

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

---

На правах рукопису

УДК 575.167 + 575.224 + 575.17

СТОЛІНА  
Марина Романівна

ГЕНЕТИЧНІ ЕФЕКТИ У ЛІНІЙНИХ МИШЕЙ СС57W/1iv, ІНДУКОВАНІ  
МАЛИМИ ДОЗАМИ ХРОНІЧНОГО ІОНІЗУЮЧОГО ОПРОМІНЕННЯ

03.00.15 - генетика

Автореферат  
дисертації на здобуття вченого ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ - 1994

АВ 29.771

Дисертацією є рукопис.  
Робота виконана у відділі біохімічної генетики Інституту молекулярної біології і генетики АН України.

Науковий керівник - кандидат біологічних наук  
О.П. Соломко

Офіційні опоненти - доктор біологічних наук  
С.М. Храпунов

кандидат біологічних наук  
В.В. Сорочинський

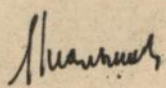
Провідна організація - Інститут удосконалення лікарів  
МОЗ України, м.Київ

Захист відбудеться 24 травня 1994 р. о 14 год. на засіданні спеціалізованої ради Д.01.19.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії АН України за адресою: 252143, Київ-143, вул. Заболотного, 148.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії АН України за адресою: 252143, Київ-143, вул. Заболотного, 148.

Автореферат розіслано "22" квітня 1994 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої ради,  
кандидат біологічних наук



Л.В.Малишева

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00801706 (M)

Актуальність проблеми. Відомо, що багато мутагенів в малих концентраціях істотно впливають на спадковість організмів при накопиченні сумарної дози та хронічному використанні. Дослідження генотоксичної дії іонізуючого випромінювання має два напрямки. Один - вивчення наслідків гострої дії значних доз опромінювання на індивідуальному і популяційному рівнях. Цей напрям відносно добре опрацьовано і результати відповідних досліджень широко репрезентовано в публікаціях міжнародних організацій (UNSCAR, USA; ICRP і т.і.) Значно менш дослідженим залишається напрям вивчення генетичних ефектів, індукованих внаслідок хронічного іонізуючого опромінювання в малих дозах /Oftedal P., 1991/, та їх віддалених наслідків в поколіннях. Труднощі в цьому напрямку пов'язані зі складністю моделювання умов хронічного опромінювання та невивченістю спричинюваних ними змін в біологічних об'єктах. Останнє зумовлює відсутність характеристик, які можна було б використовувати як стандартні специфічні показники наявності певних змін.

Експериментальні дані, отримані на різних біологічних об'єктах, підданих опроміненню в зв'язку з аварією на Чорнобильській АЕС, вказують на неспівпадання рівня генетичних ефектів та їхньої динаміки із встановленими раніше класичними закономірностями, які мали місце при інших умовах опромінення /Gould, Goldman, 1990/. Добре відомо, що генотоксична дія іонізуючого випромінювання реалізується на рівні мутацій як соматичних, так і статевих клітин. Для вивчення радіаційно індукованого мутагенезу в статевих клітинах ссавців найчастіше використовують гамети та ембріони мишей інбредних ліній. Саме за таких умов стає можливим відділення різноманітних аспектів ініціації мутагенних процесів, таких, як рівень дози, стать, лінійні особливості тварин; дослідження індукції генетичної нестабільності в статевих клітинах та зиготах; проведення експериментів в системах in vivo та in vitro.

Мета та завдання досліджень. Метою цієї роботи було вивчення генетичних наслідків хронічного іонізуючого опромінення в малих дозах на репродуктивну функцію ряду поколінь лінійних мишей СС57W/Mv та виявлення специфічних ознак геном-дестабілізуючих радіонуклідних ефектів на рівні статевих і соматичних клітин.

До конкретних завдань роботи входили:

1. Створення модельної системи з одночасним використанням в експериментах мишей різних ліній для виявлення генотипічних та феноменологічних ефектів хронічного опромінення в малих дозах на ряд показників репродуктивної функції.

2. Проведення порівняльного аналізу репродуктивної функції трьох послідовних поколінь тварин з чорнобильської та київської експериментальних популяцій за рядом показників.

3. Вивчення генотоксичного впливу хронічного іонізуючого опромінення в малих дозах на рівень ембріональних втрат у трьох поколіннях мишей лінії СС57W/Mv з чорнобильської експериментальної популяції та на успіх розвитку зигот різного популяційного походження в системі *in vitro*.

4. Проведення порівняльного аналізу ряду показників репродуктивної функції мишей лінії СС57W/Mv з чорнобильської експериментальної популяції з такими, отриманими для тварин батьківських генотипів BALB/c і С57Bl/6 та мишей СС57W/Mv з київської експериментальної популяції.

5. Тестування каріотипічної стабільності геному соматичних клітин кісткового мозку тварин-донорів гамет з чорнобильської та київської експериментальних популяцій.

Наукова новизна та практична цінність роботи. Вперше для дослідження генотоксичного впливу хронічного іонізуючого опромінення в малих дозах на репродуктивну функцію ссавців запропоновано модельну систему, основу якої складають миши інбредних ліній - СС57W/Mv, С57BL/6, BALB/c. Завдяки тому, що генотип мишей СС57W/Mv є похідним від батьківських - BALB/c та С57Bl/6 - стає можливим виділення з феноменологічних ефектів генотоксичної дії мутагенів генотипічних та епігенетичних аспектів на організменому та клітинному рівнях.

Показано достовірне зниження плідності тварин лінії СС57W/Mv з чорнобильської експериментальної популяції, пов'язане зі зменшенням кількості погонів протягом життя та кількістю народжених в погоні. Останнє в значній мірі обумовлено зростанням в 2-3 рази рівня доімплантаційних втрат у опромінених тварин обох статей. Критичним періодом при формуванні гамет мишей лінії СС57W/Mv є стадія первинних статевих клітин. В основі порушень раннього ембріонального розвитку можуть бути дефекти нормального поділу клітин, оскільки в клітинах кісткового мозку мишей генотипу СС57W/Mv

під впливом хронічного низькодозового іонізуючого опромінювання спостерігаються зміни багатьох каріотипічних характеристик.

