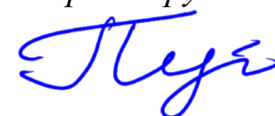


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
РАДИОЛОГИИ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи



Пугачева Екатерина Николаевна

**Морфологические особенности овофолликулогенеза после фракционного
локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой
кислоты**

1.5.22. Клеточная биология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Демяшкин Григорий Александрович

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	17
1.1. Преждевременная недостаточность яичников	17
1.2. Радиационно-индуцированная преждевременная недостаточность яичников	22
1.3. Молекулярные механизмы радиационно-индуцированного повреждения яичника	25
1.4. Радиопротекторы. Роль антиоксидантов в предотвращении радиационно- индуцированного повреждения	32
1.5. Заключение по обзору литературы.....	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1. Дизайн эксперимента.....	38
2.2. Моделирование радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников	41
2.3. Лекарственные препараты, использованные для радиопротекции.....	45
2.4. Методы исследования.....	47
2.4.1. Оценка гормонального статуса.....	47
2.4.2. Анализ маркеров оксидации и ферментов антиоксидантной системы	48
2.4.3. Гистологическое исследование.....	49
2.4.4. Морфометрическое исследование	49
2.4.5. Гистохимическое исследование	50
2.4.6. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование.....	50
2.4.7. TUNEL-анализ	52
2.4.8. Молекулярно-генетическая оценка	53
2.4.9. Статистические методы.....	54
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	55
3.1. Характеристика лабораторных животных.....	55
3.2. Оценка гормонального статуса.....	56

3.3. Иммуноферментный анализ редокс-гомеостаза в яичниках	59
3.4. Макроскопическое и цитологическое исследование.....	62
3.5. Гистологическое исследование яичников	65
3.5.1. Гистологическая картина яичников контрольной группы	65
3.5.2. Гистологическая картина яичников опытных групп.....	67
3.5.3. Морфометрическая оценка овариального резерва	71
3.6. TUNEL-анализ	76
3.7. Оценка жизненного цикла.....	80
3.7.1. Молекулярно-генетический анализ экспрессии генов Ki-67, Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9.....	80
3.7.2. Молекулярно-генетический анализ активности сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a.....	84
3.8. Оценка воспалительной реакции.....	87
3.8.1. Молекулярно-генетический анализ экспрессии TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 ..	87
3.8.2. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование тучных клеток микроокружения яичника.....	90
3.9. Оценка рисков развития радиационно-индуцированного фиброза	93
3.9.1. Гистохимическое исследование	93
3.9.2. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование факторов фиброгенеза.....	96
3.9.3. Молекулярно-генетический анализ экспрессии участников сигнального пути TGF/SMAD.....	100
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	104
4.1. Радиационно-индуцированное повреждение яичников на ранних сроках	104
4.2. Радиационно-индуцированная преждевременная недостаточность яичников.....	107
4.3. Эффективность и безопасность предлучевого применения аскорбиновой кислоты.....	110
4.4. Итоги выполнения диссертационной работы.....	116
ВЫВОДЫ	118

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	120
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время, несмотря на высокую распространенность среди женщин репродуктивного возраста преждевременной недостаточности яичников, отсутствуют отечественные рекомендации по ведению пациенток с этой патологией овофолликулогенеза, что значительно затрудняет диагностику данного состояния, частота которого неуклонно возрастает и варьирует в широких пределах, достигая в некоторых популяциях до 13 % [1, 175]. В многочисленных крупных исследованиях показано, что ионизирующее излучение при лучевой терапии злокачественных новообразований органов брюшной полости и малого таза помимо атипических клеток способно поражать здоровые клетки овариальных фолликулов, приводя к уменьшению их количества и развитию преждевременной недостаточности яичников и бесплодия в отдаленные сроки [34, 59, 92, 149]. Поэтому, выбор вида ионизирующего излучения, оптимизация режимов и методов радиотерапии являются высоко актуальным направлением в контексте поиска способов снижения частоты встречаемости этого состояния [6, 13, 14, 16, 47, 70, 94].

Вторым, не менее важным направлением современной радиобиологии является поиск и апробация методов, способных снижать степень выраженности постлучевого повреждения структур яичника и нарушения овофолликулогенеза. Наиболее интересным представляется комплексное исследование радиопротекторного действия субстрата из группы антиоксидантов – аскорбиновой кислоты, эффективность которого уже была продемонстрирована в других работах в моделях радиационно-индуцированного повреждения различных органов [67, 128, 136, 152, 172, 186].

Степень разработанности темы исследования

Учитывая высокую чувствительность структур яичника к ионизирующему излучению, современные способы радиотерапии приводят к снижению овариального резерва и преждевременной потере большого количества активных овариальных фолликулов, что требует оптимизации существующих схем лучевой терапии злокачественных новообразований этой области, в том числе – путем внедрения более «щадящих» видов ионизирующего излучения, таких как локальное облучение электронами [87].

Также существует необходимость в поиске радиопротекторов, которые могут снизить дозовую нагрузку (или ее переносимость) на овариальные фолликулы и предотвратить развитие преждевременной недостаточности яичников и фиброза в отдаленные сроки. Аскорбиновая кислота с ее выраженным антиоксидантным свойством, может быть перспективным кандидатом для использования в качестве радиопротектора. Известно, что она эффективно нейтрализует свободные радикалы, предотвращая повреждения ДНК и снижая риск клеточной гибели в различных органах [32, 35, 77, 78]. Следует подчеркнуть, что молекулярные механизмы действия аскорбиновой кислоты, в том числе ее регулирующее влияние на редокс-гомеостаз, репарацию ДНК, жизненный цикл фолликулярных клеток, воспалительную реакцию и сигнальные пути, ответственные за выживаемость овариальных фолликулов и развитие фиброза на поздних сроках, остаются недостаточно изученными в контексте радиопротекции яичников. Для более глубокой оценки ее потенциала необходимы комплексные исследования, которые позволят выяснить точки приложения позитивных эффектов аскорбиновой кислоты и подтвердить ее радиопротекторные свойства, которые могут быть использованы в клинической практике врачей-онкологов.

Поэтому, проведение доклинических исследований в данном направлении с использованием молекулярно-биологических и молекулярно-генетических методов раскроет механизмы регуляции локального гомеостаза яичника как при нарушении овофолликулогенеза после воздействия электронами, так и его

нивелирования введением аскорбиновой кислоты. Это может способствовать персонализированному подбору методов радиотерапии и радиопротекции, что, в свою очередь, приведет к снижению частоты и тяжести радиационно-индуцированной недостаточности яичников у женщин репродуктивного возраста со злокачественными новообразованиями органов малого таза и брюшной полости.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – выявление морфофункциональных изменений овофолликулогенеза при преждевременной недостаточности яичника, индуцированной локальным облучением электронами, и при введении аскорбиновой кислоты.

Задачи исследования:

1. Провести морфологический анализ яичника на ранних и поздних сроках после введения аскорбиновой кислоты и локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

2. Оценить функциональный статус яичника и овариальный резерв на основании показателей уровней гормонов (ФСГ, АМГ, ЛГ, эстрадиол) на ранних и поздних сроках после введения аскорбиновой кислоты и локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

3. Оценить редокс-гомеостаз в гомогенате яичника на основании анализа уровней малонового диальдегида, супероксиддисмутазы и каталазы на ранних и поздних сроках после введения аскорбиновой кислоты и локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

4. Оценить экспрессию факторов пролиферации (Ki-67) и апоптоза (caspase 3, caspase 8, caspase 9), степень фрагментации ДНК (TUNEL-методом) в структурах яичника на ранних и поздних сроках после введения аскорбиновой кислоты и локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

5. Оценить уровни экспрессии цитокинов (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10) и маркеров тучных клеток (Chymase, Tryptase) в яичниках на ранних и поздних сроках после введения аскорбиновой кислоты и локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

6. Оценить уровни экспрессии протеинов сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a в яичниках на ранних и поздних сроках после введения аскорбиновой кислоты и локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

7. Оценить состояние волокнистого компонента и степень фиброгенеза в яичнике на основании уровней экспрессии участников сигнального пути TGF/SMAD, маркеров α -SMA, TGF- β и Collagen-1, а также гистохимической реакции на ранних и поздних сроках после введения аскорбиновой кислоты и локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

Научная новизна

На основании проведенного гистологического и молекулярно-биологического исследований впервые выявлено, что локальное облучение яичника электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр через три месяца приводит к снижению количества овариальных фолликулов на разных стадиях развития, истощению овариального резерва и появлению признаков радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников.

Впервые продемонстрировано, что аскорбиновая кислота приводит к сохранению гормонального статуса, поддерживая нормальные концентрации гонадотропных гормонов, показателя овариального резерва (антимюллера гормона) и эстрогении при локальном воздействии электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

Впервые установлено, что предлучевое использование аскорбиновой кислоты сопровождается снижением оксидативного стресса и индукцией ферментов эндогенной антиоксидантной защиты в гомогенате яичников после локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр согласно уровням малонового диальдегида, супероксиддисмутазы и каталазы.

Впервые доказано, что аскорбиновая кислота частично препятствует фрагментации ДНК, возникающей после локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр, что показано TUNEL-методом.

Впервые установлено, что предлучевое введение аскорбиновой кислоты снижает апоптотическую гибель структур яичника (экспрессия *Caspase 3* ↓, *Caspase 8* ↓, *Caspase 9* ↓), индуцируя пролиферативную активность (экспрессия *Ki-67* ↑) посредством модуляции сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a, ответственных за сохранение овариального резерва и регуляцию жизненного цикла клеток гранулезного слоя. В то же время при локальном воздействии электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр активируется преимущественно внутренний путь апоптоза.

Впервые обнаружено, что аскорбиновая кислота способствует подавлению экспрессии ключевых участников воспалительной реакции (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10), а также снижению количества тучных клеток (преимущественно химаза-позитивного фенотипа), наблюдаемых после локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр на ранних сроках эксперимента. На третьем месяце аскорбиновая кислота приводит к активации экспрессии противовоспалительного IL-10 и преобладанию химаза-позитивного фенотипа тучных клеток, ограничивая воспалительную реакцию и фиброз в яичниках.

Впервые показано антифибротическое действие аскорбиновой кислоты в отношении радиационно-индуцированного фиброза посредством ингибирования экспрессии участников TGF/SMAD-сигнального пути, активации фибробластов и

клеток эндотелия кровеносных сосудов, что способствовало снижению накопления коллагена в экстрацеллюлярном пространстве.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость научной работы основана на дополнении существующих данных о гистологических, молекулярно-биологических и молекулярно-генетических изменениях в овариальных фолликулах после локального воздействия электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр, их модуляции предлучевым введением аскорбиновой кислоты. Результаты проведенного исследования подтверждены радиопротекторные свойства этого субстрата, а именно – антиоксидантное, антиапоптотическое, противовоспалительное и антифибротическое действие при воздействии локального облучения электронами, а также снижение рисков развития радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников и фиброза. Коэкспрессия α -SMA, TGF- β и Collagen-1 преимущественно в клетках фибробластического ряда и эндотелии кровеносных сосудов яичника является предиктором фиброгенеза.

Аскорбиновая кислота способна ингибировать оба взаимодополняющих пути лучевого повреждения – прямого (фрагментация ДНК и его эффекты, формирование токсичных свободных радикалов) и косвенного (реакции оксидативного стресса). Аскорбиновая кислоты способна модулировать сигнальные пути PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a, ответственные за сохранение овариального резерва и регуляцию жизненного цикла клеток гранулезного слоя, а также активатор фиброгенеза – путь TGF/SMAD.

Аскорбиновая кислота в отдаленные сроки после облучения приводит к продукции тучными клетками химазы, разрушающей компоненты экстрацеллюлярного матрикса, что предотвращает развитие фиброза. В то же время, максимальную активность эта протеаза проявляет при воздействии

электронами на ранних сроках, вызывая деструкцию межклеточного вещества и распространение свободных радикалов, увеличивающих площадь лучевого повреждения. На поздних сроках после облучения происходит активация другого белка тучных клеток – триптазы, являющейся маркером фиброза.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты о степени лучевых повреждений овариальных фолликулов после фракционного локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, а также возможности медикаментозной радиопротекции овариального резерва предлучевым введением аскорбиновой кислоты необходимо учитывать при назначении электронотерапии злокачественных новообразований органов малого таза и брюшной полости врачами-радиотерапевтами и врачами-онкологами. Кроме того, в радиобиологической, онкологической и гинекологической практике при назначении электронотерапии следует учитывать дозозависимое развитие фиброза, радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников и бесплодия с целью возможной его протекции и профилактики, а морфологическая оценка постлучевого состояния овариальных фолликулов, в том числе – в отдаленные сроки после воздействия электронами, может быть использована в работе врача-патологоанатома.

В результате проведенного исследования **решена актуальная научная задача** – выявлено радиопротекторное действие аскорбиновой кислоты в отношении овариальных фолликулов при радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников, вызванной воздействием электронами в режиме фракционирования.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование проводили в соответствии с принципами, изложенными в отечественных и зарубежных руководствах по работе с лабораторными животными. В ходе работы использовали гистологический морфометрический, гистохимический, иммуногистохимический,

иммуноферментный, молекулярно-генетический и статистические методы анализа. Лабораторные животные – самки крыс породы Вистар (n=180), их локально облучали электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр, перед каждым облучением вводили аскорбиновую кислоту (доза 50 мг / кг за 1 час) или амифостина (доза 200 мг / кг за полчаса).

Животных всех групп обезболивали перед облучением, а завершение эксперимента осуществляли путем введения высокой дозы комбинированного анестетика. Все манипуляции выполняли в строгом соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (ЕЭС, Страсбург, 1985) и Хельсинской декларацией Всемирной медицинской ассоциации.

Положения, выносимые на защиту

1. Введение аскорбиновой кислоты приводит к частичному предотвращению развития признаков преждевременной недостаточности яичников, индуцированной локальным облучением электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр, в виде функциональных и структурных изменений: дисбаланс половых гормонов, резкое снижение числа фолликулов на всех стадиях роста и увеличение доли атретических фолликулов на ранних сроках, а также фиброгенез на поздних сроках.

2. Основой механизма радиопротекции аскорбиновой кислоты является ее способность к связыванию продуктов радиолитического распада воды (MDA) и индукции эндогенной антиоксидантной системы (SOD, CAT), что приводит к снижению уровня фрагментации ДНК (TUNEL) и клеточной гибели путем апоптоза (преимущественно внутренним, *Caspase 9*↓) и стимуляции пролиферации клеток гранулезного слоя (*Ki-67*↑) через модуляцию сигнальных путей PI3K/AKT, что снижает продукцию воспалительных цитокинов и активацию тучных клеток

фолликулярного микроокружения, наиболее выраженных в группе локального облучения электронами в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

3. Предлучевое использование аскорбиновой кислоты предотвращает развитие радиационно-индуцированного фиброза в яичниках посредством ингибирования сигнального пути TGF- β /SMAD4, препятствуя активации фибробластов и других клеток волокнистой соединительной ткани, оцененной по уровням α -SMA и избыточной экспрессии компонентов экстрацеллюлярного матрикса (коллаген-1), генерируемого в ответ на воздействие локального облучения электронами в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация на тему «Морфологические особенности овофолликулогенеза после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук соответствует шифру специальности 1.5.22. Клеточная биология. Области исследования диссертационной работы соответствуют пунктам: 10, 13, 14 паспорта научной специальности 1.5.22. Клеточная биология: пункту 10. Изучение закономерностей цито- и гистогенеза, клеточной дифференцировки, физиологической и репаративной регенерации тканей, а также, регуляции этих процессов; пункту 13. Изучение молекулярных, иммунологических, цитохимических и физиологических аспектов жизненного цикла клеток при экспериментальных (в том числе повреждающих) воздействиях. Изучение пролиферации клеток, старения и клеточной гибели; пункту 14. Исследование адаптации клеток и тканей к действию различных факторов внешней среды.

Внедрение результатов диссертации в практику

Результаты диссертационного исследования внедрены в лечебную работу федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Акт внедрения (использования) новой технологии б/н от 11.09.2024 г. Полученные в ходе исследования результаты внедрены в учебный процесс Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) при изучении дисциплины, читаемой аспирантам по направлению подготовки / научной специальности 1.5.22. Клеточная биология. Акт о внедрении №504 от 23.09.2024 г.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень обоснованности результатов обеспечена достаточным объемом репрезентативного материала. В работе применены современные методы статистического анализа. Выполнено сопоставление собственных данных с результатами, полученными другими исследователями изучаемой проблемы. На основании разработанных критериев включения и исключения сформированы группы с однородной выборкой – самки крыс породы Вистар (вес 180 ± 20 грамм; возраст 9 – 10 недель; $n=180$).

В работе использованы методы оценки достоверности различий, зарекомендовавшие себя как наиболее эффективные статистические модели, чаще всего используемые в медицине. Данные были формализованы и внесены в электронные таблицы Microsoft Excel, содержащие необходимую информацию согласно дизайну.

Для статистического анализа данных использовались программные пакеты SPSS версии 12.0 for Windows (IBM Analytics, США) и Microsoft Excel (версия

14.0.4760.1000, 32-разрядная). Количественные данные предварительно проверяли на нормальность распределения с использованием теста Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения данные представляли в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD). Для статистического сравнения двух групп использовался t-критерий Стьюдента. При оценке различий между несколькими группами применялся однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). В случае, если распределение данных отклонялось от нормального, применялись непараметрические методы: тест Манна-Уитни для парных сравнений и тест Крускала-Уоллиса для оценки различий между более чем двумя группами, дополненный post-hoc тестом Данна для уточнения значимых различий. Во всех случаях уровень значимости был установлен на уровне $p < 0,05$, что было установлено до начала исследования

Фактический материал, проанализированный в диссертации, полностью соответствует первичной документации.

Основные результаты диссертационного исследования были доложены и всесторонне обсуждены на: VII Международном форуме онкологии и радиотерапии «Ради жизни» (г. Москва, 2024 г.); XVIII Международной научно-практической конференции молодых ученых-медиков «СОВА-2024» (г. Иваново, 2024 г.).

Апробация работы состоялась 11 декабря 2024 (протокол №14) на заседании межкафедральной конференции Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России и ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно выполнил основные этапы диссертационной работы: постановка цели и определение задач, дизайна и методов клеточной биологии, анализ и статистическая обработка полученных результатов, обоснование научной новизны, теоретической и практической значимости, основных положений и

выводов. Автор лично выполнял гистологическое, морфометрическое, гистохимическое (трихромом по Массону), иммуногистохимическое (α -SMA, TGF- β , Coll-1, TUNEL-метод), молекулярно-генетическое (маркеры PI3K/АКТ/mTOR, PI3K/АКТ/FOXO3, TGF/SMAD сигнальных путей; маркеры жизненного цикла – *Ki-67*, *caspase 3*, *caspase 8*, *caspase 9*) исследования, иммуноферментный анализ (малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза, каталаза). Диссертантом в соавторстве подготовлены к печати публикации по теме диссертационной работы.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования автором опубликовано 6 работ, в том числе 1 научная статья в изданиях из базы данных RSCI, 2 статьи в журнале, включенном в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 статья в издании, индексируемом в международной базе (Scopus), 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа представляет собой рукопись на русском языке объемом 142 страницы машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, главы описания материала и методов, главы, посвященной результатам собственного исследования, обсуждения результатов исследования и заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа иллюстрирована 24 таблицами и 32 рисунками. Список цитируемой литературы включает 189 источников, из которых 23 отечественных, 166 – зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Преждевременная недостаточность яичников

Определение

Определение «Преждевременная недостаточность яичников» (ПНЯ) дано Европейским обществом по репродукции и эмбриологии человека (European society of Human reproduction and embryology, ESHRE, 2016) и является наиболее актуальным на сегодняшний день. ПНЯ – синдром, в основе которого лежит прекращение овариальной функции у женщин до 40 лет, и характеризуется нарушением менструальной функции (олиго-/ аменорея), повышением уровней гонадотропинов (фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона) и снижением концентрации эстрадиола [19, 63]. В настоящее время, несмотря на высокую распространенность, отсутствуют отечественные рекомендации по ведению пациенток с ПНЯ, что значительно затрудняет диагностику данного состояния.

Диагностические критерии

По данным Европейского общества по репродукции и эмбриологии человека, к обязательным критериям ПНЯ относятся [22]:

- Наличие вторичной аменореи (более чем 4–6 месяцев);
- Возраст пациентки 40 лет;
- Повышенные значения уровней гонадотропных гормонов, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) 25,0 МЕ/л, определенные двукратно с разницей в 4–6 недель.

Некоторыми авторами предложены дополнительные критерии. Так, часто в диагностические показатели также включается гипоестрогения, определенная по уровню эстрадиола [1, 121].

Этиология и эпидемиология

Распространенность данного состояния неуклонно возрастает и варьирует в широких пределах, достигая в некоторых популяциях до 13 % женщин репродуктивного возраста [175]. Этот факт особенно подчеркивает актуальность проведения исследований в данном направлении. При этом, ПНЯ остается полиэтиологическим заболеванием, на развитие которого может влиять большое число факторов, а в 90 % случаев так и не удастся окончательно установить причину [171]. Так, существуют молекулярно-генетические и гормональные причины развития ПНЯ, к которым относятся редкие мутации в генах рецепторов гонадотропных гормонов (ФСГ и ЛГ) с развитием резистентности к ним яичников, что приводит к нарушению процесса созревания овариальных фолликулов и нарушению их овуляторной функции [132]. Помимо этого, к развитию ПНЯ предрасполагают многочисленные ятрогенные причины, такие как: овариэктомия, химио- и / или радиотерапия в анамнезе, а также некоторые инфекционные заболевания (эпидемический паротит, ветряная оспа, малярия, шигеллез, туберкулез и др.), которые способствуют гибели фолликулярных клеток и сокращению функциональной массы овариальных фолликулов (снижению овариального резерва), то есть – преждевременной недостаточности яичников [26].

Таким образом, этиологические причины возникновения ПНЯ могут быть поделены на следующие группы:

Генетические факторы:

- *Хромосомные аномалии.* Наиболее распространенная генетическая причина – это синдром Шершевского – Тёрнера (моносомия X). Также могут быть вовлечены хромосомные перестройки, такие как транслокации или инверсии (изохромосома X (i), кольцевая X-хромосома, делеция длинного плеча X-хромосомы (Xq), делеция короткого плеча X-хромосомы (Xp)) [11].

- *Мутации в генах.* Некоторые мутации в определенных генах, таких как гены, ответственные за фолликулогенез (например, FMR1), могут привести к ранней менопаузе. Упомянутая мутация в гене FMR1 связана с премутацией, вызывая развитие преждевременного снижения овариального запаса. Помимо

этого, нарушения экспрессии участников сигнальных путей *p16* и *SIRT1/FOXO1*, РНК *NOTA1R*, фактора транскрипции *NOBOX*, а также генах *FIGLA*, *GDF9*, *FOXL2*, *FOXO3*, *PTHV1*, *ADAMST19*, *LAMC1*, *STAG3*, *BRCA1* и *BRCA2* и др. по данным различных авторов также ассоциированы с развитием ПНЯ в различных популяциях [1, 7, 48, 96].

Аутоиммунные заболевания:

- Аутоиммунный процесс может вызвать повреждение яичников, когда иммунная система ошибочно атакует собственные клетки организма. Примером является аутоиммунный овариальный синдром, при котором формируются антитела к клеткам яичников. Ожирение, диабет, заболевания щитовидной железы, болезнь Аддисона и другие аутоиммунные расстройства также могут увеличивать риск развития ПНЯ [8, 38, 95, 165].

Инфекции:

- Различные инфекционные заболевания – цитомегаловирус, парвовирус, вирус герпеса, эпидемический паротит, малярия, шигеллез, COVID-19, вирус иммунодефицита человека, туберкулез, и др. могут вызвать повреждение яичников, приводя к преждевременному угнетению их функциональной активности [20, 131, 188].

Токсические экзогенные воздействия:

- Химические вещества и радиация могут нарушать функцию яичников. Это может происходить вследствие воздействия на организм токсичных веществ, например при проведении химиотерапии или радиотерапии, которые часто используются при лечении онкологических заболеваний [6, 13, 14, 16, 47, 70, 94].

- Вредные экологические факторы, включая загрязнение воздуха, химикаты в воде и пище, курение и др. могут способствовать повреждению яичников и ускорению их недостаточности [50, 62].

Синдромы и заболевания, ассоциированные с нарушением репродуктивной функции:

- Различные синдромы, такие как синдром поликистозных яичников (СПКЯ), могут сопровождаться преждевременной недостаточностью яичников, особенно в сочетании с другими нарушениями со стороны эндокринной системы [126].
- Хронические заболевания, такие как эндометриоз, могут также привести к повреждению яичников и нарушению их функции [54, 72].

Психоэмоциональные и физические стрессы:

- Хронический стресс, резкие изменения массы тела или физическое истощение могут нарушить нормальное функционирование гипоталамо-гипофизарно-яичниковой оси, что приводит к преждевременному истощению яичников [106, 165].

Наследственные и семейные факторы:

- Если в семье уже имелись случаи преждевременной недостаточности яичников, риск возникновения этой патологии у родственников увеличивается, что свидетельствует о наличии наследственной предрасположенности [76, 79].

Таким образом, этиологические причины ПНЯ могут быть многогранными и включать как генетические, аутоиммунные, инфекционные, так и внешние (экологические) факторы. Точные механизмы развития этой патологии диктуют необходимость комплексного персонализированного подхода к диагностике и лечению преждевременной недостаточности яичников.

Уже упомянутое ранее Европейское общество по репродукции и эмбриологии человека с 2016 года заявляет о критической необходимости снижения частоты встречаемости преждевременной недостаточности яичников в популяции, отмечая наиболее перспективные направления предотвращения развития этой патологии:

- изменение хирургической гинекологической тактики с целью максимального исключения ятрогенного удаления и / или повреждения функционально активных овариальных фолликулов;

- изменение образа жизни (например, отказ от курения), а также лечение сопутствующей патологии;

- модификация методов лечения онкологических и хронических заболеваний органов малого таза (в том числе, повышение безопасности этих методов для здоровой части яичника, в которой патологический процесс отсутствует) [63].

Таким образом, оптимизация режимов радиотерапии злокачественных новообразований органов брюшной полости и малого таза (при которой происходит облучение и гибель фолликулярных клеток) является высоко актуальным направлением в контексте поиска способов снижения частоты встречаемости преждевременной недостаточности яичников.

Осложнения. Помимо очевидного снижения репродуктивной функции вплоть до перманентной формы бесплодия, другие симптомы преждевременной недостаточности яичников (в первую очередь, гипоестрогении), такие как приливы, раздражительность, ночная потливость, нарушения сна, сухость и раздражение влагалища, а также боль при половом акте, могут доставлять женщинам значительный дискомфорт [82]. Тем не менее, они не представляют угрозы для жизни и могут быть облегчены с помощью заместительной гормональной терапии. Однако гормональная терапия может иметь серьезные побочные эффекты, включая повышенный риск тромбозов глубоких вен, тромбоэмболии легочной артерии и инсультов. Кроме того, долгосрочные последствия преждевременной недостаточности яичников включают ухудшение когнитивных функций и снижение плотности костной ткани, что может привести к остеопорозу, остеопении и повышенному риску переломов [134]. Однако наибольшее влияние ПНЯ оказывает на сердечно-сосудистую систему женщины, увеличивая риск преждевременной смерти в результате прогрессирования ишемической болезни сердца [46]. Кроме того, бесплодие, вызванное ПНЯ, может привести к длительным психосоциальным последствиям, таким как тревожность, депрессия и сексуальные расстройства, значительно снижая качество жизни пациентов, особенно прошедших лучевую терапию по поводу злокачественного новообразования [101, 182].

1.2. Радиационно-индуцированная преждевременная недостаточность яичников

Многочисленные крупные исследования доказали, что лучевая терапия злокачественных новообразований (воздействие ионизирующего излучения) помимо таргетных атипических клеток способна поражать здоровые клетки овариальных фолликулов, приводя к сокращению их количества и развитию преждевременной недостаточности яичников и бесплодия в отдаленные сроки [34, 59, 92, 149].

Несмотря на то, что степень постлучевых осложнений со стороны яичников значительно варьирует в зависимости от множества факторов (таких как доза, режим, график фракционирования, время экспозиции), в том числе со стороны пациента (возраст, локализация и радиочувствительность первичной опухоли), преждевременная недостаточность яичников может проявиться достаточно быстро. Это связано с высокой степенью радиочувствительности фолликулярных клеток гранулезной оболочки яичника ввиду их активной пролиферации и дифференцировки (в соответствии с правилом Бергонье-Трибондо) [187].

По мнению некоторых авторов, доза общего облучения (всего тела) более 6 Гр значительно увеличивает риск развития преждевременной недостаточности яичников, в то время как в препубертатном возрасте пациентки могут переносить значительно более высокие дозы [159]. Так, в одном когортном исследовании, проведенном на 215 детях, прошедших лечение рака, авторы отметили, что лучевая терапия, наравне с алкилирующими химиотерапевтическими препаратами прокарбазином и циклофосфамидом, является лидирующей причиной развития преждевременной недостаточности яичников [25].

Следует отметить, что до недавнего времени лучевую терапию использовали только для паллиативного ведения рака яичника, что значительно ограничивало проведение научных исследований в этом направлении. Несколько ретроспективных исследований продемонстрировали противоопухолевую эффективность лучевой терапии в дозе 45–60 Гр в фракциях по 1,8–2 Гр с

достижением показателей локального контроля опухоли 89–100 % [150]. Тем не менее, авторы многих исследований не считают подобные исследования окончательным доказательством противоопухолевой эффективности ионизирующего излучения в качестве монотерапии ввиду малой выборки и отсутствия сравнения с современными схемами химиотерапии, что требует проведения новых исследований в области подбора и анализа степени и глубины радиационных эффектов в яичниках [151]. Тем не менее, большинство авторов сходятся во мнении, что лучевая терапия обладает менее выраженными отдаленными токсическими эффектами при сравнении со стандартными схемами химиотерапии [88].

В недавнем исследовании была предложена прогностическая модель, позволяющая путем расчета выяснить предполагаемые сроки развития ранней менопаузы у пациенток, прошедших лучевую терапию в различных дозах. Согласно этой модели, у женщин 27 лет, яичники которых облучили в низкой дозе (например, 4 Гр), развивается преждевременная недостаточность с исходом в раннюю менопаузу на 50 % раньше, чем у здоровых, то есть – в 40 лет. Таким образом, можно говорить о том, что в данной ситуации овариальный резерв данной пациентки в результате воздействия ионизирующего излучения снизился на количество фолликулов, необходимое для ≈ 11 лет функционирования яичника [130]. Для решения этой проблемы, авторы предлагают исследование и введение в практику более «щадящих» методов лучевой терапии в максимально низких (при этом эффективных в отношении атипических клеток) дозах, например, - внешнее облучение пучками, а также методы лучевой терапии с модулированной интенсивностью (IMRT), лучевой терапии с объемной модулированной дугой (VMAT) и / или интраоперационного облучения в комбинации с хирургической резекцией опухоли. Авторы полагают, что это позволит снизить дозу, получаемую яичниками женщин репродуктивного возраста, и сохранить овариальный резерв [130]. Важно отметить, что при всех перечисленных «щадящих» методах лучевой терапии могут быть использованы электроны, однако их введение в клиническую практику еще остается предметом дискуссий [117, 136, 172].

Так, учитывая потенциальное применение лучевой терапии взамен высоко токсичным схемам химиотерапии диктует необходимость в проведении исследований, посвященных поиску способов снижения отдаленных эффектов ионизирующего излучения в яичниках, а также раскрытию молекулярных механизмов радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников. Еще более интересным является исследование электронов как наиболее перспективного вида ионизирующего излучения, высокая безопасность которого в отношении здоровых тканей (по сравнению с другими видами ионизирующего излучения, применяемыми сегодня – X- и γ -лучами) в сочетании с не менее высокой противоопухолевой эффективностью делает их кандидатом на место наиболее оптимального метода выбора для лечения злокачественных новообразований некоторых органов брюшной полости и малого таза, особенно при использовании методик IORT, IMRT, VMAT, VHEE и FLASH [39, 73, 87, 133]. При этом, проникающая способность электронов по сравнению с другими видами ионизирующего излучения намного ниже, что позволяет более прицельно воздействовать на опухоль, предотвращая повреждение нормальных нижележащих органов и тканей, попадающих в зону облучения (Рисунок 1.1).

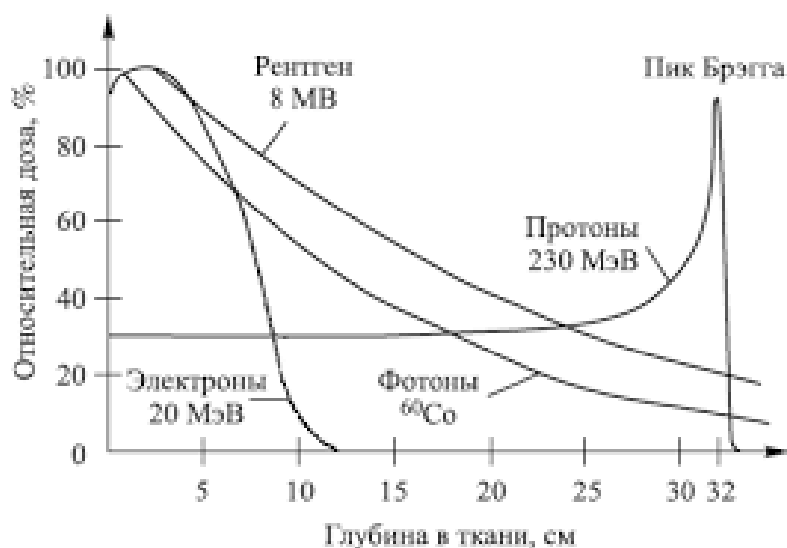


Рисунок 1.1 – Проникающая способность различных видов ионизирующего излучения и распределение относительной дозы (в %) в биологических тканях (в см). Электроны действуют поверхностно даже при энергии 20 МэВ, в то время как рентгеновское (X) излучение, гамма-лучи (^{60}Co) и протоны (энергия 230 МэВ и выше) способны проникать более чем на 30 сантиметров

1.3. Молекулярные механизмы радиационно-индуцированного повреждения яичника

Молекулярные механизмы токсического действия ионизирующего излучения и алкилирующих химиотерапевтических препаратов практически идентичны. Практически во всех органах и тканях оно классически заключается в активации двух взаимодополняющих путей повреждения клеток – прямом (повреждение генетического материала и его эффекты, формирование токсичных свободных радикалов) и косвенном (дальнейшие реакции, запускаемые при оксидативном стрессе, вызванном генерацией и дальнейшим накоплением свободных радикалов) [56, 178].

Прямое воздействие на ДНК и молекулярную воду. Способность ионизирующего излучения к ионизации определяет возможность прямого повреждения цепей ДНК (как ядерной, так и митохондриальной) в клетках, попадающих в область облучения [17, 42]. В зависимости от дозы и вида ионизирующего излучения могут формироваться как одно-, так и двуцепочечные разрывы ДНК [53]. С учетом репаративных возможностей клетки происходит частичное восстановление одноцепочечных разрывов, которые считаются менее опасными. Напротив, двуцепочечное повреждение практически не поддается репарации и могут возникать при более сильных дозах излучения и представляют собой более серьезную угрозу, так как они могут привести к хромосомным транслокациям, делециям и потере генетической информации. Кроме того, ионизирующее излучение может вызвать химические изменения в отдельных нуклеотидах ДНК. Например, радикалы могут изменять структуру основания (например, цитозина, аденина, тимина и гуанина), что приводит к его неправильному связыванию с другим основанием. Это может вызвать образование сшивок между цепями и формированию новых мутаций при репликации ДНК. Существуют данные о способности ионизирующего излучения к формированию ковалентных перекрестных связей между нуклеотидами на разных цепях ДНК, что также приводит к их сшивкам и нарушению процессов репликации. Единичные

данные также показывают, что помимо мутаций, ионизирующее излучение может также приводить к эпигенетическим изменениям, таким как метилирование ДНК и изменения структуры хроматина, что может влиять на экспрессию генов и способствовать онкогенезу. В результате накопление нерепарируемых повреждений перечисленными механизмами приводит к программируемой гибели клетки путем апоптоза [91, 93].

