

6 – сперматозоиды и поздние сперматиды отсутствуют, единичные ранние сперматиды; 5 – сперматозоиды и сперматиды отсутствуют, много сперматоцитов; 4 – сперматозоиды и сперматиды отсутствуют, единичные сперматоциты; 3 – только сперматогонии; 2 – отсутствие половых клеток, только клетки Сертоли; 1 балл – отсутствие элементов сперматогенного эпителия (тубулярная атрофия/аплазия).

**Статистический анализ.** Полученные данные обрабатывали при помощи компьютерной программы SPSS 12.0 (IBM Analytics, США). Все данные представлены как  $M \pm m$ . Гипотезу нормальности распределения значений в выборках проверяли при помощи теста Колмогорова–Смирнова, после чего использовали t-тест Стьюдента для малых выборок, непараметрический U критерий Манна–Уитни и точный критерий Фишера. Различия между выборками считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## Результаты

Масса тела животных всех экспериментальных групп уменьшилась в среднем на 25% по сравнению с массой крыс контрольной группы.

Масса и объем семенников значительно уменьшились во всех группах, в 2,0 раза и более, после облучения электронами по сравнению с контрольной, что составляет в среднем 0,4% потери от общей массы тела ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

После облучения электронами во всех опытных группах (II–VII) обнаружили снижение площади семенных канальцев, их диаметра, а также высоты сперматогенного эпителия по сравнению с образцами нормальных семенников (табл. 2). Большинство семенных канальцев соответствовало преимущественно III, а также II и IV типам сперматогенного цикла.

При световой микроскопии срезов семенников крыс контрольной группы наблюдали нормальную гистологическую архитектуру с физиологическим сперматогенезом; оценка по С. Джонсону –  $10 \pm 0,82$  балла (табл. 2, 3, рис. 3).

Таблица 1 | Table 1

**Масса и объем семенников  
при разных дозах облучения,  $p < 0,05$  |  
The weight and volume of testes at different  
exposure doses,  $p < 0,05$**

Группы   Groups	Вес семенников, г   Testes weight, g	Объем семенников   Testes volume
Контроль   Control	1,5±0,1	1397,5±140,3
2 Гр   2 Gy	0,8±0,05	688,3±74,2
4 Гр   4 Gy	0,75±0,06	598,7±87,5
6 Гр   6 Gy	0,68±0,09	530,5±68,3
8 Гр   8 Gy	0,55±0,05	463,0±43,1
10 Гр   10 Gy	0,48±0,05	456,5±47,4
12 Гр   12 Gy	0,44±0,08	449,0±46,2

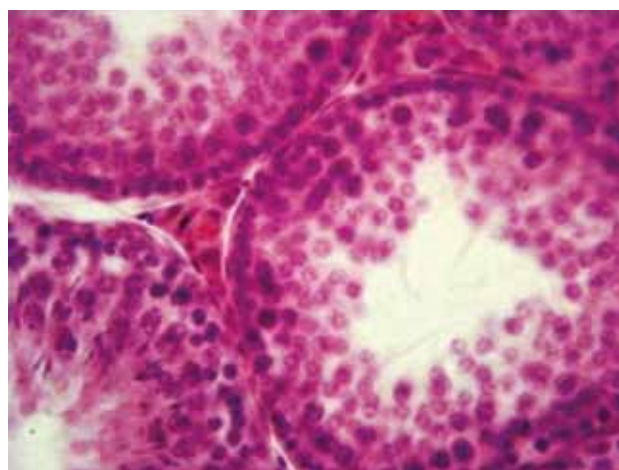


Рис. 3. Семенник крысы контрольной группы.

