

УДК 57.033:575.224

АНЕУПЛОДИЗАЦИЯ ГЕНОМА И ПОТЕРЯ ДНК РАДИАЦИОННО ПОВРЕЖДЕННЫМИ СПЕРМАТОЗОИДАМИ ЖИВОТНЫХ

Булавицкая В.М.

Облучение сперматозоидов животных гамма-радиацией в диапазоне сопровождается деградацией их ядерной ДНК и анеуплодизацией генома. Явление наблюдается в диапазоне умеренных доз, а при переходе в диапазон сублетальных и летальных доз данный процесс значительно усиливался, а также сочетается со спонтанным выбросом обломков генетического материала из сперматозоидов в питательную среду. Установленный феномен приобретает важное значение в связи с наличием векторных свойств у сперматозоидов животных, базирующихся на способности захватывать чужеродную экзогенную ДНК и переносить ее в яйцеклетку при фертилизации.

Ключевые слова: гамма-радиация, сперматозоиды, анеуплодизация.

ВВЕДЕНИЕ

Поражающий эффект ионизирующей радиации на наследственный материал сперматозоидов исследован в ряде работ [1 – 4], где было показано, что рентгеновские и гамма-лучи вызывают необратимые изменения в структуре хромосом, а также обуславливают нарушение процесса развития зиготы, задержки при дроблении и мертворождение [5, 6]. Одновременно некоторым авторам удалось установить, что несмотря на полную потерю своей подвижности генетически инактивированная радиацией сперма способна индуцировать образование партеногенетических эмбрионов как гаплоидного, так и дигаплоидного происхождения [7 – 10]. Кроме того, оказалось, что партеногенез иногда сочетается с трансгенозом, в результате чего реализуется перенос отдельных генов из убитой радиацией спермы в геном новообразованных партеногенов [11].

Как известно, действие ионизирующей радиации на генетический материал клетки инициирует одноцепочечные (ОР) и двухцепочечные (ДР) разрывы в ДНК, при этом близко расположенные друг напротив друга ОР с большой вероятностью порождают ДР косоугольного типа. Именно ДР как косоугольного, так и прямого типа могут становиться точками инициации дробления хроматина сперматозоида на фрагменты, поскольку система репарации ДНК в них не функционирует [12]. Не исключено, что присутствие активных нуклеаз на поверхности головок сперматозоидов вполне может обуславливать гидролиз и деградацию ДНК по ОР [13].

В этой связи целью настоящего исследования состояла количественная оценка изменений ядерной ДНК в крысиных сперматозоидах под действием разных доз гамма-радиации, а также установление возможности самопроизвольного выброса генетического материала из сперматозоидов в окружающую среду.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментов были выбраны половозрелые крысы-самцы массой 250 - 300 г разводки местного вивария. Сразу же после забоя животных вырезанные эпидидимисы помещали в стеклянные бюксы в изотонический раствор натрия хлорида при комнатной температуре.

Облучение сперматозоидов проводили в эпидидимисах в пластмассовых чашках Петри с изотоническим раствором натрия хлорида на дне. Облучали гамма-лучами ^{60}Co на установке «Исследователь» при мощности дозы 0,20 Гр/с различными дозами в широком дозовом диапазоне с верхним пределом в 4000 Гр. По прекращении облучения эпидидимисы переносили в новую порцию изотонического раствора хлорида натрия обратно в бюксы

Для приготовления препарата сперматозоидов использовали часовое стекло, в которое предварительно помещали 2 мл изотонического раствора натрия хлорида. Семенной придаток разрезали на часовом стекле, а его содержимое с помощью стеклянной палочки выдавливали в раствор и перемешивали в течение 30с. Полученную суспензию помещали в термостат с температурой 37°C . С целью тестирования подвижности сперматозоидов каплю приготовленной суспензии переносили на предметное стекло и просматривали под микроскопом МБИ-15 на увеличении $\times 600$. Для определения общей подвижности сперматозоидов наугад отбирали 150 сперматозоидов в каждой из трех повторностей от разных животных. Сперматозоиды считали подвижными, если они могли перемещаться или хотя бы совершать колебательные движения хвостом. В противном случае сперматозоиды классифицировали как потерявшие жизнеспособность.