За різними показниками в системах *in vivo* та *in vitro* зниження плідності хронічно опромінованих мишей лінії СС57W/Mv може реалізуватися на епігенетичному рівні.

Запропонована нова модельна система та використані методи досліджень можуть застосовуватися при дослідженні у свавців генетичних ефектів, індукованих хронічною дією мутагенів в малих дозах.

Апробація. Матеріали дисертації доповідались на: Міжнародній конференції "Medical consequences of the Chernobyl accident" (м.Київ) в 1992 р.; Конференції СНД "Актуальные проблемы влияния ионизирующих излучений на репродуктивную функцию" (Росія, м.Обнінськ) в 1992 р.; Радіобіологічному в'їзді (м.Київ) в 1993 р.; Конференції Ради Європи "Potential long-term ecological impact of genetically modified organisms" (м.Страазбург, Франція) в 1993 р.

Публікації. За темою дисертації опубліковано 9 робіт.

Структура та об'єм роботи. Дисертаційна робота складається з вступу, 3 частин, заключення, висновків, списку літератури, викладена на 113 сторінках і має 7 малюнків та 11 таблиць. Список літератури включає 157 бібліографічних посилань, 110 з яких - іноземні.

#### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Об'єктами проведених генетичних та ембріологічних досліджень були миші інбредних ліній С57B1/6, BALB/c та СС57W/Mv. Миші генотипу СС57W/Mv виведені від схрещування: BALB/c x С57B1/6 /Медведев, 1964/. В 1990 р. було засновано 2 експериментальні популяції моногамних родин мишей лінії СС57W/Mv - Чорнобильську (Ч - спецвіварій Інституту в зоні впливу ЧАЕС) та контрольну (К - віварій Інституту в м.Києві) - які підтримуються синхронно у ряді поколінь шляхом братерсько-сестринських схрещувань нащадків 2-3 місячного віку з другого-третього погонів. З цих же погонів брали тварин для генетичних та ембріологічних досліджень. Відносно біологічною нормою за рядом генетичних, ембріологічних та цитологічних показників вважали такі, отримані на мишах лінії СС57W/Mv з київської експериментальної популяції (К). Догляд за тваринами обох експериментальних популяцій проводили протягом всього

їхнього життя.

За даними регулярних вимірювань радіаційний фон у приміщенні чорнобильського спецвіварію складав 40-80 мкР/год, а у приміщенні київського - 5-10 мкР/год. Внутрішнє радіаційне навантаження у тварин з Чорнобильської експериментальної популяції (Ч) створювалося за рахунок радіонуклідів, що надходили до організму мишей інгаляційним та перкутанним шляхами, а також з харчовими додатками. Склад харчового раціону в обох віваріях не відрізнявся за винятком зеленої маси кормів (паростки алаків), яку тварини (Ч) отримували в Прип'ятьського тепличного господарства. Сумарна концентрація (визначали радіометром типу КРК-1-01) бета-активних ізотопів в паростках алаків та тушках мишей з чорнобильської експериментальної популяції перевищувала контрольний рівень на 2 порядки і складала  $4,0 \times 10^2$  Бк/кг та  $2,4 \times 10^2$  Бк/кг. Ізотопний склад радіонуклідів, які мали гама-активність, вимірювали за допомогою багатоканального аналізатора AFORA LP4900 В "Nokia" (Фінляндія). Питома активність основних радіонуклідів (Cs-137, Ra-226, Th-232, K-40) в зеленій масі кормів та тушках тварин з чорнобильського віварія не відрізнялась від контрольних показників.

Гострі досліді проводились на статевозрілих 3-5 місячних мишах. Тварин лінії СС57W/Mv з Чорнобильської популяції брали в експерименти через 3 доби після закінчення експозиції.

Сезонну мінливість плідності самиць визначали протягом 2 років. Потенційну плідність оцінювали за кількістю зародків, що знаходилися в кумулюсній масі яйцепроводів самиць першого дня вагітності, або за числом жовтих тіл в яєчниках.

Рівень ембріональних втрат в потомстві експериментальних і контрольних тварин визначали за різницею між числом жовтих тіл в яєчниках і місць імплантації в рогах матки (доімплантаційні втрати) самиць 16-18 доби вагітності, і за різницею між кількістю місць імплантації й живих ембріонів (постімплантаційні втрати) /Шевченко, Померанцева, 1985, Балонов и др., 1992/.

Для синхронізації проведення досліджень в системі *in vitro* яйцеклітини та зиготи вимивали в ампул яйцепроводів супервульованих самиць /Hogan et al., 1986/. Отримані одноклітинні зародки культивували за методикою /Hogan et al., 1986/. Для

підрахунку кількості клітин в бластоцистах готували фіксовані препарати за модифікованим методом /Паткин и др., 1992/. Препарати фарбували барвником Гімза ("Merk"). Препарати клітин кісткового мозку готували без застосування колхіцину за методом /Макгрегор, Варли, 1986/, фарбували барвником Гімза ("Merk"). Цитогенетичний аналіз матеріалу проводили на мікроскопі "Ampleval".

Достовірність різниці між двома середніми величинами визначали за допомогою критерія Ст'юдента /Плохинский, 1980/.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

**1. Створення модельної системи для проведення комплексних генетично-ембріологічних досліджень та її основні характеристики.** Для проведення комплексних генетичних експериментів було створено модельну систему щодо якої увійшли миші ліній BALB/c і C57Bl/6, а також лінії CC57W/Mv, отриманої в результаті схрещування перших двох. За нашими даними (табл.1) миші генотипу CC57W/Mv не відрізнялися від мишей генотипу C57Bl/6 за сезонною мінливістю репродуктивних характеристик. Самці генотипу BALB/c характеризуються високим рівнем пропустовувань, цей показник є сезонностабільним (35-49%). Частка вагітних самок C57Bl/6 була більшою (80-90%), ніж цей показник для лінії BALB/c. Миші CC57W/Mv характеризуються не тільки сезонною стабільністю за цією ознакою, але й високим рівнем вагітностей - 75-90% від кількості фертильних самок. Показник потенційної плідності виявився сезонно стабільним і обумовленим лінійною приналежністю самок: він достовірно нижчий у мишей лінії C57Bl/6 і не відрізняється для ліній CC57W/Mv та BALB/c. Поряд з цим у мишей генотипу CC57W/Mv найнижча середня кількість народжених у погоні і найвищий показник загибелі мишенят в перший місяць життя.