Окраска гематоксилином и эозином, ×400

Fig. 3. The rat testes in the control group. H&amp;E stain, ×400

Таблица 2 | Table 2

**Морфометрические данные семенных канальцев после облучения электронами,  $p < 0,05$  |  
Morphometric data of seminal tubules after electron irradiation,  $p < 0,05$**

Доза облучения, Гр   Radiation dose, Gy	Площадь семенных канальцев, мкм <sup>2</sup>   Area of seminiferous tubules, μm <sup>2</sup>	Диаметр семенных канальцев, мкм   Diameter of the seminiferous tubules, μm	Высота сперматогенного эпителия, мкм   Height of spermatogenic epithelium, μm
Контроль   Control	224151,32±44,3	344,4±34,4	110,9±13,05
2	173252,09±11,07	310,57±5,1	68,2±12,67
4	96743,16±6,4	293,08±33,2	63,1±61,7
6	50844,94±6,1	243,85±28,5	44,3±57,3
8	43783,46±7,1	228,19±35,4	39,4±15,9
10	37423,12±7,1	219,74±35,4	33,5±61,7
12	32396,19±7,1	207,34±35,4	27,9±61,7

В семенниках крыс опытных групп выявили уменьшение количества половых клеток, признаки дегенеративных изменений и лизиса сперматид и сперматозоидов, а также появление пикнотических ядер у первичных сперматоцитов; резкое снижение количества сперматогоний, клеток Сертоли и Лейдига без изменения их структуры (табл. 3). Сперматогенный эпителий сморщен, в межканальцевом пространстве интерстициальный отек и стаз в просветах кровеносных сосудов, лимфатические сосуды расширенные. Наиболее глубокое поражение канальцев, вплоть до аплазии сперматогенного эпителия и обширной вакуолизации, наблюдали в группах облучения 8–12 Гр. Прогрессировали деструкция и сморщивание канальцев, аплазия эпителия и его вакуолизация (табл. 2, рис. 5).

В образцах группы облучения дозой 2 Гр на долю поврежденных семенных канальцев (площадь 28079,84 мкм<sup>2</sup>, диаметр 189,083 мкм;  $p < 0,05$ ) с дезор-

Таблица 3 | Table 3

**Оценка сперматогенеза по С. Джонсону, при  $p < 0,05$  |  
Assessment of spermatogenesis according to the Johnsen  
system,  $p < 0,05$**

Доза облучения, Гр   Radiation dose, Gy	Доля канальцев с аплазией   Proportion of tubules with aplasia	Оценка канальцев по С. Джонсону, баллы   Johnsen, score
Контроль   Control	0	10,0±0,8
2	1/8	8,0±0,4
4	1/6	7,0±0,4
6	1/4	5,5±0,4
8	1/3	5,0±0,1
10	1/2	4,0±1,1
12	2/3	3,0±1,1

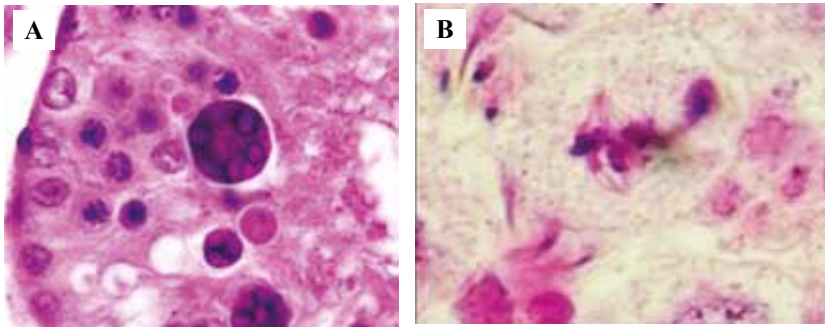


Рис. 4. Семенной каналец при облучении 10 Гр: А – семенные шары (площадь 6,43 мкм<sup>2</sup>, диаметр 2,4 мкм;  $p < 0,05$ ); В – митоз в первичном сперматоците. Окраска гематоксилином и эозином  $\times 100$

Fig. 4. Seminal tubule under 10-Gy irradiation: A – seminal balls on the left (area 6.43 mm<sup>2</sup>, diameter 2.4 mm;  $p < 0.05$ ); B – mitosis within primary spermatocyte. H&E stain,  $\times 100$

ганизацией эпителия и потерей полярности клеток приходилось до 1/8 части семенника (1–2 поперечных среза канальцев в поле зрения); средний балл по С. Джонсону –  $8,0 \pm 0,4$  при  $p < 0,05$  (табл. 3).

В микропрепаратах семенников группы облучения дозой 4 Гр дегенерации подверглась почти 1/6 всех семенных канальцев (3–4 поперечных среза в поле зрения), появились вакуолизованные первичные сперматоциты. Количество сперматид снижено, сперматозоиды отсутствуют; средний балл по С. Джонсону –  $7,00 \pm 0,4$  при  $p < 0,05$  (табл. 3).