Помимо действия на генетический материал клетки, ионизирующее излучение способно к ионизации (эндотермический процесс образования ионов из нейтральных атомов или молекул) внутриклеточной молекулярной воды с образованием большого числа свободных высокотоксичных ион-радикалов, обладающих периодом полураспада, измеряемым наносекундами [86, 142, 157]. Эти реактоспособные ионы называют активными формами кислорода (АФК) и реактивными формами азота (РФА). К первым относятся пероксид водорода (H_2O_2), синглетный кислород (1O_2), супероксид-анион радикал ($O_2^{\cdot-}$) и гидроксильный радикал (OH^{\cdot}), а ко вторым – азотистый радикал ($\cdot NO$), пероксинитрит ($ONOO^-$), нитрозильные группы ($R-NO$), нитрит (NO_2^-), нитрозо-соединения ($R-N=O$) и др. Их способность связываться с другими внутриклеточными молекулами, в том числе макромолекулами липидов биомембран, белков, углеводов, приводит к нарушению структуры последних, нарушению редокс-гомеостаза и дополнительной стимуляции клеточной гибели, преимущественно внутренним путем апоптоза (в результате оксидантного повреждения ДНК и митохондрий) [15, 91, 93, 117, 136, 172].

Косвенные эффекты свободных радикалов и оксидативный стресс. Оксидативный стресс – это состояние, при котором в клетках и тканях возникает дисбаланс между образованием АФК и способностью клеток нейтрализовать их с помощью антиоксидантной защиты. Оксидативный стресс при облучении возникает в результате активации процессов образования реактивных форм кислорода и азота, а также нарушения антиоксидантной активности клеток. Эти молекулы повреждают клетки, нарушая их структуру и функции, что может приводить к мутациям, хромосомным абберациям, воспалению и, в конечном

итоге, к клеточной гибели [118]. Помимо прямого токсического действия, перечисленные ранее радикалы реактоспособны и могут связываться с нейтральными стабильными молекулами внутри и вне клетки, что приводит к смещению их заряда и генерации еще большего числа ион-радикалов [81]. Большинство маркеров окислительного стресса способны модулировать различные сигнальные пути. Например, NF-κB – отвечает за синтез цитокинов и воспалительную реакцию. Каскад MAP-киназ (MAPK/p38, MAPK/JNK) – индуктора клеточной гибели, что приводит к повышенной экспрессии провоспалительных цитокинов и ферментов, способствующих повреждению клеток и их выхода в апоптоз [97, 111, 167].

При нормальном функционировании клеток АФК и РФА являются важными медиаторами для нескольких клеточных процессов, таких как микробная защита, иммунные реакции, клеточная сигнализация, апоптоз, дифференцировка, клеточная адгезия и др. Эндогенная антиоксидантная система включает ферменты, такие как супероксиддисмутаза (SOD), каталаза (CAT) и глутатионпероксидаза (GPX), а также пептиды, такие как глутатион (GSH), и молекулы – витамин С, витамин Е и др. [122]. Нейтрализации свободных радикалов в норме обеспечивает защиту клеток от действия оксидации. При облучении же, происходит чрезмерная продукция свободных радикалов в отличие от синтеза ферментов и различных маркеров антиоксидантной системы, в ткани наблюдается повышение степени повреждения ДНК, а также молекул белков и липидов [119].

Окисление аминокислот в белках (например, метионин, цистеин) может нарушать их структуру и функцию, что приводит к потере активности ферментов, в том числе – антиоксидантной системы организма. Липидная пероксидация, особенно окисление полиненасыщенных жирных кислот в мембранах клеток, ведет к образованию малонового диальдегида (MDA) и 4-гидроксинонена (HNE), которые могут повреждать клеточные мембраны, нарушать их проницаемость и приводить к клеточной дисфункции. Так, процесс пероксидации липидов в совокупности с ионами железа приводит к активации отдельного пути клеточной гибели – ферроптозу [71, 143, 161].

Кроме того, избыточное накопление продуктов радиолита в сочетании с клеточной гибелью приводит к выходу высоко токсичных свободных радикалов во внеклеточное пространство, взаимодействуя с окружающими здоровыми клетками. Это явление было названо «эффектом свидетеля» или «нецелевой эффект» [111, 140]. Таким образом, происходит повреждение не только клеток, попавших в зону облучения, но и близких к ним здоровых тканей, в которых также запускаются процессы оксидации и клеточной гибели (чаще внешним путем апоптоза), что значительно усугубляет течение и масштаб радиационно-индуцированного повреждения органа [6, 13, 14].

Жизненный цикл облученных клеток. Сообщается, что воздействие облучения в дозе 2 Гр может привести к потере половины овариального резерва в результате активации апоптоза (каскадами цитохрома *c* и каспазными путями) фолликулярных клеток гранулезной оболочки яичника [26]. Аналогичные результаты были получены в единичных исследованиях – авторы отмечали снижение пролиферативной активности и резкое увеличение клеточной гибели в яичниках после воздействия X- и гамма-излучением [146]. Впоследствии, в эксперименте на крысах, которых облучали гамма-излучением в низких дозах (1 Гр, 5 Гр, 10 Гр) уже при воздействии минимальной дозы 1 Гр обнаружили фрагментацию гранулезных клеток, снижение количества фолликулов и уровня АМГ, многочисленные кровоизлияния, значимое увеличение маркеров апоптотической гибели клеток (\uparrow фактора терминации апоптоза каспазы 3) и воспалительной реакции (TNF- α , IL-1 β), а также признаки формирования радиационно-индуцированного фиброза яичника [174].

Другие авторы в том же году подтвердили гипотезу о том, что при воздействии ионизирующего излучения (в режиме VMAT) происходит нарушения активности пути PI3K/AKT/FOXO3a, который в нормальных условиях отвечает за сохранение овариального резерва и перевод фолликулов в «спящее состояние» при воздействии неблагоприятных триггирующих факторов, предотвращая преждевременное истощение яичников [133]. Было доказано, что данные мутации в гене ключевого участника этого пути FOXO3 связаны с развитием

преждевременной недостаточности яичников. Предполагается, что именно этот путь нарушается при лучевом воздействии, приводя к развитию радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников, однако данная гипотеза требует проверки и комплексного молекулярно-биологического подтверждения.

Однако, сигнальный путь PI3K/AKT считается регулятором жизненного цикла клеток посредством активации множества нижележащих эффекторов. Так, в эксперименте на мышах было показано, что данный каскад связан с восстановлением функции яичников путем изменения соотношения клеток Th17/Tc17 и Th17/Treg после трансплантации hPMSC в модели аутоиммунно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников [1]. Не исключено, что позитивные эффекты этого пути при различных патологических состояниях могут быть обусловлены активацией нижележащего участника – mTOR (от англ. mammalian target of rapamycin), который координирует энергетический баланс и метаболизм клеток яичника, обеспечивая адекватный синтез белков и липидов, необходимых для клеточного роста и деления фолликулярных клеток [120]. Механизм включает ингибирование белка PTEN, что приводит к повышению активности АКТ и последующей активации мишени mTOR, способствующей клеточному росту. Кроме того, PI3K/AKT/mTOR участвует в регуляции мейоза и созревания ооцитов, обеспечивая необходимую поддержку энергетических и метаболических процессов в ооцитах и клетках их микроокружения, а также повышает экспрессию факторов роста, необходимых для созревания ооцита [80]. Было даже сделано предположение о том, что высокая активность mTOR способствует развитию радиорезистентности и протекции атипичных клеток от воздействия высоких доз ионизирующего излучения [84]. Однако, точные механизмы и эффекты сигнального пути PI3K/AKT/mTOR при воздействии облучения до сих пор остаются предметом дискуссий и требуют проведения новых исследований.

Воспалительная реакция. Воспалительная реакция в яичниках, возникающая в ответ на воздействие ионизирующего излучения, включает несколько

молекулярных механизмов, связанных с синтезом провоспалительных цитокинов, миграцией и активацией клеток иммунной системы [6, 13, 14]. Ионизирующее излучение вызывает повреждения ДНК, что активирует молекулы, такие как АТМ и АТР, которые запускают каскад сигнальных путей, ведущий к активации транскрипционного фактора NF-κB и сигнального пути JAK-STAT [115, 127]. В связи с чем, стимулируется продукция провоспалительных цитокинов – TNF-α, IL-1 и IL-6 и хемокинов. Это способствуют таксису и миграции иммунных клеток в область лучевого воздействия [90]. В ответ на радиационное повреждение происходит активация различных типов иммунных клеток, включая макрофаги, нейтрофилы и Т-лимфоциты, которые секретируют дополнительные воспалительные медиаторы, усиливая воспаление и усугубляя повреждение фолликулярных клеток ферментами [66, 105]. Помимо этого, не исключена активация тучных клеток микроокружения яичника, которые секретируют триптазу (ответственную за синтез компонентов экстрацеллюлярного матрикса) и химазу (ответственную за метаболизм волокнистого компонента) [37, 104].

В подтверждение данной теории, была опубликована работа, в которой доказано, что гамма-излучение провоцирует воспалительную реакцию в яичнике за счет усиления экспрессии NF-κB и поли(АДФ-рибозо) полимеразы (PARP)-1, усиливая экспрессию воспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, IL-10, а также индуцибельной синтазы оксида азота iNOS и циклооксигеназы-2 COX-2) [158]. Это приводит к миграции воспалительных клеток, преимущественно Т-клеточного звена иммунитета и CD68-макрофагов в область локального облучения в яичнике [117, 136, 172]. Однако, роль микроокружения при воспалительной реакции, индуцированной в яичнике воздействием ионизирующего излучения, остается малоизученной.

Радиационно-индуцированный фиброз. В недавнем исследовании авторы обнаружили, что воздействие гамма-излучения в низкой дозе (3,2 Гр) приводит к развитию выраженной воспалительной реакции посредством активации молекулярных путей MAPK и NF-κB, что сопровождалось резким увеличением NF-κB, p65, COX-2 и iNOS, а также активацией TGF-β/p38/JNK (TGF-β/MAPK)-

сигнального пути, обеспечивающий продукцию различных фиброгенных факторов практически во всех органах [27, 102, 129].

Ионизирующее излучение приводит к повреждению большинства клеток и активирует молекулярные фиброгенные механизмы [21, 49, 141]. Одним из ключевых механизмов является активация фактора роста трансформирующегося бета (TGF- β), который играет центральную роль в процессах фиброза, индуцируя экспрессию участников нижестоящих STAT-зависимых и non-STAT (STAT-независимых) сигнальных путей [147].

STAT-зависимый путь. TGF- β может активировать сигнальный путь через рецепторы TGF β R, которые активируют молекулы Janus-киназ (JAK), что, в свою очередь, приводит к фосфорилированию и активации STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3). STAT3 после активации транскрибирует фиброгенные гены, активируя пролиферацию клеток фибробластического ряда, стимулируя дифференцировку фибробластов в миофибробласты и увеличение коллагенообразования и синтез других компонентов внеклеточного матрикса. Этот путь также способствует воспалению и усилению фиброобразования [139].

Non-STAT пути. Помимо активации STAT3, TGF- β активирует и другие сигнальные пути, не связанные с STAT. Одним из таких путей является активация Smad-сигналинга, где Smad1, Smad2 и Smad3 фосфорилируются после связывания TGF- β с его рецепторами, и переходят в ядро, где они активируют общий для них Smad4, который регулирует дальнейшую экспрессию генов, связанных с фиброзом [137]. Это способствует активации фибробластов и их дифференциации в миофибробласты с последующей активной секрецией компонентов экстрацеллюлярного матрикса во внеклеточное пространство (преимущественно, коллагеновых волокон I и III типов) [181]. Помимо этого, происходит усиление метаболизма ткани и активация эндотелия кровеносных сосудов для усиления проницаемости сосудистой стенки и облегчения фиброгенеза. Вероятно, α -SMA потенциально может быть ранним маркером активации фибробластов и эндотелиоцитов, являясь предвестником радиационно-индуцированного фиброза в

тканях яичников, однако его прогностическая ценность до сих пор не изучена и является предметом дискуссий [36, 85, 160, 164].

1.4. Радиопротекторы. Роль антиоксидантов в предотвращении радиационно-индуцированного повреждения

Учитывая доказанную связь радиационного воздействия с повышением риска развития преждевременной недостаточности яичников, высоко актуальным и перспективным направлением современных исследований является поиск и апробация препаратов, способных снижать степень выраженности постлучевого нарушения функций этого органа. На сегодняшний день, единственным доказанным препаратом-радиопротектором, который рекомендован к применению при лучевой терапии, является амифостин, который вводится только внутривенно / внутримышечно, требует длительного мониторинга из-за большого количества нежелательных лекарственных реакций (тошнота, рвота, слабость и др.), а также является дорогостоящим, что делает его использование экономически невыгодным [163, 184].

При этом, относительно недавно, было опубликовано исследование радиопротекторных свойств амифостина в стандартной дозе 200 мг/кг при воздействии на яичники X-излучения трижды в дозе по 15–20 mR и при проведении гистеросальпингографии [68]. Помимо малой выборки животных, авторы отметили незначительное снижение уровней MDA и слабое повышение АМГ у животных, получивших амифостин, по сравнению с группой X-облучения. Кроме того, спустя 1 месяц, амифостин привел к значительному уменьшению фиброза в яичниках лабораторных животных, однако практически не снизил апоптотический индекс по сравнению с группой X-облучения. В связи с этим, проведение исследований потенциальных радиопротекторов продолжается, а слабая эффективность амифостина в яичниках определяет необходимость поиска новых аналогов данному препарату.

В научной литературе существует несколько публикаций относительно применения радиопротекторов в экспериментальной модели лучевого повреждения яичника. Так, в работе Zhang Q. с соавт. на мышах описаны позитивные эффекты предлучевого (до воздействия X-лучами) введения фолиевой кислоты, которая способствовала снижению клеточной гибели путем стимуляции репарации ДНК (через ATM и RAD51), поврежденной ионизирующим излучением [74]. Однако, малая выборка и возможность коррекции только прямого пути лучевого повреждения (посредством защиты ДНК) не позволяет добиться выраженной эффективности в отношении предотвращения преждевременной недостаточности яичников и рекомендовать данный субстрат для клинического применения.

В другом исследовании, была предпринята попытка использования куркумина, который демонстрировал некоторую эффективность при лучевом поражении других органов [41, 154]. Однако, его применение в качестве радиопротектора яичников от воздействия ионизирующего излучения также не продемонстрировало выраженных позитивных эффектов, приводя лишь к частичному сохранению небольшой доли овариальных фолликулов, причем даже спустя 12 часов авторы заявляют о преобладании клеточной гибели (оцененной методом TUNEL) над пролиферацией (PCNA) [28].

Наиболее интересным представляется апробация и комплексное исследование радиопротекторной эффективности субстрата из группы антиоксидантов – аскорбиновой кислоты (витамина С), эффективность которой уже была продемонстрирована в ранних работах на многих моделях радиационно-индуцированного повреждения различных органов и клеток [67, 117, 128, 136, 152, 172, 186]. Так, помимо способности к связыванию и утилизации активных форм кислорода (воздействия на косвенный путь лучевого повреждения), существуют данные о ее эффективности в предотвращении генерации повреждений ДНК посредством взаимодействия с ионами меди Cu^{2+} [45].

Некоторые витамины и антиоксиданты, встречающиеся в природе, были исследованы на предмет их радиопротекторной эффективности [23]. В работах,

посвященных изучению клеточных культур *in vitro*, было показано, что витамин Е и селен способны снижать количество радиационно-индуцированных трансформаций [31]. В то же время, аскорбиновая кислота и витамин Е продемонстрировали способность снижать количество радиационно-индуцированных хромосомных аномалий, мутаций ДНК и клеточной гибели путем апоптоза в клетках млекопитающих [135]. Кроме того, существуют единичные заявления о том, что витамины А, С, Е и бета-каротин способствовали повышению сопротивляемости к высоким дозам радиации, а также снижению выраженности оксидативного стресса [153].

На основании многочисленных исследований можно предполагать, что аскорбиновая кислота проявляет свои антиоксидантные свойства через несколько молекулярных механизмов [32, 35, 77, 78]:

1. *Прямое нейтрализующее действие на свободные радикалы.* Аскорбиновая кислота способна напрямую нейтрализовывать различные продукты радиолиза воды, такие как супероксидный анион ($O_2^{\cdot-}$), гидроксил-радикал ($\cdot OH$) и пероксид водорода (H_2O_2). В процессе этих реакций аскорбиновая кислота окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты (DHA), которая эффективно нейтрализует свободные радикалы, тем самым предотвращая их повреждающее воздействие на клеточные структуры, такие как биомембраны (липиды), белки и ДНК.

2. *Модуляция окислительно-восстановительных процессов.* Аскорбиновая кислота участвует в поддержании окислительно-восстановительного баланса клеток и индуцирует активность ферментов эндогенной антиоксидантной системы (SOD, CAT, GPX и др.). Этот субстрат способен влиять на активность различных ферментов редокс-сигнализации (например, оксидаз), тем самым регулируя клеточный цикл и апоптоз клеток, а также экспрессию и накопление участников антиоксидантных защитных механизмов.

3. *Восстановление других антиоксидантов.* Аскорбиновая кислота играет одну из ключевых ролей в восстановительных свойствах других антиоксидантов (например, витамин Е и др.). Активированный витамин Е при его окислении, нейтрализует свободные радикалы. Аскорбиновая кислота восстанавливает

окисленную форму витамина Е, восстанавливая его антиоксидантную активность и индуцирует / усиливает антиоксидантный эффект – синергия.

4. *Защита ДНК от окисления.* Одним из наиболее важных эффектов аскорбиновой кислоты является защита ДНК от повреждений, вызванных окислительным стрессом. Аскорбиновая кислота снижает уровень окислительных повреждений ДНК (мутаций с образованием 8-оксогуанина), снижая риск развития онкологических заболеваний и клеточного старения.

5. *Поддержание клеточного гомеостаза.* Аскорбиновая кислота участвует в регуляции синтеза коллагена, поддерживая васкулогенез, а также функционирование нервной и иммунной систем. Она также способствует детоксикации и нейтрализации тяжелых металлов, что дополнительно снижает уровень окислительного стресса в клетках.

6. *Модуляция воспаления.* В некоторых случаях аскорбиновая кислота оказывает противовоспалительное действие, снижая уровень воспалительных цитокинов и запуская репарацию тканей. Однако, молекулярные механизмы и точные эффекты взаимодействия аскорбиновой кислоты с клетками иммунной природы и генами, ответственными за синтез цитокинов, остаются нераскрытыми.

Таким образом, несмотря на отсутствие исследований, посвященных изучению роли аскорбиновой кислоты в протекции яичника от радиационно-индуцированного повреждения, в том числе на ранних и поздних сроках, можно ожидать позитивных результатов ее предлучевого введения при воздействии ионизирующего излучения (в том числе, электронов). Кроме того, интересным представляется раскрытие молекулярных механизмов радиопротекторного действия этого субстрата с применением комплекса современных гистологических, молекулярно-биологических и молекулярно-генетических методик.

1.5. Заключение по обзору литературы

Актуальность исследования преждевременной недостаточности яичников, вызванной воздействием ионизирующего излучения, остается высокой из-за

возрастающей частоты встречаемости данного состояния среди женщин молодого возраста. Радиационно-индуцированная преждевременная недостаточность яичников достоверно приводит к значительным долгосрочным последствиям, включая гормональные нарушения, угнетение репродуктивной функции (вплоть до перманентной формы женского бесплодия), повышение риска сердечно-сосудистых заболеваний. Учитывая высокую чувствительность яичников к ионизирующему излучению, современные способы радиотерапии приводят к снижению овариального резерва и преждевременной потере большого количества активных овариальных фолликулов, что требует оптимизации существующих схем лучевой терапии злокачественных новообразований этой области, в том числе – путем внедрения более «щадящих» видов ионизирующего излучения, таких как локальное облучение электронами.

Кроме того, возникает необходимость в поиске радиопротекторов, которые могут снизить дозовую нагрузку (или ее переносимость) на яичники и предотвратить развитие преждевременной недостаточности яичников и фиброза в отдаленные сроки. Аскорбиновая кислота, с ее мощными антиоксидантными свойствами, может быть перспективным кандидатом для использования в качестве радиопротектора. Исследования показывают, что аскорбиновая кислота эффективно нейтрализует свободные радикалы, предотвращая повреждения ДНК, что снижает риск клеточной гибели. Следует подчеркнуть, что молекулярные механизмы действия аскорбиновой кислоты, в том числе ее регулирующее влияние не редокс-гомеостаз, репарацию ДНК, жизненный цикл фолликулярных клеток, воспалительную реакцию и сигнальные пути, ответственные за выживаемость овариальных фолликулов и развитие фиброза на поздних сроках, остаются недостаточно изученными в контексте радиопротекции яичников. Для более глубокой оценки потенциала этого субстрата необходимы комплексные исследования, которые позволят выяснить точки приложения позитивных эффектов аскорбиновой кислоты и подтвердить радиопротекторные свойства аскорбиновой кислоты, которые могут быть использованы в клинической практике врачей онкологов. Ожидается, что такие исследования могут способствовать

созданию персонализированных методов радиотерапии и радиопротекции, что, в свою очередь, приведет к снижению частоты и тяжести радиационно-индуцированной недостаточности яичников у молодых женщин репродуктивного возраста, проходящих лечение злокачественных новообразований органов брюшной полости и малого таза.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Диссертационное исследование проводили в Центре доклинических исследований Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и в лаборатории экспериментальной морфологии и цифровой патологии Медицинского радиологического научного центра им. А.Ф. Цыба – филиале федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

2.1. Дизайн эксперимента

Экспериментальное исследование проводили на лабораторных животных – самках крыс породы Вистар (*Rattus Wistar*; n=180; вес 180±20 грамм; возраст 9 – 10 недель) аутбредного стока, случайным образом распределенных в экспериментальные группы соответственно дизайну эксперимента (Таблица 2.1).

Выведение лабораторных животных из эксперимента осуществляли введением высоких доз анестетика (комбинированное введение кетамина и ксилазина) с учетом фазы эстрального цикла таким образом, чтобы результаты исследования были получены в наиболее продолжительную (в среднем, 2–3 дня) фазу диэструса (межтечки / покоя), когда уровни половых гормонов наиболее низкие, чтобы исключить влияние их эффектов на полученные данные. Для оценки фазы эстрального цикла была использована стандартная методика подсчета соотношения характерных клеток в мазках, взятых из влагалища, непосредственно перед выведением из эксперимента, в соответствии с дизайном исследования [12].

Содержание экспериментальных животных

Лабораторных животных содержали в клетках из пластика, выстланных абсорбирующим гнездовым материалом. В помещении поддерживали следующие

условия: 12-ти часовой световой день, температура воздуха 23°C, уровень относительной влажности поддерживали в диапазоне от 40 до 60 %. Питание животных соответствовало стандартному рациону с доступом к источнику питьевой воды.

Уход за животными, условия их содержания, способы обезболивания при проведении болезненных процедур, а также методы умерщвления по окончании эксперимента были выбраны на основании рекомендаций, изложенных в отечественных и международных нормативно-правовых документах, регламентирующих гуманное отношение к лабораторным животным: и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964 г.), Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985 г.), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (1986 г.; ETS №123), Директиве Европейского парламента о защите животных, используемых в научных целях (2010 г., L 276/52), Федеральном законе №498-ФЗ «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации», Приказе Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», Приказе №755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», Приказе №742 от 13.11.1984 г. «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Таблица 2.1 – Распределение лабораторных животных (крыс породы Вистар) по группам и сроки выведения из эксперимента

ГРУППА		n	манипуляция	Сроки выведения*
№	обозначение			
I	Контроль	20	Интраперитонеальное введение изотонического раствора NaCl 0,9 %	по 5 самок на 7, 30, 60, 90 сутки
II	СОД 30 Гр	40	Воздействие локального облучения электронами во фракционном режиме в суммарной очаговой дозе (СОД) 30 Гр	по 10 самок на 7, 30, 60, 90 сутки
III	СОД 30 Гр +АК	40	Интраперитонеальное введение аскорбиновой кислоты (АК) в дозе 50 мг / кг за 1 час до локального облучения электронами (суммарная доза 30 Гр)	по 10 самок на 7, 30, 60, 90 сутки
IV	СОД 30 Гр + АМИ	40	Интраперитонеальное введение Амифостина (АМИ) в дозе 200 мг / кг за 30 минут до локального облучения электронами (суммарная доза 30 Гр)	по 10 самок на 7, 30, 60, 90 сутки
V	АК	20	Интраперитонеальное введение аскорбиновой кислоты (АК) в дозе 50 мг / кг	по 5 самок на 7, 30, 60, 90 сутки
VI	АМИ	20	Интраперитонеальное введение препарата сравнения Амифостина (АМИ) в дозе 200 мг / кг	по 5 самок на 7, 30, 60, 90 сутки

Примечание: * – срок выведения (сутки) отсчитывали от последнего дня облучения в режиме фракционирования

Проведение диссертационного исследования «Морфологические особенности овофолликулогенеза после фракционного локального облучения электронами и на фоне введения аскорбиновой кислоты» одобрено «Комиссией по биоэтическому контролю за содержанием и использованием лабораторных животных в научных целях» федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Выписка из протокола №6 от 27.04.2023 г.

Объект исследования – яичники, которые предварительно анализировали макроскопически на предмет наличия / отсутствия воспалительного и / или опухолевого процесса.

2.2. Моделирование радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников

Информационная справка. Выбор доз и режима облучения был проведен на основании литературных данных и отечественных рекомендаций по использованию лучевой терапии при лечении злокачественных новообразований:

- яичника – может быть рекомендована при паллиативном лечении [5];
- тела матки – пациенткам со ЗНО тела матки групп промежуточно-высокого и высокого риска с учетом стадии, гистологического типа опухоли и объема выполненного хирургического лечения рекомендуется проведение дистанционной лучевой терапии и/или брахитерапии. Учитываются все принципы конформной дистанционной лучевой терапии при планировании объема облучения на область малого таза и зон регионарного метастазирования с включением парааортальной области или без нее. При фракционировании суммарная доза может достигать 50 Гр в фракциях по 2 Гр 5 раз в неделю. Кроме того, считается что послеоперационная конформная дистанционная лучевая терапия с использованием лучевой терапии с модулированной интенсивностью после

хирургического этапа лечения является предпочтительной. В настоящее время рекомендовано применение гамма-облучения (^{60}Co , ^{192}Ir), обладающего наибольшей токсичностью по сравнению с другими видами ионизирующего излучения, причем суммарные дозы облучения могут достигать 35 Гр и более, в зависимости от индивидуальных особенностей пациента, стадии заболевания, характера метастазирования и др. [3];

- шейки матки – пациенткам с раком шейки матки с учетом стадии заболевания и желания пациентки рекомендовано проведение химиолучевой терапии, включающей в себя дистанционную лучевую терапию в суммарной дозе до 45 – 50 Гр, причем разовая доза на одну фракцию в России составляет 2 Гр в режиме 5 раз в неделю. Кроме того, лучевая терапия может быть применена в качестве адъювантной или паллиативной помощи, а при стадии рака шейки матки IVB – по индивидуальному плану [4];

- прямой кишки – по показаниям рекомендуется применение дистанционной конформной лучевой терапии в разовой облучающей дозе 5 Гр в 5 фракциях до суммарной дозы 25 Гр в течение 5 последовательных дней [2] и др.

Кроме того, лучевое поражение яичника, являющегося высоко радиочувствительным органом, можно наблюдать и при использовании общего облучения (всего тела) при некоторых видах лимфом, при этом доза облучения может достигать 100 Гр и более в зависимости от индивидуальных характеристик пациента.

Тактика лечения пациентов со злокачественными новообразованиями органов малого таза избирается индивидуально и основана на данных о распространенности опухолевого процесса, его топографии, факторах риска и прогностических факторах (в т.ч. результатах исследования биопсийного материала), наличии / отсутствии сопутствующей патологии различной степени, а также ожидаемой продолжительности жизни.

Следует отметить, что при лучевой терапии злокачественных новообразований существует две четкие цели – полное / частичное удаление опухоли, а также максимальное сохранение функции вовлеченного органа. Данное

исследование посвящено структурно-функциональному анализу яичника без опухолевого роста, изучению реактивных изменений в ответ на воздействие локального облучения электронами. Полученные данные могут быть полезными в работе врачей-радиотерапевтов, онкологов, врачей-патологоанатомов.

Настоящая работа является экспериментальным морфологическим исследованием в рамках доклинической апробации с возможностью дальнейшей трансляции полученных результатов в клиническую практику для коррекции существующих протоколов лечения злокачественных новообразований органов малого таза. Учитывая высокую степень радиочувствительности органов малого таза, современные рекомендации подчеркивают крайнюю необходимость наиболее «щадящего» лучевого воздействия, позволяющего добиться эффективной терапии злокачественного новообразования с минимальным повреждением соседних органов, особенно – яичников. Таким образом, особенно актуальным является исследование радиационно-индуцированных осложнений со стороны яичника в ответ на воздействие электронов, которые считаются менее токсичными для окружающих тканей при сохранении высокой эффективности в отношении атипичных клеток.

Обоснование дозы и режимов облучения, представленных в диссертационном исследовании. Учитывая широкий диапазон доз и режима, применяемых врачами-радиотерапевтами в клинической практике при работе в абдомино-пельвикальном сегменте в зависимости от локализации злокачественного новообразования и морфологического субстрата, в диссертационном исследовании представлены результаты после локального облучения электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр. Выбор дозы локального облучения электронами в режиме фракционирования обусловлен клиническими рекомендациями (см. выше) и результатами собственных исследований, в которых также проводили анализ радиационно-индуцированных изменений структур яичника при воздействии электронами в СОД 20 Гр [6, 13, 14, 117, 136, 172].

Процедура локального облучения электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр. Лабораторных животных размещали на предметном столике в положении на спинке и подвергали локальному облучению электронами в проекции яичников, ориентируясь на анатомические ориентиры. Для обеспечения седации во время процедуры использовали однократное введение комбинации кетамина и ксилазина внутримышечно и интраперитонеально, соответственно.

Облучение проводилось с использованием линейного электронного ускорителя «NOVAC-11» (на базе радиологического экспериментального сектора МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал «НМИЦ радиологии» Минздрава России, г. Обнинск, Россия). Установленная разовая очаговая доза составляла 6 Гр, мощность дозы – 1 Гр/мин, энергия – 10 МэВ, частота – 9 Гц. Диаметр тубуса – 40 мм, и его располагали перпендикулярно поверхности кожи под углом 90°, чтобы избежать воздействия на легкие и сердце, дополнительно их экранировали. Эти параметры применялись для каждой фракции облучения, которые проводились через день, чтобы достичь общей очаговой дозы 30 Гр.

Для планирования облучения с различными энергиями и тубусами были рассчитаны кривые «Доза-Глубина», позволяющие оценить проникающую способность пучка электронов на основе заданных оператором параметров (Рисунок 2.1). При локальном облучении дозой 6 Гр с энергией 6 МэВ и тубусом диаметром 40 мм расчетная глубина проникновения составляла 2 см. Это значение соответствует эффективному распределению дозы в биологических тканях и позволяет обеспечить получение клетками яичников (расположенной на том же уровне) дозы 6 Гр / фракция с допустимой погрешностью около 10 %.

В течение эксперимента животных взвешивали и осматривали каждые сутки, производили оценку поведенческих реакций, состояния кожного покрова и слизистых. После каждой фракции облучения ректально измеряли температуру.

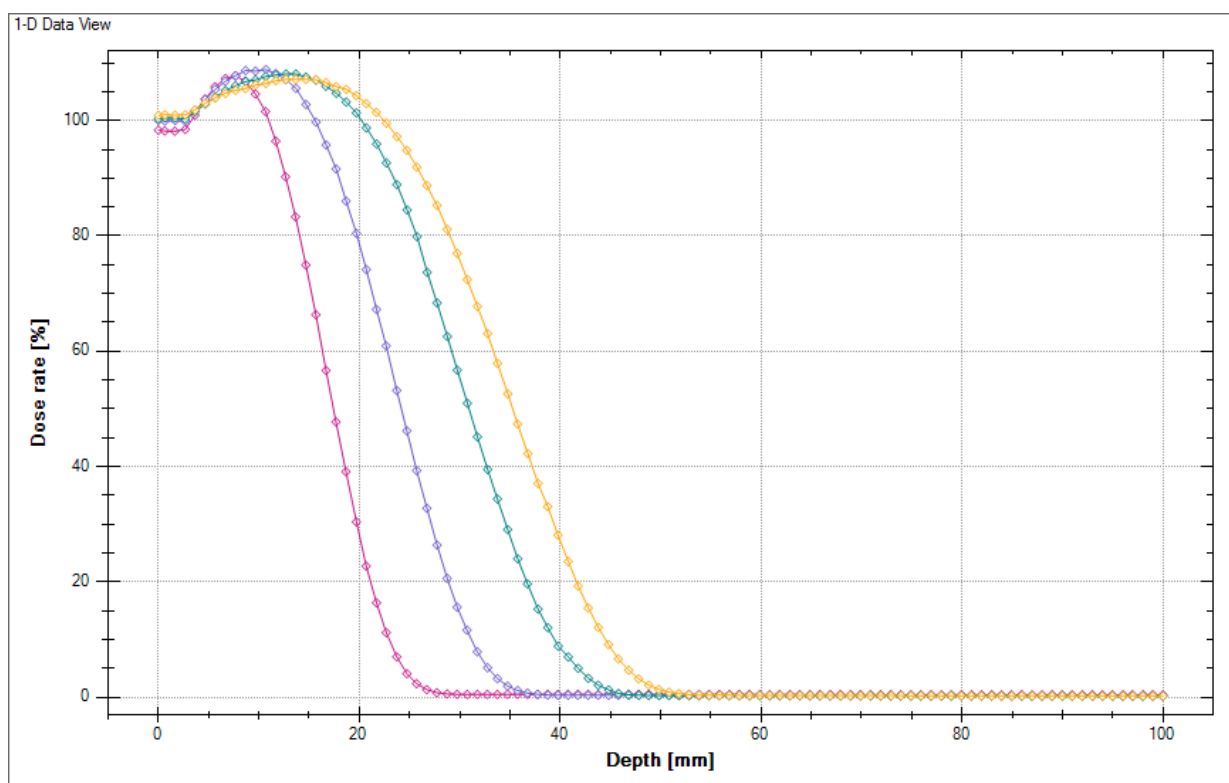


Рисунок 2.1 – Распределение дозы локального облучения электронами в биологических тканях при различных энергиях. Заданные в настоящем исследовании параметры (энергия 6 MeV, диаметр тубуса 40 мм) позволяют достигнуть поступления $100 \pm 10\%$ разовой очаговой дозы на глубину до 20 мм с последующим снижением (на глубине 4 см от поверхности тела ткани получают лишь 10 % установленной дозы, то есть $\approx 0,6$ Гр). Погрешность данного расчета равна $\pm 10\%$

2.3. Лекарственные препараты, использованные для радиопротекции

Доза аскорбиновой кислоты для крыс весом 200 грамм была подобрана на основании проведенного пилотного исследования, в котором сравнивали эффекты трех доз – 20 мг/кг, 50 мг/кг и 100 мг/кг. Эквивалентные дозы при пересчете на человека с использованием межвидовых коэффициентов расчета доз составляли – 3,3 мг/кг, 8,3 мг/кг и 16,6 мг/кг [18]. Дозы в диапазоне от 25 мг/сут до 600 мг указаны в инструкции производителя как «терапевтические», рекомендованные для профилактики и лечения дефицитарных состояний у человека.

По результатам пилотного исследования было обнаружено, что спустя неделю после предлучевого применения аскорбиновой кислоты в дозе 20 мг/кг не отмечали никаких различий по сравнению с группой облученных животных; использование дозы 100 мг/кг вызывало у животных нежелательные лекарственные реакции (многократная рвота, слабость, повышение температуры тела), а использование дозы 50 мг/кг обладало наилучшей переносимостью в сочетании с признаками радиопротекторной активности. Таким образом, для настоящего исследования было выбрано предлучевое интраперитонеальное введение аскорбиновой кислоты (50 мг/мл в ампулах по 2 мл, АО «Новосибхимфарм», Россия) в разовой дозе 50 мг/кг массы тела, которую вводили за 1 час перед облучением электронами (время, необходимое для всасывания и накопления минимальной эффективной концентрации в крови).

В качестве препарата сравнения, обладающего доказанной радиопротекторной активностью, был выбран Амифостин (Amifostine; АМИ; Код CAS – 20537-88-6; “Ethyol”, 500 мг, MedImmune Pharma, Нидерланды) в средней терапевтической дозе 200 мг/кг, подобранной для крыс породы Вистар массой \approx 200 грамм на основании оценки литературных источников и инструкции по применению в рамках профилактики и лечения лучевых поражений [29,68]. Раствор для интраперитонеального введения амифостина получали путем разведения порошка в фосфатном буферном растворе (PBS, “Invitrogen Life Technologies”, США) в соответствии с инструкцией производителя, после чего вводили животным за 30 минут перед облучением электронами (время, необходимое для всасывания и накопления минимальной эффективной концентрации в крови).

