

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

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) и федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Демяшкин Григорий Александрович

Официальные оппоненты:

Асатурова Александра Вячеславовна – доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 1-е патологоанатомическое отделение, заведующий отделением

Карев Вадим Евгеньевич – доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства, научно-исследовательский отдел патоморфологии, заведующий отделом

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «15» «сентября» 2025 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.31 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Блинова Екатерина Валериевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 % [IAEA Safety Standards; Series No. GSR, Part 3, General Safety Requirements; 2015]. 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 [R. Ramón et al., 2023; Y. Ren et al., 2023; K.J. McKelvey et al., 2018; M. Bursać-Mitrović et al., 2016].

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 [Y. Du et al., 2022; , O. Morante-Palacios et al., 2022; E.C. Fields et al., 2017; S.D. Sullivan et al., 2016; F.M. Di Maggio et al., 2015; M.T. Giardi et al., 2013].

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 [G. Demyashkin et al., 2023].

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 [T.W. Kelsey et al., 2022; A. Geçotek et al., 2022; M.M. França et al., 2019; T.

Cervelli et al., 2017]. 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 гомогонате 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/АКТ/mTOR и PI3K/АКТ/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. Результатами 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/АКТ/mTOR и PI3K/АКТ/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).

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 радиолитиза 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 соответствует паспорту научной специальности 1.5.22. Клеточная биология, а также областям исследования согласно пунктам 10, 13, 14 отрасли медицинских наук.

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.

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/AKT/mTOR, PI3K/AKT/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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Дизайн

В диссертационном исследовании использовали Экспериментальное исследование проводили на лабораторных животных – самках крыс породы Вистар (*Rattus Wistar*; n=180; вес 180±20 грамм; возраст 9 – 10 недель): I группа (n=20) – контрольная, интраперитонеальное введение изотонического раствора NaCl 0,9 %; II группа (n=40) – Воздействие локального облучения электронами во фракционном режиме в суммарной очаговой дозе (СОД) 30 Гр; III группа (n=40) – Интраперитонеальное введение аскорбиновой кислоты (АК) в дозе 50 мг / кг за 1 час до локального облучения электронами (суммарная доза 30 Гр); IV группа (n=40) – Интраперитонеальное введение Амифостина (АМИ) в дозе 200 мг / кг за 30 минут до локального облучения электронами (суммарная доза 30 Гр); V группа (n=20) – Интраперитонеальное введение аскорбиновой кислоты (АК) в дозе 50 мг / кг; VI группа (n=20) – Интраперитонеальное введение препарата сравнения Амифостина (АМИ) в дозе 200 мг / кг. Согласно дизайна эксперимента и правила по проведению доклинических исследований, сроки введения составили: 7-е, 30-е, 60-е и 90-е сутки.

Методы исследования

В диссертационном исследовании использовали следующий комплекс методов: а) анализ гормонального статуса на ФСГ, ЛГ, АМГ, эстроген; б) иммуноферментный (ELISA) анализ гомогената яичника на уровни малонового диальдегида (MDA), супероксиддисмутазы (SOD), каталазы (CAT); в) гистологический – окраска гематоксилином и эозином; г) гистохимический – окраска трихромом по Массону для оценки состояния волокнистого компонента; д) TUNEL-метод; е) молекулярно-генетический: полимеразная цепная реакция в режиме реального времени гомогената яичника на экспрессию Ki-67, caspase 3, caspase 8, caspase 9, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10, а также маркеров сигнальных путей; ж) иммуногистохимические реакции (α -SMA, TGF- β , Coll-1; Chymase, Trypsase); з) статистический.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка гормонального статуса

Локальное облучение яичников электронами в режиме фракционирования СОД 30 Гр привело 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. 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.

Иммуноферментный анализ редокс-гомеостаза в яичниках

Локальное облучение яичников электронами в режиме фракционирования СОД 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 ($p \leq 0,05$). Также наблюдалось угнетение 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 ($p \leq 0,05$). 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 выражалось 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.