Количественный анализ ДНК в ядрах сперматозоидов проводили цитофотометрическим методом после их окраски реактивом Шиффа по методу Фельгена в течение 2 ч при комнатной температуре после предварительной фиксации образцов в смеси Карнуа – этанол:хлороформ:уксусная кислота (6:3:1) как минимум 3 ч [14]. После этого образцы проводили через нисходящую серию спиртов (50%, 30%, 5%) вплоть до воды, споласкивали холодной 0,1н соляной кислотой (HCl), а затем гидролизовали в 1н HCl в течение 9 мин при 60°C . Отмытые в сернистых водах образцы сперматозоидов проводили через восходящую серию спиртов, смесь спирт-ксилол, ксилол, а затем заключали в бальзам “DPX” (Fluka). Спектрофотометрические измерения осуществляли на спектрофотометре МФТХ-2М (Санкт-Петербург) при длине волны в 546 нм. Специально разработанная программа позволяла с помощью сопряженного компьютера определять общую абсорбцию ядерной ДНК в сперматозоидах. В качестве контроля использовали необлученные сперматозоиды здоровых животных и лимфоциты их крови, что дало возможность определить коэффициент корреляции между плоидностью и абсорбцией ДНК.

Для количественного учета свободной экзогенной ДНК суспензию облученных сперматозоидов центрифугировали при 500 g. Супернатант переливали в отдельную колбу, а осадок ресуспендировали в 10-кратном объеме холодной 10% хлорной кислоты (HClO_4). После повторного центрифугирования супернатант переносили в колбу, а осадок снова ресуспендировали. Промывку проводили трижды. После этого собранный супернатант анализировали на присутствие в нем свободной ДНК, для чего концентрацию HClO_4 доводили до 0,5 н.

АНЕУПЛОДИЗАЦИЯ ГЕНОМА И ПОТЕРЯ ДНК РАДИАЦИОННО ПОВРЕЖДЕННЫМИ СПЕРМАТОЗОИДАМИ ЖИВОТНЫХ

С целью осуществления полного гидролиза ДНК пробу нагревали на водяной бане до 70⁰С и выдерживали в течение 20 мин. Количественное определение присутствующей в пробе ДНК проводили в соответствии с протоколом Бартон [15], используя модифицированную реакцию Дише с дифениламином. Интенсивность окраски измеряли на спектрометре «СФ-46» (Россия) при длине волны 598 нм. Развитие окраски происходило в течение 18 ч. Для количественного определения ДНК в пробах использовали калибровочную кривую, которую строили на основании данных, полученных после гидролиза и окраски известных навесок ДНК тимуса теленка (Sigma).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

Дозовая зависимость подвижности крысиных сперматозоидов представлена в табл. Как видим, сперматозоиды проявляют достаточно высокую радиорезистентность по этому критерию, поскольку некоторые сперматозоиды (~ 4%) сохраняли свою подвижность даже при дозе в 2000 Гр. Гистограммы количественного распределения сперматозоидов по уровню их плоидности в зависимости от дозы облучения представлены на рис.1.

Таблица.

Влияние дозы гамма-радиации на подвижность облученных сперматозоидов

Доза, Гр	0	500	1000	1500	2000	2500
Подвижность, %	89	47	28	12	4	0

Было установлено, что для необлученных сперматозоидов характерно присутствие выраженного пика в области значения 1n, которое соответствовало гаплоидному геному сперматозоидов. При возрастании дозы облучения наблюдалось некоторое расширение пика и его смещение в область пониженной плоидности.

Как оказалось, при дозах 5 и 100 Гр в образцах отсутствовали сперматозоиды с плоидностью меньше 0,75n. Последующий рост дозы облучения обусловил дальнейшее перемещение пика на диаграмме количественного распределения сперматозоидов в сторону значения 0,75n. При дозе в 1000 Гр отмечено заметное расслоение общей популяции сперматозоидов на несколько субпопуляций с пониженным количеством ядерной ДНК. Отмеченная тенденция усиливалась при переходе в область доз в диапазоне 2000-3000 Гр, причем при дозе в 3000 Гр уже в значительной степени преобладали сперматозоиды с величинами плоидности в интервале 0,2-0,7 n. Полученные цитометрические данные указывали на протекание деградации ДНК в ядрах сперматозоидов, которое проявляло тенденцию к усилению с ростом дозы облучения.