Для мишей генотипів C57Bl/6 і CC57W/Mv рівень доімплантаційних втрат складав 4-5%, а для тварин лінії BALB - 11-12%. Суто генотипічною ознакою для мишей лінії CC57W/Mv виявився високий рівень постімплантаційних втрат (35%), відмінний від такого для мишей двох інших ліній (11-14%).

Культивування з одноклітинної стадії до бластоцисти понад 100 лінійних зародків кожного генотипу дало можливість визначити рівень доімплантаційної загибелі на трьох основних

Таблиця 1. Порівняльні генетичні та ембріогенетичні особливості мишей інбредних ліній BALB/c, C57Bl/6 і C57W/Mv.

Генетичні та ембріологічні характеристики	Лінія		
	BALB/c	C57Bl/6	C57W/Mv
Гаплотип	H2-k	H2-b	H2-b
Гени кольору шерсті	b,c	a	a,b,c
Відмінності за:			
- рівнем сезонної фертильності	+	-	-
- потенційною плідністю	-	+	-
- рівнем ембріональних втрат			
а/до імплантації	+	-	-
б/після імплантації	-	-	+
- кількістю мишенят в погоні	-	-	+
- життєдатністю доімплантаційних зародків при культивуванні	+	-	-

"+" - відмінність однієї лінії від двох інших за вказаним показником

"-" - дві лінії з трьох мають співставимі значення за показником

стадіях: зиготи, двоклітинного зародку та бластоцисти. Для зародків ліній C57W/Mv та C57Bl/6 відсоток загиблих на стадії зиготи становив 3-5%, а кількість двоклітинних зародків, які пройшли послідовні поділи і стали бластоцистами, була близька до 90%. Отже, рівень доімплантаційних втрат коливався в межах 10 - 15%. Після запліднення яйцеклітин генотипу BALB/c доімплантаційні втрати при культивуванні зигот до бластоцист досягали 60%.

То ж, для мишей генотипу C57W/Mv на рівні з суто лінійними особливостями (високий рівень постімплантаційних втрат та відмінність за кількістю мишенят в погоні при народженні і після періоду лактації) існує ряд генетичних характеристик, що успадковані від батьківських лінійних мишей BALB/c та C57Bl/6.

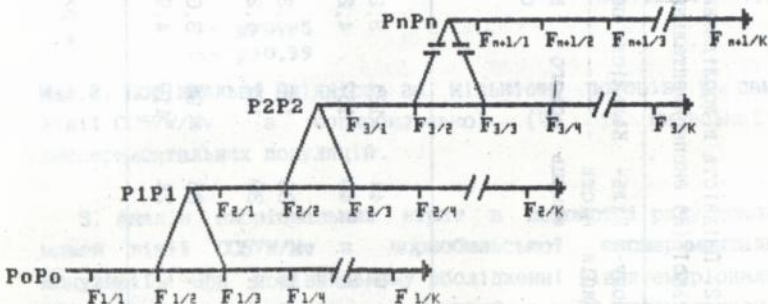
Таким чином, використання запропонованої модельної системи робить можливим виділення з феноменологічних ефектів генотоксичного впливу хронічного іонізуючого опромінення в малих

довах епігенетичних аспектів на організменому, клітинному та молекулярно-генетичному рівнях.

**2. Аналіз плідності ряду поколінь моногамних родин мишей лінії СС57W/Mv з чорнобильської та київської експериментальних популяцій.** Чорнобильську та київську експериментальні популяції лабораторних мишей лінії СС57W/Mv було започатковано в 1990р. Підтримання обох популяцій велося за схемою, яка забезпечувала порівняльний комплексний аналіз репродуктивної функції тварин протягом всього їхнього життя (мал.1).

За нашими даними (табл.2) тварини з двох експериментальних популяцій не відрізнялися за тривалістю життя, а їхні нащадки - за кількістю загиблих в перший місяць після народження. Серед тварин з (Ч) та (К) мишей з фенотипічними аномаліями не виявлено. В результаті зворотних схрещувань рецесивних мутацій не отримано.

У мишей СС57W/Mv з чорнобильської експериментальної популяції нами було зафіксовано зниження репродуктивних функцій за показниками "кількість погонів на самицю" та "кількість народжених у погоні" (табл.2). Якщо самки, які належали до (К), мали в середньому 4-5 погонів протягом життя, то чорнобильські миші тільки 3, і така різниця зберігалася в трьох поколіннях тварин. Від 80-90% самоць (К) було отримано 3 погони, від 60-70% - чотири, а від 30-50% - п'ять (мал.2). Ці показники для мишей з (Ч) були достовірно нижчими і складали 50-60%, 30-40% та 20-25% (відповідно до кількості погонів).



Мал.1. Схема підтримки та розплоду мишей лінії СС57W/Mv в київській та чорнобильській експериментальних популяціях.