В образцах семенников группы 6 Гр просвет канальцев расширен и заполнен клеточным детритом (дегенерированные половые клетки), четкие границы между клетками сперматогенного эпителия потеряны. Подобные изменения наблюдались в 1/4 части всех канальцев (5–7 поперечных срезов в поле зрения). Тем не менее количество сперматоцитов, а также клеток Сертоли и Лейдига снижено незначительно по сравнению с предыдущими опытными образцами (табл. 4); средний балл по С. Джонсону –  $5,5 \pm 0,4$  при  $p < 0,05$  (табл. 3).

В группе облучения 8 Гр в 1/3 семенных канальцев наблюдали появление высокодегенерированных сперматид и сперматоцитов, объединенных в семенные шары (площадь  $0,7 \text{ мкм}^2$ , диаметр  $0,9 \text{ мкм}$ ;  $p < 0,05$ ) – крупные структуры с множественными

пикнотичными ядрами и интенсивно окрашенной оксифильной цитоплазмой (7–8 поврежденных канальцев в поле зрения). Площадь единичных первичных сперматоцитов составила  $0,8 \text{ мкм}^2$  при  $p < 0,05$ , а диаметр  $0,9 \text{ мкм}$  при  $p < 0,05$ , что в 1,1 раза больше, чем в норме. Средний балл по С. Джонсону –  $5,00 \pm 0,1$  при  $p < 0,05$  (табл. 3).

При 10 Гр вакуолизованные сперматоциты с опустошенной цитоплазмой обнаружены почти в половине семенных канальцев. В большинстве половых клеток наблюдали пузырчатость ядерной мембраны, кариопикноз и гетерохромазию ядер. При этом часть первичных сперматоцитов утратила связь с клетками Сертоли и находилась в просвете канальца в виде детрита. Кроме того, количество клеток Сертоли и Лейдига снижено, их цитоплазма бледная, отечная, с пикнотическими ядрами. Средний балл по С. Джонсону –  $4,00 \pm 1,1$  при  $p < 0,05$  (табл. 3). Семенные шары были крупнее в сравнении с группой облучения 8 Гр (площадь  $1,0 \text{ мкм}^2$ , диаметр  $1,1 \text{ мкм}$ ), наблюдали также патологические митозы (рис. 4).

Самые крупные вакуоли сперматоцитов обнаружили в семенных канальцах группы облучения дозой 12 Гр (площадь сперматоцитов достигала  $3,71 \text{ мкм}^2$  при  $p < 0,05$ ). Количество семенных шаров возросло вдвое, их размер варьировал от  $0,859 \text{ мкм}^2$  до  $8 \text{ мкм}^2$ ,

Таблица 4 | Table 4

Количество половых клеток в семенных канальцах при облучении разными дозами электронов, при  $p < 0,05$  |  
The number of germ cells in the seminal tubules under electron irradiation at different doses,  $p < 0.05$

Доза облучения, Гр   Radiation dose, Gy	Сперматогонии (А и В)   Spermatogonia (A and B)	Сперматоциты   Spermatocytes	Сперматиды   Spermatids	Клетки Сертоли   Sertoli cells	Клетки Лейдига   Leydig cells
Контроль   Control	$117,0 \pm 0,31$	$110,0 \pm 0,11$	$163,0 \pm 0,13$	$12,0 \pm 0,2$	$8,0 \pm 0,06$
2	$42,0 \pm 0,11$	$105,0 \pm 0,1$	$150,0 \pm 0,2$	$10,0 \pm 0,5$	$7,0 \pm 0,07$
4	$40,0 \pm 0,2$	$90,0 \pm 0,1$	$124,0 \pm 0,11$	$9,0 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,2$
6	$38,0 \pm 0,2$	$78,0 \pm 0,3$	–	$9,0 \pm 0,11$	$6,0 \pm 0,22$
8	$25,0 \pm 0,13$	$68,0 \pm 0,2$	–	$9,0 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,07$
10	$18,0 \pm 0,1$	$55,0 \pm 0,13$	–	$8,0 \pm 0,1$	$5,0 \pm 0,2$
12	$14,0 \pm 0,13$	$43,0 \pm 0,13$	–	$8,0 \pm 0,5$	$5,0 \pm 0,07$