Гистологическое исследование яичников

В микропрепаратах яичников, локально облученных электронами в режиме фракционирования СОД 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 – полнокровие и стаз. В корковом веществе отмечали небольшие геморрагические очаги и лишь единичные овариальные фолликулы, преимущественно примордиальные. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты и амифостина способствовало частичной протекции яичников – слабо выраженные признаки острого радиационно-индуцированного повреждения: мелкие точечные кровоизлияния в строме органа и застои в просвете кровеносных сосудов мелкого и среднего калибров. Корковое вещество в основном с неизменной гистоархитектоникой, в большом количестве обнаружены овариальные фолликулы на разных стадиях развития. К третьему месяцу эксперимента в яичниках после воздействия электронами СОД 30 Гр наблюдали: снижение количества овариальных фолликулов с прерывистой текой и стазом в просвете некоторых кровеносных сосудов, а также значительное разрастание соединительнотканного компонента яичника. В некоторых срезах группы предлучевого введения аскорбиновой кислоты и амифостина также наблюдали единичные пучки волокнистой ткани, однако доля овариальных фолликулов значительно превышала таковую по сравнению с II группой. Морфологическая картина яичников животных, которым вводили аскорбиновую кислоту и амифостин, на третьем месяце соответствовала таковой в контрольной группе (Рисунок 1).

Морфометрическая оценка овариального резерва

Воздействие локального облучения электронами во фракционном режиме в суммарной дозе 30 Гр привело к резкому снижению показателя овариального резерва: 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. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты привело к протекции овариальных фолликулов, что проявлялось менее

выраженным уменьшением их количества через 7 суток по сравнению с контрольной группой ($p \leq 0,05$), с постепенным восстановлением их количества на третьем месяце эксперимента (Таблицы 1, 2).

Таблица 1 – Количество овариальных фолликулов на разных стадиях в контрольной и опытных группах на 7 сутки

Группа	Примордиальные	Первичные	Вторичные	Третичные	Атретические
I	12,5±0,6	10,4±0,5	9,8±0,4	7,7±0,3	3,6±0,1
II	7,1±0,3*	5,8±0,2*	5,1±0,2*	3,4±0,1*	10,8±0,5*
III	10,4±0,5*!	9,5±0,4*!	9,0±0,4!	7,9±0,3!	7,3±0,3*!
IV	9,9±0,4*!	9,0±0,4*!	8,7±0,4*!	7,8±0,3!	8,6±0,5*!+
V	13,2±0,6!	10,3±0,5!	9,9±0,4!	7,5±0,3!	3,7±0,1!
VI	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 $M \pm SD$. 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»; $p \leq 0,05$

Таблица 2 – Количество овариальных фолликулов на разных стадиях в контрольной и опытных группах на 90 сутки

Группа	Примордиальные	Первичные	Вторичные	Третичные	Атретические
I	9,8±0,4	8,2±0,4	7,6±0,3	4,5±0,2	5,3±0,2
II	3,3±0,1*	2,2±0,1*	1,4±0,07*	0,7±0,03*	3,6±0,1*
III	9,1±0,4!	7,0±0,3*!	6,6±0,3*!	3,9±0,1*!	4,8±0,2!
IV	9,2±0,4!	7,3±0,3*!	6,3±0,2*!	3,2±0,1*!+	5,3±0,2!+
V	9,6±0,4!	8,3±0,4!	7,5±0,3!	4,2±0,2!	5,5±0,2!
VI	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 $M \pm SD$. 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»; $p \leq 0,05$

TUNEL-анализ

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 ($p \leq 0,05$). 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; $p \leq 0,05$). 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: количество TUNEL-позитивных клеток превышало контрольные значения на 7 сутки лишь на 60 % (в группе аскорбиновой кислоты) и на 93 % (в группе амифостина) ($p \leq 0,05$). 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 % ($p \leq 0,05$). 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) (Рисунок 1).