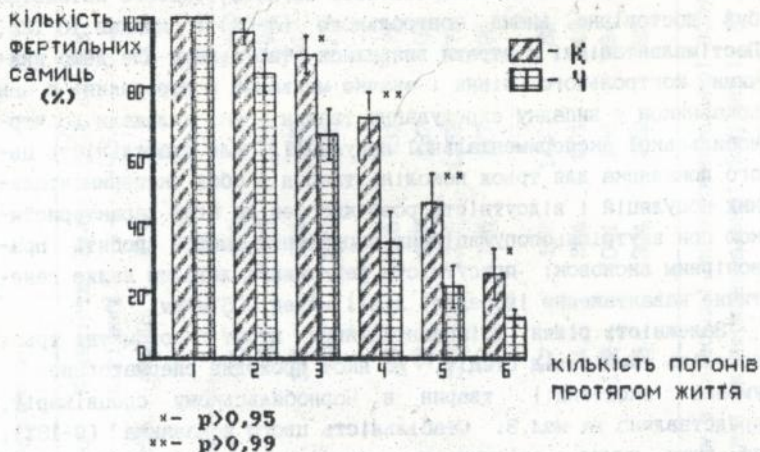
Таблиця 2. Плідність в досліджених моногамних родинах мишей лінії CC57W/Mv з чорнобильської (Ч) та київської (К) експериментальних популяцій.

Гене- рація	Попу- ляція	Кіль- кість самиць	Кількість погонів		Кількість народжених		Результат відсадки			Трива- лість життя ( міс.)
			всього	на 1 самицю	всього	на 1 погон	всього	на 1 погон	спів- відно- шення о:о	
F1	Ч	44	131	3,2 $\pm$ 0,2***	580	4,4 $\pm$ 0,1**	358	2,7 $\pm$ 0,2	1,1	12,7 $\pm$ 0,3
	К	40	167	4,2 $\pm$ 0,2	799	4,8 $\pm$ 0,1	466	2,8 $\pm$ 0,1	1,0	13,4 $\pm$ 0,3
F2	Ч	35	116	3,3 $\pm$ 0,2*	468	4,0 $\pm$ 0,2**	284	2,4 $\pm$ 0,3	1,3	13,1 $\pm$ 0,4
	К	30	127	4,2 $\pm$ 0,3	623	4,9 $\pm$ 0,1	308	2,4 $\pm$ 0,3	1,2	13,6 $\pm$ 0,4
F3	Ч	32	96	3,0 $\pm$ 0,3***	386	4,0 $\pm$ 0,1**	221	2,3 $\pm$ 0,4	1,4	13,8 $\pm$ 0,3
	К	24	119	4,9 $\pm$ 0,2	548	4,6 $\pm$ 0,1	322	2,7 $\pm$ 0,3	1,2	13,8 $\pm$ 0,4

\*  $p > 0,95$     \*\* $p > 0,99$     \*\*\* $p > 0,999$

Проведений аналіз фертильності самиць різного віку показав, що в віці до 1 року дві третини самиць (К) і (Ч) залишаються плідними і дають погонів. Таким чином, зниження кількості погонів за репродуктивний період життя у самиць (Ч) не пов'язано з передчасною втратою фертильності, а обумовлено нижчою частотою вагітностей в порівнянні з тваринами (К).

Відомо / Шевченко, Померанцева, 1985, Померанцева и др., 1990, Балонов и др., 1992/ що подібний ефект може обумовлюватися зростанням рівня до- або післяімплантаційних втрат в потомстві тварин, які перебували під впливом іонізуючого опромінення. Тому, наступним етапом досліджень став аналіз ембріональних втрат в потомстві мишей лінії СС57W/Mv з чорнобильської експериментальної популяції.



Мал.2. Порівняльна плідність за кількістю погонів у самиць лінії СС57W/Mv з чорнобильської (Ч) та київської (К) експериментальних популяцій.

**3. Аналіз ембріональних втрат в потомстві ряду поколінь мишей лінії СС57W/Mv з чорнобильської експериментальної популяції.** При порівняльному дослідженні рівня ембріональних втрат виявилось (табл.3), що у мишей з (Ч) доімплантаційна загибель ембріонів достовірно вища (10-12%) того ж показника в контрольних схрещеннях (4-5%). Таким чином, рівень доімплантаційної загибелі нащадків опромінених мишей генотипу СС57W/Mv

стає співставимим з таким показником для мишей генотипу BALB/c. За показником постімплантаційної загибелі ембріонів дані, отримані в схрещуваннях трьох поколінь тварин з обох експериментальних популяцій, не відрізнялись. Отже, зміни в показнику доімплантаційних втрат виявилися "індикатором" генотоксичного впливу хронічного іонізуючого опромінення в малих дозах на репродуктивну функцію мишей лінії CC57W/Mv.

Подібний ефект може зумовлюватися втратою адатності до запліднення частиною статевих клітин внаслідок дестабілізації геномів гамет. Для відокремлення внеску гамет самців та самиць в рівень ембріональних втрат було здійснено синхронні міжпопуляційні схрещування (табл.3). Незалежно від покоління і статі мишей з (Ч) рівень доімплантаційної загибелі їхнього потомства був достовірно вищий контрольного (4-5%) і складав 10-12%. Постімплантаційні ж втрати виявилися стабільними але дещо нижчими контрольного рівня і значно меншими в порівнянні з цим показником у випадку схрещування тварин, які належали до чорнобильської експериментальної популяції. Але стабільність цього показника для трьох поколінь тварин з обох експериментальних популяцій і відсутність розбіжностей за цією характеристикою при внутрішньопопуляційних паруваннях мишей робить правомірним висновок: присутність рецесивних лелей являє генетичне навантаження інбредної лінії мишей CC57W/Mv.