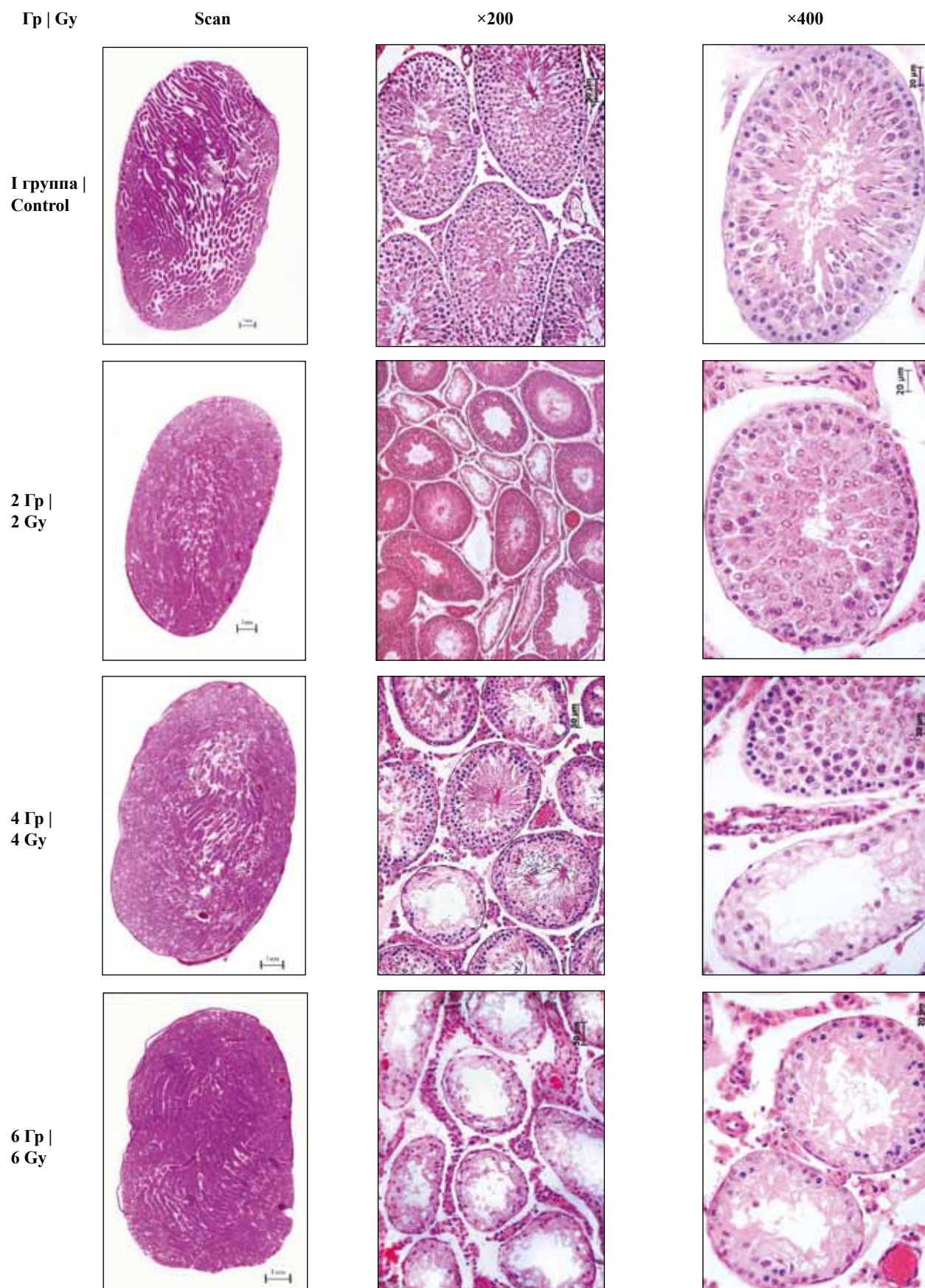


Рис. 5. Семенники крыс экспериментальных групп при разных дозах облучения. Окраска гематоксилином и эозином  
 Fig. 5. Rat testes in experimental groups at variable radiation doses. H&E stain