Кроме того, они косвенно свидетельствовали в пользу потери ядерной ДНК сперматозоидами. В этой связи были проведены количественные измерения экзогенной ДНК, которая попадает в питательный раствор во время инкубирования облученных сперматозоидов. Как видно из рис. 2, количество экзогенной ДНК находится на фоновом уровне до дозы в 500 Гр, а затем резко начинает увеличиваться с ростом дозы, достигая максимального значения при дозе в 3000 Гр.

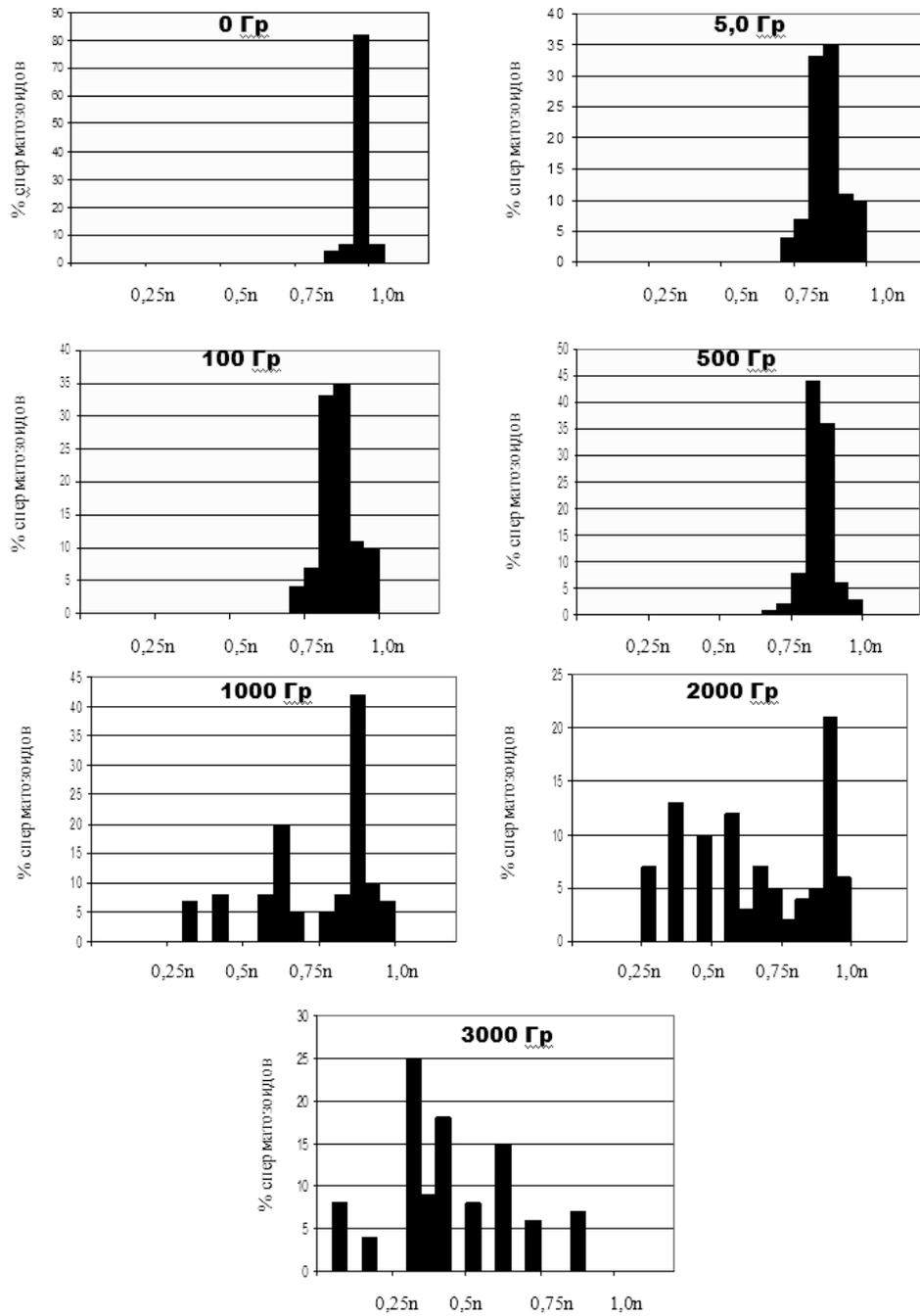


Рис. 1. Гистограммы количественного распределения сперматозоидов по уровню их плоидности.