2.4. Методы исследования

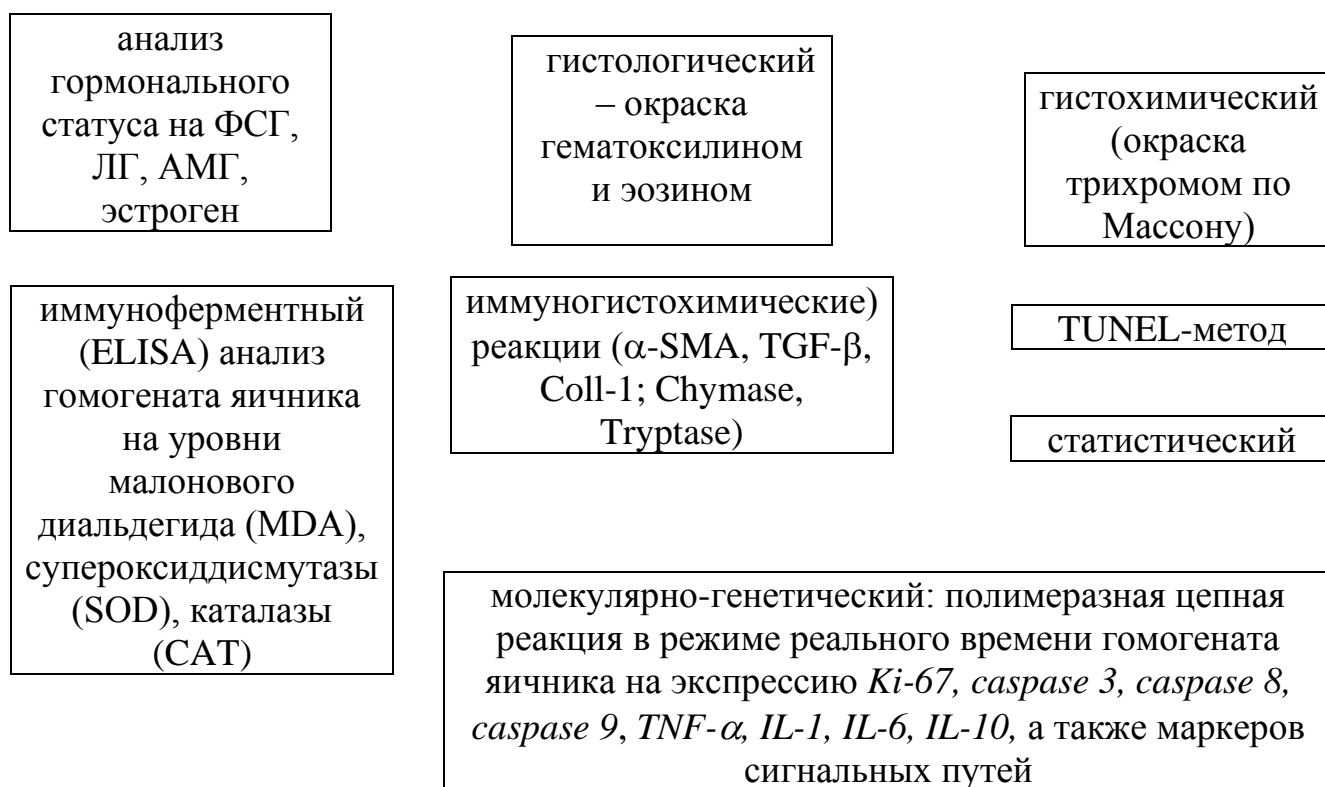


Рисунок 2.2 – Методы исследования

2.4.1. Оценка гормонального статуса

Для оценки уровней гонадотропных гормонов в сыворотке крови лабораторных животных исследовали концентрации фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ) в фазу диэструса эстрального цикла. При спектрофотометрии использовали метод линейной регрессии; применяли – коммерческие наборы для иммуноферментного анализа (англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) согласно рекомендациями производителя: Rat FSH ELISA-Kit (Cat. № EEL125, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) и Rat Luteinizing Hormone ELISA-Kit (Cat. № EEL122, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США). Уровни ФСГ и ЛГ в результатах исследования представлены в нг/мл и мЕд/мл, соответственно.

Для оценки овариального резерва и уровня эстрогении проводили анализ сыворотки крови с оценкой концентраций антимюллерова гормона (АМГ) и эстрадиола (Е2) в фазу диэструса эстрального цикла. Для этого применяли метод линейной регрессии при спектрофотометрии с использованием коммерческих наборов ELISA-kit в соответствии с рекомендациями производителя: Rat anti-Mullerian hormone (AMH) ELISA-kit (Cat. № CSB-E11162r, Cusabio Biotech Co., Ухань, Китай) и Rat Estradiol Rapid ELISA-Kit (Cat. № EELR015, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США). Уровни АМГ и эстрадиола в результатах исследования представлены в нг/мл и пг/мл, соответственно.

2.4.2. Анализ маркеров оксидации и ферментов антиоксидантной системы

Ткани яичников гомогенизировали, затем в течение 5 минут центрифугировали при 1000 оборотах/мин на ледяной бане. Полученный 10 % гомогенат центрифугировали, а супернатант собирали для дальнейшего анализа. Для оценки уровня маркера пероксидации липидов малонового диальдегида (MDA) использовали коммерческий набор ELISA-kit (Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit, Cat. № LS-K658-100, LifeSpan BioSciences, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для оценки уровня фермента эндогенной антиоксидантной системы супероксиддисмутазы (SOD) использовали коммерческий набор ELISA-kit (Rat Superoxide Dismutases (SOD) ELISA Kit, Cat. № MBS266897, MyBioSource, Калифорния, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для оценки уровня фермента эндогенной антиоксидантной системы каталазы (CAT) использовали коммерческий набор ELISA-kit (Rat Catalase ELISA Kit, Cat. № MBS726781, MyBioSource, Калифорния, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Уровни в образцах рассчитывали по стандартным кривым с использованием метода линейной регрессии и выражали в нМоль/мг белка (MDA), Ед/мг белка (SOD), Ед/мг белка (CAT).

2.4.3. Гистологическое исследование

Для проведения гистологического анализа фрагменты яичников обрабатывались с использованием аппарата для гистологической проводки тканей фирмы «Leica Biosystems» (Германия). Сначала образцы обезвоживались в спиртовых растворах с повышающейся концентрацией (50%, 60%, 70%, 80%, 96% и абсолютный спирт), затем проводились этапы просветления в ксилоле, и выдерживались при температуре +37 °С в насыщенном парафиновом растворе в ксилоле, после чего помещались в парафин, разогретый до +56 °С. Далее материал заливался в смесь парафина и воска, образуя парафиновые блоки. Из этих блоков с помощью автоматического ротационного микротом (Leica RM 2255, Германия) нарезались серийные срезы толщиной 2–3 мкм, которые окрашивались гематоксилином Майера и эозином или использовались для иммуногистохимических исследований на специально подготовленных адгезивных предметных стеклах. Затем полученные гистологические срезы анализировались в 10 полях зрения под световым микроскопом.

2.4.4. Морфометрическое исследование

Морфометрический анализ проводился в 10 случайных полях зрения микроскопа при увеличении $\times 400$, с использованием 5 рандомных срезов из каждого образца. Цифровые изображения гистологических срезов (отсканированные препараты) для морфометрического исследования получали с помощью системы видео-микроскопии (микроскоп Leica DM3000, Германия; камера DFC450 C; компьютер Platrun LG) и программного обеспечения Leica Application Suite (LAS) Version 4.9.0. и компьютерная программа Image J. В микропрепаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, подсчитывали количество овариальных фолликулов (примордиальных, первичных, вторичных, третичных и атретических) на всех сроках в соответствии с дизайном

эксперимента. При этом оценивали целостность ооцитов и базальной мембраны. Для дифференцирования фолликулов на различных стадиях созревания применяли общепризнанные гистологические критерии с учетом характеристик ядра ооцитов в соответствии со стандартной методикой [138].

2.4.5. Гистохимическое исследование

Для оценки состояния волокнистого компонента яичника из каждой группы отбирали по одному образцу. Использовали гистохимическое окрашивание трихромом по Массону, при котором волокнистые структуры окрашивались в синий цвет красителем (анилиновым синим). Морфометрическую оценку микропрепаратов, окрашенных по Массону, проводили с использованием анализатора изображений Leica Application Suite (LAS) Version 4.9.0 и программы Image J. Полученные данные затем преобразовывались в баллы, с учетом площади и оптической плотности (хромогенности) в относительных единицах: «1» – слабое (0–0,3); «2» – умеренное (0,3–0,6); «3» – выраженное (>0,6).

2.4.6. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование

Мультиплексное иммунофлуоресцентное окрашивание было выполнено с помощью 7-цветного флуоресцентного иммуногистохимического набора Opal (Akoya Biosciences, Marlborough, MA) в соответствии с протоколом производителя.

После депарафинизации, регидратации проводилось извлечение антигена в растворе R-UNIVERSAL в микроволновой печи 95 °C × 20 минут. Затем было выполнено блокирование эндогенной пероксидазы.

Исследование маркеров фиброгенеза в яичниках

Первый цикл окрашивания. Срезы инкубировали в течение 60 минут с антителами к Alpha-Smooth Muscle Actin (Abcam; clone ab124964, 1:200), а затем с полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP в течение 30 минут, после чего инкубацию

проводили с фторофором Opal480 также в течение 10 минут. Затем связанные первичные и вторичные антитела были разрушены с помощью повторного кипячения в микроволновой печи в растворе R-UNIVERSAL (см. описание выше).

Второй и третий цикл окрашивания. Повторение перечисленных манипуляций с антителами к TGF-beta 1 (Abcam; clone ab315254, 1:50) и Collagen-I (Abcam; clone ab138492, 1:1000), инкубацией полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP в течение 30 минут, а затем инкубацией с фторофором Opal690 Opal488 в течение 10 минут. Кроме того, образцы ткани были окрашены DAPI в течение 5 минут и установлены в ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Исследование маркеров тучных клеток

Первый цикл окрашивания. Срезы инкубировали в течение 60 минут с антителами к Chymase (Abcam clone ab186417; 1:500), а затем полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP в течение 30 минут, после чего инкубацию проводили с фторофором Opal480 также в течение 10 минут. Затем связанные первичные и вторичные антитела были разрушены с помощью повторного кипячения в микроволновой печи в растворе R-UNIVERSAL (см. описание выше).

Второй цикл окрашивания. Повторение перечисленных манипуляций с антителами к Tryptase (Abcam clone ab2378; 1:2500), инкубацией полимером Opal Anti-Ms + Rb HRP в течение 30 минут, а затем инкубацией с фторофором Opal690 в течение 10 минут. Кроме того, образцы ткани были окрашены DAPI в течение 5 минут и установлены в ProLong Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher Scientific).

Визуализация

Автоматизированная система количественной патологии Vectra Polaris (Akoya Biosciences) использовалась для многоспектральной визуализации при 20-кратном увеличении. После этого целые изображения слайдов были загружены в программное обеспечение для анализа изображений InForm (Akoya Bioscience).

Полномасштабные изображения препаратов получали, используя цифровой гистопатологический сканер KF-PRO-005.

Количество клеток соединительной ткани (фибробластов, эндотелиоцитов и др.), позитивно окрашенных с антителами к α -SMA, TGF- β и Collagen-I, а также долю тучных клеток после мультиплексного иммуногистохимического исследования с антителами к триптазе и химазе определяли при компьютерной морфометрии в 10 полях зрения суммарной площадью 1,6 мм², затем количественную плотность клеток на 1 мм² рассчитывали по формуле:

$$N_{\text{клеток в } 1 \text{ мм}^2} = \Sigma N_{\text{клеток}} \times 1000000 \text{ мкм}^2 / (N_{\text{полей зрения}} \times S),$$

где $\Sigma N_{\text{клеток}}$ – суммарное количество клеток соединительной ткани или тучных клеток во всех исследуемых полях зрения флуоресцентного микроскопа, S – площадь одного поля зрения в мкм².

2.4.7. TUNEL-анализ

Для детекции двунитевых разрывов ДНК в клетках гранулезного слоя и теки проводили Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL). После депарафинизации и регидратации парафиновые срезы по стандартному протоколу инкубировали в 100 мкл раствора протеиназы К при концентрации 20 мкг/мл с последующей инкубацией в течение 20 минут. Отмывку осуществляли посредством погружения предметных стекол в фосфатный буфер на 5 минут при комнатной температуре. Затем добавляли 100 мкл окрашивающего раствора 1X TdT (Thermo Fisher Scientific, США) и инкубировали 90 минут при 37°C. После удаления рабочего раствора TdT промывали в фосфатно-буферном растворе. Ядра докрасивали DAPI (синий спектр) (Thermo Fisher Scientific, США).

Полномасштабные изображения препаратов получали, используя цифровой гистопатологический сканер KF-PRO-005.

2.4.8. Молекулярно-генетическая оценка

Экспрессию мРНК генов факторов пролиферации (Ki-67) и терминации апоптоза (каспаза 3), а также маркеров внешнего (каспаза 8) и внутреннего (каспаза 9) путей апоптотического каскада; провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6) и противовоспалительного IL-10; а также ключевых участников PI3K/АКТ/mTOR, PI3K/АКТ/FOXO3 и TGF- β /SMAD сигнальных путей оценивали с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР). Для всех образцов была выделена кДНК.

Фрагменты яичников хранили в стабилизирующем растворе при температуре -70°C . Затем, образцы гомогенизировали по стандартному протоколу. Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора готовых реагентов RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Нидерланды). Синтез комплементарной ДНК (кДНК) проводили с использованием Super Script[™] VILO[™] Master Mix (Invitrogen). Выделенные кДНК подвергали РТ-ПЦР с использованием готовой смеси реагентов Absolute Blue QPCR Mix (Thermo Scientific, США) с SYBR Green I. РТ-ПЦР проводили с использованием Step One System (Applied Biosystems, США) и стандартного программного обеспечения. Анализ экспрессии генов проводили с использованием метода порогового цикла (Ct) и расчета относительной экспрессии генов согласно протоколу. Контроль осуществляли по референсному гену GAPDH. Подбор праймеров проводили на основе общедоступных баз данных по последовательностям ДНК и мРНК генов в базе данных NCBI с помощью программы Primer-BLAST (Таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Последовательности праймеров при проведении полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Gene	Direct Primer	Reverse Primer
Ki67	CTGCAGAGAAGGTTGGGATAAA	CTGACTTTGCCCAGAGATGAA
Caspase 3	TTTGTTTGTGTGCTTCTGAGCC	ATTTCTGTTGCCACCTTTCGC
Caspase 8	TGCCCTCAAGTTCCTGTGCTT	TTCCSTCCAACATCCCCTCTTC

Продолжение Таблицы 2.2

Caspase 9	GGCTGTCTACGGCACAGATGG	CTGGCTCGGGGTTACTGCCAG
TNF α	CCCAATCTGTGTCCTTCTAACT	CAGCGTCTCGTGTGTTTCT
IL-1b	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	CTGGATGCTCTCATCAGGACA
IL-6	TCTCCACAAGCGCCTTGG	CTCAGGGCTGAGATGCC
IL-10	AGTGGAGCAGGTGAAGAATG	GAGTGTCACGTAGGCTTCTATG
PI3K	GGTGCAGAGAGGAGTGGACAA	CGGGACAGGTGGAAGAACAGC
AKT	AAACCTGGCGGCCACGCTAC	TTGGCCAGGGCCACCTCCAT
mTOR	GGTGGACGAGCTCTTTGTCA	AGGAGCCCTAACACTCGGAT
FOXO3a	ATGGCAGAGGCACCAGCC	CAAAGCTGGCTACCAGGCTGA
TGF β R1	GCTGACATCTATGCAATGGG	ATATTTGGCCTTAACTTCTGTTC
SMAD4	CCCATCCTGGACATTACTGG	TACACCAGTCCGTCCTTTC
GAPDH	GCAAGGATACTGAGAGCAAGAG	GGATGGAATTGTGAGGGAGATG

2.4.9. Статистические методы

Для статистического анализа данных использовались программные пакеты SPSS версии 12.0 for Windows (IBM Analytics, США) и Microsoft Excel (версия 14.0.4760.1000, 32-разрядная). Количественные данные предварительно проверяли на нормальность распределения с использованием теста Колмогорова-Смирнова. В случае нормального распределения данные представляли в виде среднего значения (M) и стандартного отклонения (SD). Для статистического сравнения двух групп использовался t-критерий Стьюдента. При оценке различий между несколькими группами применялся однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим post-hoc тестом Тьюки для выявления значимых межгрупповых различий. В случае, если распределение данных отклонялось от нормального, применялись непараметрические методы: тест Манна-Уитни для парных сравнений и тест Крускала-Уоллиса для оценки различий между более чем двумя группами, дополненный post-hoc тестом Данна для уточнения значимых различий. Во всех случаях уровень значимости был установлен на уровне $p < 0,05$, что было установлено до начала исследования.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Характеристика лабораторных животных

Лабораторных животных размещали по 3 особи в каждой клетке, строго соблюдая установленные стандарты содержания: температура воздуха – в среднем 23°C, влажность воздуха – 40 – 60%, питание – стандартный рацион, вода – свободный доступ через поилку. На момент начала эксперимента возраст всех самок породы Вистар (n=180) составлял 9 – 10 недель, через месяц – 13–14 недель, через два месяца – 17–18 недель, через три месяца – 21–22 недели. В процессе всего эксперимента поведенческие реакции животных всех опытных групп, а также состояние их слизистых оболочек и кожи оставались в пределах контрольных значений. В группе локального облучения электронами суммарной дозой 30 Гр базальная температура тела (измеренная *per rectum*) у отдельных животных (в 10 % случаев) незначительно превышала контрольные значения (среднее значение 38,1°C), но отклонение составило не более 1°C. В то же время, базальная температура у крыс остальных групп на всех сроках, включая группу, подвергшуюся воздействию электронами в суммарной очаговой дозе 30 Гр на 1-м, 2-м и 3-м месяцах, не отличалась от результатов термометрии в контрольной группе.

Вес самок в течение эксперимента возрастал, прирост за три месяца наблюдения составил 20,4 % ($p \leq 0,05$). Прирост массы тела крысы из групп моноведения аскорбиновой кислоты и амифостина составил 19,5 % и 18,5 % ($p \leq 0,05$), соответственно. Локальное облучение электронами в суммарной дозе 30 Гр привело к постепенному снижению массы тела лабораторных животных, наиболее выраженному на первом месяце эксперимента с дальнейшим незначительным ее восстановлением. Тем не менее, к третьему месяцу в данной группе отмечали потерю средней массы тела по сравнению с первой неделей, составляющую 8,2 % ($p \leq 0,05$). Предлучевое введение аскорбиновой кислоты и

амифостина, напротив, способствовало частичному сохранению массы тела лабораторных животных, а прирост данного показателя к третьему месяцу эксперимента (по сравнению с первой неделей) в этих группах составил 8,3 % и 14,5 % ($p \leq 0,05$), соответственно (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Вес самок контрольной и опытных групп на 7, 30, 60 и 90 сутки

	n	7 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
Контроль	20	182,3±9,0	191,6±9,3	204,2±10,1	219,4±10,5
СОД 30 Гр	40	178,7±8,7	156,7±7,6*	162,4±8,1*	164,1±8,2*
СОД 30 Гр + АК	40	188,4±9,2	185,9±9,2!	193,6±9,6!	204,2±10,1!
СОД 30 Гр + АМИ	40	183,9±9,1	189,7±9,4!	196,1±9,6!	210,5±10,4!
АК	40	174,4±8,8!	186,3±9,1!	195,6±9,2!	208,4±10,2!
АМИ	20	180,3±8,9!	187,0±9,2!	199,3±9,8!	213,7±10,4!

Примечание: Данные представлены в формате $M \pm SD$. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

3.2. Оценка гормонального статуса

У всех лабораторных животных на сроках 7, 30, 60 и 90 суток проводили оценку уровней гонадотропных гормонов – фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ), а также маркеров овариального резерва – антимюллерова гормона (АМГ), и эстрогении – эстрадиола (Е2). Так, в контрольной группе на первой неделе эксперимента показатели ФСГ и ЛГ составили 5,2 нг/мл и 6,3 мЕд/мл, соответственно. Впоследствии, на 90 сутки отмечали незначительное снижение уровня ФСГ до 5,0 нг/мл. Аналогичную картину отмечали в этой группе при исследовании эстрадиола Е2 и АМГ, уровни которых на первой неделе составили 50,7 пг/мл и 9,8 нг/мл, соответственно. Однако, по мере взросления животных, данные показатели претерпевали незначительное снижение: уровня эстрадиола – на 14,1 % ($p \leq 0,05$), а уровня АМГ – на 7,2 % ($p \leq 0,05$) к 90 суткам эксперимента. Аналогичный гормональный статус

на всех сроках эксперимента демонстрировали животные из групп введения аскорбиновой кислоты и амифостина без последующего воздействия электронами (Таблица 3.2, Таблица 3.3).

Локальное облучение яичников электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр привело к развитию признаков радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников, а именно – к гипоестрогении и снижению овариального резерва, оцененных по уровням гормонов эстрадиола (E2) и АМГ, концентрации которых были ниже контрольных значений уже на первой неделе эксперимента – на 30,8 % и на 26,6 %, соответственно ($p \leq 0,05$). В течение эксперимента наблюдали продолжающееся снижение этих уровней, а на третьем месяце они были ниже контрольных на 32,2 % (E2) и на 55 % (АМГ) ($p \leq 0,05$), подтверждая нарушение гормон-синтезирующей функции яичников. Кроме того, в этой группе к концу эксперимента наблюдали выраженные признаки резистентности яичников к гонадотропинам, проявляющейся повышением уровней ФСГ и ЛГ в сыворотке крови по сравнению с контрольной группой в 2,3 раза и на 28,5 % ($p \leq 0,05$), соответственно (Таблица 3.2, Таблица 3.3).

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты привело к частичной протекции гормонального статуса при воздействии локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, снижая степень гипоестрогении и овариальный резерв, оцененные по уровням эстрадиола и АМГ: данные показатели на первой неделе были ниже контрольных значений на 22,1 % и на 15,4 % ($p \leq 0,05$), соответственно, а к окончанию эксперимента возвращались до нормальных цифр. При этом практически не наблюдали повышения гонадотропных гормонов ФСГ и ЛГ в течение всего эксперимента, а на последнем сроке уровень ФСГ лишь незначительно превышал контрольные показатели. Аналогичные изменения гормонального статуса наблюдали в группе предлучевого введения амифостина при воздействии локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр на всех сроках эксперимента (Таблица 3.2, Таблица 3.3).

Таблица 3.2 – Показатели уровней гонадотропных гормонов ФСГ (в нг/мл) и ЛГ (в мЕд/мл) в сыворотке крови контрольной и опытных групп на 7, 30, 60 и 90 сутки

	7 сутки		30 сутки		60 сутки		90 сутки	
	ФСГ	ЛГ	ФСГ	ЛГ	ФСГ	ЛГ	ФСГ	ЛГ
Контроль	5,2±0,2	6,3±0,3	5,3±0,2	6,5±0,3	5,2±0,2	6,3±0,3	5,0±0,2	6,3±0,3
СОД 30 Гр	8,3±0,4*	6,7±0,3*	9,5±0,4*	6,9±0,3*	10,3±0,4*	7,4±0,3*	11,7±0,4*	8,1±0,3*
СОД 30 Гр + АК	6,5±0,3*!	6,4±0,3	6,3±0,3*!	6,7±0,3	5,9±0,2*!	6,6±0,3!	5,6±0,2*!	6,4±0,3!
СОД 30 Гр + АМИ	6,6±0,3*!	6,4±0,3	6,5±0,2*!	6,6±0,2	6,2±0,3*!	6,7±0,2!	5,4±0,2!	6,5±0,2!
АК	5,3±0,2!	6,3±0,3!	5,4±0,2!	6,5±0,3!	5,4±0,2!	6,2±0,3!	4,9±0,2!	6,3±0,3!
АМИ	5,1±0,2!	6,4±0,3!	5,2±0,2!	6,4±0,3!	5,2±0,2!	6,2±0,3!	5,0±0,2!	6,4±0,3!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

Таблица 3.3 – Показатели уровней половых гормонов эстрадиола Е2 (в пг/мл) и АМГ (в нг/мл) в сыворотке крови контрольной и опытных групп на 7, 30, 60 и 90 сутки

	7 сутки		30 сутки		60 сутки		90 сутки	
	Е2	АМГ	Е2	АМГ	Е2	АМГ	Е2	АМГ
Контроль	50,7±2,4	9,8±0,4	48,2±2,3	9,9±0,4	45,9±2,2	9,5±0,4	43,6±2,1	9,1±0,4
СОД 30 Гр	35,1±1,6*	7,2±0,3*	33,4±1,5*	6,4±0,3*	31,7±1,5*	5,2±0,2*	29,6±1,4*	4,1±0,2*
СОД 30 Гр + АК	39,5±1,7*!	8,3±0,4*!	42,4±2,0!	8,6±0,4*!	44,2±2,0!	9,0±0,4!	47,7±2,2!	9,3±0,4!
СОД 30 Гр + АМИ	37,9±1,6*	7,9±0,3*!	39,8±1,8*!	8,0±0,4*!	42,7±2,5*!	8,6±0,3*!	46,0±2,0*!	8,9±0,4!
АК	46,6±2,4!	9,6±0,4!	45,8±2,3!	9,8±0,4!	43,5±2,2!	9,4±0,4!	42,9±2,0!	9,2±0,4!
АМИ	49,4±2,4!	9,7±0,4!	46,7±2,3!	9,8±0,4!	44,9±2,2!	9,3±0,4!	44,0±2,1!	9,1±0,4!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

3.3. Иммуноферментный анализ редокс-гомеостаза в яичниках

Иммуноферментный анализ гомогената яичников проводили с использованием коммерческих наборов ELISA-kit для оценки концентраций маркера пероксидации липидов (малонового диальдегида, MDA) и экспрессии ферментов эндогенной антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы (SOD) и каталазы (CAT). В контрольной группе по мере взросления животных отмечали незначительный прирост MDA (на 5,4 %; $p \leq 0,05$) при снижении ферментативной активности локальной антиоксидантной защиты яичника (SOD – на 9 %, CAT – на 5,7 %; $p \leq 0,05$) на третьем месяце по сравнению с началом эксперимента. Аналогичные тенденции возрастного изменения гомеостаза обнаружили в группах моноведения аскорбиновой кислоты и амифостина (Таблица 3.4, Таблица 3.5).

Локальное облучение яичников электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр привело к резкому увеличению уровня липидной пероксидации, оцененной по количеству малонового диальдегида в гомогенате. Так, на первой неделе уровень MDA составил 21,3 нМоль/мг белка, что превышает контрольные значения в 5,7 раза ($p \leq 0,05$). В течение эксперимента, повышенная концентрация MDA в этой группе сохранялась с незначительным ее снижением к третьему месяцу на 14,6 % по сравнению с начальными сроками ($p \leq 0,05$). Высокий уровень оксидации сопровождался не менее выраженным угнетением системы антиоксидантной защиты: уже на первой неделе обнаружили резкое снижение уровней SOD и CAT в гомогенате яичника на 35,9 % и на 53,6 %, соответственно, по сравнению с контролем ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что в этой группе практически не наблюдали признаков восстановления функциональной активности редокс-системы, что подтверждается уровнями SOD и CAT, сниженными по сравнению с контрольными значениями на 47,8 % и на 34,3 % на третьем месяце эксперимента ($p \leq 0,05$), соответственно (Таблица 3.4, Таблица 3.5).

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты способствовало значительному снижению локального оксидативного стресса, эффективно снижая

количество продуктов пероксидации липидов (MDA) – на 43,7 % по сравнению с показателями во II-ой группе ($p \leq 0,05$) уже на первой неделе эксперимента. Уровень MDA на 90 сутках после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр демонстрировал наименьшие значения, превышающие показатели контрольной группы лишь на 12,8 % ($p \leq 0,05$). Помимо воздействия на оксидативный стресс, аскорбиновая кислота индуцировала экспрессию ферментов эндогенной антиоксидантной защиты, что выразалось в резком увеличении их локальных концентраций в яичнике на первой неделе эксперимента выше контрольных значений: SOD – на 25,3 %, CAT – на 63,4 % ($p \leq 0,05$). К 90 суткам данные показатели в этой группе практически возвращались к контрольным значениям.

Следует отметить, что предлучевое введение аскорбиновой кислоты демонстрировало более выраженное подавление оксидативного стресса и стимуляцию антиоксидантной защиты по сравнению с амифостином на ранних сроках эксперимента. Так, на первой неделе уровень MDA в группе предлучевого введения амифостина превышал показатели группы аскорбиновой кислоты на 29,2 % ($p \leq 0,05$), индукция CAT была ниже на 9,5 % ($p \leq 0,05$) на первой неделе, а SOD – на 3,8 % ($p \leq 0,05$) на первом месяце исследования. Тем не менее, к окончанию эксперимента не было различий при анализе концентраций исследуемых маркеров редокс-системы в группах предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина перед воздействием локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр (Таблица 3.4, Таблица 3.5).

Таблица 3.4 – Результаты иммуноферментного анализа маркеров редокс-гомеостаза SOD (в Ед/мг белка), MDA (в нМоль/мг белка) и CAT (в Ед/мг белка) в контрольной и опытных группах на 7 и 30 сутки эксперимента

	7 сутки			30 сутки		
	SOD	MDA	CAT	SOD	MDA	CAT
Контроль	57,8±2,5	3,7±0,1	7,1±0,3	54,9±2,5	3,7±0,1	7,0±0,3
СОД 30 Гр	37,1±1,6*	21,3±1,0*	3,3±0,1*	33,4±1,6*	20,9±1,0*	3,5±0,1*
СОД 30 Гр + АК	72,4±3,5*!	12,0±0,5*!	11,6±0,5*!	67,2±3,3*!	7,6±0,3*!	10,1±0,5*!
СОД 30 Гр + АМИ	66,9±3,1*!	15,5±0,7*!+	12,7±0,5*!+	64,7±3,2*!+	11,5±0,5*!+	10,8±0,5*!
АК	59,3±2,9!	3,6±0,1!	7,1±0,3!	55,6±2,5!	3,6±0,1!	7,0±0,3!
АМИ	62,6±3,1!	3,6±0,1!	7,3±0,3!	57,2±2,5!	3,6±0,1!	7,1±0,3!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

Таблица 3.5 – Результаты иммуноферментного анализа маркеров редокс-гомеостаза SOD (в Ед/мг белка), MDA (в нМоль/мг белка) и CAT (в Ед/мг белка) в контрольной и опытных группах на 60 и 90 сутки эксперимента

	60 сутки			90 сутки		
	SOD	MDA	CAT	SOD	MDA	CAT
Контроль	53,7±2,6	3,8±0,1	6,9±0,3	52,6±2,5	3,9±0,1	6,7±0,2
СОД 30 Гр	29,3±1,4*	19,7±0,8*	4,0±0,2*	27,5±1,3*	18,2±0,1*	4,4±0,2*
СОД 30 Гр + АК	63,5±3,1*!	5,9±0,2*!	8,3±0,4*!	58,7±2,6*!	4,4±0,2*!	6,1±0,3*!
СОД 30 Гр + АМИ	63,0±3,1*!	7,2±0,3*!+	7,9±0,3*!	60,3±2,9*!	4,7±0,2*!	6,5±0,3!
АК	53,2±2,6!	3,7±0,1!	7,0±0,3!	50,9±2,4!	3,8±0,1!	6,9±0,3!
АМИ	54,9±2,5!	3,6±0,1!	7,1±0,2!	53,3±2,5!	3,7±0,1!	6,9±0,3!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

3.4. Макроскопическое и цитологическое исследование

На протяжении всего периода наблюдений внешний вид животных, состояние их шерсти, кожи и слизистых оболочек, а также двигательная активность оставались стабильными. Во время адаптации у животных снизилась настороженность, страх и агрессивность по отношению к проводимым манипуляциям.

Цитологическая картина на фазе диэструса характеризовалась наличием большого объема густой слизи; клетки – базальные и парабазальные эпителиоциты, умеренное количество. Во влагалищных мазках отметили чередование стадии лейкоцитарной инфильтрации и их отсутствия. К концу диэструса в некоторых случаях наблюдалось раннее ороговение эпителиальных клеток, при этом ороговевшие клетки перемешивались с лейкоцитами и увеличенными эпителиальными клетками с раздувшимися ядрами.

При изъятии яичников лабораторных животных, локально облученных электронами во фракционном режиме в суммарной дозе 30 Гр, визуально отмечали их уменьшение в размерах, уплощенную форму с крупнобугристой поверхностью, белесовато-желтого цвета, истонченной белочной оболочкой, глубокими бороздами и незначительной асимметрией по сравнению с контрольной группой (Рисунок 3.1, Рисунок 3.2, Рисунок 3.3). Яичники животных других экспериментальных групп визуально не отличались от таковых в группе контроля (Рисунок 3.4, Рисунок 3.5).