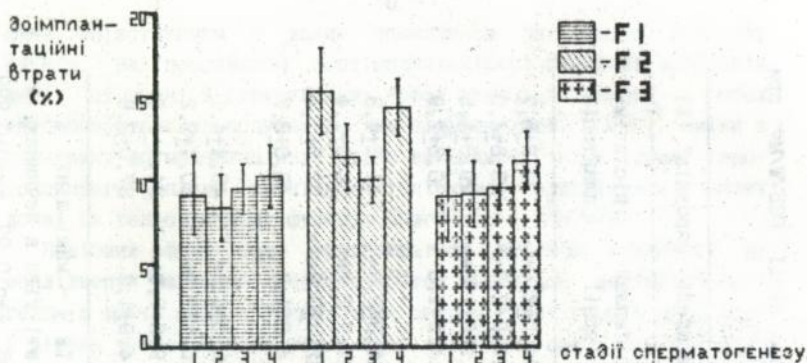
Залежність рівня доімплантаційних втрат в потомстві трьох поколінь самців від стадії, до якої проходив сперматогенез в умовах експозиції тварин в Чорнобильському спецвіварії, представлено на мал.3. Стабільність цього показника (9-13%), на нашу думку, свідчить про наявність генотоксичного ефекту хронічного іонізуючого опромінення в малих дозах на стадіях сперматогенезу, які передують формуванню стовбурових сперматогоніїв.

Ми прийшли до висновку, що генотоксична дія опромінення реалізується в умовах нашої модельної системи до початку стадій формування стовбурових сперматогоніїв у самців і до настання статевої зрілості у самиць. У зв'язку з цим було проведено серію експериментів (табл.4). Рівень доімплантаційних втрат у самиць, народжених в чорнобильському спецвіварії, складав 11-12% незалежно від популяційної належності їх батьків, в той час, як аналогічний показник для самиць, які народилися в

Таблиця 3. Ембріональна загибель потомства самців та самиць лінії СС57W/Mv при міжпопуляційних схрещуваннях

Поко- лінія	Тип схрещування		Кількість вагітних самиць	Кількість в аналізі			Загибель зародків (%)	
	самиця	х самець		Ж Т	М І	Ж Е	до імплан- тації	після ім- плантації
F1	Ч	Ч	15	129	114	72	11,6 $\pm$ 2,8*	36,8 $\pm$ 5,7
	Ч	К	14	139	121	90	12,2 $\pm$ 2,8*	25,6 $\pm$ 4,0
	К	Ч	104	964	872	612	9,5 $\pm$ 1,0**	29,8 $\pm$ 1,5
	К	К	29	256	246	170	4,5 $\pm$ 1,3	30,6 $\pm$ 2,9
F2	Ч	Ч	15	146	131	77	10,3 $\pm$ 2,3*	41,2 $\pm$ 4,3
	Ч	К	18	157	137	90	12,7 $\pm$ 2,7*	34,3 $\pm$ 1,4
	К	Ч	136	1315	1152	778	12,4 $\pm$ 0,9***	32,5 $\pm$ 1,4
	К	К	20	186	177	106	4,8 $\pm$ 1,5	40,0 $\pm$ 3,7
F3	Ч	Ч	17	162	145	82	10,5 $\pm$ 2,4*	43,4 $\pm$ 4,1
	Ч	К	24	224	201	140	10,3 $\pm$ 2,0*	30,4 $\pm$ 3,2
	К	Ч	112	1071	966	634	9,8 $\pm$ 0,9**	34,4 $\pm$ 1,5
	К	К	35	304	289	182	4,9 $\pm$ 1,2	37,0 $\pm$ 2,8

К - миші лінії СС57W/Mv з київської експериментальної популяції; Ч - миші лінії СС57W/Mv з чорнобильської експериментальної популяції; ЖТ - жовті тіла в яєчниках, МІ - місця імплантації в рогах матки, ЖЕ - живі ембріони. \* $p > 0,95$ , \*\* $p > 0,99$ , \*\*\* $p > 0,999$



- 1 - сперматозоїди та сперматиди
- 2 - сперматоцити 2 порядку
- 3 - сперматоцити 1 порядку
- 4 - стовбурові сперматогонії

Мал.3. Доімплантаційні втрати в потомстві самців мишей лінії СС57W/Mv з чорнобильської експериментальної популяції відповідно стадії, до якої проходив сперматогенез в чорнобильському спецвіварії.

"чорнобильських" родин, але в умовах київського віварію, не відрізнявся від контрольного (4-5%). Засновуючись на отриманих даних ми прийшли до висновку, що генотоксична дія хронічного іонізуючого опромінення в малих дозах реалізується на стадіях закладання, поділення і визрівання жіночих гоніцитів протягом ембріонального розвитку самок і в ранній постнатальний період - час початку визрівання ооцитів. При дослідженні ембріональних втрат в потомстві 3,5-5місячних самців, пренатальний розвиток і лактація яких проходили у спецвіварії м. Чорнобиля в родин, зформованих із статевозрілих тварин київської експериментальної популяції, виявилось, що рівень доімплантаційної загибелі їхніх нащадків (6-7%) близький до контрольного показника. За умов проведення нашого експерименту в заплідненні яйцеклітин інтактних самиць СС57W/Mv (К) брали участь сперматозоїди "чорнобильських" самців, гаметогенез яких, починаючи зі стадії сперматогоніїв А1 проходив в київському віварії. Отже, в умовах нашої модельної системи критичним періодом при форму-

Таблиця 4.

Аналіз чутливості первинних статевих клітин (на стадіях розмноження та росту) до хронічної дії іонізуючого опромінювання в малих дозах за показником доімплантаційних втрат в потомстві мишей лінії СС57W/Mv з київської (К) та чорнобильської (Ч) експериментальних популяцій.

Популя-Умови утримання F1 з моменту запліднення до закінчення періоду лактації		Стать	Віварій, в якому гонючили	Популяційна принадлежність партнера в схрещуванні	Кількість вагітних самоць	Кількість			Ембріональні втрати (%)	
						Ж	Т	М	І	Ж
К	К	самка	К	К	20	186	177	106	4,8 <sub>±</sub> 1,6	40,1 <sub>±</sub> 3,7
К	Ч	"-	Ч	К	19	165	146	95	11,5 <sub>±</sub> 2,5*	34,9 <sub>±</sub> 3,9
К	Ч	самець	К	К	64	610	570	362	6,6 <sub>±</sub> 1,0	36,5 <sub>±</sub> 3,7
Ч	К	самці та самиці	К	внутрішньогрупові	14	129	123	79	4,7 <sub>±</sub> 1,9	35,8 <sub>±</sub> 4,3
Ч	Ч	"-	Ч	"-	15	129	114	72	11,6 <sub>±</sub> 2,8*	36,8 <sub>±</sub> 5,7

К - принадлежність мишей лінії СС57W до київської експериментальної популяції, умови утримання у київському віварії ІМБіГ АН України.