Таблица 3 – Количество TUNEL-позитивных фолликулярных клеток

Группа	7 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
I	8,6±0,4	8,9±0,4	9,3±0,4	9,8±0,4
II	27,3±1,1*	26,1±1,2*	23,7±1,1*	21,6±1,0*
III	13,8±0,6*!	12,6±0,6*!	11,4±0,5*!	10,3±0,4!
IV	16,6±0,7*!+	14,3±0,7*!+	11,8±0,5*!	10,7±0,5*!
V	8,4±0,3!	8,7±0,4!	9,1±0,4!	9,7±0,4!
VI	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»; $p \leq 0,05$

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

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. 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 % ($p \leq 0,05$).

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

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 *AKT* 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.

Мультиплексное иммуногистохимическое исследование факторов фиброгенеза

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. 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 1).

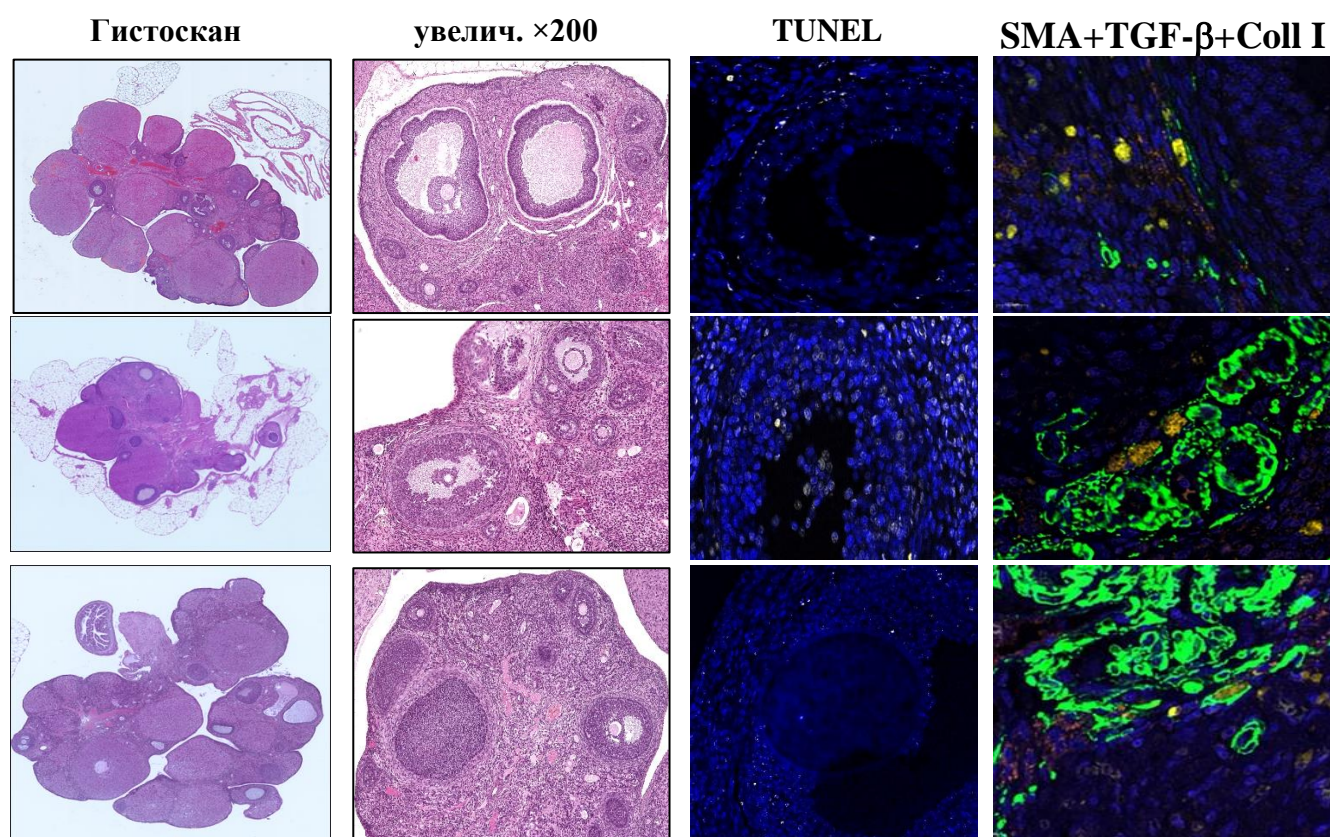


Рисунок 1 – Фрагмент яичника на 7 сутки. Группы, ряд: верхний – контроль, средний – СОД 30 Гр, нижний – СОД 30 Гр + АК. Первый и второй столбцы – окрашивание гематоксилином и эозином. Третий столбец – TUNEL метод, увелич., ×400. Четвертый столбец: иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к α -SMA (зеленое свечение), TGF- β (желтое свечение) и Collagen I (оранжевое свечение), совмещенное изображение; DAPI – синее свечение, флуоресцентная микроскопия, увелич. ×400