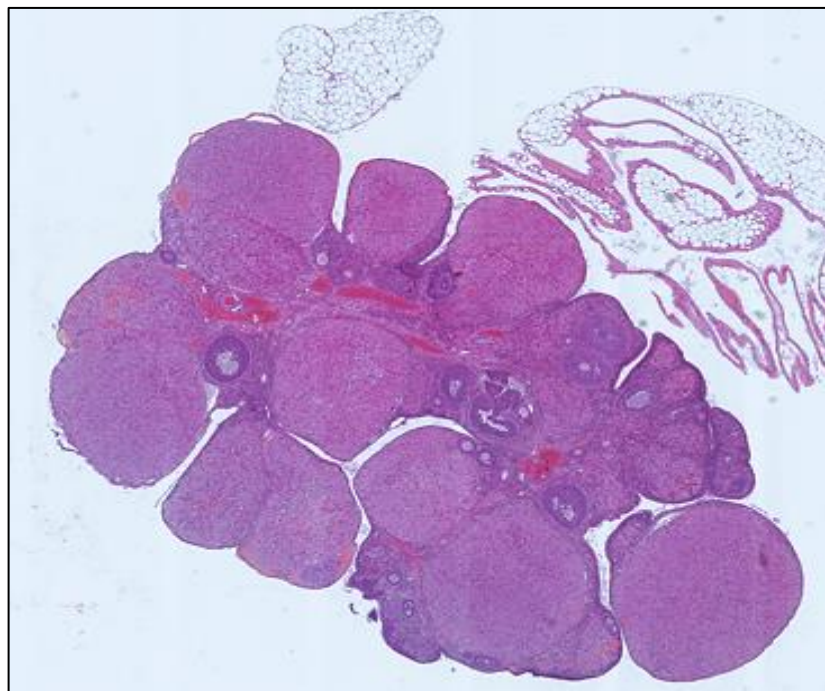


Рисунок 3.1 – Яичник контрольной группы, 7 сутки; окраска – гематоксилином и эозином, гистоскан

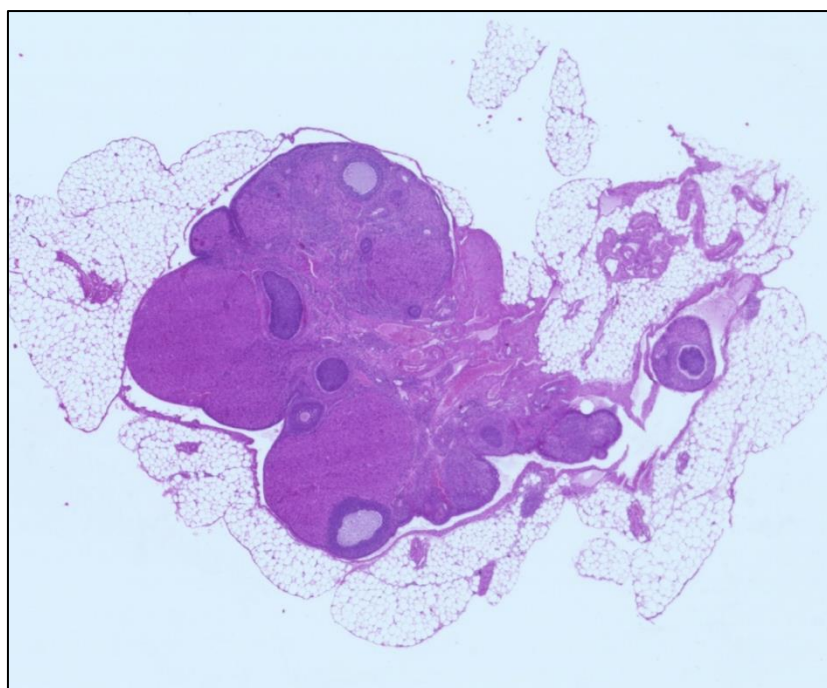


Рисунок 3.2 – Яичник после локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр, 7 сутки; окраска – гематоксилином и эозином, гистоскан

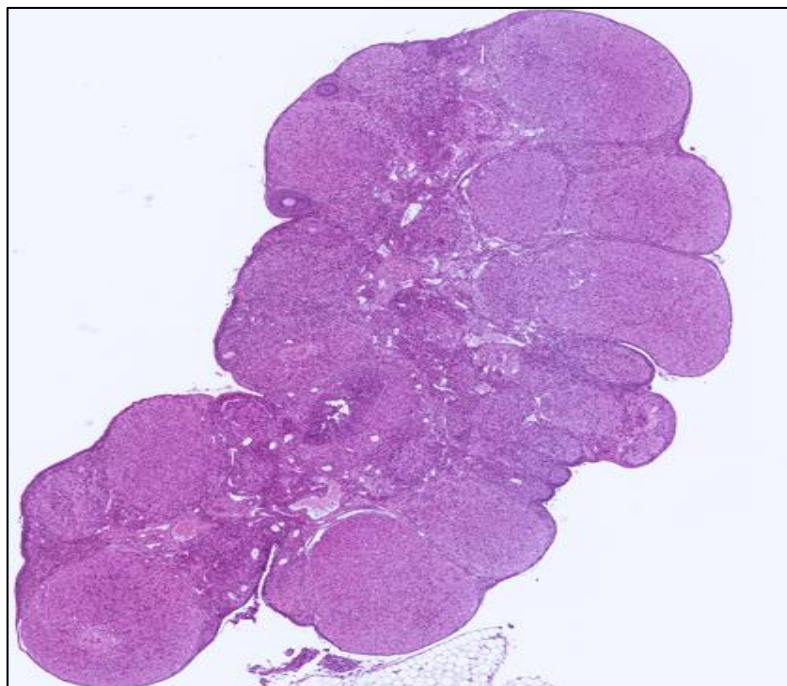


Рисунок 3.3 – Яичник после локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр, 90 сутки; окраска – гематоксилином и эозином, гистоскан

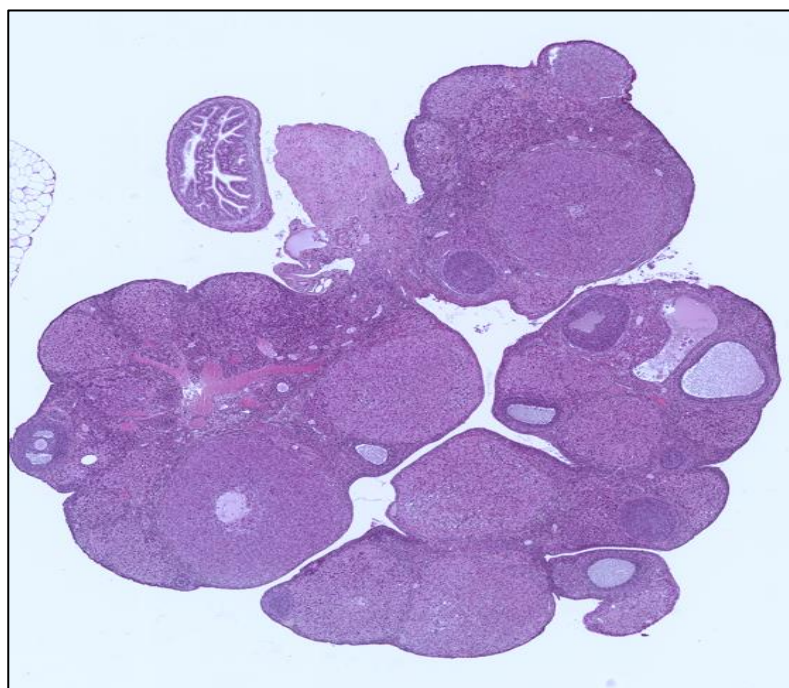


Рисунок 3.4 – Яичник после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр, 7 сутки; окраска – гематоксилином и эозином, гистоскан

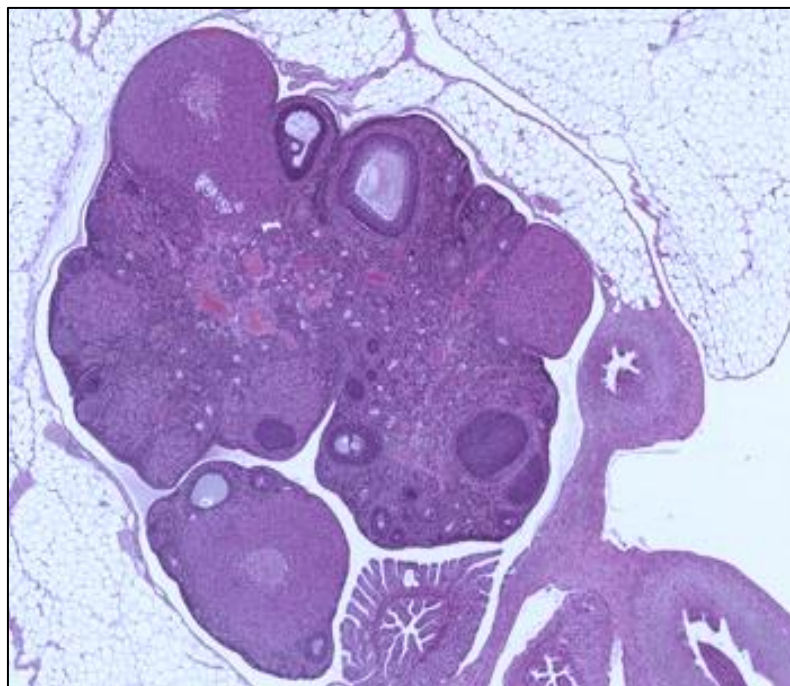


Рисунок 3.5 – Яичник после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр, 90 сутки; окраска – гематоксилином и эозином, гистоскан

3.5. Гистологическое исследование яичников

3.5.1. Гистологическая картина яичников контрольной группы

На протяжении всего срока наблюдения гистологическая картина яичников животных контрольной группы не менялась (Рисунок 3.6). В группах введения аскорбиновой кислоты и амифостина без облучения обнаружили такую же гистоархитектонику яичника. Так, яичник снаружи покрыт мезотелием, под которым располагается белочная оболочка, состоящая из плотной волокнистой соединительной ткани. От нее отходили соединительнотканые тяжи, которые проникают в направлении к мозговому веществу. В паренхиме яичника выделяются две основные области: корковое (основная часть органа) и мозговое (узкая центральная область). Мозговое вещество в основном состоит из рыхлой неоформленной волокнистой соединительной ткани, в которой проходят

кровеносные сосуды и нервы. В корковом веществе расположены фолликулы, находящиеся на различных стадиях развития: примордиальные, первичные, вторичные, третичные, а также атретические.

В некоторых яичниках можно обнаружить желтое тело, состоящее из лютеоцитов, одни – гранулезные, они имеют крупные, округлой формы клетки с ячеистой цитоплазмой с пигментом желтого цвета и многочисленными кровеносными сосудами, а также – мелкие клетки – лютеоциты и фибробласты теки. В некоторых срезах встречается белое тело – соединительнотканый рубец.

В субкапсулярной зоне располагаются многочисленные примордиальные фолликулы, которые имеют небольшой размер и окружены тонким слоем фолликулярных клеток вокруг первичного овоцита на стадии диплотены профазы мейоза, прилегающих к базальной мембране. Помимо этого, встречаются развивающиеся фолликулы (первичные, вторичные, третичные), содержащие ооциты на различных стадиях мейоза: диплотен, диакинез, а также первое деление мейоза (метафаза, анафаза, телофаза).

Первичные фолликулы крупнее примордиальных, вокруг первичного овоцита формируется прозрачная оболочка и 1 – 2 слоя фолликулярных эпителиоцитов кубической формы, расположенных внутри от базальной мембраны. Вторичные фолликулы имеют больший размер, образованы многослойным гранулезным слоем, а также сохраняют блестящую оболочку вокруг первичного овоцита. В этой стадии начинается формирование теки, состоящей из двух слоев: внутренний (эндокриноциты с округлыми ядрами) и наружный (фибробласты), а также появляются микрополости, заполненные секретом.

Третичные (везикулярные, антральные) фолликулы имеют наибольший размер, основную часть объема занимает крупная полость, заполненная жидкостью. Гранулезный слой располагается по периферии прозрачной оболочки вторичного овоцита, который смещен к периферии, образуя яйценосный бугорок. Тека сохраняет двуслойное строение. В некоторых яичниках можно встретить третичные фолликулы со вторичным овоцитом (клетка с объемной цитоплазмой,

окруженная прозрачной оболочкой и эпителиоцитами гранулезы) и полярными тельцами (полоцитами).

Атретические фолликулы (атретические тельца) не содержат овоцита и фолликулярных клеток. Они имеют сморщенную эозинофильную блестящую оболочку в центре, окружены клетками теки, которые выполняют роль клеток гранулезы в процессе синтеза эстрогена, и замещены волокнистой соединительной тканью.

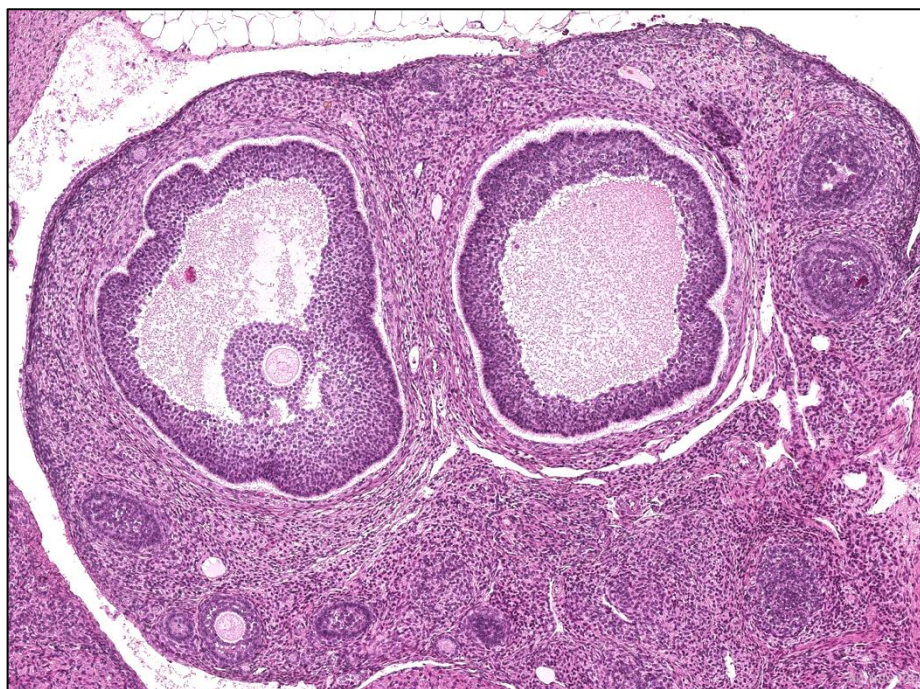


Рисунок 3.6 – Яичник, фрагмент, контрольной группы на 7 сутки. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич. $\times 100$

3.5.2. Гистологическая картина яичников опытных групп

В микропрепаратах яичников, локально облученных электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр, при гистологическом исследовании, на ранних сроках обнаружили признаки радиационно-индуцированного повреждения: уменьшение количества овариальных фолликулов, которые обладали прерывистой текой и диффузно распределялись по площади среза; в просвете кровеносных сосудов мелкого и среднего калибров наблюдали

признаки нарушения местного кровообращения – полнокровие и стаз форменных элементов крови (Рисунок 3.7). Кортикальное вещество по объему практически не преобладало над мозговым, в нем отмечали небольшие геморрагические очаги и лишь единичные овариальные фолликулы, преимущественно примордиальные. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты и амифостина способствовало частичной протекции яичников, а при гистологической оценке микропрепаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, отмечали слабо выраженные признаки острого радиационно-индуцированного повреждения – мелкие точечные кровоизлияния в строме органа и застой в просвете кровеносных сосудов мелкого и среднего калибров. Кортикальное вещество в основном с неизменной гистоархитектоникой, в большом количестве обнаружены овариальные фолликулы на разных стадиях созревания (Рисунок 3.8).

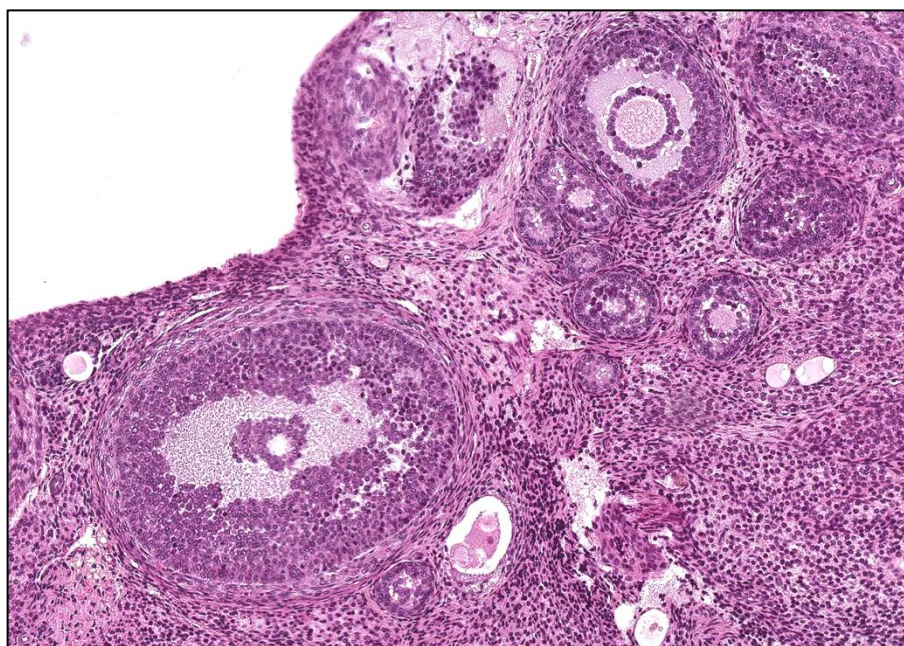


Рисунок 3.7 – Фрагмент яичника на 7 сутки после локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич. $\times 200$

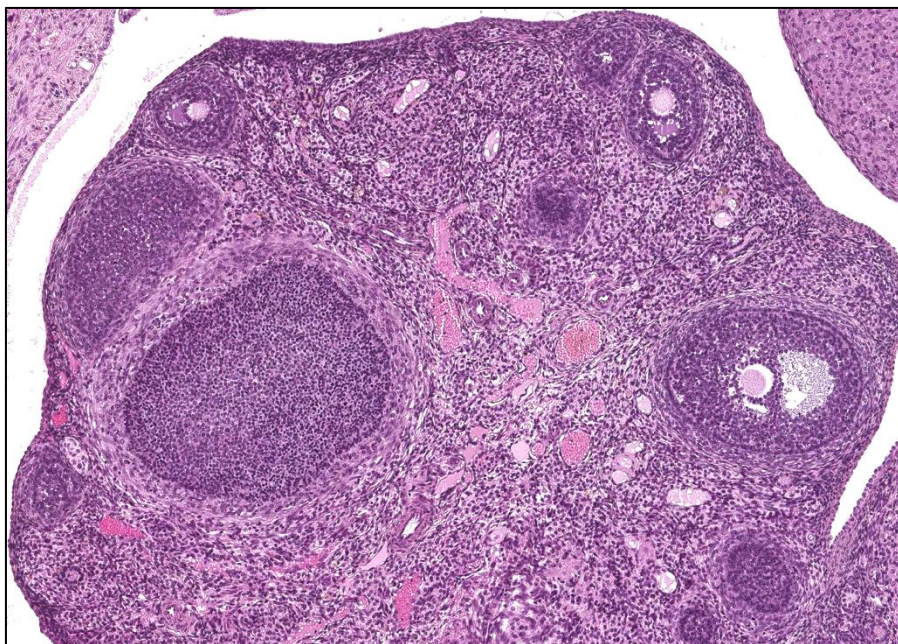


Рисунок 3.8 – Фрагмент яичника на 7 сутки после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич. $\times 200$

К третьему месяцу эксперимента гистологическая картина в яичниках, локально облученных электронами во фракционном режиме в суммарной дозе 30 Гр: значительно снижение количества овариальных фолликулов с прерывистой текой и стазом форменных элементов крови в просвете некоторых кровеносных сосудов, а также значительное разрастание соединительнотканного компонента яичника («преобладание» мозгового вещества яичника над корковым), состоящего из пучков волокнистой соединительной ткани, расположенных параллельно друг другу (Рисунок 3.9). В некоторых срезах группы предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина также наблюдали единичные пучки, однако доля овариальных фолликулов значительно превышала таковую для группы локального облучения электронами (Рисунок 3.10). Морфологическая картина яичников животных, которым вводили аскорбиновую кислоту и амифостин, на третьем месяце соответствовала таковой в контрольной группе.

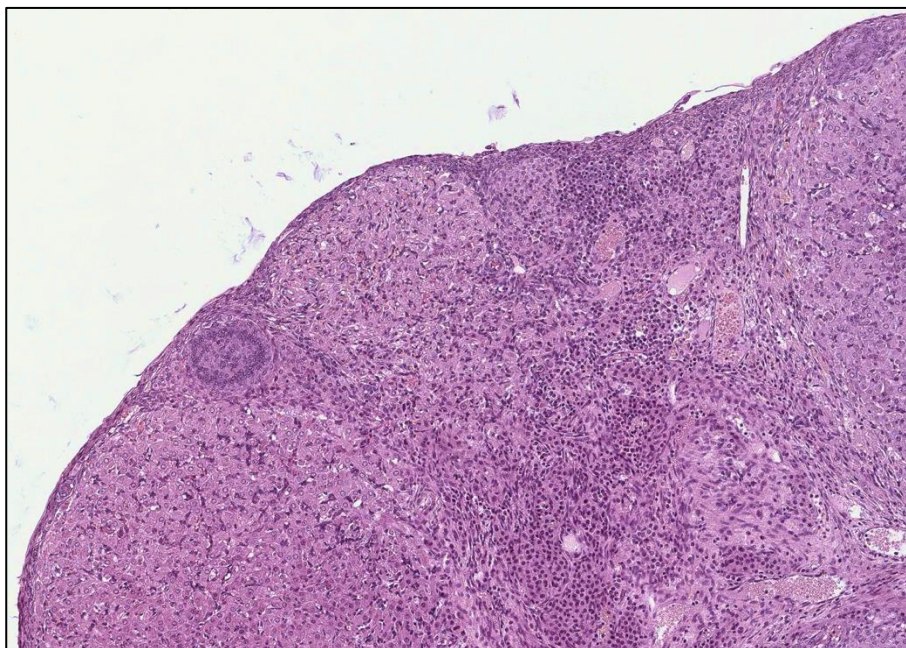


Рисунок 3.9 – Фрагмент яичника на 90 сутки после локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич. $\times 200$

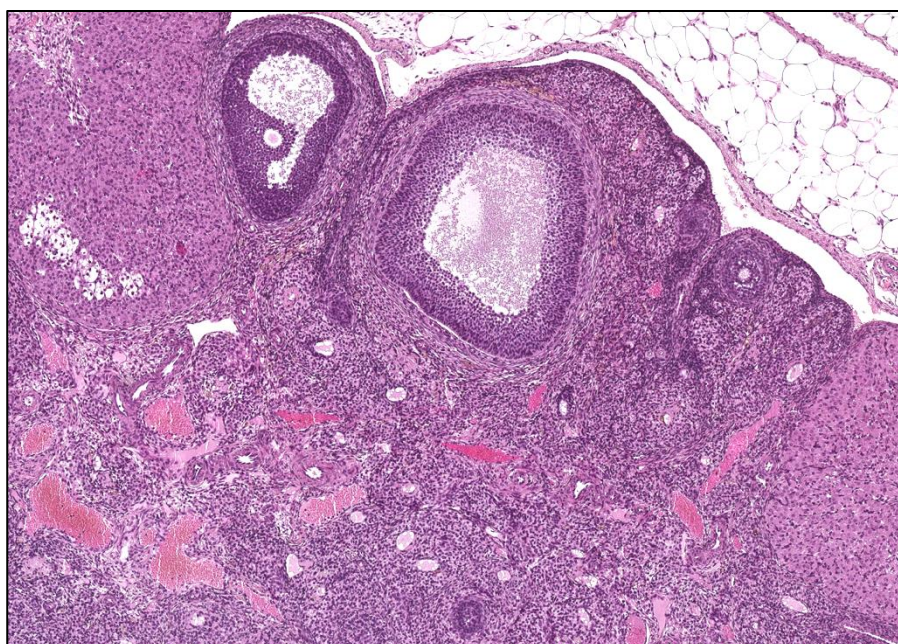


Рисунок 3.10 – Фрагмент яичника на 90 сутки после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. Окраска: гематоксилин и эозин, увелич. $\times 200$

3.5.3. Морфометрическая оценка овариального резерва

Изменения овариального резерва подтверждали морфометрическим анализом микропрепаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, при помощи компьютерной программы ImageJ (Рисунок 3.11). Так, в поле зрения светового микроскопа подсчитывали количество овариальных фолликулов с учетом особенностей их строения на разных стадиях созревания.

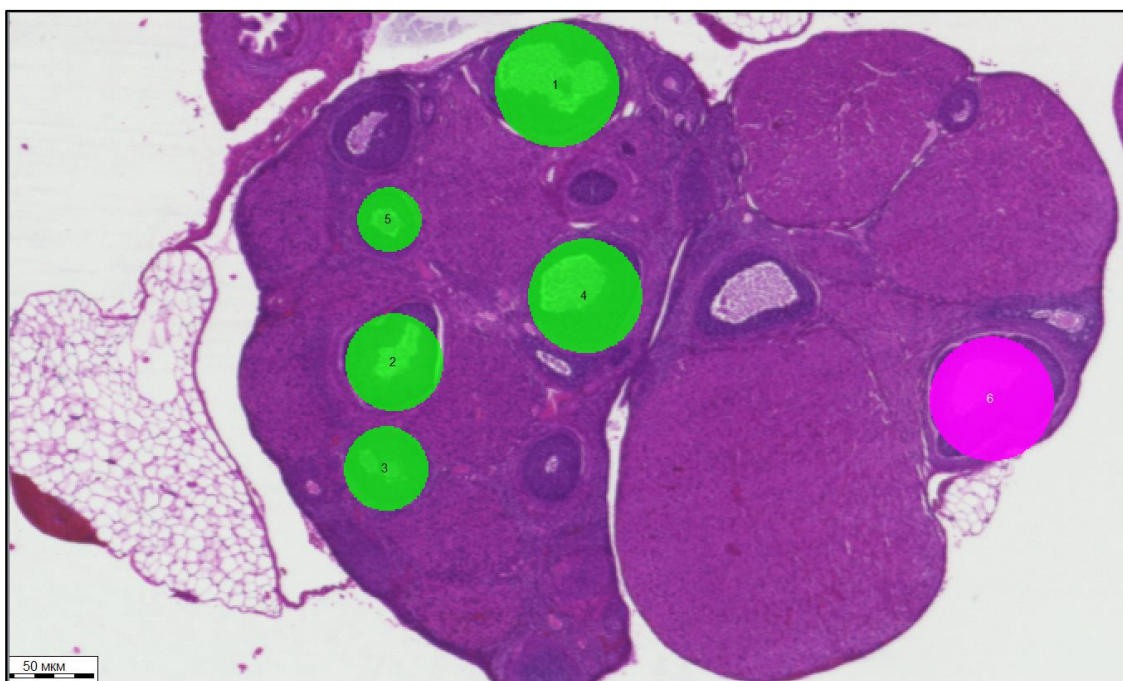


Рисунок 3.11 – Морфометрический анализ цифрового изображения яичника контрольной группы, обработанного при помощи компьютерной программы ImageJ, овариальные фолликулы выделены зеленым цветом

В контрольной группе через 7 суток в микропрепаратах отмечали большое число овариальных фолликулов на разных стадиях развития. Чаще всего встречались примордиальные фолликулы (в среднем – 12,5 шт. в поле зрения светового микроскопа). Количество первичных, вторичных и третичных фолликулов в этой группе составляло 10,4 шт., 9,8 шт. и 7,7 шт., соответственно. Кроме того, обнаружили некоторое количество атретических фолликулов (3,6 шт.), являющееся нормой (Таблица 3.6, Таблица 3.7, Таблица 3.8, Таблица 3.9).

Практически аналогичные значения количественного состава фолликулов наблюдали в группах моноведения аскорбиновой кислоты и амифостина. С возрастом овариальный резерв животных этих групп незначительно сокращался, а количество атретических фолликулов в контрольной группе превышало таковое на первом сроке на 47,2 % (Таблица 3.6, Таблица 3.7, Таблица 3.8, Таблица 3.9).

Воздействие локального облучения электронами во фракционном режиме в суммарной дозе 30 Гр привело к резкому сокращению овариального резерва. Морфометрическое исследование подтвердило это предположение. Так, через 7 суток после воздействия электронами в этой группе отмечали выраженное уменьшение количества примордиальных (на 43,2 %), первичных (на 44,3 %), вторичных (на 52 %) и третичных (на 55,9 %) овариальных фолликулов на фоне резкого возрастания числа атретических (в 3,0 раза) по сравнению с показателями контрольной группы на том же сроке ($p \leq 0,05$). Тенденция к уменьшению количества овариальных фолликулов и нарастанию числа атретических сохранялась в этой группе на протяжении всего эксперимента (Таблица 3.6, Таблица 3.7, Таблица 3.8, Таблица 3.9).

На третьем месяце их количество было значительно снижено по сравнению с контрольной группой: примордиальных – на 66,4 %, первичных – на 73,2 %, вторичных – на 81,6 %, третичных – на 84,5 % ($p \leq 0,05$). В то же время, количество атретических фолликулов также было снижено в этой группе (на 32,1 %) по сравнению с контрольными значениями ($p \leq 0,05$) ввиду общего низкого количества идентифицируемых фолликулов (Таблица 3.6, Таблица 3.7, Таблица 3.8, Таблица 3.9).

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты привело к протекции овариальных фолликулов от воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, что проявлялось менее выраженным уменьшением их количества через 7 суток по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$): примордиальных – на 16,8 %, первичных – на 8,7 %, вторичных – на 8,2 %. В то же время, количество атретических фолликулов в этой группе в 2,0 раза превышало

контрольные значения ($p \leq 0,05$) (Таблица 3.6, Таблица 3.7, Таблица 3.8, Таблица 3.9).

Тем не менее, в течение эксперимента количество овариальных фолликулов в этой группе постепенно увеличивалось, практически достигая на третьем месяце эксперимента контрольных значений. Количество большинства фолликулов разных стадий овофолликулогенеза, в том числе и атретических, было ниже в этой группе на 7,2 %, 14,7 %, 13,2 %, 13,4 % и 9,5 % по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$), соответственно. Практически аналогичные показатели овариального резерва демонстрировали лабораторные животные из группы предлучевого введения амифостина, однако на первом месяце его применение приводило к формированию большего числа атретических фолликулов (на 17,8 %) по сравнению с показателями предлучевого введения аскорбиновой кислоты ($p \leq 0,05$), а к третьему месяцу амифостин способствовал сохранению более низкого числа третичных фолликулов (на 18 %) и более высокого числа атретических фолликулов (на 10,4 %) по сравнению с предлучевым использованием аскорбиновой кислоты ($p \leq 0,05$) (Таблица 3.6, Таблица 3.7, Таблица 3.8, Таблица 3.9).

Таблица 3.6 – Количество овариальных фолликулов на разных стадиях в контрольной и опытных группах на 7 сутки

Группа	Примордиальных	Первичных	Вторичных	Третичных	Атретических
Контроль	12,5±0,6	10,4±0,5	9,8±0,4	7,7±0,3	3,6±0,1
СОД 30 Гр	7,1±0,3*	5,8±0,2*	5,1±0,2*	3,4±0,1*	10,8±0,5*
СОД 30 Гр + АК	10,4±0,5*!	9,5±0,4*!	9,0±0,4!	7,9±0,3!	7,3±0,3*!
СОД 30 Гр + АМИ	9,9±0,4*!	9,0±0,4*!	8,7±0,4*!	7,8±0,3!	8,6±0,5*!+
АК	13,2±0,6!	10,3±0,5!	9,9±0,4!	7,5±0,3!	3,7±0,1!
АМИ	12,9±0,6!	10,7±0,5!	10,2±0,5!	8,0±0,4!	3,6±0,1!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

Таблица 3.7 – Количество овариальных фолликулов на разных стадиях в контрольной и опытных группах на 30 сутки

Группа	Примордиальных	Первичных	Вторичных	Третичных	Атретических
Контроль	11,3±0,5	9,5±0,4	9,0±0,4	6,6±0,3	4,2±0,2
СОД 30 Гр	5,9±0,2*	4,2±0,2*	3,2±0,1*	2,8±0,1*	9,4±0,5*
СОД 30 Гр + АК	10,0±0,5*!	8,8±0,4!	7,9±0,3*!	6,1±0,3!	6,3±0,3*!
СОД 30 Гр + АМИ	9,7±0,4*!	8,7±0,4*!	7,9±0,3*!	6,5±0,3!	6,7±0,3*!
АК	12,3±0,6!	9,4±0,4!	9,0±0,4!	6,9±0,3!	4,0±0,2!
АМИ	11,8±0,5!	9,3±0,4!	8,8±0,4!	6,7±0,3!	4,1±0,2!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

Таблица 3.8 – Количество овариальных фолликулов на разных стадиях в контрольной и опытных группах на 60 сутки

Группа	Примордиальных	Первичных	Вторичных	Третичных	Атретических
Контроль	10,5±0,5	8,8±0,4	8,1±0,4	5,3±0,2	4,7±0,2
СОД 30 Гр	4,4±0,2*	3,5±0,1*	2,3±0,1*	1,6±0,05*	5,6±0,2*
СОД 30 Гр + АК	9,4±0,4*!	7,9±0,3*!	7,1±0,3*!	4,8±0,2*!	5,5±0,2*
СОД 30 Гр + АМИ	9,5±0,4*!	7,9±0,3*!	7,0±0,3*!	4,5±0,2*!	6,0±0,3*+
АК	10,8±0,5!	8,8±0,4!	8,2±0,4!	5,5±0,2!	4,9±0,2!
АМИ	10,7±0,5!	8,9±0,4!	8,1±0,4!	5,2±0,2!	4,8±0,2!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

Таблица 3.9 – Количество овариальных фолликулов на разных стадиях в контрольной и опытных группах на 90 сутки

Группа	Примордиальных	Первичных	Вторичных	Третичных	Атретических
Контроль	9,8±0,4	8,2±0,4	7,6±0,3	4,5±0,2	5,3±0,2
СОД 30 Гр	3,3±0,1*	2,2±0,1*	1,4±0,07*	0,7±0,03*	3,6±0,1*
СОД 30 Гр + АК	9,1±0,4!	7,0±0,3*!	6,6±0,3*!	3,9±0,1*!	4,8±0,2!
СОД 30 Гр + АМИ	9,2±0,4!	7,3±0,3*!	6,3±0,2*!	3,2±0,1*!+	5,3±0,2!+
АК	9,6±0,4!	8,3±0,4!	7,5±0,3!	4,2±0,2!	5,5±0,2!
АМИ	9,8±0,3!	8,5±0,4!	7,3±0,3!	4,3±0,2!	5,4±0,2!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

3.6. TUNEL-анализ

Для количественно-качественной оценки прямого пути лучевого повреждения (воздействия электронов на генетический материал овоцитов, фолликулярных клеток и клеток теки) было проведено TUNEL-исследование яичников, которое позволяет детектировать участки фрагментации ДНК (при флюоресцентной микроскопии – сигналинг зеленого цвета). В качестве контроля использовали DAPI (синее свечение). При этом подсчитывали количество TUNEL-позитивных клеток в яичниках, полученные данные анализировали статистически и представили в виде таблицы (Таблица 3.10).

Так, в контрольной группе через 7 суток была обнаружена незначительная доля TUNEL-позитивных клеток (преимущественно клеток гранулезного слоя), составляющая 8,6 % (Рисунок 3.12). В течение эксперимента, по мере взросления животных, доля окрашенных клеток незначительно увеличивалась, их прирост составил 13,9 % ($p \leq 0,05$). Практически аналогичное количество эпителиоцитов гранулезы с локусами фрагментации ДНК наблюдали в группах моно введения аскорбиновой кислоты и амифостина, то есть без последующего локального облучения электронами.

Локальное облучение электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр уже спустя 7 суток привело к резкому увеличению доли TUNEL-позитивных клеток гранулезного слоя более чем в 3,0 раза превышающей контрольные значения ($p \leq 0,05$) (Рисунок 3.13). Несмотря на некоторое снижение их количества в течение эксперимента (на 20,9 % по сравнению с первой неделей), его высокие уровни также превышали показатели контрольной группы (в 2,2 раза; $p \leq 0,05$) (Рисунок 3.14).

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты и амифостина перед воздействием локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр привело к частичной протекции генетического материала клеток гранулезы и теки. Об этом свидетельствуют результаты TUNEL-исследования, по данным которого количество позитивных клеток превышало контрольные значения на 7 сутки лишь

на 60 % (в группе аскорбиновой кислоты) и на 93 % (в группе амифостина) ($p \leq 0,05$) (Рисунок 3.15). При этом, в обеих группах отмечали неуклонную тенденцию к снижению данного показателя, в связи с чем, к концу эксперимента, количество TUNEL-позитивных клеток в группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты соответствовало контрольному уровню, а в группе предлучевого введения амифостина превышало таковое для контроля на 9,1 % ($p \leq 0,05$) (Рисунок 3.16). Следует отметить, что на ранних сроках аскорбиновая кислота была более эффективной по сравнению с амифостином в рамках протекции ДНК от радиационно-индуцированного повреждения.

Сигналинг на фрагментации ДНК в овоцитах всех исследуемых группах не наблюдали.

Таблица 3.10 – Количество TUNEL-позитивных фолликулярных клеток в овариальных фолликулах контрольной и опытных группах на 7, 30, 60 и 90 сутках

	7 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
Контроль	8,6±0,4	8,9±0,4	9,3±0,4	9,8±0,4
СОД 30 Гр	27,3±1,1*	26,1±1,2*	23,7±1,1*	21,6±1,0*
СОД 30 Гр + АК	13,8±0,6*!	12,6±0,6*!	11,4±0,5*!	10,3±0,4!
СОД 30 Гр + АМИ	16,6±0,7*!+	14,3±0,7*!+	11,8±0,5*!	10,7±0,5*!
АК	8,4±0,3!	8,7±0,4!	9,1±0,4!	9,7±0,4!
АМИ	8,7±0,4!	9,1±0,4!	9,5±0,4!	9,8±0,4!