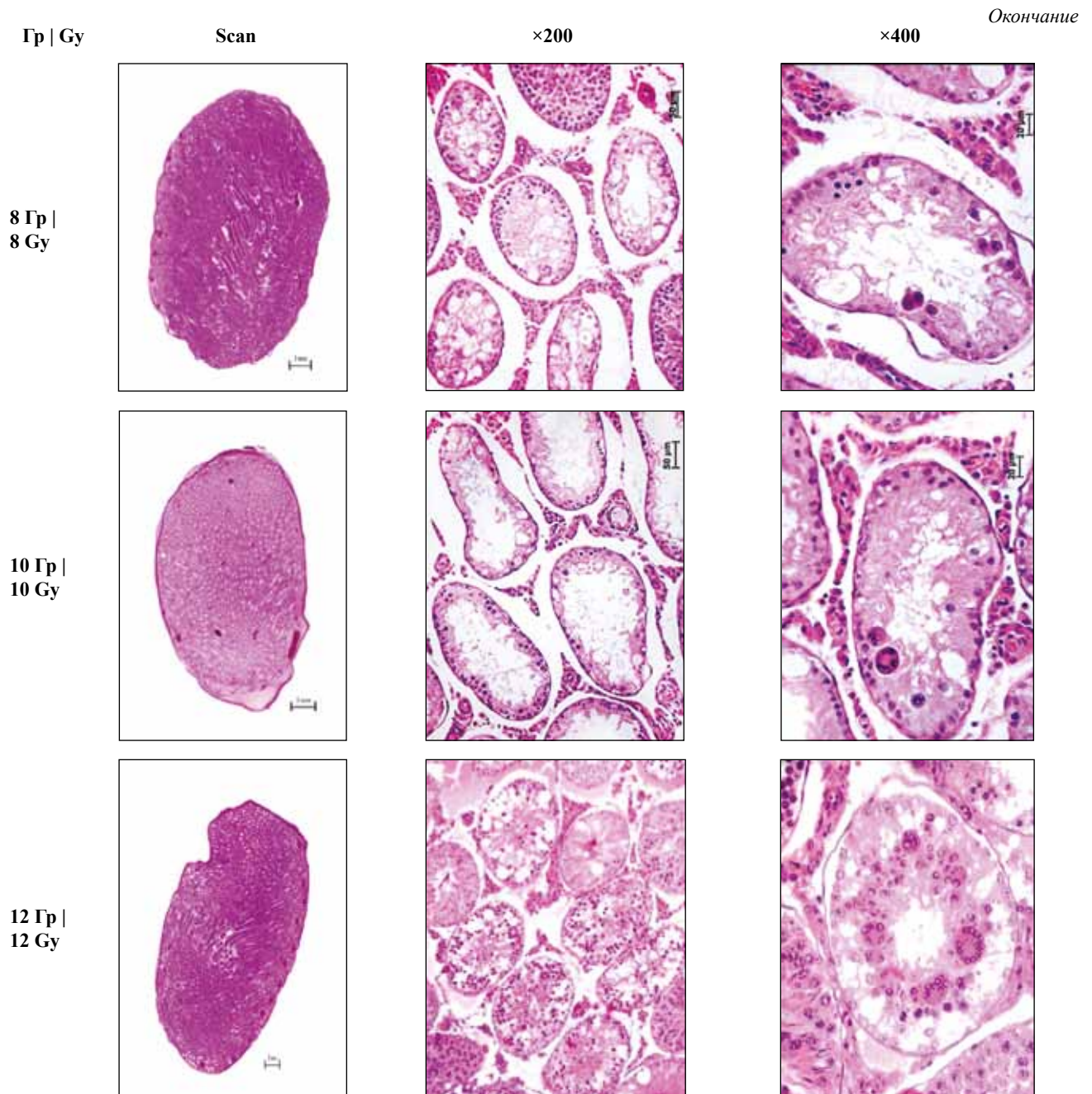


Рис. 5. Семенники крыс экспериментальных групп при разных дозах облучения. Окраска гематоксилином и эозином  
Fig. 5. Rat testes in experimental groups at variable radiation doses. H&E stain