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. 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 1).

Гистохимическое исследование

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. 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 (Рисунок 2).

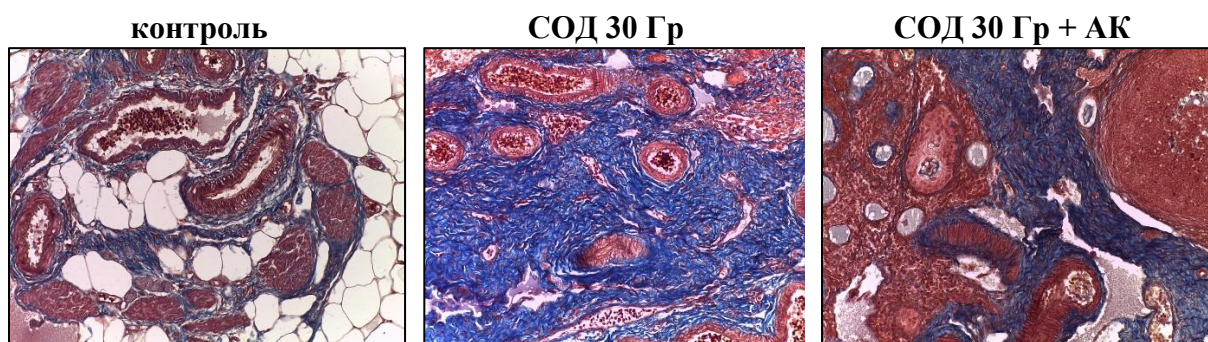


Рисунок 2 – Фрагмент яичника контрольной группы на 90 сутках. Гистохимическое окрашивание трихромом по Массону, волокна соединительной ткани окрашены в синий цвет, увелич. $\times 200$

Молекулярно-генетический анализ экспрессии TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10

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- α), в 3,2 раза (IL-1 β), 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- α), 2,8 раза (для IL-1 β), 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- α , IL-1 β , 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 ($p \leq 0,05$).

Мультиплексное иммуногистохимическое исследование тучных клеток микроокружения яичника

Локальное облучение электронами в суммарной дозе 30 Гр привело к миграции и активации тучных клеток в яичниках, преимущественно в стромальном компартменте (Таблица 4, Рисунок 3).

Таблица 4 – Количество тучных клеток в 1 мм² в яичниках контрольной и опытных группах на 7, 30, 60 и 90 сутках

Группа	7 сутки	30 сутки	60 сутки	90 сутки
I	12,3±0,6	11,7±0,5	11,9±0,5	12,5±0,6
II	39,7±1,8*	45,1±2,1*	40,4±2,0*	36,3±1,8*
III	22,4±1,0*!	20,8±1,0*!	18,1±0,9*!	15,8±0,7*!
IV	19,9±0,9*!+	18,5±0,9*!+	15,9±0,7*!+	14,6±0,7*!
V	12,8±0,6!	12,5±0,6!	11,9±0,5!	11,8±0,5!
VI	12,5±0,6!	12,3±0,5!	12,0±0,6!	12,2±0,6!