Примечание: Данные представлены в формате $M \pm SD$. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

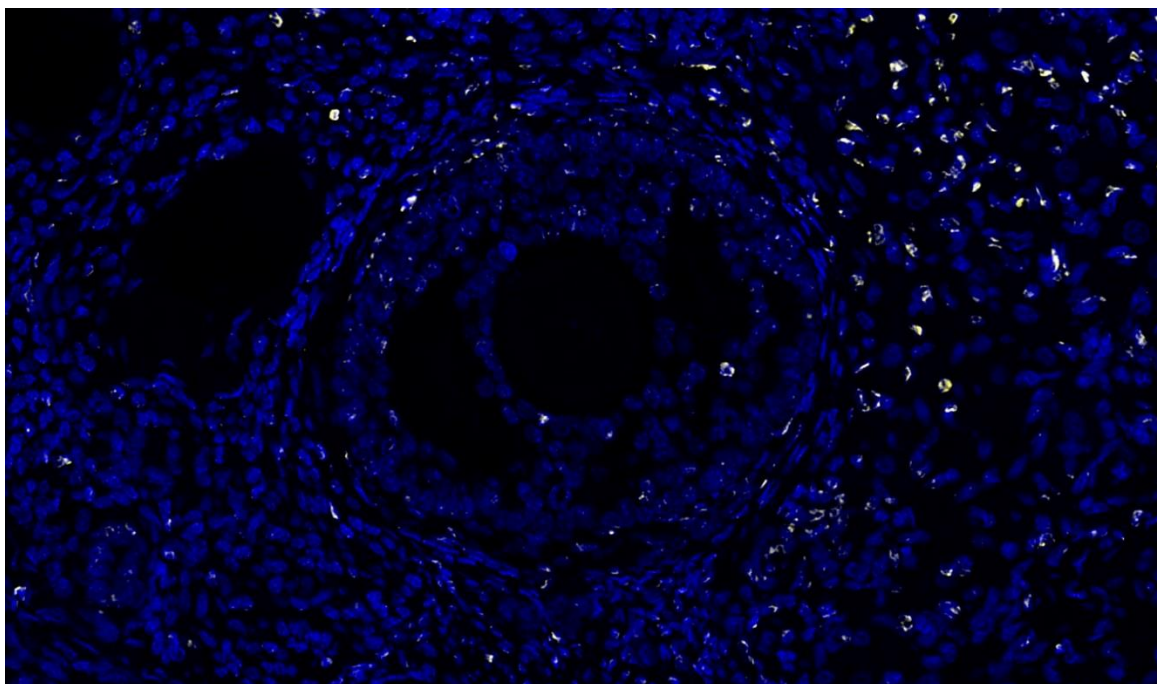


Рисунок 3.12 – Яичник, фрагмент, контрольной группы. TUNEL-исследование. Локусы фрагментации ДНК – желтое свечение, контроль DAPI – синее свечение (ядра). Флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 200$

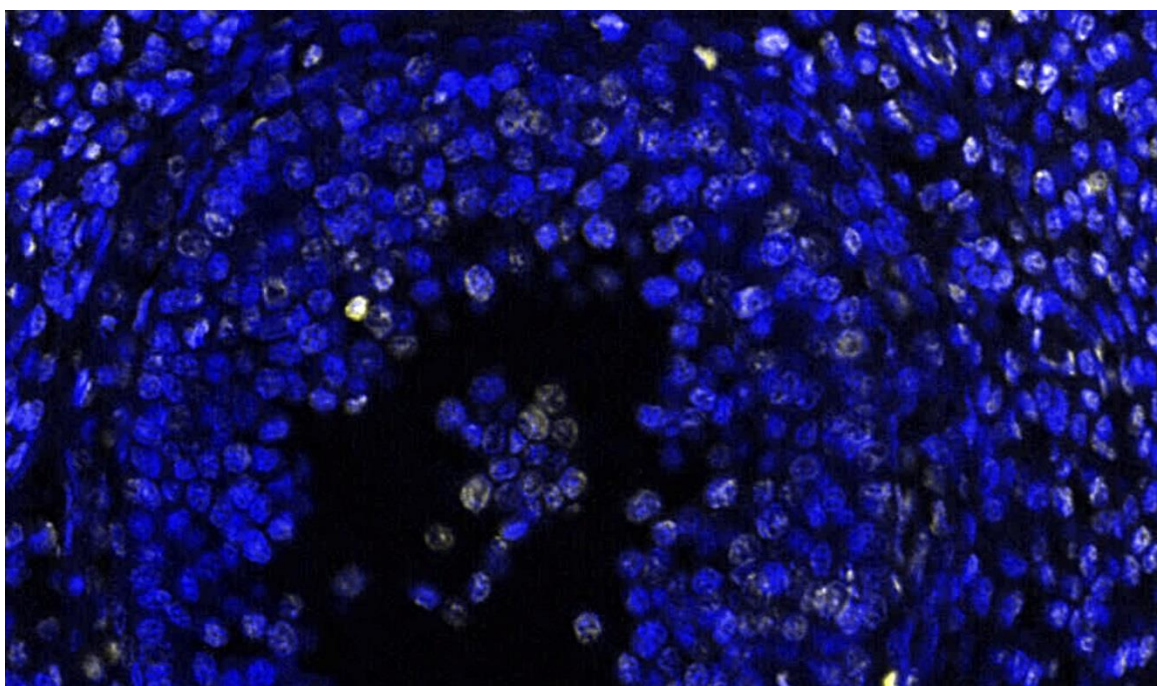


Рисунок 3.13 – Яичник, фрагмент, на 7 сутки после локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. TUNEL-исследование. Локусы фрагментации ДНК – желтое свечение, контроль DAPI – синее свечение (ядра). Флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 400$

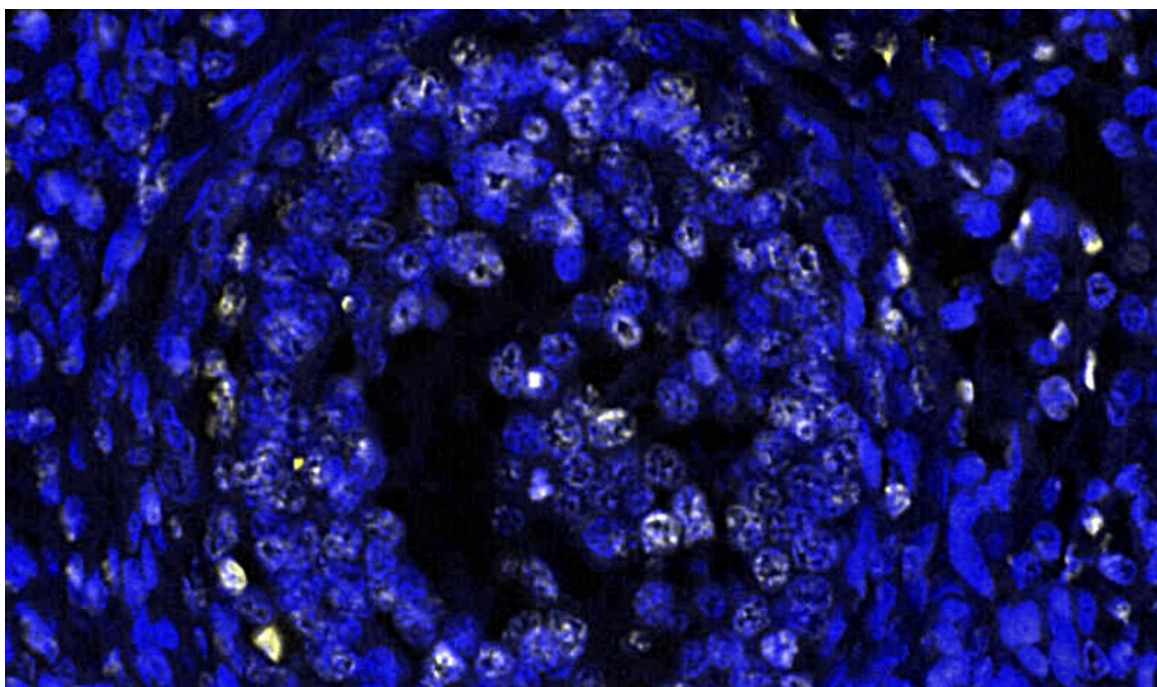


Рисунок 3.14 – Яичник, фрагмент, на 90 сутки после локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. TUNEL-исследование. Локусы фрагментации ДНК – желтое свечение, контроль DAPI – синее свечение (ядра). Флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 400$

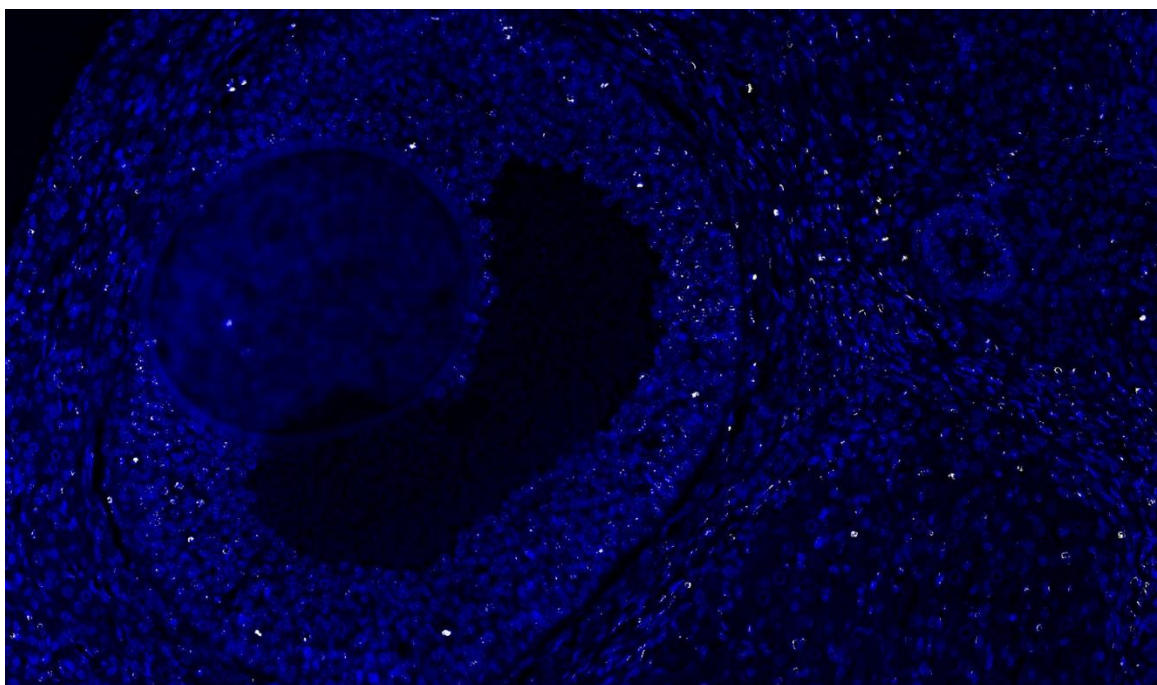


Рисунок 3.15 – Яичник, фрагмент, на 7 сутки после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. TUNEL-исследование. Локусы фрагментации ДНК – желтое свечение, контроль DAPI – синее свечение (ядра). Флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 200$

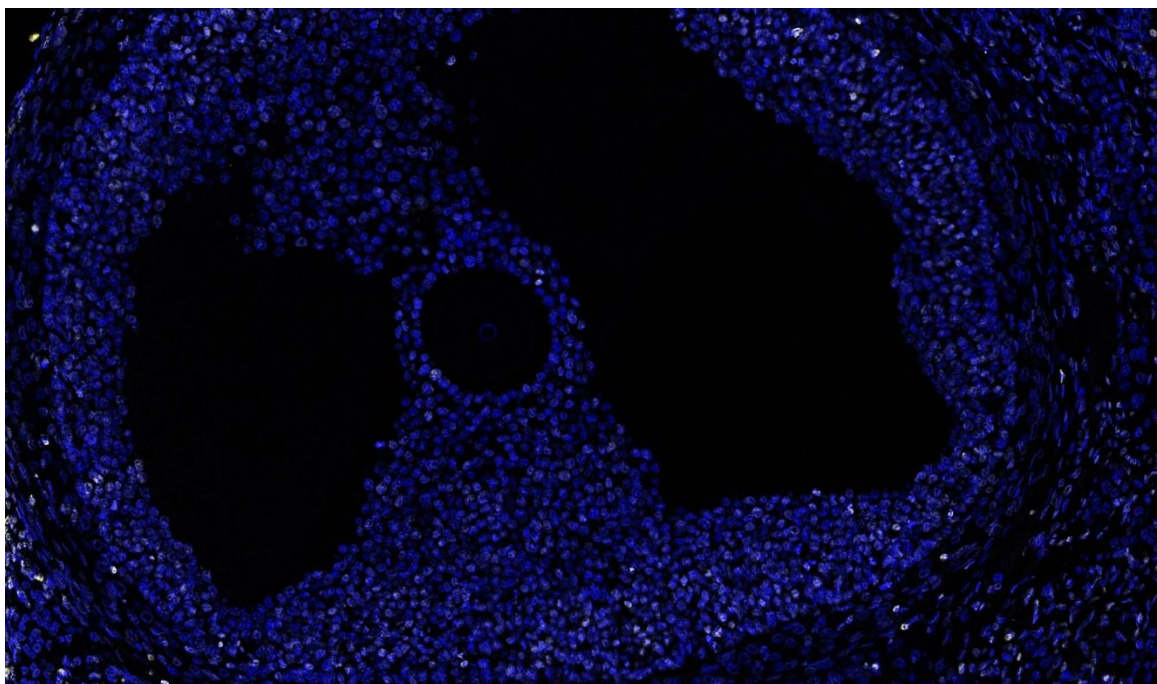


Рисунок 3.16 – Яичник, фрагмент, на 90 сутки после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. TUNEL-исследование. Локусы фрагментации ДНК – желтое свечение, контроль DAPI – синее свечение (ядра). Флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 200$

3.7. Оценка жизненного цикла

3.7.1. Молекулярно-генетический анализ экспрессии генов *Ki-67*, *Caspase 3*, *Caspase 8*, *Caspase 9*

Оценку жизненного цикла клеток яичника проводили при помощи полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием коммерческих наборов к генам-регуляторам пролиферации клеток (*Ki-67*) и апоптотической гибели (внешний путь – *caspase 8*, внутренний путь – *caspase 9*, общий фактор терминации апоптоза – *caspase 3*). Контрольные значения при каждом исследовании принимали за единицу ($1 \pm 0,05$), после чего рассчитывали относительную экспрессию мРНК в опытных группах. Введение аскорбиновой кислоты и амифостина без последующего воздействия электронами

не влияло на амплификацию генов *Ki-67*, *caspase 8*, *caspase 9* и *caspase 3*, которая не отличалась от контрольных значений (соответствовала уровню $1 \pm 0,05$) (Таблица 3.11, Таблица 3.12).

Воздействие локального облучения электронами во фракционном режиме в суммарной дозе 30 Гр привело к снижению экспрессии гена *Ki-67* в гомогенате тканей яичника, что было ниже контрольных значений на 60 % ($p \leq 0,05$). Начиная со второго месяца эксперимента в этой группе экспрессия *Ki-67* незначительно возросла, однако все еще была ниже контрольных показателей на 40 % ($p \leq 0,05$). Напротив, в этой группе наблюдали резкое увеличение экспрессии мРНК генов, ответственных за апоптотическую гибель фолликулярных клеток. Так, показатели амплификации *caspase 3* резко возрастали на первой неделе эксперимента, превышая контрольные значения в 2,4 раза ($p \leq 0,05$), а на третьем месяце – в 1,9 раза ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что в этой группе при анализе экспрессии каспазы 8 и каспазы 9 на всех сроках эксперимента отмечали преобладание экспрессии мРНК маркеров внутреннего пути апоптоза. Так, относительная экспрессия *caspase 9* на первой неделе превышала контрольные значения в 2,8 раза ($p \leq 0,05$) с последующим незначительным снижением в течение эксперимента. В то же время, экспрессия *caspase 8* была выше контрольных показателей в 2,1 раза на первой неделе ($p \leq 0,05$) также с небольшой тенденцией к снижению на третьем месяце (Таблица 3.11, Таблица 3.12).

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты перед воздействием локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр способствовало частичному предотвращению активации апоптотического каскада посредством снижения экспрессии генов ключевых белков-эффекторов, а также привело к повышению амплификации гена фактора пролиферативной активности фолликулярных клеток *Ki-67*. Так, уже на первой неделе эксперимента позитивные эффекты от использования этого антиоксиданта в качестве радиопротектора проявлялись значительным снижением уровней относительной экспрессии мРНК *caspase 3*, *caspase 8* и, в большей степени, *caspase 9* – на 33,4 %, 42,9 % и 53,6 %, соответственно, по сравнению с группой локального облучения электронами в

суммарной дозе 30 Гр ($p \leq 0,05$). На том же сроке, в этой группе отмечали сохранение амплификации *Ki-67* на уровне контрольных значений. В течение эксперимента степень экспрессии генов *caspase 3* и *caspase 9*, ответственных за внутренний путь апоптоза, неуклонно снижалась до показателей контрольной группы, а уровень амплификации *caspase 8* превышал их лишь на 10 % ($p \leq 0,05$) (Таблица 3.11, Таблица 3.12).

Предлучевое введение амифостина в дозе 200 мг/кг также способствовало снижению экспрессии факторов апоптотической гибели клеток яичника и усилению амплификации гена *Ki-67*. Так, на первой неделе эксперимента относительная экспрессия мРНК *caspase 3* превышала контрольные значения в 1,8 раза (что на 12,5 % выше, чем при предлучевом введении аскорбиновой кислоты; $p \leq 0,05$), а уровни экспрессии *caspase 8* и *caspase 9* были ниже, чем в группе локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, на 33,4 % и 46,5 %, соответственно ($p \leq 0,05$). Таким образом, введение амифостина на первом месяце эксперимента было менее эффективно по сравнению с аскорбиновой кислотой в отношении угнетения внутреннего пути апоптотического каскада. Однако, степень пролиферативной активности клеток яичника поддерживалась показателями относительной экспрессии мРНК *Ki-67*, аналогичными таковым в контроле. Кроме того, амплификация *caspase 9* в этой группе спустя три месяца после облучения электронами на 10% превышала показатели группы предлучевого введения аскорбиновой кислоты ($p \leq 0,05$) (Таблица 3.11, Таблица 3.12).

Таблица 3.11 – Относительная экспрессия мРНК *Ki-67* и *caspase 3* при ПЦР-РВ в контрольной и опытных группах на 7, 30, 60 и 90 сутках

	7 сутки		30 сутки		60 сутки		90 сутки	
	<i>Ki-67</i>	<i>Caspase 3</i>	<i>Ki-67</i>	<i>Caspase 3</i>	<i>Ki-67</i>	<i>Caspase 3</i>	<i>Ki-67</i>	<i>Caspase 3</i>
Контроль	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05
СОД 30 Гр	0,4±0,02*	2,4±0,1*	0,4±0,02*	2,2±0,1*	0,5±0,02*	2,0±0,1*	0,6±0,03*	1,9±0,09*
СОД 30 Гр + АК	0,9±0,04*!	1,6±0,08*!	1,1±0,05	1,3±0,06*	1,2±0,06*	1,1±0,05	1,2±0,06*!	1±0,05!
СОД 30 Гр + АМИ	0,9±0,05!	1,8±0,09*!+	0,9±0,04*+	1,6±0,08*+	1,0±0,04+	1,2±0,06*	1,1±0,05!	1±0,05!
АК	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!
АМИ	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

Таблица 3.12 – Относительная экспрессия мРНК *caspase 8* и *caspase 9* при ПЦР-РВ в контрольной и опытных группах на 7, 30, 60 и 90 сутках

	7 сутки		30 сутки		60 сутки		90 сутки	
	<i>Caspase 8</i>	<i>Caspase 9</i>	<i>Caspase 8</i>	<i>Caspase 9</i>	<i>Caspase 8</i>	<i>Caspase 9</i>	<i>Caspase 8</i>	<i>Caspase 9</i>
Контроль	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05
СОД 30 Гр	2,1±0,1*	2,8±0,1*	1,9±0,09*	2,5±0,1*	1,8±0,09*	2,0±0,1*	1,7±0,08*	1,8±0,09*
СОД 30 Гр + АК	1,2±0,06*!	1,3±0,06*!	1,2±0,06*	1,2±0,06*	1,1±0,05	1,1±0,05	1,1±0,05*!	1±0,05!
СОД 30 Гр + АМИ	1,2±0,06*!	1,5±0,07*!+	1,2±0,06*	1,4±0,07*+	1,1±0,05	1,2±0,06*	1,1±0,05*!	1,1±0,05*!+
АК	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!
АМИ	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

3.7.2. Молекулярно-генетический анализ активности сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a

С целью оценки экспрессии ключевых участников сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a, ответственных за регуляцию жизненного цикла клеток овариальных фолликулов, была проведена молекулярно-генетическая оценка методом ПЦР-РВ. Контрольные значения при каждом исследовании принимали за единицу ($1 \pm 0,05$), после чего рассчитывали относительную экспрессию мРНК в опытных группах. Введение аскорбиновой кислоты и амифостина без последующего воздействия электронами не влияло на амплификацию генов участников сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a, которая не отличалась от контрольных значений (соответствовала уровню $1 \pm 0,05$) (Таблица 3.13, Таблица 3.14).

По результатам ПЦР-РВ через 7 суток после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр было обнаружено резкое возрастание экспрессии генов *PI3K* и *AKT* (в 3,7 раза и в 3,5 раза по сравнению с контрольной группой; $p \leq 0,05$), которые являются общими активаторами для многих нижестоящих каскадов белков. Однако отмечали слабо выраженное увеличение амплификации *mTOR* и *FOXO3a* (в 1,2 раза и в 1,4 раза по сравнению с контролем; $p \leq 0,05$), не соответствующее значениям *PI3K* и *AKT*, что может быть связано с активацией других механизмов этих путей, связанных с клеточной гибелью. В течение эксперимента отмечали сохранение повышенных значений экспрессии *PI3K* и *AKT* при низких показателях амплификации *mTOR* и *FOXO3a* с незначительным преобладанием последнего.

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты на 7 сутки способствовало повышению относительной экспрессии мРНК генов *PI3K* и *AKT* по сравнению с контрольной группой в 2,4 раза и в 2,3 раза, соответственно ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что это сопровождалось практически пропорциональным увеличением экспрессии *mTOR* и *FOXO3a* (в 1,9 раза и в 2,1 раза по сравнению с контролем;

$p \leq 0,05$), что подтверждает активацию вышестоящими протеинами PI3K и АКТ этих сигнальных путей, ответственных за выживаемость фолликулярных клеток, репарацию тканей яичника и сохранение овариального резерва от воздействия облучения. Повышенные значения амплификации генов *mTOR* и *FOXO3a* сохранялись вплоть до третьего месяца эксперимента, превышая контрольные значения в 1,2 раза и в 1,3 раза, соответственно ($p \leq 0,05$). Аналогичную активацию исследуемых сигнальных путей вызвало предлучевое использование амифостина, однако в этом случае (в отличие от аскорбиновой кислоты) на ранних сроках преобладала экспрессия генов участников сигнального пути PI3K/АКТ/mTOR над PI3K/АКТ/FOXO3a с последующим быстрым их подавлением.

Таблица 3.13 – Относительная экспрессия мРНК генов участников сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a при ПЦР-РВ в контрольной и опытных группах на 7 и 30 сутках

	7 суток				30 суток			
	<i>PI3K</i>	<i>AKT</i>	<i>mTOR</i>	<i>FOXO3a</i>	<i>PI3K</i>	<i>AKT</i>	<i>mTOR</i>	<i>FOXO3a</i>
Контроль	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05
СОД 30 Гр	3,7±0,1*	3,5±0,1*	1,2±0,05*	1,4±0,07*	3,5±0,1*	3,2±0,1*	1,3±0,06*	1,5±0,07*
СОД 30 Гр + АК	2,4±0,1*!	2,3±0,1*!	1,9±0,09*!	2,1±0,1*!	2,2±0,1*!	2,0±0,1*!	1,7±0,08*!	1,9±0,09*!
СОД 30 Гр + АМИ	2,4±0,1*!	2,4±0,1*!	2,1±0,1*!+	1,8±0,09*!+	2,1±0,1*!	2,0±0,1*!	1,8±0,09*!	1,5±0,07*+
АК	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!
АМИ	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!

Примечание: Данные представлены в формате M±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

Таблица 3.14 – Относительная экспрессия мРНК генов участников сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a при ПЦР-РВ в контрольной и опытных группах на 7 и 30 сутках

	60 суток				90 суток			
	<i>PI3K</i>	<i>AKT</i>	<i>mTOR</i>	<i>FOXO3a</i>	<i>PI3K</i>	<i>AKT</i>	<i>mTOR</i>	<i>FOXO3a</i>
Контроль	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05	1±0,05
СОД 30 Гр	3,3±0,1*	3,1±0,1*	1,3±0,06*	1,6±0,08*	3,1±0,1*	2,9±0,1*	1,3±0,05*	1,6±0,07*
СОД 30 Гр + АК	1,9±0,09*!	1,7±0,08*!	1,4±0,07*	1,5±0,07*	1,6±0,07*!	1,4±0,06*!	1,2±0,06*!	1,3±0,1*!
СОД 30 Гр + АМИ	1,9±0,09*!	1,7±0,08*!	1,3±0,06*	1,2±0,06*!+	1,8±0,07*!+	1,4±0,06*!	1±0,05!+	1±0,05!+
АК	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!
АМИ	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!	1±0,05!

Примечание: Данные представлены в формате M±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

3.8. Оценка воспалительной реакции

3.8.1. Молекулярно-генетический анализ экспрессии $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-10$

Оценку воспалительной реакции проводили на основании молекулярно-генетического анализа экспрессии генов ее ключевых участников – воспалительных цитокинов $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-10$. Для этого использовали метод ПЦР-РВ. Контрольные значения при каждом исследовании принимали за единицу ($1\pm 0,05$), после чего рассчитывали относительную экспрессию мРНК в опытных группах. Введение аскорбиновой кислоты и амифостина без последующего воздействия электронами не влияло на амплификацию генов провоспалительных цитокинов ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$) и противовоспалительного $IL-10$, которая не отличалась от контрольных значений (соответствовала уровню $1\pm 0,05$) (Таблица 3.15, Таблица 3.16).

Локальное облучение электронами в суммарной дозе 30 Гр привело к резкому увеличению экспрессии генов провоспалительных цитокинов уже на первой неделе, превышая контрольные значения в 3,0 раза ($TNF-\alpha$), в 3,2 раза ($IL-1\beta$), в 2,8 раза ($IL-6$) при менее выраженной относительной экспрессии противовоспалительного $IL-10$ (в 2,6 раза превышающего контрольный уровень) ($p\leq 0,05$). К третьему месяцу практически не отмечали снижения уровней относительной экспрессии мРНК исследуемых цитокинов, которая превышала контрольные значения в 2,4 раза (для $TNF-\alpha$), 2,8 раза (для $IL-1\beta$), в 2,3 раза (для $IL-6$) и в 2,6 раза (для $IL-10$) ($p\leq 0,05$).

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты перед воздействием локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр через 7 суток привело к менее выраженной экспрессии воспалительных цитокинов по сравнению с группой локального облучения электронами. Тем не менее, уровни амплификации генов $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ превышали контрольные значения в 2,1 раза, в 1,8 раза, в 1,7 раза, соответственно ($p\leq 0,05$).

Следует отметить особо высокую активацию гена противовоспалительного цитокина IL-10, которая превышала контрольный показатель в 2,2 раза ($p \leq 0,05$). К третьему месяцу в этой группе наблюдали возвращение к контрольным уровням относительной экспрессии мРНК *TNF- α* и *IL-6*, однако амплификация генов *IL-1 β* и *IL-10* превышала таковую в группе контроля на 10 % и на 30 %, соответственно ($p \leq 0,05$).

Предлучевое введение амифостина перед воздействием локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр также демонстрировало снижение уровней экспрессии воспалительных цитокинов по сравнению с группой локального облучения электронами. Однако его противовоспалительная эффективность была ниже таковой у аскорбиновой кислоты, особенно на ранних сроках наблюдения. Тем не менее, к третьему месяцу в этой группе амплификация генов *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6* соответствовала показателями контрольной группы, а относительная экспрессия гена *IL-10* превышала таковую в контроле в 1,5 раза ($p \leq 0,05$).

Таблица 3.15 – Относительная экспрессия мРНК генов провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-6 при ПЦР-РВ в контрольной и опытных группах на 7, 30, 60 и 90 сутках

	7 сутки		30 сутки		60 сутки		90 сутки	
	<i>IL-1β</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-1β</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-1β</i>	<i>IL-6</i>	<i>IL-1β</i>	<i>IL-6</i>
Контроль	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05
СОД 30 Гр	3,2 \pm 0,1*	2,8 \pm 0,1*	3,1 \pm 0,1*	2,7 \pm 0,1*	2,9 \pm 0,1*	2,5 \pm 0,1*	2,8 \pm 0,1*	2,3 \pm 0,1*
СОД 30 Гр + АК	1,8 \pm 0,08*!	1,7 \pm 0,07*!	1,6 \pm 0,08*!	1,4 \pm 0,07*!	1,2 \pm 0,06*!	1,1 \pm 0,05!	1,1 \pm 0,05*!	1 \pm 0,05!
СОД 30 Гр + АМИ	2,0 \pm 0,1*!+	1,9 \pm 0,08*!+	1,8 \pm 0,09*!+	1,6 \pm 0,08*!+	1,3 \pm 0,06*!	1,3 \pm 0,06*!+	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!
АК	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!
АМИ	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!

Примечание: Данные представлены в формате М \pm SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

Таблица 3.16 – Относительная экспрессия мРНК генов провоспалительного цитокина TNF- α и противовоспалительного IL-10 при ПЦР-РВ в контрольной и опытных группах на 7, 30, 60 и 90 сутках

	7 сутки		30 сутки		60 сутки		90 сутки	
	<i>TNF-α</i>	<i>IL-10</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-10</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-10</i>	<i>TNF-α</i>	<i>IL-10</i>
Контроль	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05
СОД 30 Гр	3,0 \pm 0,1*	2,6 \pm 0,1*	2,9 \pm 0,1*	2,5 \pm 0,1*	2,6 \pm 0,1*	2,6 \pm 0,1*	2,4 \pm 0,1*	2,6 \pm 0,1*
СОД 30 Гр + АК	2,1 \pm 0,1*!	2,2 \pm 0,1*!	1,6 \pm 0,08*!	2,0 \pm 0,1*!	1,2 \pm 0,06*!	1,6 \pm 0,08*!	1 \pm 0,05!	1,3 \pm 0,06*!
СОД 30 Гр + АМИ	2,4 \pm 0,1*!+	2,0 \pm 0,1*!	2,0 \pm 0,1*!+	1,8 \pm 0,09*!+	1,6 \pm 0,08*!+	1,6 \pm 0,08*!	1 \pm 0,05!	1,5 \pm 0,07*!+
АК	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!
АМИ	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!

Примечание: Данные представлены в формате М \pm SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

3.8.2. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование тучных клеток микроокружения яичника

В рамках оценки воспалительной реакции проводили мультиплексное иммуногистохимическое исследование с антителами к маркерам Chymase и Tryptase тучных клеток микроокружения, что позволяет фенотипировать эти клетки в соответствии с уровнями экспрессии в них соответствующих протеаз. Так, в контрольной группе на всех сроках обнаружили лишь единичные тучные клетки, в которых относительно в равной степени были представлены гранулы, окрашенные как антителами к Chymase, так и к Tryptase (гранулы оранжевого и зеленого цвета при флуоресцентной микроскопии, соответственно) (Рисунок 3.17). Аналогичную иммуногистохимическую картину демонстрировали яичники лабораторных животных, которым вводили аскорбиновую кислоту или амифостин без дальнейшего воздействия локального облучения электронами (Таблица 3.17).

Локальное облучение электронами в суммарной дозе 30 Гр привело к миграции и активации тучных клеток в яичниках, преимущественно в стромальном компартменте. Уже на первой неделе их количество значительно превышало контрольные показатели в 3,2 раза ($p \leq 0,05$) без последующего значительного снижения их количества вплоть до окончания эксперимента, когда их количество превышало таковое в контроле в 2,9 раза ($p \leq 0,05$). Кроме того, при флуоресцентной микроскопии было обнаружено, что на ранних сроках в составе тучных клеток в этой группе преимущественно преобладают гранулы, окрашенные в оранжевый цвет (Chymase+ фенотип), в то время как на поздних сроках происходит изменение их функциональной активности, активное накопление и секреция субстратов, окрашенных в зеленый цвет (Tryptase+ фенотип) (Таблица 3.17, Рисунок 3.18, Рисунок 3.19).

В группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина перед воздействием локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр на первой неделе также происходит увеличение числа тучных клеток (в 1,8 раза и в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой, соответственно; $p \leq 0,05$). В течение

эксперимента их количество снижалось, превышая контрольные показатели на третьем месяце на 26,4 % (в группе предлучевого введения аскорбиновой кислоты) и на 16,8 % (в группе предлучевого введения амифостина) ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что начиная со второго месяца эксперимента по результатам флуоресцентной микроскопии большинство тучных клеток обладали преимущественно Chymase+ фенотипом (гранулы окрашивались в оранжевый цвет) (Таблица 3.17, Рисунок 3.20, Рисунок 3.21).

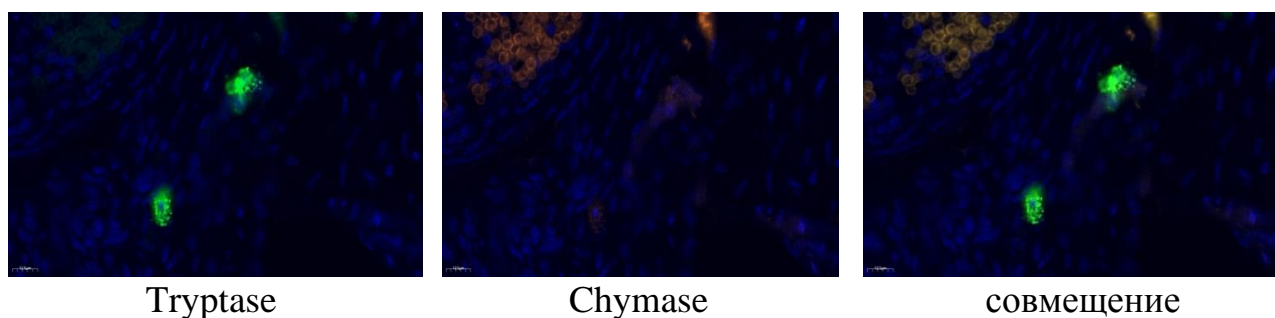


Рисунок 3.17 – Яичник, фрагмент, контрольной группы. Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к Tryptase и Chymase тучных клеток.

Флуоресцентная микроскопия; увелич. $\times 400$. Зеленое свечение – Триптаза+ гранулы тучных клеток; оранжевое свечение – Химаза+ гранулы тучных клеток; синее свечение – DAPI

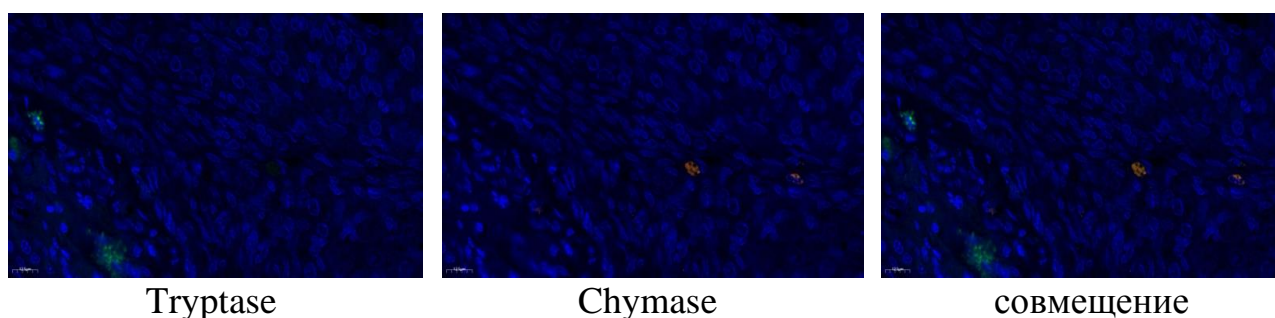


Рисунок 3.18 – Яичник, фрагмент, на 7 сутки после локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к Tryptase и Chymase тучных клеток.