что в 5,0–10,0 раза больше, чем площадь первичного сперматоцита. Размеры аплазированных семенных канальцев существенно меньше (площадь 14123,72 мкм<sup>2</sup>, диаметр 76,142 мкм; высота сперматогенного эпителия 14,2±12,1 при  $p < 0,05$ ), чем в предыдущих группах; в связи с этим наблюдали увеличение интерстициального компонента семенников с отеком. В этой группе чаще встречались патологические митозы. Повреждение семенных канальцев составило 3/4. Средний балл по С. Джонсону – 3,00±1,1 при  $p < 0,05$  (табл. 3).

### Обсуждение

В настоящей экспериментальной работе впервые изучено воздействие прицельного облучения электронами с энергией 10 МэВ в различных дозах на сперматогенез крыс. Актуальность проведенного исследования обусловлена появлением в онкологической практике современных аппаратов для лучевой терапии и необходимостью подбора правильных режимов дозирования, а также созданием наиболее перспективных моделей по изучению нарушений сперматогенеза.



При использовании лучевой терапии в лечении злокачественных опухолей часто происходит повреждение ДНК половых клеток [8, 12]. В связи с этим необходимо повышать безопасность облучения и сведение к минимуму нежелательных побочных эффектов, что является одной из ключевых задач современной радиотерапии.

В настоящей работе шесть опытных групп (II–VII) подвергались однократному прицельному облучению электронами в дозах 2, 4, 6, 8, 10 и 12 Гр, соответственно, после чего были проведены морфологический и морфометрический анализ, результаты которого продемонстрировали прогрессирующее снижение количества и площади семенных канальцев, уменьшение толщины сперматогенного эпителия, снижение числа половых клеток, особенно выражено эти признаки наблюдали при сублетальных дозах.

Полученные нами результаты в целом находят отражение в последних исследованиях в области радиологии, хотя имеются и некоторые существенные отличия. По данным литературы, в семенниках мышей, прицельно облученных умеренными дозами (около 4 Гр), только половые клетки на премейотических стадиях переходят в состояние апоптоза [13]. Однако есть исследования, в которых уже при 2 Гр прицельного облучения (линейный ускоритель Elekta, модель Synergy) истощается пул сперматид и сперматозоидов, то есть постмейотическая стадия сперматогенеза [14]. Аналогичный эффект достигается при 4 Гр общего облучения [15]. При прицельном облучении в дозе 2 Гр (на кобальтовой установке Theatron 780C, Atomic Energy of Canada Limited, Kanata, ON, Канада) дегенерации и аплазии подверглись половые клетки как на пре-, так и на постмейотических стадиях развития [16].

В настоящей работе при использовании импульсного ускорителя электронов NOVAC 11 обнаружено в первую очередь снижение количества сперматогоний при минимальной дозе облучения. Подобный эффект сопровождался появлением пикнотических ядер. Тем не менее семенные канальцы сохранили свою целостность и структурированность сперматогенного эпителия. Наблюдаемый эффект можно объяснить более «мягким» воздействием электронов на ткани семенника и импульсным воздействием в отличие от гамма-облучения.

Повышение дозы до 4 и 6 Гр проявлялось еще большим усугублением аплазии и появлением вакуолизованных сперматоцитов и клеточного детрита в просвете семенных канальцев.

В то время как дозу 6 Гр при прицельном облучении можно считать пограничной, дозы 8, 10 и 12 Гр оказывают крайне негативное влияние на сперматогенез [15].

Описанное некоторыми авторами появление дегенерированных сперматоцитов и сперматид при общем гамма-облучении дозами 8–10 Гр [15] в данном случае наблюдалось при прицельном облучении 8 Гр: при указанной дозе нарушается не только премейотический этап сперматогенеза, но и постмейотический. О тяже-

лой деструкции сперматогенного эпителия свидетельствуют образование семенных шаров и дислокация вакуолизованных сперматоцитов в просвет семенных канальцев, а также наличие клеток с пикнотическими ядрами. Аналогичные результаты были получены другими исследователями [17]. Вероятно, при повышении облучающей дозы до сублетальной нивелируются некоторые различия между мощным гамма-облучением и более слабым – ускорителем электронов, вследствие чего используемая высокая доза проявляется одинаково негативно при обоих видах облучения.