Ч - принадлежність мишей лінії СС57W до чорнобильської експериментальної популяції, умови утримання в спецвіварії ІМБіГ АН України в м.Чорнобилі.

ЖТ - жовті тіла в яєчниках, МІ - місця імплантації, ЖЕ - живі ембріони.

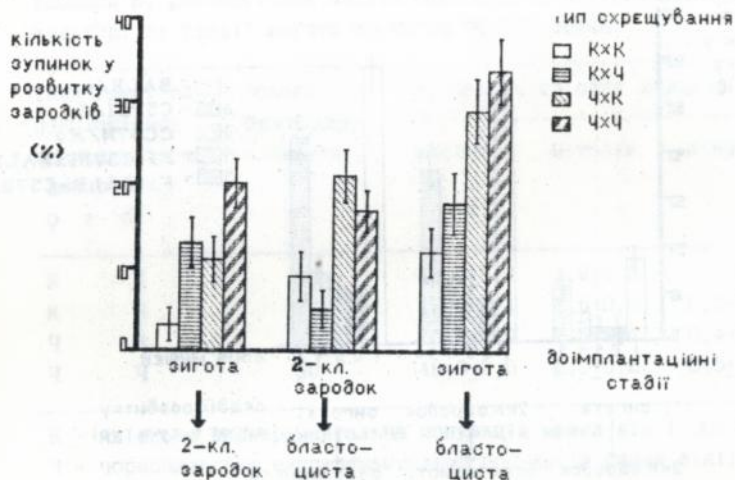
\*p>0,95

ванні статевих клітин самців є стадії стовбурових сперматогоніїв А1-А4 в сперматогенному епітелії, який за останніми даними /Vergouwen et al., 1990, Агарков и др., 1991/ є найбільш радіаційно чутливим у сім'янику (що може бути підтвердженням наших висновків).

Таким чином, зниження плідності та продуктивності мишей генотипу СС57W/Мv з (Ч) обумовлено зростанням в 2-3 рази рівня доїмплантаційних втрат. Але на рівень доїмплантаційних втрат в потомстві опромінених тварин можуть впливати як пошкодження в генетичному апараті статевих клітин та бластомірів ембріонів, так і фізіологічні, біохімічні та генетичні порушення в системі материнського організму. Вирішення цього питання можливе при проведенні культивування зигот СС57W/МV різної популяційної приналежності до пізніх доїмплантаційних стадій з дослідженням динаміки клітинних поділів та формування бластоцист.

**4. Аналіз культивування зигот, отриманих в схрещуваннях мишей лінії СС57W/Мv різного популяційного походження.** При культивуванні зигот СС57W/Мv (мал. 4) ембріони контрольної групи (К) успішно розвивалися до стадії бластоцисти і зупинялись у розвитку на стадії зиготи в 3-4% випадків, а на двоклітинній - в 9% випадків ( $P > 0,99$ ). Для зародків, отриманих від схрещування самця (Ч) і самиці (К) характерна інша тенденція - дроблення достовірно частіше зупинялося на стадії зиготи (13%), ніж на двоклітинній стадії (5%). Але сумарна кількість зупинок була близькою до контрольного рівня (17% і 12%, відповідно). Участь у схрещенні самиці (Ч) з самцем (К) приводила до більш глибоких пошкоджень процесів дроблення. Так само, як і у випадку участі самця (Ч) - різко зростала кількість зупинок розвитку на стадії зиготи (11%). Крім того, спостерігалось істотне збільшення відсотка ембріонів, які зупиняються у розвитку на двоклітинній стадії (20%). Таким чином, хронічне (протягом неонатального розвитку) опромінювання в малих дозах мишей обох статей дає свій внесок у порушення проходження стадій доїмплантаційного ембріогенезу нащадків. Найвищі ж втрати при культивуванні фіксувалися для зигот, отриманих від обох опромінених батьків, тобто спостерігалось складання ефектів опромінення.

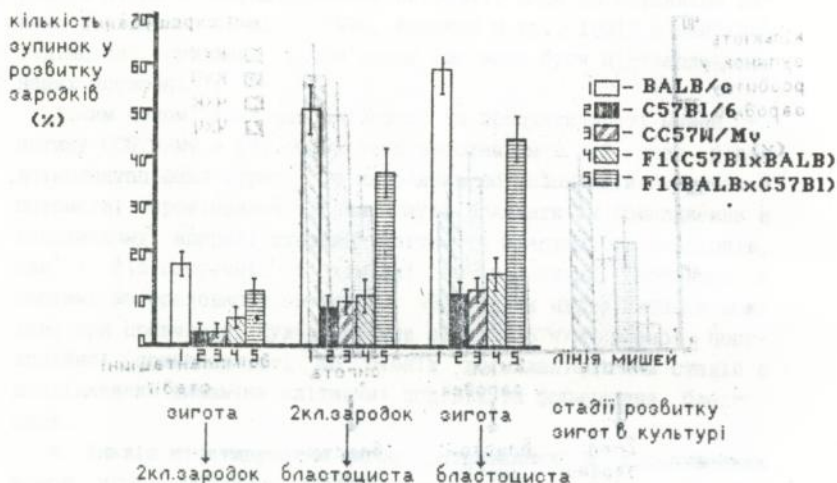
Аналогічні за наслідками результати (мал. 5) було отримано



Мал.4. Успіх культивування зигот СС57W/Mv різного походження.