Флуоресцентная микроскопия; увелич. $\times 400$. Зеленое свечение – Триптаза+ гранулы тучных клеток; оранжевое свечение – Химаза+ гранулы тучных клеток; синее свечение – DAPI

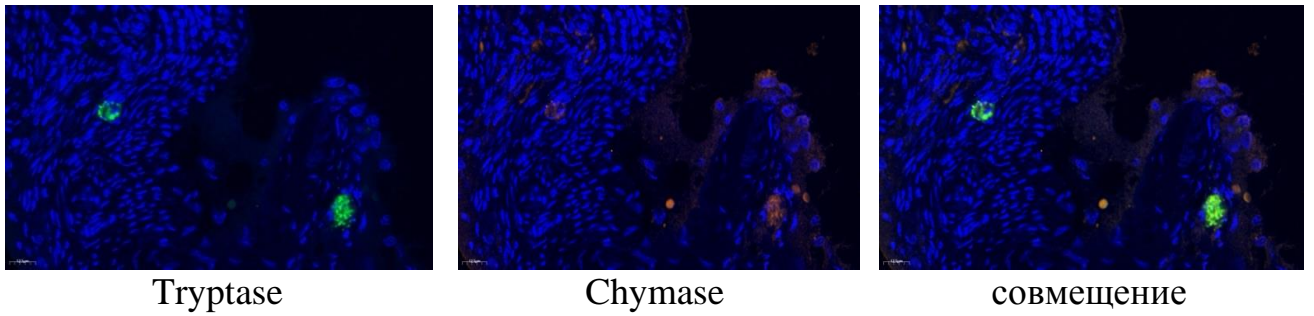


Рисунок 3.19 – Яичник, фрагмент, на 90 сутки после локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к Tryptase и Chymase тучных клеток. Флуоресцентная микроскопия; увелич. $\times 400$. Зеленое свечение – Триптаза+ гранулы тучных клеток; оранжевое свечение – Химаза+ гранулы тучных клеток; синее свечение – DAPI

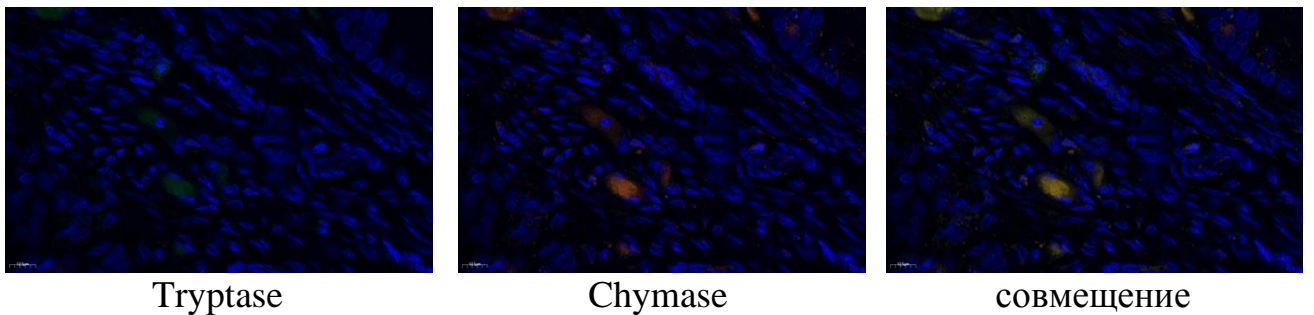


Рисунок 3.20 – Яичник, фрагмент, на 7 сутки после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к Tryptase и Chymase тучных клеток. Флуоресцентная микроскопия; увелич. $\times 400$. Зеленое свечение – Триптаза+ гранулы тучных клеток; оранжевое свечение – Химаза+ гранулы тучных клеток; синее свечение – DAPI

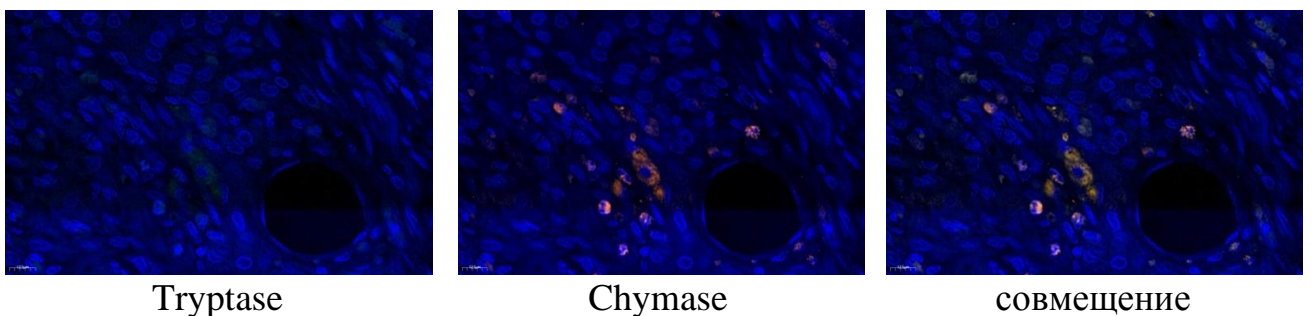


Рисунок 3.21 – Яичник, фрагмент, на 90 сутки после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к

Tryptase и Chymase тучных клеток. Флуоресцентная микроскопия; увелич. $\times 400$.

Зеленое свечение – Триптаза+ гранулы тучных клеток; оранжевое свечение –

Химаза+ гранулы тучных клеток; синее свечение – DAPI

Таблица 3.17 – Количество тучных клеток в 1 мм^2 в яичниках контрольной и опытных группах на 7, 30, 60 и 90 сутках

	7 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
Контроль	12,3 \pm 0,6	11,7 \pm 0,5	11,9 \pm 0,5	12,5 \pm 0,6
СОД 30 Гр	39,7 \pm 1,8*	45,1 \pm 2,1*	40,4 \pm 2,0*	36,3 \pm 1,8*
СОД 30 Гр + АК	22,4 \pm 1,0*!	20,8 \pm 1,0*!	18,1 \pm 0,9*!	15,8 \pm 0,7*!
СОД 30 Гр + АМИ	19,9 \pm 0,9*!+	18,5 \pm 0,9*!+	15,9 \pm 0,7*!+	14,6 \pm 0,7*!
АК	12,8 \pm 0,6!	12,5 \pm 0,6!	11,9 \pm 0,5!	11,8 \pm 0,5!
АМИ	12,5 \pm 0,6!	12,3 \pm 0,5!	12,0 \pm 0,6!	12,2 \pm 0,6!

Примечание: Данные представлены в формате $M \pm SD$. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

3.9. Оценка рисков развития радиационно-индуцированного фиброза

3.9.1. Гистохимическое исследование

Для детекции волокнистой соединительной ткани в яичниках контрольной и опытных групп на поздних сроках эксперимента использовали гистохимический метод окрашивания трихромом по Массону, при котором волокна окрашиваются в синий цвет (красителем анилиновым синим) с расчетом их оптической плотности при помощи компьютерной программы (с предварительным переводом полученных данных в баллы). Так, в контрольной группе и в группах введения аскорбиновой кислоты или амифостина без последующего облучения электронами на третьем месяце отмечали незначительные локусы окрашивания в синий цвет некоторых волокон с низкой оптической плотностью, расположенных преимущественно в органоспецифичной строме яичника – веретеновидноклеточной соединительной ткани (Таблица 3.18, Рисунок 3.22).

В группе воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр на третьем месяце эксперимента при гистохимическом окрашивании микропрепаратов трихромом по Массону отмечали резкое усиление интенсивности окрашивания анилиновым синим, а также объема коллагеновых и ретикулярных волокон (синий цвет) с высокой оптической плотностью (на 64,7 % превышающей показатели контрольной группы; $p \leq 0,05$), что указывает на выраженное разрастание волокнистого компонента, преимущественно в корковом веществе яичника (Таблица 3.18, Рисунок 3.23).

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты практически предотвратило развитие радиационно-индуцированного фиброза на третьем месяце эксперимента. Так, окрашенные анилиновым синим волокна соединительной ткани располагались преимущественно в корковом веществе яичника, а их оптическая плотность превышала контрольные значения на 11,7 % ($p \leq 0,05$). Следует отметить, что в группе предлучевого введения амифостина оптическая плотность волокон экстрацеллюлярного матрикса, окрашенных в синий цвет, превышала показатели контрольной группы на 23,5 % ($p \leq 0,05$), что свидетельствует о более выраженной эффективности аскорбиновой кислоты в рамках протекции яичника от развития радиационно-индуцированного фиброза в отдаленные сроки (Таблица 3.18, Рисунок 3.24).

Таблица 3.18 – Показатели оптической плотности волокнистого компонента яичника при гистохимическом окрашивании микропрепаратов трихромом по Массону в контрольной и опытных группах на 7, 30, 60 и 90 сутках, в баллах

	7 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
Контроль	1,6±0,08	1,6±0,07	1,6±0,08	1,7±0,08
СОД 30 Гр	1,8±0,09*	1,9±0,09*	2,3±0,1*	2,8±0,1*
СОД 30 Гр + АК	1,7±0,08	1,7±0,08!	1,8±0,09*!	1,9±0,09*!
СОД 30 Гр + АМИ	1,7±0,07	1,8±0,09*	1,9±0,09*!	2,1±0,1*!+
АК	1,7±0,08	1,7±0,08!	1,6±0,08!	1,7±0,08!
АМИ	1,6±0,08!	1,7±0,08!	1,6±0,08!	1,6±0,07!

Примечание: Данные представлены в формате $M \pm SD$. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

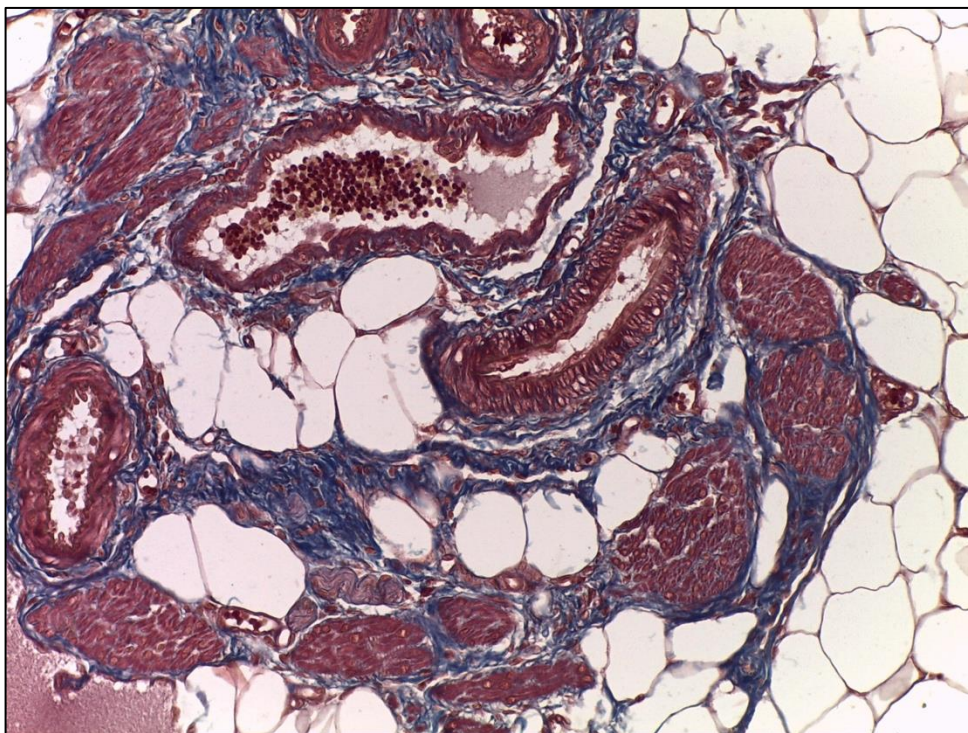


Рисунок 3.22 – Фрагмент яичника контрольной группы на 90 сутках. Гистохимическое окрашивание трихромом по Массону, волокна соединительной ткани окрашены в синий цвет, увелич. $\times 200$

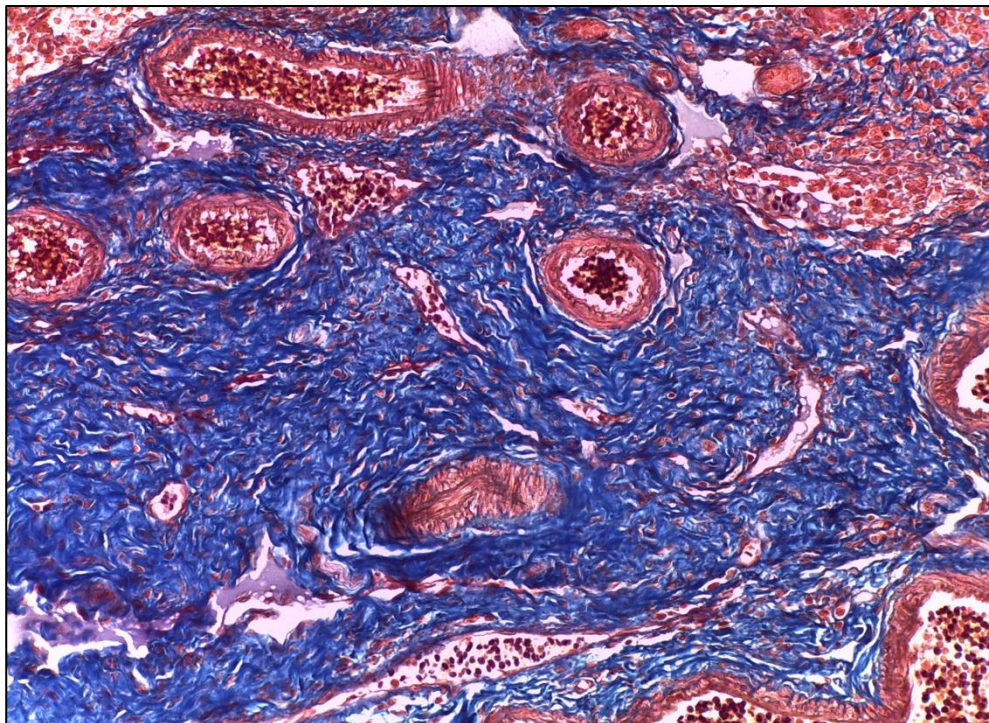


Рисунок 3.23 – Яичник, фрагмент, на 90 сутки после локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. Гистохимическое окрашивание трихромом по Массону, волокна соединительной ткани окрашены в синий цвет, увелич. $\times 200$

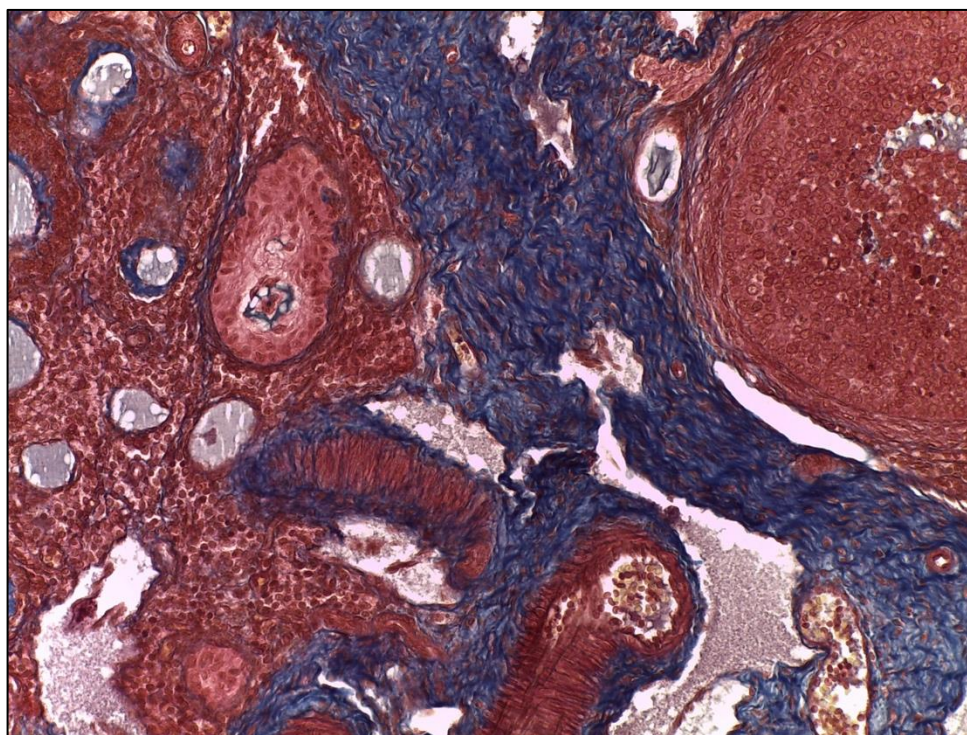


Рисунок 3.24 – Яичник, фрагмент, на 90 сутки после введения аскорбиновой кислоты и локального облучения электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр. Гистохимическое окрашивание трихромом по Массону, волокна соединительной ткани окрашены в синий цвет, увелич. $\times 200$

3.9.2. Мультиплексное иммуногистохимическое исследование факторов фиброгенеза

С целью изучения роли прежде всего миофиibroбластов стромы, фибробластов теки и клеток эндотелия в предотвращении радиационно-индуцированного фиброгенеза предлучевым введением аскорбиновой кислоты было проведено мультиплексное иммуногистохимическое исследование с антителами к маркеру активации клеток фибробластического ряда /фиброгенеза – α -SMA (зеленое свечение при флуоресцентной микроскопии), триггеру фиброгенеза TGF- β (желтое свечение при флуоресцентной микроскопии), а также компоненту экстрацеллюлярного матрикса коллагену I типа (оранжевое свечение при флуоресцентной микроскопии). В контрольной группе, как и в группах введения аскорбиновой кислоты или амифостина без дальнейшего локального

облучения электронами, на всех сроках эксперимента отмечали единичные пучки коллагеновых волокон, окрашенные в оранжевый цвет практически без признаков активации факторов фиброгенеза (α -SMA или TGF- β) (Таблица 3.19, Таблица 3.20, Таблица 3.21, Рисунок 3.25).

Локальное облучение электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр привело к значительному увеличению иммуномечения выбранных маркеров фиброгенеза к третьему месяцу эксперимента по сравнению с ранними сроками (Таблица 3.19, Таблица 3.20, Таблица 3.21). Так, при флуоресцентной микроскопии, преимущественно в периваскулярной зоне, преобладали многочисленные клетки уплощенной формы (клетки фибробластического ряда) с высокой степенью свечения в зеленом, желтом и оранжевом спектре, причем последнее распространялось в экстрацеллюлярное пространство, формируя волокнистые тяжи, также окрашенные в оранжевый цвет (коллагеновые волокна I типа) (Рисунок 3.26, Рисунок 3.27).

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты или амифостина (до локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр) предотвращало активацию клеток, ответственных за фиброгенез в яичнике (клетки фибробластического ряда стромы или наружного слоя теки), нарушая передачу сигнала TGF- β фибробластам и клеткам эндотелия, а также дальнейшую секрецию ими коллагеновых волокон I типа (Таблица 3.19, Таблица 3.20, Таблица 3.21). Тем не менее, в некоторых срезах были обнаружены локусы накопления коллагеновых волокон I типа, что проявлялось их свечением при флуоресцентной микроскопии в оранжевом спектре, а также многочисленные гладкомышечные клетки (внутренний контроль иммуногистохимической реакции с антителами к α -SMA), экспрессирующие α -SMA (зеленое свечение при флуоресцентной микроскопии) и / или TGF- β (желтое свечение при флуоресцентной микроскопии) (Рисунок 3.28, Рисунок 3.29).

Таблица 3.19 – Количество α -SMA-окрашенных клеток в 1 мм² в яичниках контрольной и опытных группах на 7, 30, 60 и 90 сутках

	7 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
Контроль	14,7±0,7	13,9±0,6	14,1±0,7	15,6±0,7
СОД 30 Гр	39,4±1,9*	47,4±2,3*	52,9±2,5*	63,5±3,0*
СОД 30 Гр + АК	20,8±1,0*!	22,1±1,0*!	25,7±1,2*!	23,3±1,1*!
СОД 30 Гр + АМИ	23,2±1,1*!+	24,6±1,2*!+	26,5±1,3*!	26,9±1,3*!+
АК	14,1±0,7!	13,4±0,6!	13,5±0,6!	14,5±0,7!
АМИ	14,6±0,7!	14,0±0,7!	14,3±0,7!	14,9±0,7!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

Таблица 3.20 – Количество TGF- β -окрашенных клеток в 1 мм² в яичниках контрольной и опытных группах на 7, 30, 60 и 90 сутках

	7 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
Контроль	7,6±0,3	7,8±0,3	8,4±0,4	8,5±0,4
СОД 30 Гр	9,8±0,4*	10,4±0,5*	10,9±0,5*	11,7±0,5*
СОД 30 Гр + АК	8,1±0,4!	8,3±0,4!	8,4±0,4!	8,8±0,4!
СОД 30 Гр + АМИ	8,3±0,4!	8,6±0,4*!	8,9±0,7!	9,7±0,4*!
АК	7,5±0,3!	7,6±0,3!	7,9±0,3!	8,1±0,4!
АМИ	7,5±0,3!	7,7±0,3!	8,0±0,4!	8,2±0,4!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

Таблица 3.21 – Количество Collagen-I-окрашенных клеток в 1 мм² в яичниках контрольной и опытных группах на 7, 30, 60 и 90 сутках

	7 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
Контроль	8,8±0,4	8,7±0,4	9,1±0,4	9,2±0,4
СОД 30 Гр	9,7±0,4*	10,6±0,5*	12,9±0,6*	15,4±0,7*
СОД 30 Гр + АК	8,8±0,4!	9,0±0,4!	9,4±0,4!	9,7±0,4!
СОД 30 Гр + АМИ	8,9±0,4!	9,5±0,4*!	10,5±0,5*!+	10,8±0,5*!+
АК	8,8±0,4!	8,9±0,4!	8,9±0,4!	9,0±0,4!
АМИ	8,9±0,4!	8,9±0,4!	9,1±0,4!	9,1±0,4!

Примечание: Данные представлены в формате М±SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

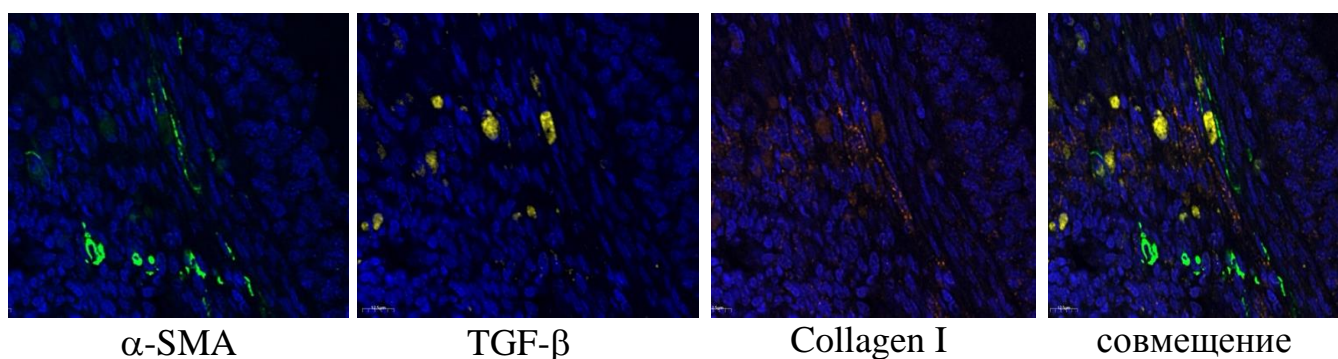


Рисунок 3.25 – Яичник, фрагмент, контрольной группы на 7 сутки.
Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к α -SMA (зеленое свечение), TGF- β (желтое свечение) и Collagen I (оранжевое свечение), а также совмещенное изображение иммуномечения α -SMA+TGF- β +Collagen I. DAPI – синее свечение. Флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 400$

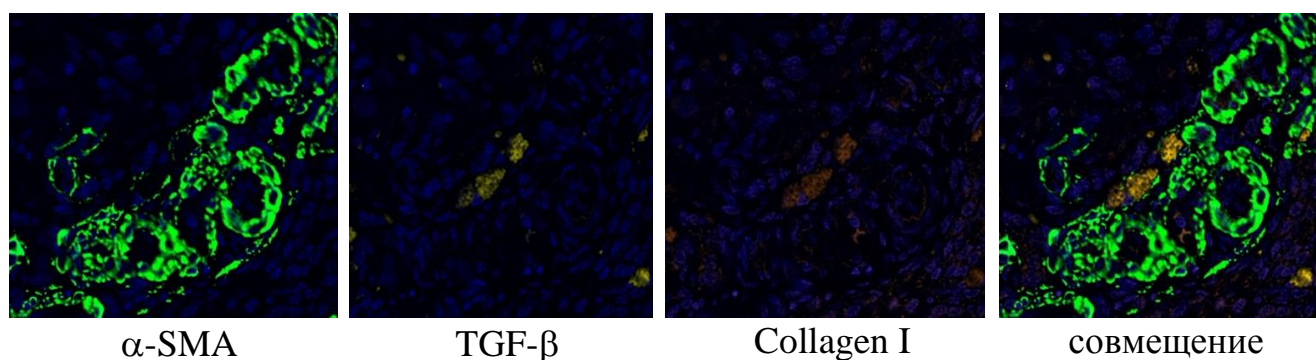


Рисунок 3.26 – Яичник, фрагмент, группа СОД 30 Гр, на 7 сутки.
Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к α -SMA (зеленое свечение), TGF- β (желтое свечение) и Collagen I (оранжевое свечение), а также совмещенное изображение иммуномечения α -SMA+TGF- β +Collagen I. DAPI – синее свечение. Флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 400$

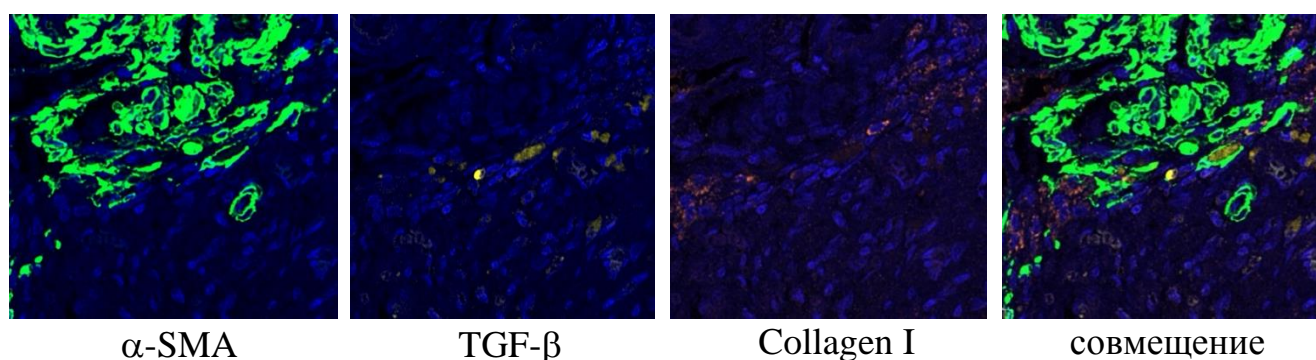


Рисунок 3.27 – Яичник, фрагмент, группа СОД 30 Гр + АК, на 7 сутки.
Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к α -SMA (зеленое свечение), TGF- β (желтое свечение) и Collagen I (оранжевое свечение), а также совмещенное изображение иммуномечения α -SMA+TGF- β +Collagen I. DAPI – синее свечение. Флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 400$

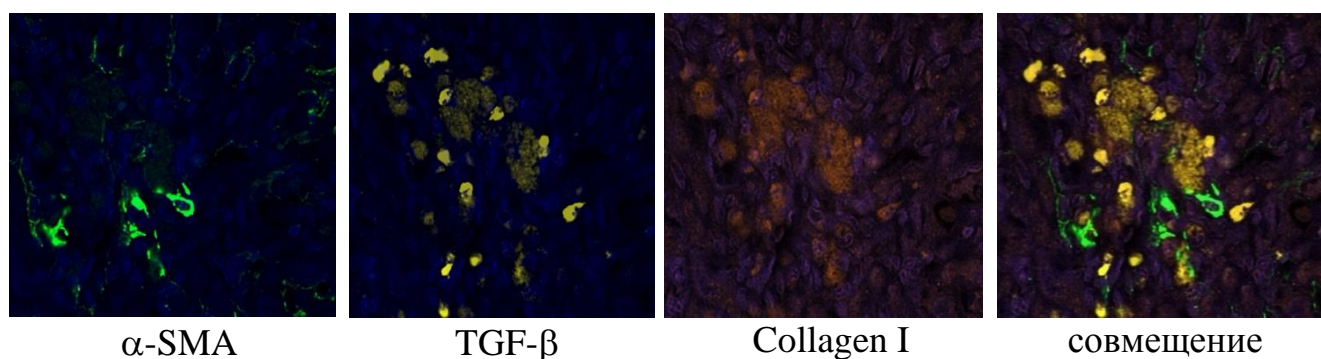


Рисунок 3.28 – Яичник, фрагмент, группа СОД 30 Гр, на 90 сутки. Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к α -SMA (зеленое свечение), TGF- β (желтое свечение) и Collagen I (оранжевое свечение), а также совмещенное изображение иммуномечения α -SMA+TGF- β +Collagen I. DAPI – синее свечение. Флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 400$

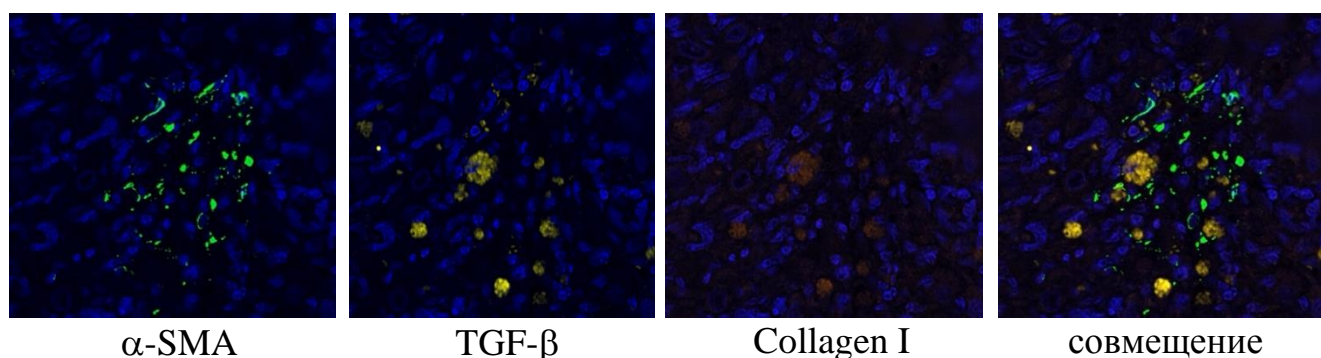


Рисунок 3.29 – Яичник, фрагмент, группа СОД 30 Гр + АК, на 90 сутки. Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к α -SMA (зеленое свечение), TGF- β (желтое свечение) и Collagen I (оранжевое свечение), а также совмещенное изображение иммуномечения α -SMA+TGF- β +Collagen I. DAPI – синее свечение. Флуоресцентная микроскопия, увелич. $\times 400$

3.9.3. Молекулярно-генетический анализ экспрессии участников сигнального пути TGF/SMAD

Для оценки антифибротического действия аскорбиновой кислоты было проведено молекулярно-генетическое исследование методом ПЦР-РВ участников одного из ключевых сигнальных путей, ответственных за фиброгенез в яичниках, – TGF- β /SMAD, а именно – относительной экспрессии мРНК генов TGFR1

(рецептора трансформирующего фактора роста- β I-го типа) и *SMAD4* (общего белка-эффектора). Контрольные значения при каждом исследовании принимали за единицу ($1 \pm 0,05$), после чего рассчитывали относительную экспрессию мРНК в опытных группах. Введение аскорбиновой кислоты и амифостина без последующего воздействия электронами не влияло на амплификацию генов *TGFR1* и *SMAD4*, которая не отличалась от контрольных значений (соответствовала уровню $1 \pm 0,05$) (Таблица 3.22).

Так, локальное облучение электронами во фракционном режиме в суммарной дозе 30 Гр на первой неделе способствовало активации сигнального пути TGF- β /SMAD, подтвержденной значениями относительной экспрессии мРНК *TGFR1* и *SMAD4*, превышающими показатели контрольной группы в 1,4 раза и в 1,2 раза, соответственно ($p \leq 0,05$). В течение эксперимента в этой группе отмечали выраженное увеличение уровней исследуемых маркеров, а на третьем месяце амплификация превышала контрольные значения в 2,7 раза и в 2,2 раза, соответственно ($p \leq 0,05$).

Предлучевое введение аскорбиновой кислоты уже через 7 суток после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр способствовало значительному предотвращению активации сигнального пути TGF- β /SMAD, амплификация генов которого превышала контрольные значения лишь на 10 % (*TGFR1*), а уровни экспрессии *SMAD4* значимо не отличались от таковых в группе контроля. Тем не менее, в течение эксперимента отмечали незначительное повышение активности этого пути, однако даже на третьем месяце эксперимента показатели относительной экспрессии генов *TGFR1* и *SMAD4* были значительно ниже (на 48,2 % и на 41 %, соответственно; $p \leq 0,05$) по сравнению с группой локального облучения электронами, превышая контрольные значения лишь в 1,4 раза и в 1,3 раза ($p \leq 0,05$). Практически аналогичные изменения обнаружили в группе предлучевого введения амифостина, однако его влияние на активность сигнального пути TGF- β /SMAD было менее значимым по сравнению с

аскорбиновой кислотой: на третьем месяце показатели этой группы превышали контрольные значения в 1,5 раза (*TGFR1*) и в 1,3 раза (*SMAD4*) ($p \leq 0,05$).

Таблица 3.22 – Относительная экспрессия мРНК генов участников сигнального пути TGF- β /SMAD при ПЦР-РВ в контрольной и опытных группах на 7, 30, 60 и 90 сутках

	7 сутки		30 сутки		60 сутки		90 сутки	
	<i>TGFR1</i>	<i>SMAD4</i>	<i>TGFR1</i>	<i>SMAD4</i>	<i>TGFR1</i>	<i>SMAD4</i>	<i>TGFR1</i>	<i>SMAD4</i>
Контроль	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05	1 \pm 0,05
СОД 30 Гр	1,4 \pm 0,07*	1,2 \pm 0,06*	1,8 \pm 0,07*	1,6 \pm 0,08*	2,3 \pm 0,1*	1,7 \pm 0,08*	2,7 \pm 0,1*	2,2 \pm 0,1*
СОД 30 Гр + АК	1,1 \pm 0,05*!	1 \pm 0,05!	1,2 \pm 0,06*!	1,1 \pm 0,05!	1,3 \pm 0,06*!	1,2 \pm 0,05*!	1,4 \pm 0,06*!	1,3 \pm 0,06*!
СОД 30 Гр + АМИ	1,2 \pm 0,06*!	1 \pm 0,05!	1,3 \pm 0,06*!	1,1 \pm 0,05!	1,5 \pm 0,06*!+	1,2 \pm 0,06*!	1,5 \pm 0,07*!	1,3 \pm 0,05*!
АК	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!
АМИ	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!	1 \pm 0,05!

Примечание: Данные представлены в формате М \pm SD. Статистически значимые различия для обозначены как: * – по сравнению с контрольной группой, ! – по сравнению с группой «СОД 30 Гр», + по сравнению с группой «СОД 30 Гр + АК»; $p \leq 0,05$. СОД – суммарная очаговая доза, АК – аскорбиновая кислота, АМИ – амифостин

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании проведена комплексная оценка радиопротекторных свойств аскорбиновой кислоты в яичниках, локально облученных электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр, исследованы механизмы ее антиапоптотического, противовоспалительного и антифибротического действия, а также возможность снижения рисков развития на поздних сроках радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности и фиброза яичников.

4.1. Радиационно-индуцированное повреждение яичников на ранних сроках

В группе воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр на ранних сроках обнаружили признаки радиационно-индуцированного повреждения яичников, а именно совокупность гормональных (снижение уровней АМГ и эстрадиола на фоне увеличения уровней гонадотропинов), оксидантных (повышение уровней оксидации при снижении активности ферментов антиоксидантной защиты), гистологических (снижение количества овариальных фолликулов, очаговые кровоизлияния в паренхиме яичника, полнокровие и стаз в просвете кровеносных сосудов), проапоптотических (преобладание апоптоза фолликулярных клеток, преимущественно внутреннего его пути, над пролиферацией) и провоспалительных (увеличение количества провоспалительных интерлейкинов и тучных клеток Tryptase+ фенотипа) изменений. Это обусловлено активацией классических механизмов радиационно-индуцированного поражения, которые принято подразделять на прямые и косвенные [49]. Первые запускаются в результате непосредственного взаимодействия ионизирующего излучения с молекулами ДНК и внутриклеточной воды, вторые являются следствием токсического действия свободных радикалов, образующихся в результате ионизации и радиолиза [109].

Так, уже в первые часы после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр в результате повреждения ДНК (увеличение количества локусов фрагментации при TUNEL-анализе) и локального накопления высоких концентраций продуктов радиолиза воды и перекисидации липидов (\uparrow MDA) на фоне быстрого истощения антиоксидантной защиты (\downarrow SOD и CAT) происходит активация многочисленных сигнальных путей, ответственных за репарацию повреждений ДНК, восстановление и выживание фолликулярных клеток, сохранение овариальных фолликулов в «спящем состоянии», а в случаях нерепарируемого повреждения – каскадов, регулирующих клеточный цикл и запускающих молекулярные механизмы программируемой клеточной гибели (апоптоз) [110].

В контексте радиационного повреждения органов особую роль играют сигнальные пути MAPK/ERK/JNK/p38 и PI3K/AKT, многообразие нижележащих белковых каскадов которых позволяет точно регулировать жизненный цикл клеток [50, 108, 111, 112]. Наиболее часто ионизирующее излучение приводит к запуску MAPK/JNK/p38-опосредованной программируемой гибели клеток, причем чаще всего апоптоз происходит как внешним (в результате воздействия токсических радикалов из экстрацеллюлярного пространства), так и внутренним (в результате оксидантного повреждения ДНК и митохондрий) путями [61]. Общим терминальным белком-эффектором для обоих этих каскадов служит каспаза 3 [180]. Это объясняет наиболее выраженные значения каспазы 3 в начале настоящего исследования, а преобладание экспрессии каспазы 9 над каспазой 8 свидетельствует об активации преимущественно внутреннего пути апоптотического каскада в модели радиационно-индуцированного повреждения яичника при воздействии локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр [89, 99].