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»; $p \leq 0,05$

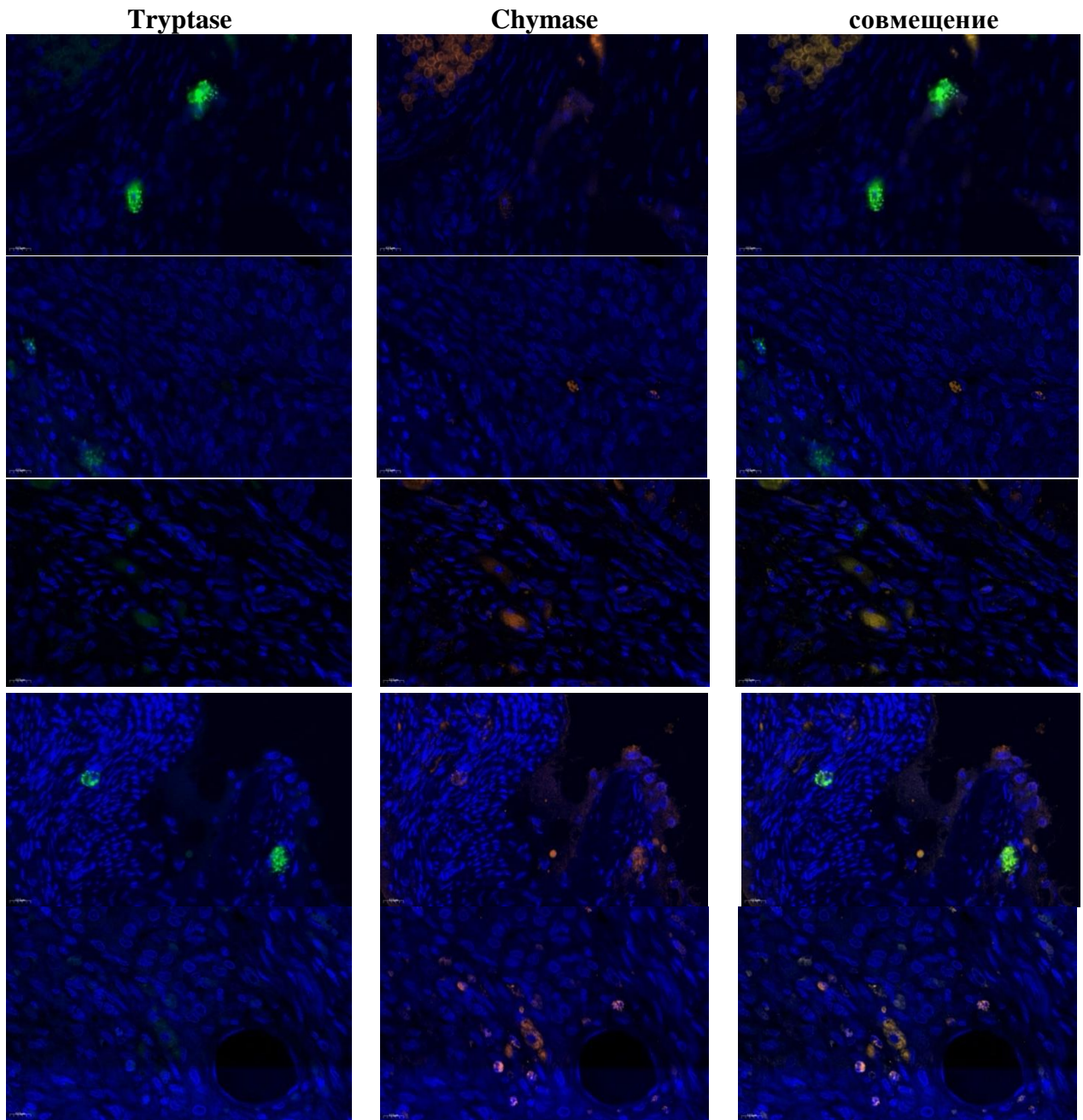


Рисунок 3 – Яичник, фрагмент, на 7 (второй и третий ряды) и 90 (четвертый и пятый ряды) сутки контрольной (первый ряд) и опытных групп. Иммуногистохимическое мультиплексное исследование с антителами к Триптаза и Chymase тучных клеток. Флуоресцентная микроскопия; увелич. $\times 400$. Зеленое свечение – Триптаза+ гранулы тучных клеток; оранжевое свечение – Химаза+ гранулы тучных клеток; синее свечение – DAPI. Группы: второй и четвертый ряды – СОД 30 Гр; третий и пятый ряды – СОД 30 Гр + АК.

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). 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 4, Рисунок 3).

Молекулярно-генетический анализ экспрессии участников сигнального пути TGF/SMAD

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 ($p \leq 0,05$).

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±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±0,4).

2. Предлучевое введение аскорбиновой кислоты способствует поддержанию уровней гонадотропных (ФСГ – 6,5±0,3 нг/мл, ЛГ – 6,4±0,3 мЕд/мл) гормонов, а также предотвращает развитие гипоестрогении (E2 – 39,5±1,7 пг/мл) и снижение маркера овариального резерва (АМГ – 8,3±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±0,5 нМоль/мг белка), а также стимуляции синтеза ферментов эндогенной антиоксидантной защиты (SOD – 72,4±3,5 Ед/мг белка, САТ – 11,6±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/AKT/mTOR и PI3K/AKT/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-1β*, *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

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.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Морфофункциональные особенности воспаления в яичнике после воздействия локального облучения электронами и введения плазмы, обогащённой тромбоцитами / Демяшкин Г.А., Муртазалиева З.М., **Пугачева Е.Н.**, Вадюхин М.А., Шукюрова М.М., Корякин С.Н., Проскурякова А.А. // **Морфология**. – 2023. – Т. 161. - №4. - С. 43-52. [RSCI]