АНЕУПЛОДИЗАЦИЯ ГЕНОМА И ПОТЕРЯ ДНК РАДИАЦИОННО ПОВРЕЖДЕННЫМИ СПЕРМАТОЗОИДАМИ ЖИВОТНЫХ

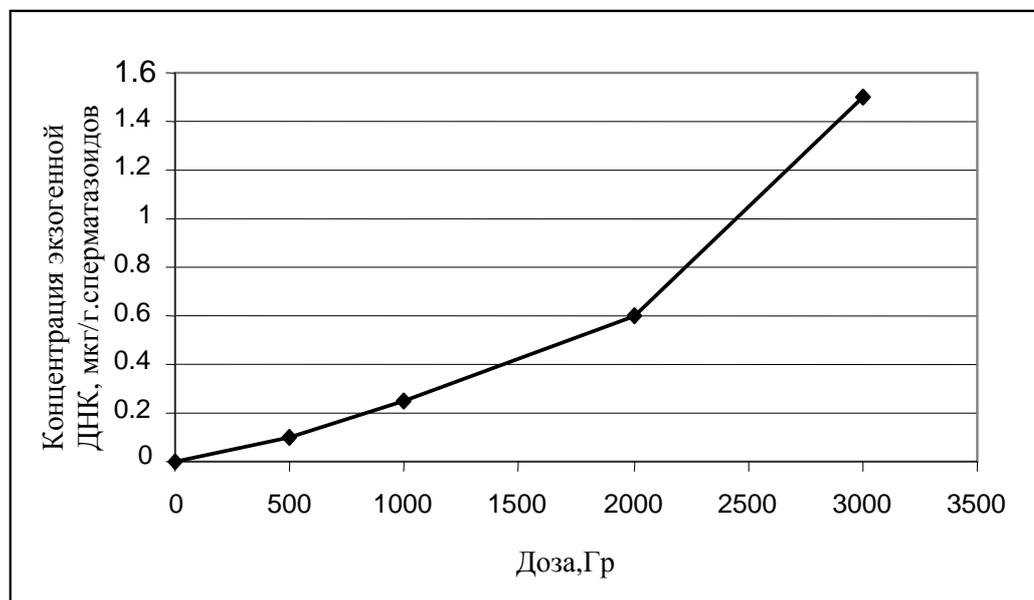


Рис. 2. Дозовая зависимость появления экзогенной ДНК в специальной жидкости.

Таким образом, при высоких дозовых нагрузках сперматозоиды, хотя и полностью теряют способность к перемещению в пространстве и осуществлению колебательных движений, но зато становятся донорами своей ядерной ДНК, фрагменты которой начинают самопроизвольно мигрировать в питательную среду.

ВЫВОДЫ

Настоящими экспериментами было установлено, что плоидность сперматозоидов практически не изменяется по сравнению с контролем в диапазоне доз до 500 Гр. При 1000 Гр было отмечено расслоение популяции и появление около 48% клеток с плоидностью в диапазоне 0,25-0,75n. При 3000 Гр пик диаграммы распределения еще больше сдвигался влево, причем количество анеуплоидных сперматозоидов с плоидностью 0,25-0,50n достигало величины 51%. Кроме того, при высоких дозовых нагрузках наблюдался выброс генетического материала из облученных сперматозоидов в питательную среду, что происходило в строго выраженной зависимости от дозы облучения.

Список литературы

1. Ali Ahmadi, Soon-Chey Ng. Developmental capacity of damaged spermatozoa // Human Reproduction. - 1999. - V.14. - №6. - P. 2279-2285.
2. Grant A. Haines, Jolyon H. Hendry, C. Paul Daniel. Germ cell and dose-dependent DNA damage measured by the comet assay in murine spermatozoa after testicular X-irradiation // Biology of reproduction. - 2002 - Vol. 67. - P. 854-861.