Однако, молекулярным механизмам активации митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК) в ответ на воздействие ионизирующего излучения посвящено множество исследований, а его участие в индукции апоптоза облученных клеток считается доказанным [24, 112, 155]. Интересным является

изучение роли PI3K/AKT-сигнального пути, который также считается регулятором жизненного цикла [52, 55]. В данном исследовании было показано, что этот каскад запускается в яичниках при воздействии локального облучения электронами, однако экспрессия генов *mTOR* и *FOXO3a* остается относительно низкой, что может быть связано с активацией AKT других нижестоящих эффекторов, способствующих клеточной гибели. Это предположение не противоречит мнению других авторов о двойственной роли PI3K/AKT-сигнального пути [124, 173].

В результате, нерепарируемые повреждения ДНК, угнетение эндогенной антиоксидантной системы и нарастание концентраций токсических свободных радикалов (продуктов радиолиза воды, пероксидации липидов, реактивные формы азота и др.), изменение ими заряда и конформации других нейтральных биологических макромолекул, а также повреждение органелл облученной клетки и окружающих ее здоровых клеток («эффект свидетеля» или нецелевой эффект лучевой терапии) в совокупности приводят к модуляции перечисленных сигнальных путей, ответственных за регуляцию выживаемости и гибели фолликулярных клеток яичника. В ответ на это запускается апоптотический каскад (преимущественно внутренний путь при локальном облучении электронами) и гибель фолликулярных клеток, причем как облученных, так и соседних здоровых клеток, что значительно увеличивает глубину радиационно-индуцированного поражения яичника.

В то же время, активация клеточной гибели, разрушение фолликулярных клеток с образованием большого количества апоптотических телец, а также токсическое действие большого количества оксидантных радикалов (оксидативный стресс) приводят к индукции в окружающих клетках экспрессии аларминов и воспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10), обеспечивающих таксис и миграцию в область воздействия облучения иммунных клеток, преимущественно Т-лимфоцитов и макрофагов [117, 136, 142, 144, 148, 157, 172]. Кроме того, в настоящем исследовании был проведен количественно-качественный анализ тучных клеток с определением их фенотипа, что позволило получить новые сведения о роли микроокружения яичника при радиационно-

индуцированном повреждении. Так, было обнаружено, что на ранних сроках в ответ на локальное облучение электронами в суммарной дозе 30 Гр происходит активная миграция тучных клеток, преимущественно содержащих гранулы, заполненные специфической протеазой – химазой, которая при дегрануляции способствует разрушению экстрацеллюлярного матрикса, что способствует облегчению распространения токсических радикалов во внеклеточном пространстве и усугубляет степень радиационного повреждения соседних здоровых фолликулов, снижая овариальный резерв и предрасполагая к развитию преждевременной недостаточности яичников в отдаленные сроки [37].

4.2. Радиационно-индуцированная преждевременная недостаточность яичников

Полученные в настоящем исследовании морфометрические данные о снижении количества овариальных фолликулов (примордиальных, первичных, вторичных, третичных) в течение всего эксперимента, а также нарастании количества атретических фолликулов, в сочетании с постоянным снижением уровней АМГ (маркера овариального резерва) и гипоестрогенией (оцененной по уровням эстрадиола) после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр являются достоверными признаками развития на третьем месяце радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников и, как следствие, резкого снижения репродуктивной функции лабораторных животных [34, 133]. Следует отметить, что высокие значения уровней гонадотропных гормонов (ФСГ и ЛГ) объясняются резистентностью яичников к их регулирующему действию в результате резкого снижения количества клеток гранулезного слоя и теки овариальных фолликулов, что сопровождается нарушением функционирования оси «гипоталамус-гипофиз-яичники» [43, 107, 176].

Помимо этого, даже спустя три месяца после воздействия локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр, отмечали сохранение

большинства радиационно-индуцированных изменений, описанных выше, с незначительной репарацией. Так, к 90 суткам эксперимента в яичниках этой группы отмечали сохранение оксидантно-антиоксидантного дисбаланса (нарушение редокс-гомеостаза) с высоким содержанием продуктов окисления (MDA) и пониженными значениями экспрессии эндогенных антиоксидантных ферментов (SOD и CAT). Кроме того, в ДНК эпителиоцитов гранулезы на этом сроке отмечали сохранение участков фрагментации по результатам TUNEL-анализа, что может быть связано с истощением клеточных механизмов репарации. Этот факт объясняет сопутствующее преобладание апоптотической гибели клеток над их пролиферацией, что видно из соотношения относительной экспрессии мРНК *Ki-67* (\downarrow) и *caspase 3* (\uparrow) в гомогенизированной ткани яичника, причем, как и вначале эксперимента, отмечали незначительное преобладание амплификации генов участников внутреннего пути апоптоза (экспрессия *caspase 9* $\uparrow/++$) над внешним (экспрессия *caspase 8* $\uparrow/+$). В ответ на сохранение повышенных значений оксидации и продолжающуюся гибель фолликулярных клеток на этом сроке экспрессия воспалительных цитокинов оставалась повышенной, особенно в гене противовоспалительного цитокина IL-10, который считается ответственным за прекращение клеточной воспалительной инфильтрации, активацию факторов фиброгенеза и индукцию замещения утраченных тканей компонентами экстрацеллюлярного матрикса, и, как следствие, исход воспалительного процесса в фиброз [114, 162, 170].

Кроме того, к третьему месяцу сохранялось значительно повышенное количество тучных клеток в микроокружении яичника, однако их фенотип в группе локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр менялся в течение эксперимента: в отличие от первых сроков, когда тучные клетки были представлены преимущественно химаза-фенотипом, на поздних сроках преобладающей протеазой гранул в этих клетках становилась триптаза, также ответственная за поддержание воспалительной реакции, синтез провоспалительных медиаторов и индукцию исхода воспалительной реакции в фиброз, являясь регулятором синтеза компонентов экстрацеллюлярного матрикса

[104]. Следует отметить, что некоторые авторы заявляли о прямой связи между гиперэстрогенией и высокой степенью активации тучных клеток [65]. Можно предположить, что активация тучных клеток является слабо выраженной при радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников по сравнению с воздействием других повреждающих факторов ввиду гипоестрогении, отмечаемой в настоящем исследовании на всех сроках.

Перечисленные изменения уже начиная с первого месяца (максимально – на третьем месяце) приводят к активации факторов фиброгенеза посредством индукции амплификации генов TGF/SMAD-сигнального пути – одного из ключевых регуляторов синтеза компонентов экстрацеллюлярного матрикса [168]. Это подтвердилось при проведении ПЦР-РВ, при которой относительная экспрессия мРНК *TGFR1* и *SMAD4* значительно увеличивалась в течение всего эксперимента. Следует отметить, что SMAD4 является общим белком-эффектором при активации как SMAD2, так и SMAD3, а его повышенные значения также свидетельствуют о высокой степени экспрессии SMAD2/ SMAD3 [83]. На молекулярном уровне связывание TGF- β с рецептором TGF 1-го типа приводит к активации нижестоящих SMAD2 и SMAD3, которые иницируют экспрессию SMAD4, связываются в единый комплекс, который проникает в ядро и способствует увеличению экспрессии факторов фиброгенеза (компонентов экстрацеллюлярного матрикса, таких как коллагены, ламинин и др.) [100, 102]. Кроме того, мультиплексное иммуногистохимическое исследование подтвердило активацию фибробластов и их трансформацию в миофибробласты (маркером которой является α -SMA) в результате связывания рецепторов этих клеток с TGF- β , что приводит к синтезу коллагеновых волокон, преимущественно I-го типа, перечисленными ранее механизмами и отложению их во внеклеточное пространство [113, 166]. Это способствует замещению утраченных тканей яичника, снижению функционально-активной массы органа, сохранению низкого овариального резерва, а также прогрессированию радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников и фиброза [116].

4.3. Эффективность и безопасность предлучевого применения аскорбиновой кислоты

Аскорбиновая кислота – это мощный водорастворимый антиоксидант, который эффективно нейтрализует активные формы кислорода (АФК) и другие свободные радикалы, образующиеся при воздействии ионизирующего излучения [128, 153]. Это приводит к значительному снижению оксидативного стресса, вызванного локальным облучением электронами в суммарной дозе 30 Гр. Радиопротекторные свойства аскорбиновой кислоты опосредованы активацией нескольких защитных механизмов [32, 35, 78, 98, 183]:

Данное свойство аскорбиновой кислоты обусловлено тем, что этот субстрат является эффективным донором электрона, восстанавливая и нейтрализуя различные оксидантные молекулы, тем самым снижая их оксидантный потенциал и способность к повреждению других макромолекул. Так, она способствует нейтрализации посредством передачи электрона одному из наиболее токсичных радикалов, образующихся при радиолизе воды облучением электронами, – гидроксил-радикалу ($\bullet\text{OH}$). Помимо этого, те же свойства донора электрона позволяют аскорбиновой кислоте взаимодействовать с супероксидным анионом ($\text{O}_2^{\bullet-}$), предотвращая его трансформацию в более токсичные радикалы (например, пероксинитрит). Хотя пероксид водорода (H_2O_2) не является свободным радикалом, аскорбиновая кислота предотвращает его распад с образованием более активных форм кислорода, таких как гидроксил-радикал.

Аскорбиновая кислота восстанавливает окисленные антиоксиданты, такие как витамин Е (токоферол) [40]. Витамин Е в своем окисленном виде (при связывании с оксидантом) теряет активность, в то время как аскорбиновая кислота способна инактивировать связанный токоферолом радикал, восстанавливая его активную форму, что позволяет витамину Е повторно нейтрализовывать другие свободные радикалы. Этот пример демонстрирует взаимосвязь между различными участниками системы антиоксидантной защиты, которые взаимодействуют друг с другом, потенцируя восстановление продуктов радиолиза воды, обеспечивая

синергетический антиоксидантный эффект и поддерживая локальный редокс-гомеостаз [58, 60].

Аскорбиновая кислота доказанно приводит к индукции активности ферментов антиоксидантной защиты, таких как супероксиддисмутаза (SOD), глутатионпероксидаза (GPX), каталаза (CAT) и др., способствуя превращению супероксидного аниона ($O_2^{\bullet-}$) в более стабильные молекулы кислорода и пероксида водорода (при участии SOD), поддержанию высоких уровней восстановленных форм глутатиона, необходимых для функционирования GPX, а также участвует в расщеплении пероксида водорода, превращая его в воду и кислород (при участии каталазы) [57, 64]. Кроме того, аскорбиновая кислота посредством сигнального пути MAPK/p38 способна к модуляции активности транскрипционных факторов, таких как NF- κ B, которые регулируют воспалительные реакции и клеточные механизмы ответа на оксидативный стресс, вызванный облучением [44, 177, 185]. В этих условиях аскорбиновая кислота оказывает тормозное влияние на активацию этих путей, предотвращая избыточное воспаление и иммунное повреждение клеток [33, 77]. В случае радиационного повреждения митохондрий, аскорбиновая кислота способствует поддержанию их функции, восстанавливая митохондриальный антиоксидантный статус и предотвращая митохондриальный стресс, который может привести к клеточной гибели внутренним путем апоптоза.

Аскорбиновая кислота косвенно обеспечивает защиту ДНК от радиационно-индуцированных разрывов цепей, модификации оснований и образования мутаций фрагментов хромосом. Она нейтрализует свободные радикалы, которые способны к оксидантному нарушению структуры ДНК предотвращая их связывание с нуклеотидными основаниями, а также предотвращая мутации и фрагментацию генетического материала [169]. Кроме того, аскорбиновая кислота участвует в репарации ДНК, стимулируя активность ферментов, вовлеченных в механизмы восстановления поврежденной ДНК. Не исключена и прямая роль аскорбиновой кислоты в протекции ДНК посредством связывания ионов меди (Cu^{2+}), которые активно взаимодействуют с ионизирующими частицами, потенцируя оксидантное

повреждение ДНК при облучении, что было доказано в единичных исследованиях других авторов [45].

Воздействие ионизирующего излучения способствует индукции молекулярных механизмов развития воспалительной реакции, усугубляемой избыточным образованием свободных радикалов и оксидантным повреждением жизненно важных органелл (цитоплазматической мембраны, митохондрий, ДНК). Аскорбиновая кислота способствует снижению уровней экспрессии провоспалительных цитокинов (например, TNF- α , IL-1), поддерживая баланс между про- и противовоспалительными медиаторами [77]. Это способствует снижению воспалительной реакции в облученных тканях, а также предотвращению дополнительного иммунного повреждения и хронического воспаления, в том числе – в здоровых необлученных участках органа.

На основании перечисленных механизмов, можно говорить о высоком радиопротекторном потенциале аскорбиновой кислоты в качестве препарата для предлучевого введения с целью предотвращения как ранних, так и отсроченных негативных эффектов радиационно-индуцированного повреждения яичника. Кроме того, в исследовании проведено комплексное сравнение радиопротекторной эффективности аскорбиновой кислоты по сравнению с предлучевым введением препарата с доказанной эффективностью в отношении лучевых повреждений – амифостином [184].

Необходимо отметить, что наблюдение за животными в течение всего эксперимента демонстрировало хорошую переносимость выбранной дозы 50 мг/кг, при которой отсутствовали какие-либо нежелательные лекарственные реакции, а радиопротекторный эффект был ярко выражен и проявлялся уже на первой неделе исследования. Данную дозу можно считать оптимальной для применения при воздействии на яичники локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр.

Так, уже на первой неделе эксперимента аскорбиновая кислота значительно снизила степень локального оксидативного стресса в яичниках, что было доказано результатами иммуноферментной оценки редокс-гомеостаза в

гомогенизированной ткани яичника. Следует отметить, что помимо снижения уровней продуктов радиолитиза воды и перекисидации липидов, аскорбиновая кислота также способствовала резкому увеличению концентраций ферментов эндогенной антиоксидантной защиты значительно выше, чем в контрольной группе. Кроме того, было показано снижение количества TUNEL-позитивных клеток, что может быть объяснено как общим снижением оксидации и оксидантного повреждения ДНК, так и прямыми протекторными эффектами в отношении молекул ДНК при участии ионов Cu^{2+} ; не исключено и комбинированное снижение обоих механизмов повреждения ДНК, что привело к уменьшению количества локусов ее фрагментации. Таким образом, можно считать доказанными антиоксидантные свойства аскорбиновой кислоты, которые, на ранних сроках, были более эффективны, чем в группе предлучевого введения амифостина, что может объясняться слабым влиянием этого препарата на степень оксидантного повреждения ДНК [30].

Учитывая снижение степени оксидации и нарушения редокс-гомеостаза в клетках яичников, аскорбиновая кислота уже на первой неделе способствовала увеличению экспрессии генов участников сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a, которые считаются ведущими регуляторами выживаемости фолликулярных клеток, что было доказано при многих заболеваниях яичника [69, 80, 103, 179]. Данные пути тормозят клеточную гибель, индуцируя репаративные механизмы. Кроме того, некоторыми исследователями было показано, что нарушение активности сигнального пути PI3K/AKT/FOXO3a достоверно связано с развитием преждевременной недостаточности яичников при различных патологических состояниях, был сделан вывод, что FOXO3a отвечает за сохранение овариальных фолликулов в «спящем состоянии» с целью их защиты от действия повреждающих факторов [75, 123, 156]. Поэтому, высокая амплификация гена *FOXO3a*, индуцированная аскорбиновой кислотой при лучевом воздействии, вероятно является механизмом защиты овариального резерва яичников и предотвращает развитие преждевременной недостаточности на поздних сроках. В совокупности, предлучевое введение аскорбиновой кислоты способствовало

активации сигнальных путей PI3K/АКТ/mTOR и PI3K/АКТ/FOXO3a, что привело к угнетению гибели овариальных клеток путем апоптоза, индукции их пролиферативной активности (экспрессия *Ki-67*↑), а также частичной протекции овариальных фолликулов (примордиальных, первичных, вторичных, третичных) уже на ранних сроках эксперимента при низком количестве атретических фолликулов. Это подтверждается результатами анализа гормонального статуса животных – незначительным снижением уровней АМГ и эстрадиола при отсутствии резкого повышения уровней гонадотропных гормонов. Это также свидетельствует о сохранении функционирования оси «гипоталамус-гипофиз-яичники».

Помимо этого, можно говорить о косвенном противовоспалительном действии аскорбиновой кислоты при воздействии на яичники локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр. Данный эффект проявлялся менее выраженной относительной экспрессией мРНК провоспалительных цитокинов с преобладанием амплификации гена противовоспалительного IL-10. Это также связано со снижением оксидантного повреждения ДНК и других биологических макромолекул, угнетением молекулярных механизмов клеточной гибели, а также стимулирующим влиянием на процессы репарации. Это сопровождалось снижением количества мигрировавших в яичник тучных клеток со значительно сниженным накоплением химаза-позитивных гранул, что, вероятно, предотвращало выраженное разрушение экстрацеллюлярного матрикса и ограничивало распространение свободных радикалов и продуктов клеточной гибели в соседние необлученные ткани, предотвращая развитие «эффекта свидетеля». На более поздних сроках количество активированных тучных клеток возрастало, преимущественно химаза-позитивного фенотипа, что вероятно способствовало разрушению компонентов экстрацеллюлярного матрикса для предотвращения фиброзирования тканей яичника.

Перечисленные позитивные эффекты предлучевого введения аскорбиновой кислоты сохранялись в течение всего эксперимента. Так, к третьему месяцу наблюдения мы отмечаем восстановление до контрольных значений количества

маркеров редокс-гомеостаза (MDA, SOD, CAT), уровней половых гормонов и гонадотропинов, а также маркера овариального резерва АМГ и соответствующее практически полное восстановление количества овариальных фолликулов на разных стадиях созревания. Кроме того, уровни пролиферации и гибели фолликулярных клеток соответствовали таковым в группе контроля, а активность сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR и PI3K/AKT/FOXO3a демонстрировала тенденцию к снижению. Уровни экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов также полностью возвращались к контрольным значениям при незначительном сохранении повышенной амплификации *IL-10*.

Отдельного внимания заслуживает проведенная в настоящем исследовании оценка фиброгенеза в яичниках. Так, предлучевое введение аскорбиновой кислоты способствовало значительному угнетению сигнального пути, ответственного за индукцию фиброза во многих органах при воздействии ионизирующего излучения [51, 125]. Так, уже на ранних сроках эксперимента отмечали лишь незначительное повышение относительной экспрессии мРНК *TGFR1* и *SMAD4*, которая была ниже по сравнению с показателями группы, локально облученной электронами в суммарной дозе 30 Гр. В течение эксперимента отмечали слабое нарастание активности TGF/SMAD-сигнального пути, которая, тем не менее, была практически в 2 раза ниже, чем при воздействии электронами. Можно говорить о подавляющем влиянии предлучевого введения аскорбиновой кислоты на активацию факторов фиброгенеза и предотвращения развития радиационно-индуцированного фиброза в яичниках.

Для проверки этой теории было проведено мультиплексное иммуногистохимическое исследование, результаты которого демонстрировали резкое уменьшение TGF- β -сигналинга и сокращение количества активированных фибробластов и эндотелиальных клеток (оцененное по уровню α -SMA), что привело к значительному уменьшению синтеза и отложения коллагеновых волокон I-го типа в экстрацеллюлярном матриксе тканей яичника. Это подтвердилось также при проведении гистохимического окрашивания волокнистого компонента трихромом по Массону, при котором оптическая плотность, прежде всего,

коллагеновых волокон на третьем месяце эксперимента были выражено снижены по сравнению с группой локального облучения электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр.

4.4. Итоги выполнения диссертационной работы

Локальное облучение электронами в режиме фракционирования в суммарной очаговой дозе 30 Гр приводит к развитию радиационно-индуцированного повреждения на ранних сроках с исходом в преждевременную недостаточность яичников в отдаленные сроки (спустя три месяца) без тенденции к восстановлению, что сопровождается перманентным снижением герминативной функции и развитием фиброза. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты является безопасным и высоко эффективным способом радиопротекции, позволяющим предотвратить развитие оксидативного стресса и радиационно-индуцированного повреждения ДНК, действуя как на прямые, так и на косвенные пути лучевого повреждения, что служит причиной более выраженного защитного эффекта этого субстрата по сравнению с амифостином при воздействии ионизирующих видов излучения на яичник.

Эффективное снижение концентраций свободных радикалов и продуктов пероксидации на фоне индукции локальной ферментативной системы антиоксидантной защиты способствует сохранению редокс-гомеостаза и подавлению молекулярных каскадов апоптотической клеточной гибели, что сопровождается увеличением пролиферативной активности и репаративных механизмов в эпителиоцитах гранулезного слоя на ранних сроках. Это приводит к частичному сохранению овариального резерва и гормонального статуса, замедляя развитие радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников и снижение репродуктивной функции.

Помимо антиоксидантного и антиапоптотического действия, аскорбиновая кислота обладает косвенными противовоспалительными и антифибротическими эффектами, связанным с угнетением экспрессии провоспалительных цитокинов (на

фоне стимуляции противовоспалительных медиаторов) и активности TGF/SMAD-сигнального пути, ответственного за развитие радиационно-индуцированного фиброза в яичниках в ответ на воздействие локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр.

На основании полученных данных можно заключить, что аскорбиновая кислота является потенциальным высоко эффективным радиопротектором, который может быть использован при проведении электронотерапии у пациенток молодого возраста со злокачественными новообразованиями яичника и органов малого таза на основании выраженных антиоксидантных, репаративных, антиапоптотических, противовоспалительных и антифибротических свойств, которые позволяют применять данный субстрат для защиты здоровых тканей яичников, сохранения овариального резерва пациентки, а также снижения рисков развития таких грозных осложнений лучевой терапии как радиационно-индуцированная преждевременная недостаточность яичников и фиброз. Это позволит сократить частоту случаев снижения репродуктивной функции и женской формы бесплодия в отдаленные сроки у пациенток молодого возраста онкологического профиля.

ВЫВОДЫ

1. Локальное воздействие электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр приводит к дистрофическим изменениям большинства овариальных фолликулов на ранних сроках с последующим уменьшением овариального резерва (число примордиальных фолликулов – $3,3 \pm 0,1$) и развитием преждевременной недостаточности яичников к третьему месяцу. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты способно к частичному сохранению пула овариальных фолликулов (число примордиальных фолликулов – $9,1 \pm 0,4$).

2. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты способствует поддержанию уровней гонадотропных (ФСГ – $6,5 \pm 0,3$ нг/мл, ЛГ – $6,4 \pm 0,3$ мЕд/мл) гормонов, а также предотвращает развитие гипоэстрогении (Е2 – $39,5 \pm 1,7$ пг/мл) и снижение маркера овариального резерва (АМГ – $8,3 \pm 0,4$ нг/мл) на ранних сроках эксперимента, в то время как повышенные значения гонадотропинов и низкие значения эстрадиола и АМГ наблюдали на всех сроках эксперимента в группе фракционного локального облучения электронами в суммарной дозе 30 Гр.

3. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты снижает степень оксидативного стресса посредством связывания и утилизации активных форм кислорода и продуктов пероксидации (MDA, $12,0 \pm 0,5$ нМоль/мг белка), а также стимуляции синтеза ферментов эндогенной антиоксидантной защиты (SOD – $72,4 \pm 3,5$ Ед/мг белка, САТ – $11,6 \pm 0,5$ Ед/мг белка), наиболее выраженных на ранних сроках. При этом, амифостин обладал менее выраженными антиоксидантными свойствами.

4. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты частично предотвращает фрагментацию ДНК электронами (число TUNEL+ клеток ↓), апоптотическую гибель структур яичника (экспрессия *Caspase 3* ↓, *Caspase 8* ↓, *Caspase 9* ↓), индуцируя их пролиферативную активность (экспрессия *Ki-67* ↑). Аналогичные позитивные эффекты амифостина были менее выражены.

5. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты модулирует сигнальные пути PI3K/АКТ/mTOR и PI3K/АКТ/FOXO3a, ответственные за сохранение

овариального резерва и регуляцию жизненного цикла клеток гранулезного слоя. Аналогичные позитивные эффекты амифостина были менее выражены.

6. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты способствует подавлению воспалительной реакции в ответ на облучение электронами, посредством снижения экспрессии генов воспалительных цитокинов (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-6*) и частичного увеличения экспрессии противовоспалительного *IL-10*. Это способствует менее выраженной активации тучных клеток фолликулярного микроокружения и подавлению высвобождения их протеаз – триптазы и химазы. Аналогичные позитивные эффекты амифостина были менее выражены.

7. В ответ на воздействие электронами в режиме фракционирования суммарной очаговой дозе 30 Гр в яичнике происходит активация факторов фиброгенеза и развитие радиационно-индуцированного фиброза. Введение аскорбиновой кислоты снижает экспрессию участников ключевого сигнального пути, ответственного за фиброз, – *TGF- β /SMAD*, предотвращая активацию ключевой функции клеток фибробластического ряда и эндотелия кровеносных сосудов (*α -SMA* ↓) и синтез ими компонентов экстрацеллюлярного матрикса (*Collagen 1* ↓), что приводит к сохранению гистоархитектоники яичника и его репродуктивной функции. Аналогичные позитивные эффекты амифостина были менее выражены.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В практике врачей онкологов / онкогинекологов и радиотерапевтов при назначении лучевой терапии злокачественных новообразований яичника и / или органов малого таза, необходимо учитывать высокий риск появления радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников и, как следствие, женского бесплодия. Раннее определение фенотипа тучных клеток и уровней экспрессии факторов фиброгенеза (α -SMA, TGF- β , коллаген) в совокупности являются независимыми маркерами-предикторами снижения овариального резерва и фиброза яичников. Кроме того, необходимо учитывать возможности снижения рисков развития преждевременной недостаточности яичников путем предлучевого введения аскорбиновой кислоты.

2. При назначении облучения электронами необходимо учитывать развитие радиационно-индуцированной преждевременной недостаточности яичников и бесплодия с целью подбора оптимальных способов радиопротекции и профилактики отсроченных осложнений, а комплексная структурно-функциональная оценка овариальных фолликулов на разных сроках после лучевого воздействия может быть использована при проведении доклинических исследований и в работе врача-патологоанатома.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

ВДФ – время–доза–фракционирование

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИИ – ионизирующее излучение

ЛТ – лучевая терапия

МДА – малоновый диальдегид

НАДН – никотинамидадениннуклеотид

НАДФН – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

п. зр. св. микр. – в поле зрения светового микроскопа

РНК – рибонуклеиновая кислота

РОД – разовая очаговая доза

РФА – реактивные формы азота

СОД – суммарная очаговая доза

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЦПЭ – цепь переноса электронов

ALS – кислотолабильная субъединица (англ. acid-labile subunit)

DSB – двухнитевые разрывы ДНК (англ. double-strand breaks)

eaq- – гидратированный электрон (англ. hydrated electron)

GPx – глутатионпероксидаза (англ. glutathione peroxidase)

GSH – глутатион (англ. glutathione)

GST – глутатион-S-трансфераза (англ. glutathione S-transferase)

H• – водородный радикал (англ. hydrogen radical)

H₂O₂ – пероксид водорода (англ. hydrogen peroxide)

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота (англ. inducible nitric oxide synthase)

IR – ионизирующее излучение (англ. ionizing radiation)

LOOH – липидный гидропероксид (англ. lipid hydroperoxide)

МАРК – митоген-активируемая протеинкиназа (англ. mitogen activated protein kinase)

NF-κB – ядерный фактор «каппа-би» (англ. nuclear factor kappa B)

NOX – НАДФН-оксидаза (англ. NADPH oxidase)

O₂•- – супероксид (англ. superoxide)

•OH – гидроксильный радикал (англ. hydroxyl radical)

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (англ. phosphoinositide 3-kinase)

Ptx – пероксиредоксин (англ. peroxiredoxin)

SOD – супероксиддисмутаза (англ. superoxide dismutase)

SSB – однонитевые разрывы ДНК (англ. single-strand breaks)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамян, Л.В. Патогенетические аспекты преждевременной недостаточности яичников / Л.В. Адамян, Е.В. Сибирская, А.В. Щерина // Проблемы репродукции. – 2021. – Т. 27. – № 1. – С. 6-12.
2. Ассоциация онкологов России. Клинические рекомендации «Рак прямой кишки». Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2020. URL: https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak_prjamoj_kishki.pdf.
3. Ассоциация онкологов России. Клинические рекомендации «Рак тела матки и саркомы матки». Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2023. URL: <https://rrcrst.ru/content/klinicheskie-rekomendaczii/Рак%20тела%20матки%20и%20саркомы%20матки.pdf>.
4. Ассоциация онкологов России. Клинические рекомендации «Рак шейки матки». Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2020. URL: https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak_shejki_matki.pdf.
5. Ассоциация онкологов России. Клинические рекомендации «Рак яичников / рак маточной трубы / первичный рак брюшины». Министерство здравоохранения Российской Федерации. 2020. URL: https://oncology-association.ru/wp-content/uploads/2020/09/rak_jaichnikov_matochnoj_truby.pdf
6. Влияние васкулярного эндотелиального фактора роста на яичник в модели радиационно-индуцированной овариальной недостаточности / Г. А. Демяшкин, З. М. Муртазалиева, Е. Н. Пугачева [и др.] // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2023. – Т. 13, № 4. – С. 22-26.
7. Гены, вовлеченные в развитие преждевременной недостаточности яичников / Г. Е. Чернуха, Г. И. Табеева, С. Д. Рштуни [и др.] // Акушерство и гинекология. – 2021. – № 11. – С. 71-80.
8. Заболевания щитовидной железы и репродуктивная функция у женщин и девочек-подростков: обзор литературы / Л. В. Адамян, Е. В. Сибирская, Л. Г. Пивазян [и др.] // Эффективная фармакотерапия. – 2023. – Т. 19, № 23. – С. 34-37.

9. Демяшкин, Г. А. Морфологический анализ сперматогенеза – основа диагностики мужского идиопатического бесплодия (иммуногистохимический аспект): специальность 14.03.02 «Патологическая анатомия»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Г. А. Демяшкин. – Москва, 2017. – 142 с.
10. Демяшкин, Г. А. Сперматогенез: внутригонадные механизмы регуляции, их нарушения в модели локального β -облучения семенников, реабилитация экзогенными факторами роста тромбоцитов: специальность 1.5.22. «Клеточная биология», 3.3.2. «Патологическая анатомия»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Г. А. Демяшкин. – Москва, 2023. – 266 с.
11. Кравченко, Е. Н. Преждевременная недостаточность яичников, современный взгляд на проблему / Е. Н. Кравченко, М. С. Воронцова // *Мать и дитя в Кузбассе*. – 2022. – № 1(88). – С. 4-10.
12. Локтаева, А. В. Характеристика эстрального цикла у крыс и значение кисспептинергической системы в его регуляции / А. В. Локтаева, В. И. Беляков // *Вестник молодых ученых и специалистов Самарского государственного университета*. – 2016. – № 2(9). – С. 32-38.
13. Морфологическая оценка яичников после однократного и фракционного локального облучения электронами / Г. А. Демяшкин, З. М. Муртазалиева, М. А. Вадюхин, М. Б. Бимурзаева, М. И. Лотыров // *Медицинский академический журнал*. – 2023. – Т. 23. – №4. – С. 43-52.
14. Морфофункциональные особенности воспаления в яичнике после воздействия локального облучения электронами и введения плазмы, обогащённой тромбоцитами / Г. А. Демяшкин, З. М. Муртазалиева, Е. Н. Пугачева [и др.] // *Морфология*. – 2023. – Т. 161, № 4. – С. 43-52.
15. Особенности пролиферации и апоптоза фолликулярных клеток при введении аскорбиновой кислоты в модели радиационно-индуцированной овариальной недостаточности / Е. Н. Пугачева, М. А. Вадюхин, З. М. Муртазалиева, И. В. Игнатко // *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. – 2024. – Т. 14, № 2. – С. 47-51.

16. Оценка жизненного цикла в фолликулах яичников крыс после локального облучения электронами / Е. Н. Пугачева, З. М. Муртазалиева, Д. И. Угурчиева [и др.] // Молодежный инновационный вестник. – 2024. – Т. 13, № 2. – С. 106-107.
17. Ранняя менопауза и преждевременная недостаточность яичников: проблемы и перспективы / Д. В. Блинов, П. Л. Хазан, А. Л. Мнацаканьян [и др.] // Акушерство, гинекология и репродукция. – 2020. – Т. 14, № 3. – С. 328-345.
18. Раскоша, О.В. Цитогенетические эффекты хронического воздействия ионизирующего излучения в малых дозах / О.В. Раскоша, Л.А. Башлыкова // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 4.
19. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Издание 2-е, переработанное и дополненное. – Москва: Издательство "Медицина", 2005. – 832 с. – ISBN 5-225-04219-8.
20. Салимова, М. Д. Современные представления о клинко-диагностических критериях преждевременной недостаточности яичников (обзор литературы) / М. Д. Салимова, Я. Г. Надеяева, И. Н. Данусевич // Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal). – 2020. – Т. 5, № 6. – С. 42-50.
21. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2020622283 Российская Федерация. Факторы, ассоциированные с преждевременной недостаточностью яичников различного генеза: № 2020622175: заявл. 03.11.2020: опубл. 16.11.2020 / К. Ю. Тихаева, Л. В. Ткаченко, Л. Н. Рогова [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ВолГМУ МЗ РФ).
22. Характеристика волокнистого компонента яичника в модели радиационно-индуцированной овариальной недостаточности / Г. А. Демяшкин, Е. Н. Пугачева, З. М. Муртазалиева, М. А. Вадюхин // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2024. – Т. 14, № 1. – С. 24-28.

23. Частота преждевременной недостаточности яичников и ранней менопаузы у носительниц патогенных вариантов BRCA1 / С.Д. Рштуни, Г.Е. Чернуха, А.Е. Донников [и др.] // Гинекология. – 2022. – Т. 24. – № 5. – С. 374-379.
24. A comparative study on the life-saving radioprotective effects of vitamins A, E, C and over-the-counter multivitamins / S.M. Mortazavi, S. Rahimi, M.A. Mosleh-Shirazi, [et al.] // J Biomed Phys Eng. – 2015. – Vol. 5. – P. 59–66.
25. A comprehensive review on MAPK: A promising therapeutic target in cancer / C. Braicu, M. Buse, C. Busuioc, [et al.] // Cancers (Basel). – 2019. – Vol. 11. – № 10. – P. 1618.
26. Acute ovarian failure in the childhood cancer survivor study / W. Chemaitilly, A.C. Mertens, P. Mitby, [et al.] // J Clin Endocrinol Metab. – 2006. – Vol. 91. – № 5. – P. 1723–1728.
27. Advances in human primordial follicle activation and premature ovarian insufficiency / E.A. Ford, E.L. Beckett, S.D. Roman, [et al.] // Reproduction. – 2020. – Vol. 159. – № 1. – P. R15-R29.
28. Ahamed, J. Role of platelet-derived transforming growth factor- β 1 and reactive oxygen species in radiation-induced organ fibrosis / J. Ahamed, J. Laurence // Antioxid. Redox Signal. – 2017. – Vol. 27. – P. 977–988.
29. Aktas, C. Antiapoptotic and proliferative activity of curcumin on ovarian follicles in mice exposed to whole body ionizing radiation / C. Aktas, M. Kanter, Z. Kocak // Toxicol Ind Health. – 2012. – Vol. 28. – № 9. – P. 852-863.
30. Amifostine attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway / W. Yang, L. Pan, Y. Cheng, [et al.] // Sci Rep. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 10485.
31. Amifostine does not protect thyroid cancer cells in DNA damaging in vitro models / J. Klubo-Gwiezdzinska, J. Costello Jr, K. Jensen, [et al.] // Endocr Connect. – 2017. – Vol. 6. – № 7. – P. 469-478.
32. A new natural antioxidant mixture protects against oxidative and DNA damage in endothelial cells exposed to low-dose irradiation / T. Cervelli, D. Panetta, T. Navarra, [et al.] // Oxid Med Cell Longev. – 2017. – Vol. 2017. – P. 9085947.