2. Характеристика волокнистого компонента яичника в модели радиационно-индуцированной овариальной недостаточности / Демяшкин Г.А., **Пугачева Е.Н.**, Муртазалиева З.М., Вадюхин М.А. // **Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины**. – 2024. – Т. 14, № 1. – С. 24-28.
3. 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.
4. Demyashkin G, Vadyukhin M, Murtazaliev Z, **Pugacheva E.**, et al./ Novel molecular mechanisms underlying the ameliorative effect of Platelet-rich plasma against electron radiation-induced premature ovarian failure. // **Int J Mol Sci**. 2024;25(18):10115. [Scopus]
5. Оценка жизненного цикла в фолликулах яичников крыс после локального облучения электронами / **Е. Н. Пугачева**, З. М. Муртазалиева, Д. И. Угурчиева // Молодежный инновационный вестник. – 2024. – Т. 13, № 2. – С. 106-107.
6. Паршенков М. А. Потенциал аскорбиновой кислоты в протекции острого лучевого повреждения / Паршенков М.А., Урусханова Ж.Э., Якименко В.А., Угурчиева Д.И.,

Муртазалиева З.М., Пугачева Е.Н. //VII Международный форум онкологии и радиотерапии «Ради жизни», сборник материалов. Москва, 2024: С.81.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АК – аскорбиновая кислота
АФК – активные формы кислорода
АЛТ – аланинаминотрансфераза
АМ – амифостин
АСТ – аспаргатаминотрансфераза
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ИИ – ионизирующее излучение
ИЛ – интерлейкин,
ЛТ – лучевая терапия, п. зр. св. микр. –
в поле зрения светового микроскопа
РНК – рибонуклеиновая кислота
СОД – суммарная очаговая доза
MDA – малоновый диальдегид
МДА (анг. malondialdehyde)
SOD – супероксиддисмутаза (англ.
superoxide dismutase)
SSB – одностранные разрывы ДНК
(англ. single-strand breaks)