Возможно, доза 8 Гр является не только сублетальной, но и фатальной для большинства половых клеток – выявленная конденсация гетерохроматина в ядрах сохранившихся гамет при дозе облучения 10 Гр говорит об индуцированном радиацией повреждении ДНК [18]. Данные признаки обычно встречаются при воздействии низких доз прицельного облучения (<5 Гр), но при использовании других установок [13]. Скорее всего, при облучении электронами на ускорителе NOVAC 11 пороговая доза значительно выше в связи с более щадящим режимом дозирования.

При кобальтовом гамма-облучении в дозе 14 Гр (установка Shohada-E-Tajrish) некоторые авторы сообщали об отсутствии половых клеток в большинстве семенных канальцев или наличии лишь недифференцированных сперматогоний в базальном отсеке [19]. Практически аналогичная морфологическая картина в настоящем исследовании наблюдалась при дозе 12 Гр, однако сперматогенный потенциал все еще сохранялся.

Таким образом, можно предположить, что эффекты облучения, степень и глубина поражения сперматогенного эпителия являются дозозависимыми. Другие не менее важные факторы эффективности облучения – вид излучения (бета-облучение, гамма-облучение и т.д.), его направленность (общее, прицельное), активность и сила установки, а также стадия сперматогенеза. Данное предположение подтверждается результатами морфометрического анализа – снижением массы семенников, диаметра семенных канальцев и высоты сперматогенного эпителия из-за уменьшения количества дифференцированных половых клеток, что зависит от характера радиационного воздействия при разных режимах дозирования [19, 20].

## Заключение

В семенниках прослеживаются дозозависимые прогрессирующие патоморфологические изменения гистоархитектоники, уменьшение количества сперматогоний и других половых клеток уже на 7-е сутки после облучения. С повышением дозы облучения увеличивается количество клеток с пикнозом ядер. Наличие в базальном отделе семенных канальцев единичных низкодифференцированных сперматогоний говорит о возможном восстановлении сперматогенеза даже при суб- и летальных дозах облучения электронами, то есть

данный процесс можно считать обратимым, а также использовать в качестве модели гипосперматогенеза. Зафиксированные морфологические изменения сперматогенеза при воздействии импульсного ускорителя электронов NOVAC 11 являются более щадящими в отличие от других ранее используемых установок.