33. An overview of the antioxidant effects of ascorbic acid and alpha lipoic acid (in liposomal forms) as adjuvant in cancer treatment / M. Attia, E.A. Essa, R.M. Zaki, [et al.] // *Antioxidants* (Basel). – 2020. – Vol. 9. – № 5. – P. 359.
34. Anti-inflammatory effect of vitamin C during the postoperative period in patients subjected to total knee arthroplasty: A randomized controlled trial / R. Ramón, E. Holguín, J.D. Chiriboga, [et al.] // *J Pers Med*. – 2023. – Vol. 13. – № 9. – P. 1299.
35. A predictive model of the effect of therapeutic radiation on the human ovary / T.W. Kelsey, C.H. Hua, A. Wyatt, [et al.] // *PLoS One*. – 2022. – Vol. 17. – № 11. – P. e0277052.
36. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties / D. Njus, P.M. Kelley, Y.J. Tu, [et al.] // *Free Radic Biol Med*. – 2020. – Vol. 159. – P. 37-43.
37. α -smooth muscle actin is not a marker of fibrogenic cell activity in skeletal muscle fibrosis / W. Zhao, X. Wang, K.H. Sun, [et al.] // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13. – № 1. – P. e0191031.
38. Atiakshin, D. Mast cell chymase: Morphofunctional characteristics / D. Atiakshin, I. Buchwalow, M. Tiemann // *Histochem Cell Biol*. – 2019. – Vol. 152. – № 4. – P. 253-269.
39. Autoimmune diseases in patients with premature ovarian insufficiency - Our current state of knowledge / A. Szeliga, A. Calik-Ksepka, M. Maciejewska-Jeske, [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22. – № 5. – P. 2594.
40. Back to the future: Very high-energy electrons (VHEEs) and their potential application in radiation therapy / M.G. Ronga, M. Cavallone, A. Patriarca, [et al.] // *Cancers* (Basel). – 2021. – Vol. 13. – № 19. – P. 4942.
41. Beyer, R.E. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: Interaction with vitamin E and coenzyme Q / R.E. Beyer // *J Bioenerg Biomembr*. – 1994. – Vol. 26. – № 4. – P. 349-358.
42. Boretti, A. Evidence for the use of curcumin in radioprotection and radiosensitization / A. Boretti // *Phytother Res*. – 2024. – Vol. 38. – № 2. – P. 464-469.

43. Borrego-Soto, G. Ionizing radiation-induced DNA injury and damage detection in patients with breast cancer / G. Borrego-Soto, R. Ortiz-López, A. Rojas-Martínez // *Genet Mol Biol.* – 2015. – Vol. 38. – № 4. – P. 420-432.
44. Bouter, J. Effects on the hypothalamo-pituitary axis in patients with CNS or head and neck tumors following radiotherapy / J. Bouter, Y. Reznik, J. Thariat // *Cancers (Basel).* – 2023. – Vol. 15. – № 15. – P. 3820.
45. Bowie, A.G. Vitamin C inhibits NF-kappa B activation by TNF via the activation of p38 mitogen-activated protein kinase / A.G. Bowie, L.A. O'Neill // *J Immunol.* – 2000. – Vol. 165. – № 12. – P. 7180-7188.
46. Cai, L. Roles of vitamin C in radiation-induced DNA damage in presence and absence of copper / L. Cai, J. Koropatnick, M.G. Cherian // *Chem Biol Interact.* – 2001. – Vol. 137. – № 1. – P. 75-88.
47. Cardiovascular risk factors in premature ovarian insufficiency using hormonal therapy / G.P. Rezende, T. Dassie, D.A.Y. Gomes, [et al.] // *Rev Bras Ginecol Obstet.* – 2023. – Vol. 45. – № 6. – P. 312-318.
48. Chemotherapy associated ovarian failure / D. Mauri, I. Gazouli, G. Zarkavelis, [et al.] // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2020. – Vol. 11. – P. 572388.
49. Chen, M. Selected genetic factors associated with primary ovarian insufficiency / M. Chen, H. Jiang, C. Zhang // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 5. – P. 4423.
50. Citrin, D.E. Mechanisms of normal tissue injury from irradiation / D.E. Citrin, J.B. Mitchell // *Semin Radiat Oncol.* – 2017. – Vol. 27. – № 4. – P. 316-324.
51. Cui, J. Premature ovarian insufficiency: A review on the role of tobacco smoke, its clinical harm, and treatment / J. Cui, Y. Wang // *J Ovarian Res.* – 2024. – Vol. 17. – № 1. – P. 8.
52. Dancea, H.C. Role of radiation-induced TGF-beta signaling in cancer therapy / H.C. Dancea, M.M. Shareef, M.M. Ahmed // *Mol Cell Pharmacol.* – 2009. – Vol. 1. – № 1. – P. 44-56.
53. De Felici, M. PI3K/PTEN/AKT signaling pathways in germ cell development and their involvement in germ cell tumors and ovarian dysfunctions / M. De Felici, F.G. Klinger // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22. – № 18. – P. 9838.

54. DNA damage and somatic mutations in mammalian cells after irradiation with a nail polish dryer / M. Zhivagui, A. Hoda, N. Valenzuela, [et al.] // *Nat Commun.* – 2023. – Vol. 14. – P. 276.
55. Donnez, J. Ovarian endometriosis and fertility preservation: A challenge in 2018 / J. Donnez, J. García-Solares, M.M. Dolmans // *Minerva Ginecol.* – 2018. – Vol. 70. – № 4. – P. 408-414.
56. Ediriweera, M.K. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance / M.K. Ediriweera, K.H. Tennekoon, S.R. Samarakoon // *Semin Cancer Biol.* – 2019. – Vol. 59. – P. 147-160.
57. Effect of platelet-rich plasma (PRP) on ovarian structures in cyclophosphamide-induced ovarian failure in female rats: a stereological study / F. Dehghani, H. Aboutalebi, T. Esmaeilpour, [et al.] // *Toxicol Mech Methods.* – 2018. – Vol. 28. – № 9. – P. 653-659.
58. Effect of vitamin C and E on oxidative stress and antioxidant system in the salivary glands of STZ-induced diabetic rats / F.K. Ibuki, C.T. Bergamaschi, M. da Silva Pedrosa, [et al.] // *Arch Oral Biol.* – 2020. – Vol. 116. – P. 104765.
59. Effects of L-ascorbic acid and alpha-tocopherol on biochemical parameters of swimming-induced oxidative stress in serum of guinea pigs / M. Bursać-Mitrović, D.R. Milovanović, R. Mitić, [et al.] // *Afr J Tradit Complement Altern Med.* – 2016. – Vol. 13. – № 4. – P. 29-33.
60. Effects of paternal ionizing radiation exposure on fertility and offspring's health / J. Li, J. Liu, Y. Zhang, [et al.] // *Reprod Med Biol.* – 2024. – Vol. 23. – № 1. – P. e12567.
61. Effects of supplementation with α -tocopherol, ascorbic acid, selenium, or their combination in linseed oil-enriched diets on the oxidative status in broilers / J. Leskovec, A. Levart, A. Nemeč Svete, [et al.] // *Poult Sci.* – 2018. – Vol. 97. – № 5. – P. 1641-1650.
62. Emerging roles of the p38 MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways in oncogene-induced senescence / Y. Xu, N. Li, R. Xiang, [et al.] // *Trends Biochem Sci.* – 2014. – Vol. 39. – № 6. – P. 268-276.

63. Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data / P. Vabre, N. Gatimel, J. Moreau, [et al.] // *Environ Health*. – 2017. – Vol. 16. – № 1. – P. 37.
64. ESHRE guideline: Management of women with premature ovarian insufficiency / L. Webber, M. Davies, R. Anderson, [et al.] // *Hum Reprod*. – 2016. – Vol. 31. – № 5. – P. 926-937.
65. Essential features for antioxidant capacity of ascorbic acid (vitamin C) / K.L.B. Santos, V.A.N. Bragança, L.V. Pacheco, [et al.] // *J Mol Model*. – 2021. – Vol. 28. – № 1. – P. 1.
66. Estrogen is an important mediator of mast cell activation in ovarian endometriomas / T.H. Zhu, S.J. Ding, T.T. Li, [et al.] // *Reproduction*. – 2018. – Vol. 155. – P. 73–83.
67. Evidence of cancer therapy-induced chronic inflammation in the ovary across multiple species: A potential cause of persistent tissue damage and follicle depletion / Y. Du, Z. Carranza, Y. Luan, [et al.] // *J Reprod Immunol*. – 2022. – Vol. 150. – P. 103491.
68. Evidence that the radioprotector effect of ascorbic acid depends on the radiation dose rate / E. González, M.P. Cruces, E. Pimentel, [et al.] // *Environ Toxicol Pharmacol*. – 2018. – Vol. 62. – P. 210-214.
69. Examination of the effect of ovarian radiation injury induced by hysterosalpingography on ovarian proliferating cell nuclear antigen and the radioprotective effect of amifostine: an experimental study / B. Can, R. Atilgan, S. Pala, [et al.] // *Drug Des Devel Ther*. – 2018. – Vol. 12. – P. 1491-1500.
70. Expression regulation and physiological role of transcription factor FOXO3a during ovarian follicular development / H. Zhang, F. Lin, J. Zhao, [et al.] // *Front Physiol*. – 2020. – Vol. 11. – P. 595086.
71. Factors associated with premature ovarian insufficiency in young women with locally advanced rectal cancer treated with pelvic radiation therapy / L. Hilal, A. Cercek, J. Navilio, [et al.] // *Adv Radiat Oncol*. – 2021. – Vol. 7. – № 1. – P. 100801.
72. Ferroptosis, a new form of cell death defined after radiation exposure / X. Zhang, X. Li, C. Zheng, [et al.] // *Int J Radiat Biol*. – 2022. – Vol. 98. – № 7. – P. 1201-1209.

73. Fertility preservation in women with endometriosis / S. Rangi, C. Hur, E. Richards, [et al.] // *J Clin Med.* – 2023. – Vol. 12. – № 13. – P. 4331.
74. Flores-Balcázar, C.H. Radiotherapy in women with epithelial ovarian cancer: Historical role, current advances, and indications / C.H. Flores-Balcázar, D.M. Urías-Arce // *Chin Clin Oncol.* – 2020. – Vol. 9. – № 4. – P. 49.
75. Folic acid preconditioning alleviated radiation-induced ovarian dysfunction in female mice / Q. Zhang, Z. Wei, H. Weng, [et al.] // *Front Nutr.* – 2022. – Vol. 9. – P. 854655.
76. FOXO3 is a potential biomarker and therapeutic target for premature ovarian insufficiency (Review) / X. Meng, L. Peng, X. Wei, [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2023. – Vol. 27. – № 2. – P. 34.
77. França, M.M. Genetics of primary ovarian insufficiency in the next-generation sequencing era / M.M. França, B.B. Mendonca // *J Endocr Soc.* – 2019. – Vol. 4. – № 2. – P. bvz037.
78. Gęgotek, A. Antioxidative and anti-inflammatory activity of ascorbic acid / A. Gęgotek, E. Skrzydlewska // *Antioxidants (Basel).* – 2022. – Vol. 11. – № 10. – P. 1993.
79. Gęgotek, A. Ascorbic acid as antioxidant / A. Gęgotek, E. Skrzydlewska // *Vitam Horm.* – 2023. – Vol. 121. – P. 247-270.
80. Genetic insights into the complexity of premature ovarian insufficiency / L. Nie, X. Wang, S. Wang, [et al.] // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2024. – Vol. 22. – № 1. – P. 94.
81. Guo, Z. Role of mTOR signaling in female reproduction / Z. Guo, Q. Yu // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2019. – Vol. 10. – P. 692.
82. Haimovitz-Friedman, A. Manipulating oxidative stress following ionizing radiation / A. Haimovitz-Friedman, A. Mizrachi, E.A. Jaimes // *J Cell Signal.* – 2020. – Vol. 1. – № 1. – P. 8-13.
83. Hamoda, H. Premature ovarian insufficiency, early menopause, and induced menopause / H. Hamoda, A. Sharma // *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* – 2024. – Vol. 38. – № 1. – P. 101823.
84. Hata, A. TGF- β signaling from receptors to Smads / A. Hata, Y.G. Chen // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2016. – Vol. 8. – № 9. – P. a022061.

85. High expression of mTOR is associated with radiation resistance in cervical cancer / M.K. Kim, T.J. Kim, C.O. Sung, [et al.] // *J Gynecol Oncol.* – 2010. – Vol. 21. – № 3. – P. 181-185.
86. Histochemical and immunohistochemical study of α -SMA, collagen, and PCNA in epithelial ovarian neoplasm / N. Anggorowati, R. Kurniasari Ch, K. Damayanti, [et al.] // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2017. – Vol. 18. – № 3. – P. 667-671.
87. Immunohistochemical and histochemical analysis of the rat skin after local electron irradiation / G. Demyashkin, Y. Shapovalova, A. Marukyan, [et al.] // *Open Vet J.* – 2023. – Vol. 13. – № 12. – P. 1570-1582.
88. Intra-operative electron radiation therapy: An update of the evidence collected in 40 years to search for models for electron-FLASH studies / F.A. Calvo, J. Serrano, M. Cambeiro, [et al.] // *Cancers (Basel).* – 2022. – Vol. 14. – № 15. – P. 3693.
89. Involved-field radiation therapy for locoregionally recurrent ovarian cancer / A.P. Brown, A. Jhingran, A.H. Klopp, [et al.] // *Gynecol Oncol.* – 2013. – Vol. 130. – № 2. – P. 300–305.
90. Involvement of both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in tridecylpyrrolidine-diol derivative-induced apoptosis in vitro / N. Nosalova, A. Keselakova, M. Kello, [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 14. – P. 11696.
91. Ionizing radiation stimulates secretion of pro-inflammatory cytokines: dose-response relationship, mechanisms and implications / Y.X. Shan, S.Z. Jin, X.D. Liu, [et al.] // *Radiat Environ Biophys.* – 2007. – Vol. 46. – № 1. – P. 21-29.
92. Ionizing radiation triggers mitophagy to enhance DNA damage in cancer cells / Y. Ren, P. Yang, C. Li, [et al.] // *Cell Death Discov.* – 2023. – Vol. 9. – P. 267.
93. Ishizuka, B. Current understanding of the etiology, symptomatology, and treatment options in premature ovarian insufficiency (POI) / B. Ishizuka // *Front Endocrinol (Lausanne).* – 2021. – Vol. 12. – P. 626924.
94. Jiao, Y. Radiation-induced cell death and its mechanisms / Y. Jiao, F. Cao, H. Liu // *Health Phys.* – 2022. – Vol. 123. – № 5. – P. 376-386.

95. Kashi, O. Overactivation or apoptosis: Which mechanisms affect chemotherapy-induced ovarian reserve depletion? / O. Kashi, D. Meiorow // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 22. – P. 16291.
96. Kirshenbaum, M. Premature ovarian insufficiency (POI) and autoimmunity—an update appraisal / M. Kirshenbaum, R. Orvieto // *J Assist Reprod Genet.* – 2019. – Vol. 36. – № 11. – P. 2207-2215.
97. La Marca, A. Fertility preservation for genetic diseases leading to premature ovarian insufficiency (POI) / A. La Marca, E. Mastellari // *J Assist Reprod Genet.* – 2021. – Vol. 38. – № 4. – P. 759-777.
98. Lingappan, K. NF- κ B in oxidative stress / K. Lingappan // *Curr Opin Toxicol.* – 2018. – Vol. 7. – P. 81-86.
99. Liu, Y. Comparison of vitamin C and its derivative antioxidant activity: Evaluated by using density functional theory / Y. Liu, C. Liu, J. Li // *ACS Omega.* – 2020. – Vol. 5. – № 39. – P. 25467-25475.
100. Lossi, L. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis / L. Lossi // *Biochem J.* – 2022. – Vol. 479. – № 3. – P. 357-384.
101. Macias, M.J. Structural determinants of Smad function in TGF- β signaling / M.J. Macias, P. Martin-Malpartida, J. Massagué // *Trends Biochem Sci.* – 2015. – Vol. 40. – № 6. – P. 296-308.
102. Maciejewska-Jeske, M. Consequences of premature ovarian insufficiency on women's sexual health / M. Maciejewska-Jeske, A. Szeliga, B. Męczekalski // *Prz Menopauzalny.* – 2018. – Vol. 17. – № 3. – P. 127-130.
103. Mantawy, E.M. Mechanistic approach of the inhibitory effect of chrysin on inflammatory and apoptotic events implicated in radiation-induced premature ovarian failure: Emphasis on TGF- β /MAPKs signaling pathway / E.M. Mantawy, R.S. Said, A.K. Abdel-Aziz // *Biomed Pharmacother.* – 2019. – Vol. 109. – P. 293-303.
104. MAPK, AKT/FoxO3a and mTOR pathways are involved in cadmium regulating the cell cycle, proliferation and apoptosis of chicken follicular granulosa cells / M. Zhu, S. Miao, W. Zhou, [et al.] // *Ecotoxicol Environ Saf.* – 2021. – Vol. 217. – P. 112187.

105. Mast cell tryptase and carboxypeptidase A3 in the formation of ovarian endometrioid cysts / D. Atiakshin, O. Patsap, A. Kostin, [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24. – № 7. – P. 6498.
106. Mechanisms of inflammatory responses to radiation and normal tissues toxicity: clinical implications / M. Najafi, E. Motevaseli, A. Shirazi, [et al.] // *Int J Radiat Biol.* – 2018. – Vol. 94. – № 4. – P. 335-356.
107. Metabolic profile of patients with premature ovarian insufficiency / A. Podfigurna, A. Stellmach, A. Szeliga, [et al.] // *J Clin Med.* – 2018. – Vol. 7. – № 10. – P. 374.
108. Mikhael, S. Hypothalamic-pituitary-ovarian axis disorders impacting female fertility / S. Mikhael, A. Punjala-Patel, L. Gavrilova-Jordan // *Biomedicines.* – 2019. – Vol. 7. – № 1. – P. 5.
109. Molecular biological mechanisms of radiotherapy-induced skin injury occurrence and treatment / J. Cui, T.J. Wang, Y.X. Zhang, [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2024. – Vol. 180. – P. 117470.
110. Molecular insights into radiation effects and protective mechanisms: A focus on cellular damage and radioprotectors / B. Ibáñez, A. Melero, A. Montoro, [et al.] // *Current Issues in Molecular Biology.* – 2024. – Vol. 46. – № 11. – P. 12718-12732.
111. Molecular mechanism and prevention strategy of chemotherapy- and radiotherapy-induced ovarian damage / S. Kim, S.W. Kim, S.J. Han, [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22. – № 14. – P. 7484.
112. Mukherjee, S. The interaction of oxidative stress with MAPK, PI3/AKT, NF- κ B, and DNA damage kinases influences the fate of γ -radiation-induced bystander cells / S. Mukherjee, A. Dutta, A. Chakraborty // *Arch Biochem Biophys.* – 2022. – Vol. 725. – P. 109302.
113. Munshi, A. Mitogen-activated protein kinases and their role in radiation response / A. Munshi, R. Ramesh // *Genes Cancer.* – 2013. – Vol. 4. – N. 9-10. – P. 401-408.
114. Myofibroblasts: Function, formation, and scope of molecular therapies for skin fibrosis / Y. Tai, E.L. Woods, J. Dally, [et al.] // *Biomolecules.* – 2021. – Vol. 11. – № 8. – P. 1095.

115. Neumann, C. Functions and regulation of T cell-derived interleukin-10 / C. Neumann, A. Scheffold, S. Rutz // *Semin Immunol.* – 2019. – Vol. 44. – P. 101344.
116. NF- κ B targeting for overcoming tumor resistance and normal tissues toxicity / K. Mortezaee, M. Najafi, B. Farhood, [et al.] // *J Cell Physiol.* – 2019. – Vol. 234. – № 10. – P. 17187-17204.
117. Novel molecular mechanisms underlying the ameliorative effect of N-acetyl-L-cysteine against γ -radiation-induced premature ovarian failure in rats / E.M. Mantawy, R.S. Said, D.H. Kassem, [et al.] // *Ecotoxicol Environ Saf.* – 2020. – Vol. 206. – P. 111190.
118. Novel molecular mechanisms underlying the ameliorative effect of Platelet-rich plasma against electron radiation-induced premature ovarian failure / G. Demyashkin, M. Vadyukhin, Z. Murtazalieva, E. Pugacheva [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2024. – № 25(18). – P. 10115.
119. Nuskiewicz, J. Ionizing radiation as a source of oxidative stress—the protective role of melatonin and vitamin D / J. Nuskiewicz, A. Woźniak, K. Szewczyk-Golec // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21. – № 16. – P. 5804.
120. Obrador, E. Ionizing radiation, antioxidant response and oxidative damage: Radiomodulators / E. Obrador, A. Montoro // *Antioxidants (Basel).* – 2023. – Vol. 12. – № 6. – P. 1219.
121. Oocyte stage-specific effects of MTOR determine granulosa cell fate and oocyte quality in mice / J. Guo, T. Zhang, Y. Guo, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2018. – Vol. 115. – № 23. – P. E5326-E5333.
122. Ovarian reserve markers in premature ovarian insufficiency: Within different clinical stages and different etiologies / X. Jiao, T. Meng, Y. Zhai, [et al.] // *Front. Endocrinol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 601752.
123. Oxidative stress in radiation-induced cardiotoxicity / Z. Ping, Y. Peng, H. Lang, [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2020. – Vol. 2020. – P. 3579143.
124. P-571 mutations in FOXO3 mutation cause human premature ovarian insufficiency / L. Sun, K. Tong, G. Huang, [et al.] // *Human Reproduction.* – 2024. – Vol. 39. – Issue Supplement_1. – P. deae108.906.

125. PI3K/AKT/mTOR pathway in ovarian cancer treatment: Are we on the right track? / M.L. Gasparri, E. Bardhi, I. Ruscito, [et al.] // *Geburtshilfe Frauenheilkd.* – 2017. – Vol. 77. – № 10. – P. 1095-1103.
126. Pivotal role of TGF- β /Smad signaling in cardiac fibrosis: Non-coding RNAs as effectual players / S. Saadat, M. Nouredini, M. Mahjoubin-Tehran, [et al.] // *Front Cardiovasc Med.* – 2021. – Vol. 7. – P. 588347.
127. Polycystic ovarian syndrome and the risk of subsequent primary ovarian insufficiency: a nationwide population-based study / M.L. Pan, L.R. Chen, H.M. Tsao, [et al.] // *Menopause.* – 2017. – Vol. 24. – № 7. – P. 803-809.
128. Portrait of inflammatory response to ionizing radiation treatment / F.M. Di Maggio, L. Minafra, G.I. Forte, [et al.] // *J Inflamm (Lond).* – 2015. – Vol. 12. – P. 14.
129. Potential of ascorbic acid in human health against different diseases: an updated narrative review / A. Ali, S. Riaz, W. Khalid, [et al.] // *International Journal of Food Properties.* – 2024. – Vol. 27. – № 1. – P. 493–515.
130. PPAR α is necessary for radiation-induced activation of noncanonical TGF β signaling in the heart / V. Subramanian, S. Borchard, O. Azimzadeh, [et al.] // *J Proteome Res.* – 2018. – Vol. 17. – P. 1677–1689.
131. Practical prediction model for ovarian insufficiency after radiation / G.O.B. Gil, C. Asano, W.P. Andrade, [et al.] // *Rev Bras Ginecol Obstet.* – 2022. – Vol. 44. – № 6. – P. 573-577.
132. Premature ovarian insufficiency - aetiopathology, epidemiology, and diagnostic evaluation / E. Rudnicka, J. Kruszezwska, K. Klicka, [et al.] // *Prz Menopauzalny.* – 2018. – Vol. 17. – № 3. – P. 105-108.
133. Premature ovarian insufficiency: A toolkit for the primary care physician / I. Lambrinoudaki, S.A. Paschou, M.A. Lumsden, [et al.] // *Maturitas.* – 2021 May. – Vol. 147. – P. 53-63.
134. Premature ovarian insufficiency (POI) induced by dynamic intensity modulated radiation therapy via P13K-AKT-FOXO3a in rat models / L. He, X. Long, N. Yu, [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2021. – Vol. 2021. – P. 7273846.

135. Premature ovarian insufficiency: the context of long-term effects / A. Podfigurna-Stopa, A. Czyzyk, M. Grymowicz, [et al.] // *J Endocrinol Invest.* – 2016 Sep. – Vol. 39. – № 9. – P. 983-990.
136. Preventive or potential therapeutic value of nutraceuticals against ionizing radiation-induced oxidative stress in exposed subjects and frequent fliers / M.T. Giardi, E. Touloupakis, D. Bertolotto, [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2013. – Vol. 14. – P. 17168–92.
137. Proliferation and apoptosis features of ovarian follicles after local irradiation with electrons and platelet-rich plasma administration / G. Demyashkin, Z. Murtazalieva, E. Pugacheva [et al.] // *RUDN Journal of Medicine.* – 2024. – Vol. 28, № 3. – P. 311-318.
138. Protective effect of low-molecular-weight fucoidan on radiation-induced fibrosis through TGF- β 1/Smad pathway-mediated inhibition of collagen I accumulation / S.Y. Wu, Y.T. Chen, G.Y. Tsai, [et al.] // *Mar Drugs.* – 2020. – Vol. 18. – № 3. – P. 136.
139. Protective effects of sildenafil citrate administration on cisplatin-induced ovarian damage in rats / M.I. Taskin, A. Yay, E. Adali, [et al.] // *Gynecol Endocrinol.* – 2015. – Vol. 31. – № 4. – P. 272-277.
140. Radiation fibrosis syndrome: the evergreen menace of radiation therapy / A. Purkayastha, N. Sharma, A. Sarin, [et al.] // *Asia Pac J Oncol Nurs.* – 2019. – Vol. 6. – № 3. – P. 238-245.
141. Radiation-induced bystander effect and its clinical implications / H. Tang, L. Cai, X. He, [et al.] // *Front Oncol.* – 2023. – Vol. 13. – P. 1124412.
142. Radiation-induced fibrosis: Mechanisms and opportunities to mitigate. Report of an NCI workshop, September 19, 2016 / D.E. Citrin, P.G.S. Prasanna, A.J. Walker, [et al.] // *Radiat Res.* – 2017. – Vol. 188. – № 1. – P. 1-20.
143. Radiation-induced inflammation and autoimmune diseases / R. Yahyapour, P. Amini, S. Rezapour, [et al.] // *Mil Med Res.* – 2018. – Vol. 5. – № 1. – P. 9.
144. Radiation-induced lipid peroxidation triggers ferroptosis and synergizes with ferroptosis inducers / L.F. Ye, K.R. Chaudhary, F. Zandkarimi, [et al.] // *ACS Chem Biol.* – 2020. – Vol. 15. – № 2. – P. 469-484.

145. Radiation-induced neuroinflammation: a potential protective role for poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors? / R. Gutierrez-Quintana, D.J. Walker, K.J. Williams, [et al.] // *Neurooncol Adv.* – 2022. – Vol. 4. – № 1. – P. v-dab190.
146. Radiation-induced normal tissue damage: Oxidative stress and epigenetic mechanisms / J. Wei, B. Wang, H. Wang [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019. – P. 3010342.
147. Radiation-induced ovarian follicle loss occurs without overt stromal changes / B.F. Kimler, S.M. Briley, B.W. Johnson, [et al.] // *Reproduction.* – 2018. – Vol. 155. – № 6. – P. 553-562.
148. Radiation-induced skin fibrosis: Pathogenesis, current treatment options, and emerging therapeutics / M.R. Borrelli, A.H. Shen, G.K. Lee, [et al.] // *Ann Plast Surg.* – 2019. – Vol. 83. – № 4S Suppl 1. – P. S59-S64.
149. Radiation, inflammation and the immune response in cancer / K.J. McKelvey, A.L. Hudson, M. Back, [et al.] // *Mamm Genome.* – 2018. – Vol. 29. – № 11-12. – P. 843-865.
150. Radiations and female fertility / R. Marci, M. Mallozzi, L. Di Benedetto, [et al.] // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2018. – Vol. 16. – № 1. – P. 112.
151. Radiation therapy for chemotherapy-resistant recurrent epithelial ovarian cancer / S. Machida, Y. Takei, C. Yoshida, [et al.] // *Oncology.* – 2014. – Vol. 86. – № 4. – P. 232–238.
152. Radiation treatment in women with ovarian cancer: Past, present, and future / E.C. Fields, W.P. McGuire, L. Lin, [et al.] // *Front Oncol.* – 2017. – Vol. 7. – P. 177.
153. Radioprotective role of vitamins C and E against the gamma ray-induced damage to the chemical structure of bovine serum albumin / H. Zarei, M. Bahreinipour, Y. Sefidbakht, [et al.] // *Antioxidants (Basel).* – 2021. – Vol. 10. – № 12. – P. 1875.
154. Radioprotectors.org: an open database of known and predicted radioprotectors / A.M. Aliper, M.E. Bozdaganyan, V.A. Sarkisova, [et al.] // *Aging (Albany NY).* – 2020. – Vol. 12. – № 15. – P. 15741-15755.
155. Radiosensitization and radioprotection by curcumin in glioblastoma and other cancers / V. Zoi, V. Galani, P. Tsekeris, [et al.] // *Biomedicines.* – 2022. – Vol. 10. – № 2. – P. 312.

156. Reactive oxygen species activation of MAPK pathway results in VEGF upregulation as an undesired irradiation response / M. Drigotas, A. Affolter, W.J. Mann, [et al.] // *J Oral Pathol Med.* – 2013. – Vol. 42. – № 8. – P. 612-619.
157. Reduced Foxo3a, FoxL2, and p27 mRNA expression in human ovarian tissue in premature ovarian insufficiency / N. Thanatsis, A. Kaponis, V. Koika, [et al.] // *Hormones (Athens).* – 2019. – Vol. 18. – № 4. – P. 537-538.
158. Reduction-oxidation (redox) system in radiation-induced normal tissue injury: molecular mechanisms and implications in radiation therapeutics / R. Yahyapour, E. Motevaseli, A. Rezaeyan, [et al.] // *Clin Transl Oncol.* – 2018. – Vol. 20. – № 8. – P. 975-988.
159. Resveratrol inhibits inflammatory signaling implicated in ionizing radiation-induced premature ovarian failure through antagonistic crosstalk between silencing information regulator 1 (SIRT1) and poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) / R.S. Said, E. El-Demerdash, A.S. Nada, [et al.] // *Biochem Pharmacol.* – 2016. – Vol. 103. – P. 140-150.
160. Rodriguez-Wallberg, K.A. Options on fertility preservation in female cancer patients / K.A. Rodriguez-Wallberg, K. Oktay // *Cancer Treat Rev.* – 2012. – Vol. 38. – № 5. – P. 354-361.
161. Role of alpha-smooth muscle actin and fibroblast activation protein alpha in ovarian neoplasms / A.C. da Silva, M.P. Jammal, R.M. Etchebehere, [et al.] // *Gynecol Obstet Invest.* – 2018. – Vol. 83. – № 4. – P. 381-387.
162. Role of ferroptosis in radiation-induced soft tissue injury / C.E. Berry, C.B. Kendig, N. An, [et al.] // *Cell Death Discov.* – 2024. – Vol. 10. – № 1. – P. 313.
163. Saraiva, M. Biology and therapeutic potential of interleukin-10 / M. Saraiva, P. Vieira, A. O'Garra // *J Exp Med.* – 2020. – Vol. 217. – № 1. – P. e20190418.
164. Serious adverse effects of amifostine during radiotherapy in head and neck cancer patients / D. Rades, F. Fehlaue, A. Bajrovic, [et al.] // *Radiother Oncol.* – 2004. – Vol. 70. – № 3. – P. 261-264.
165. Serological assessment of activated fibroblasts by alpha-smooth muscle actin (α -SMA): A noninvasive biomarker of activated fibroblasts in lung disorders / S. Holm

- Nielsen, N. Willumsen, D.J. Leeming, [et al.] // *Transl Oncol.* – 2019. – Vol. 12. – № 2. – P. 368-374.
166. Shelling, A.N. The role of lifestyle and dietary factors in the development of premature ovarian insufficiency / A.N. Shelling, N. Ahmed Nasef // *Antioxidants (Basel).* – 2023. – Vol. 12. – № 8. – P. 1601.
167. Shinde, A.V. The role of α -smooth muscle actin in fibroblast-mediated matrix contraction and remodeling / A.V. Shinde, C. Humeres, N.G. Frangogiannis // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* – 2017. – Vol. 1863. – № 1. – P. 298-309.
168. Singh, V. NF- κ B as a key player in regulation of cellular radiation responses and identification of radiation countermeasures / V. Singh, D. Gupta, R. Arora // *Discoveries (Craiova).* – 2015. – Vol. 3. – № 1. – P. e35.
169. SMAD proteins in TGF- β signalling pathway in cancer: Regulatory mechanisms and clinical applications / Q. Wang, F. Xiong, G. Wu, [et al.] // *Diagnostics (Basel).* – 2023. – Vol. 13. – № 17. – P. 2769.
170. Sram, R.J. Vitamin C for DNA damage prevention / R.J. Sram, B. Binkova, P. Rossner Jr. // *Mutat Res.* – 2012. – Vol. 733. – Nos. 1-2. – P. 39-49.
171. Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10 / R.A. Saxton, N. Tsutsumi, L.L. Su, [et al.] // *Science.* – 2021. – Vol. 371. – № 6535. – P. eabc8433.
172. Sullivan, S.D. Hormone replacement therapy in young women with primary ovarian insufficiency and early menopause / S.D. Sullivan, P.M. Sarrel, L.M. Nelson // *Fertil Steril.* – 2016. – Vol. 106. – № 7. – P. 1588-1599.
173. Targeting oxidative stress: The potential of vitamin C in protecting against liver damage after electron beam therapy / G. Demyashkin, M. Parshenkov, S. Koryakin, [et al.] // *Biomedicines.* – 2024. – Vol. 12. – № 10. – P. 2195.
174. Targeting the PI3K pathway and DNA damage response as a therapeutic strategy in ovarian cancer / T.T. Huang, E.J. Lampert, C. Coots, [et al.] // *Cancer Treat Rev.* – 2020. – Vol. 86. – P. 102021.

175. The different doses of radiation therapy-induced damage to the ovarian environment in rats / G.O. Onder, E. Balcioglu, M. Baran, [et al.] // *Int J Radiat Biol.* – 2021. – Vol. 97. – № 3. – P. 367-375.
176. The global prevalence of primary ovarian insufficiency and early menopause: a meta-analysis / S. Golezar, F. Ramezani Tehrani, S. Khazaei, [et al.] // *Climacteric.* – 2019. – Vol. 22. – № 4. – P. 403-411.
177. The impact of radiotherapy on the hypothalamo-pituitary axis: old vs new radiotherapy techniques / D.S. McLaren, A. Devi, N. Kyriakakis, [et al.] // *Endocr Connect.* – 2023. – Vol. 12. – № 9. – P. e220490.
178. The NF- κ B transcriptional network is a high-dose vitamin C-targetable vulnerability in breast cancer / A. Mussa, H.A. Afolabi, N.H. Syed, [et al.] // *Biomedicines.* – 2023. – Vol. 11. – № 4. – P. 1060.
179. The protective effect of platelet-rich plasma administered on ovarian function in female rats with Cy-induced ovarian damage / P. Ozcan, T. Takmaz, O.E. Tok, [et al.] // *J Assist Reprod Genet.* – 2020. – Vol. 37. – № 4. – P. 865-873.
180. The role of AKT and FOXO3 in preventing ovarian toxicity induced by cyclophosphamide / B.F. Zhang, Y. Hu, X. Liu, [et al.] // *PLoS One.* – 2019. – Vol. 14. – № 4. – P. e0215616.
181. The role of caspase-3, apoptosis-inducing factor, and B-cell lymphoma-2 expressions in term premature rupture of membrane / K.S. Negara, K. Suwiyoga, T.G.A. Pemayun, [et al.] // *Rev Bras Ginecol Obstet.* – 2018. – Vol. 40. – № 12. – P. 733-739.
182. Tissue fibrosis induced by radiotherapy: current understanding of the molecular mechanisms, diagnosis and therapeutic advances / Z. Yu, C. Xu, B. Song, [et al.] // *J Transl Med.* – 2023. – Vol. 21. – № 1. – P. 708.
183. Tsiligiannis, S. Premature ovarian insufficiency and long-term health consequences / S. Tsiligiannis, N. Panay, J.C. Stevenson // *Curr Vasc Pharmacol.* – 2019. – Vol. 17. – № 6. – P. 604-609.
184. Two faces of vitamin C - Antioxidative and pro-oxidative agent / J. Kaźmierczak-Barańska, K. Boguszevska, A. Adamus-Grabicka, [et al.] // *Nutrients.* – 2020. – Vol. 12. – № 5. – P. 1501.

185. Use of amifostine for cytoprotection during radiation therapy: A review / M. King, S. Joseph, A. Albert, [et al.] // *Oncology*. – 2020. – Vol. 98. – № 2. – P. 61-80.
186. Vitamin C enhances NF- κ B-driven epigenomic reprogramming and boosts the immunogenic properties of dendritic cells / O. Morante-Palacios, G. Godoy-Tena, J. Calafell-Segura, [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50. – № 19. – P. 10981-10994.
187. Vitamins and radioprotective effect: A review / I. Lledó, B. Ibáñez, A. Melero, [et al.] // *Antioxidants (Basel)*. – 2023. – Vol. 12. – № 3. – P. 611.
188. Vogin, G. The law of Bergonié and Tribondeau: A nice formula for a first approximation / G. Vogin, N. Foray // *Int J Radiat Biol.* – 2013. – Vol. 89. – № 1. – P. 2-8.
189. Wilkins, J. Premature ovarian insufficiency secondary to COVID-19 infection: An original case report / J. Wilkins, S. Al-Inizi // *Int J Gynaecol Obstet.* – 2021. – Vol. 154. – № 1. – P. 179-180.