при культивуванні контрольних гомо- та гетерозигот генотипів С57В1/6, BALB/c, F1(С57В1хBALB) і F1(BALBхС57В1): наявність материнського генотипу BALB/c значно знижувала життєздатність зародків при культивуванні, найвищий же рівень доімплантаційних втрат було зафіксовано для гомозигот BALB/c. Таким чином, нами було показано, що зниження плідності мишей лінії СС57W/Mv з (Ч) за різними характеристиками в системах *in vivo* та *in vitro* співпадає з описаними нами міжлінійними відмінностями таких характеристик у батьківських ліній BALB/c і С57В1/6. Отже, успішне проходження доімплантаційного ембріогенезу забезпечується генотипічними факторами геному зародка, а порушення чи дестабілізація геномів гамет можуть впливати на зародкові клітинні лінії у тварин і передаватися нащадкам, як постійний стан генетичної структури.

Відомо, що зародки миші можуть суттєво відрізнитися за кількістю бластомірів, знаходячись на одній стадії розвитку /Whitten, Dagg, 1962/. На процеси раннього ембріогенезу



Мал.5. Лінійні особливості рівня доімплантаційних втрат при культивуванні ембріонів зі стадії зиготи

суттєво впливають різні кількісні та структурні хромосомні аберації /Dyban, Varanov, 1987/. Однак, при збереженні blastomeres життєздатності нормально здійснюються процеси формування бластоцисти. Тому можна було припустити, що хронічне опромінювання статевих клітин *in vivo* призведе до загального пригнічення швидкості клітинного поділу зародків, яке мало б проявлятися на всіх стадіях доімплантаційного ембріогенезу. За нашими даними (табл.5) кількість клітин у бластоцистах, культивованих *in vitro* зі стадії зиготи, не відрізнялася за генотипічною (стосовно популяційної належності) ознакою. Число клітинних поділів у всіх досліджуваних груп ембріонів виявилось подібним. Отже, зупинки дроблення на одній або двоклітинній стадіях, які ми спостерігали, не можуть пояснюватися загальним неспецифічним пригніченням процесів поділу клітин ембріонів під впливом хронічного опромінювання батьків. Однією з можливих причин дефектів процесів дроблення ембріонів можуть бути різноманітні цитогенетичні пошкодження,

Таблиця 5. Цитологічний аналіз бластоцист, які розвивалися в культурі зі стадії зиготи протягом 96-102 годин.

Типи гамет за популяційною приналежністю донорів ♀ х ♂	Всього бластоцист в аналізі	Кількість на один зародок		
		клітин	мітозів	пікнозів
К К	50	45,3±2,5	1,9±0,2	0,2±0,1
К Ч	77	48,0±2,1	2,5±0,3	0,5±0,1
Ч К	54	50,1±2,9	2,5±0,4	0,4±0,1
Ч Ч	60	48,0±2,5	2,0±0,2	0,5±0,1

К - київська експериментальна популяція мишей лінії СС57W/Mv

Ч - чорнобильська експериментальна популяція мишей лінії СС57W/Mv

які здатні призводити до дестабілізації геному генеративних та соматичних клітин.

**5. Аналіз каріотипічної стабільності соматичних клітин мишей СС57W/Mv з чорнобильської та київської експериментальних популяцій.** Для з'ясування впливу хронічного іонізуючого опромінювання в малих дозах на каріотипічну стабільність геному мишей лінії СС57W/Mv нами було здійснено порівняльний аналіз параметрів цитогенетичної мінливості в клітинах кісткового мозку тварин з (К) та (Ч) популяцій. Отримані дані наведені в табл.6 і свідчать про те, що хронічне іонізуюче опромінювання в малих дозах призводить до глибокої дестабілізації генетичного матеріалу. Так, в групі (Ч) достовірно менша, ніж в контрольній, частка метафазних пластинок в диплоїдним числом  $Xr\ 2n=40$  (при розрахунках з урахуванням різних варіантів анеуплоїдії). Статистично достовірно зросла поява поліплоїдних клітин у кістковому мозку тварин дослідної групи. В цих клітинах спостерігається також підвищена частота міжхромосомного аліття за типом Робертсонівських транслокацій, рівно зросли відносно контрольної групи частоти метафаз з хромосомними аберраціями (хроматидні розвиви, делеції, фрагменти, кільцеві  $Xr$ ) і з порушеною синхронністю розщеплення центромірних районів

Таблиця 6.  
Характеристики каріотипічної мінливості в клітинах кісткового мозку мишей лінії СС57W/Mv з чорнобильської (Ч) та київської (К) експериментальних популяцій.

Каріоти- пічні характе- ристики	Число метафаз 2n=40		Число метафаз з		Число полі- плоїдів		Число метафаз (%)			Всього метафаз
	A-1 (%)	A-2	A-1 (%)	A-2	A-1 (%)	A-2	з асоці- аціями Хр	з АРЦХ	з аберра- ціями Хр	
1	50	65	36	17	14	18	13	9	4	103
2	62	76	25	11	11	13	10	6	5	100
3	59	71	30	15	11	13	12	13	7	104
4	44	54	40	27	16	19	19	16	5	37
(Ч) 5	60	73	25	8	15	19	17	19	5	84
6	60	65	27	20	13	14	11	11	8	75
7	51	51	36	24	14	16	9	6	7	101
8	56	61	24	15	20	23	10	7	3	72
9	51	66	37	18	12	16	16	14	8	49
середнє	55 $\pm$ 2	65 $\pm$ 3	31 $\pm$ 2	17 $\pm$ 2	14 $\pm$ 1	17 $\pm$ 1	13 $\pm$ 1	11 $\pm$ 1,6	5,8 $\pm$ 0,7	
1	64	77	27	12	9	11	6	2	2	100
2	72	78	15	8	13	14	13	0	0	39
3	65	76	27	14	9	10	11	1	0	84
(К) 4	72	82	20	9	8	9	10	0	0	51
5	72	83	22	9	7	8	7	0	2	134
6	74	89	24	8	2	2	11	0	0	100
7	67	81	28	12	5	6	13	2	2	130
середнє	69 $\pm$ 1	81 $\pm$ 2	23 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	9 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	0,7	0,9	

хроматид (АРЦХ).