## Литература/References

1. *Inhorn MC, Patrizio P.* Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update.* 2015;21(4):411–26. DOI: 10.1093/humupd/dmv016.
2. *Walsh TJ.* Male reproductive health and prostate cancer risk. *Curr Opin Urol.* 2011;21(6):506–13. DOI: 10.1097/MOU.0b013e32834bdf14.
3. *Choy JT, Eisenberg ML.* Male infertility as a window to health. *Fertil Steril.* 2018;110(5):810–4. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2018.08.015.
4. *Демяшкин Г.А.* Апоптоз в семенных канальцах человека в норме и при идиопатическом бесплодии. *Цитология.* 2018;60(3):208–218. DOI: 10.31116/tsitol.2018.03.07.  
*Demyashkin GA.* Apoptosis in seminiferous tubules of human in normal and in idiopathic infertility. *Tsitologia.* 2018;60(3):208–218 (In Russ.). DOI: 10.31116/tsitol.2018.03.07.
5. *Siegel RL, Miller KD, Jemal A.* Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(1):7–30. DOI: 10.3322/caac.21442.
6. *Титович Е.В., Потепалов П.О., Петкевич М.Н., Киселев М.Г.* Алгоритм определения компонентов сеанса лучевой терапии для различных методов облучения онкологических пациентов на этапе их предлучевой подготовки. Приборы и методы измерений. 2017;8(1):73–80. DOI: 10.21122/2220-9506-2017-8-1-73-80.  
*Titovich EV, Patsiapalau PA, Piatkevich MN, Kiselev MG.* The algorithm for determining timing of radiotherapy session components for different methods of oncology patients irradiation at the stage of radiotherapy planning. *Pribory i metody izmerenii [Devices and Methods of Measurements].* 2017;8(1):73–80 (In Russ.). DOI: 10.21122/2220-9506-2017-8-1-73-80.
7. *Stoneham S, Murray M, Thomas B, Williamson M, Sweeney C, Fraizer L.* AYA testis cancer: The unmet challenge. *Pediatr Blood Cancer.* 2019;66(8):e27796. DOI: 10.1002/pbc.27796.
8. *Meistrich ML.* Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril.* 2013;100(5):1180–6. DOI:10.1016/j.fertnstert.2013.08.010.
9. *Sineath RC, Mehta A.* Preservation of fertility in testis cancer management. *Urol Clin North Am.* 2019;46(3):341–51. DOI: 10.1016/j.ucl.2019.04.010.
10. *Clermont Y, Leblond CP, Messier B.* Duration of the cycle of the seminal epithelium of the rat. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 1959;48(Suppl):37–55. PMID: 13810668
11. *Johnsen SG.* Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 325 hypogonadal males. *Hormones.* 1970;1(1):2-25. DOI: 10.1159/000178170
12. *Le W, Qi L, Li J, Wu D, Xu J, Zhang J.* Low-dose ionizing irradiation triggers a 53BP1 response to DNA double strand breaks in mouse spermatogonial stem cells. *Syst Biol Reprod Med.* 2016;62(2):106–13. DOI: 10.3109/19396368.2015.1125561.
13. *Mauduit C, Siah A, Foch M, Chapet O, Clippe S, Gerard JP et al.* Differential expression of growth factors in irradiated mouse testes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001;50(1):203–12. DOI: 10.1016/s0360-3016(01)01461-4.
14. *Topcu A, Mercantepe F, Rakici S, Tumkaya L, Uydu HA, Mercantepe T.* An investigation of the effects of N-acetylcysteine on radiotherapy-induced testicular injury in rats. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2019; 392(2):147–157. DOI: 10.1007/s00210-018-1581-6.
15. *Shaban NZ, Ahmed Zahran AM, El-Rashidy FH, Abdo Koudous AS.* Protective role of hesperidin against  $\gamma$ -radiation-induced oxidative stress and apoptosis in rat testis. *J Biol Res (Thessalon).* 2017;24:5. DOI: 10.1186/s40709-017-0059-x.
16. *Marzban M, Anjamshoa M, Jafari P, Masoumi H, Ahadi R, Fatehi D et al.* Effects of gamma rays on rat testis tissue according to the morphological parameters and immunohistochemistry: Radioprotective role of silymarin. *Electron Physician.* 2017;9(6):4524–32. DOI: 10.19082/4524.
17. *Take G, Erdogan D, Helvacioğlu F, Göktas G, Özbey G, Uluoğlu C et al.* Effect of melatonin and time of administration on irradiation-induced damage to rat testes. *Braz J Med Biol Res.* 2009;42(7):621–8. DOI: 10.1590/s0100-879x2009000700006.
18. *Singh P, Raman MJ.* Dynamics of radiation induced  $\gamma$ H2AX foci in chromatin subcompartments of mouse pachytene spermatocytes and round spermatids. *Mol Reprod Dev.* 2014;81(6):484–96. DOI: 10.1002/mrd.22314.
19. *Koruji M, Movahedin M, Mowla SJ, Gourabi H, Arfaee AJ.* The morphological changes of adult mouse testes after 60Co  $\gamma$ -radiation. *Iran Biomed J.* 2008;12(1):35–42. PMID: 18392093.
20. *Jiang Z, Xu B, Yang M, Li Z, Zhang Y, Jiang D.* Protection by hydrogen against gamma ray-induced testicular damage in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2013;112(3):186–91. DOI: 10.1111/bcpt.12016.

## Информация об авторе

Григорий Александрович Демяшкин – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела радиационной патоморфологии, Национальный медицинский исследовательский центр радиологии, врач-патологоанатом, доцент кафедры патологической анатомии им. А.И. Струкова Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

## Author information

Grigory A. Demyashkin – Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Department of Radiation Pathomorphology, National Medical Research Radiological Centre; Associate Professor, A.I. Strukov Department of Pathological Anatomy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University.  
<http://orcid.org/0000-0001-8447-2600>