3. Russel W.L. Effect of radiation dose rate on mutation in mice's // J. Cell and Comp. physiology. - 1961. – Vol. 58. – № 3. – P. 183-187.
4. Дубинин Н.П. Общая генетика. М.: Наука, 1970. – 4897 с.
5. Нуждин И. И., Нижник Г. В. Влияние облучения сперматозоидов кроликов гамма-лучами на оплодотворение и ранние стадии развития зародышей // ДАН СССР. - 1960. – Т. 134. – № 6. – С. 1457 – 1460.
6. Bedford J., Overstreet J. A. A method for objective evaluation of the fertilizing ability of spermatozoa irrespective of genetic character // J. Reproduction Pert., 1972. – Vol. 31. – №3. – P. 407-414.
7. Goto K., Kinoshita A., Takuma Y., Ogawa K. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa // Vet. Rec. - 1990. – Vol. 127. – P. 517-520.
8. Hoshi K., Yanagida K., Yazava H. et al. Pregnancy and delivery after intracytoplasmic injection of an immobilized, killed spermatozoon into an oocyte // J. Assist Reprod. Genet.. - 1994. – Vol. 11. – P. 325-326.
9. Graham C. F. The production of parthenogenesis mammalian embryos and their use in biological research // Biol. Rev. - 1974. – Vol. 49. – № 4. – P. 399-422
10. Rough R. Developmental effects resulting from the exposure to X-rays. Effects on the embryo of irradiation of frog sperm // Proc. Am. Philos. Soc. - 1939. – Vol. 31. – № 3. – P. 447-471.
11. Pandey K. K., Patched M. R. Genetic transformation in chicken by the use of irradiated male gametes // Mol. Gen. Genet. - 1982. – V. 186. – № 3. – P. 295-300.
12. Roger A. Pedersen, Brigitte Brandriff. Radiation- and drug-induced DNA repair in mammalian oocytes and embryos – In: DNA repair and mutagenesis in eukariotes / Generoso W., Shelby M. (ed). – 1980, New York: Plenum Publ. Corp. – P. 389-410.
13. Радиация и патология / Под ред. Цыб А. Ф., Будагов Р.С., Замулаева И. А. и др. –М.: Высш. шк., 2005. – 341 с.
14. Andreychenko S. Evolution of tumor capabilities for recurrence in patients with larynx and pharynx malignancies on the basis of DNA criterion – In: Drug Discovery and Design Medical Aspects / T. Matsoukas, T. Mavromoustakos (ed). – IOS Press, 2002. – P.294-298.
15. Burton K. A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid // Biochem. J.. - 1956. – Vol. 62. – № 2. – P. 315-323.

Булавицкая В.М. Анеуплодизация и потеря ДНК радиационно поврежденными сперматозоидами животных
// Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. – 2007. – Серия «Биология, химия». – Т. 20 (59), № 1. – С. 129-134.

Опроминення сперматозоїдів тварин гамма-радіацією супроводжується деградацією ядерної ДНК та анеуплодизацією генома. Явище спостерігається при помірних дозах опромінення, а в діапазоні сублетальних та летальних доз значно посилюється і одночасно супроводжується неконтрольованим викидом уламків генетичного матеріалу сперматозоїдів у поживне середовище. Встановлений феномен набуває важливого значення в зв'язку з наявністю векторних властивостей у сперматозоїдів, що пов'язані з їх здатністю захоплювати чужорідну екзогенну ДНК та переносити її до яйцеклітини при фертилізації.

Ключові слова: гама-радіація, сперматозоїди, анеуплодизація.

Bulavitska V.M. Aneuplodization and loss of DNA in animal spermatozoa damaged by X-rays Ученые записки // Uchenye zapiski Tavricheskogo Natsionalnogo Universiteta im. V.I. Vernadskogo. Series "Biology, chemistry". – 2007. – Vol. 20 (59), № 1. – P. 129-134.

Gamma-irradiation of animal spermatozoa is accompanied by DNA degradation and genome aneuploidization. The phenomenon takes place in the diapason of moderate doses, in the range of sublethal and lethal radiation doses it enhances significantly and simultaneously is coupled with uncontrolled loss of genetic material from spermatozoa in feeding solution. The established phenomenon acquires great importance in connection to vector properties of spermatozoon which is responsible for exogenous DNA uptake and transfer to egg cell in the process of fertilization.

Keywords: gama-irradiation, spermatozoa, aneuplodization.