Феномен АРЦХ в клітинах кісткового мозку мишей з (К) зустрічався в середньому не більше, ніж у 1% метафазних пластинок. В клітинах кісткового мозку тварин (Ч) частота стрічання метафаз з АРЦХ істотно вища. Варто очікувати, що саме ця характеристика цитогенетичної нестабільності піддається менш жорсткому добору на передмейотичних і мейотичних стадіях поділу генеративних клітин і вносить більший внесок в патологію клітинного поділу ембріонів на ранніх стадіях розвитку, ніж такі параметри, як анеуплоїдія і міжхромосомні асоціації. Очевидно, що збільшення частоти поліплоїдизації клітин за будь-яким механізмом також може призводити до появи дефектних гамет та порушень проходження ранніх етапів ембріогенезу.

### ВИСНОВКИ

1. Запропоновано нову модельну систему для вивчення генном-дестабілізуючого впливу хронічного низькодозового опромінення на ряд поколінь ссавців. Її основу складають миші трьох інбредних ліній - СС57W/Mv, С57BL/6, BALB/c. Оскільки генотип мишей СС57W/Mv є похідним від батьківських - BALB/c та С57BL/6 - стає можливим виділення з феноменологічних ефектів генотоксичної дії мутагенів генотипічних та епігенетичних аспектів на організменому, клітинному та молекулярно-генетичному рівнях.

2. Показано достовірно знижену плідність трьох послідовних поколінь фертильних самиць лінії СС57W/Mv з чорнобильської експериментальної популяції за показниками "кількість погонів протягом життя" та "кількість народжених в погоні".

3. Встановлено, що зниження плідності мишей СС57W/Mv з чорнобильської експериментальної популяції пов'язано в значній мірі із зростанням в 2-3 рази рівня доімплантаційних втрат.

4. При хронічному низькодозовому опроміненні в умовах запропонованої модельної системи критичним періодом при формуванні та виживанні ооцитів мишей лінії СС57W/Mv є ембріональний період розвитку організму, а при формуванні статевих клітин самців - стадії стовбурових сперматогоніїв А1 - А4 в сперматогенному епітелії.

5. В експериментах in vitro показано, що опромінення мишей інбредної лінії СС57W/Mv протягом неонатального розвитку

приводить до порушень доімплантаційних стадій ембріогенезу нащадків. Для ембріонів, отриманих від схрещування обох опромінених батьків, зафіксовано найвищий рівень доімплантаційної загибелі на всіх контрольованих стадіях.

6. В клітинах кісткового мозку мишей генотипу CC57W/Mv під впливом хронічного іонізуючого опроміювання в малих дозах спостерігаються зміни каріотипічних характеристик, які можуть лежати в основі порушень раннього ембріонального розвитку.

7. Показано, що зниження плідності хронічно опроміюваних мишей лінії CC57W/Mv за різними показниками в системах *in vivo* та *in vitro* співпадає з міжлінійними відмінностями таких характеристик у батьківських ліній BALB/c і C57Bl/6. Це свідчить про можливість реалізації генотоксичної дії хронічного іонізуючого опромінення в малих дозах на епігенетичному рівні.

#### Список робіт, опублікованих за темою дисертації

1. Столина М.Р., Морозова Л.М., Соломко А.П. Оптимізація системи для проведення генетико-ембріологічних досліджень на інбредних лініях мишей. 1. Сравнительная оценка сезонной плодовитости самок мышей линий BALB/cLac, C57Bl/6j и ICR // Биополимеры и клетка. -1992. -8. -N2. -С.49-52.
2. Морозова Л.М., Столина М.Р., Соломко А.П. Оптимізація системи для проведення генетико-ембріологічних досліджень на інбредних лініях мишей. 2. Сравнение способности к оплодотворению *in vitro* у инбредных линий мышей C57Bl/6j и BALB/cLac // Биополимеры и клетка. -1992. -8. -N3. -С.33-36.
3. Соломко А.П., Столина М.Р. Генетические эффекты у самцов черновыльської популяції лабораторних мишей CC57W/Mv, індукційовані малими дозами комбінованого облучення // Тез. докл. конференції СНГ "Актуальні проблеми впливу іонізуючих випромінювань на репродуктивну функцію. -Обнинск. -1992. -С.67.
4. Столина М.Р., Соломко А.П. Аналіз репродуктивної функції самок лабораторних мишей CC57W/Mv із черновыльської та киевської популяцій // Тез. докл. конференції СНГ "Актуальні проблеми впливу іонізуючих випромінювань на репродуктивну функцію. -Обнинск. -1992. -С.69-70.
5. Solomko A.P., Stolina M.R. Effect of low doses of radiation on fertility of CC57W mice // 1-th Conf. "Medical consequences of the Chernobyl accident" (Kiev, 1992). Proc. KOLISKA Found. -1993. -N1. -P.19.

6. Столина М.Р. Влияние хронического действия низких доз сочетанного внешнего и внутреннего излучения на репродуктивную функцию самцов и самок мышей линии СС57W/Mv // Биополимеры и клетка. -1993. -9. -N3. -С.49-52.

7. Столина М.Р., Соломко А.П., Глазко Т.Т. и др. Влияние малых доз хронического ионизирующего излучения на ранние этапы эмбриогенеза у мышей // Докл.АН Украины. -1993. -N6. -С.171-176.

8. Столина М.Р., Соломко А.П. Влияние малых доз сочетанного ионизирующего излучения на доимплантационную гибель зародышей мышей СС57W //Тез.докл.Радиобиологического съезда (Киев,1993). -Пушино. -1993. -Ч.3. -С.964-965.

9. Глазко Т.Т., Столина М.Р., Соломко А.П. и др. Кариологические изменения в клетках костного мозга мышей линии СС57W, индуцируемые низкими дозами ионизирующего излучения // Тез.докл. Радиобиологического съезда (Киев, 1993). -Пушино. -1993. -Ч.1. -С.233-234.

*М. Столина*

402855

ABEY...  
**AB 29.771**