

М.А. Аль Меселмани

ВЛИЯНИЕ γ – ИЗЛУЧЕНИЯ НА МИТОХОНДРИАЛЬНОЕ ОКИСЛЕНИЕ В СЕМЕННИКАХ КРЫС

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

В работе показано, что на 60-е сутки после однократного внешнего γ – облучения крыс-самцов в дозах 0,5 и 1,0 Гр изменяется активности митохондриальной дыхательной цепи, обнаруживаются расщепление окислительного фосфорилирования и изменение энергетического метаболизма в ткани семенников. Воздействие малых доз γ – облучения на энергетическое состояние и процесс окислительного фосфорилирования является одной из причин дисфункции семенников.

Ключевые слова: семенники, митохондрия, окисление, малые дозы гаммы радиации, белые крысы.

M. A. Almeselmani

INFLUENCE γ – IRRADIATION ON THE MITOCHONDRIAL OXIDATION IN TESTIS OF RATS

In the present papers we show the condition of mitochondrial oxidation in the preparations of male rat testis after 60 days in doses 0.5 and 1.0 Gr γ – irradiation, changes stimulation activity of mitochondrial respiratory chain, availability uncoupling of oxidative and phosphorylation, and change condition of energetic in the preparation of testis, we suggest action low doses γ – radiation on mitochondrion activity and process oxidation phosphorylation, one of factor's dysfunction of testis.

Key words: testis, mitochondria, oxidation, low doses γ – radiation, albino rats.

Оригинальные научные публикации

Несмотря на то, что в течение века было проделано много исследований по изучению действия острого и хронического ионизирующего излучения на семенники, эта проблема остается актуальной и на современном этапе для медико-биологических исследований, принимая во внимание морфофункциональные изменения этого органа под воздействием малых доз радиационного облучения [3,4,13].

Изучение воздействия облучения проводилось в ходе различных клинических и экспериментальных исследований лучевой терапии, проводимой у пациентов со многими заболеваниями, в результате чего были обнаружены нарушения функций клеток Лейдига, которые продуцируются около 75% тестостерона. После тотального облучения всего организма при лечении в частности острой лимфобластной лейкемии наблюдается дисфункция клеток Лейдига и как следствие этого – нарушение нормального развития пубертатности у мальчиков [13]. Ионизирующее излучение вызывает окислительный стресс в семенниках и апоптоз, прежде всего, в зародышевых клетках [11]. По данным литературы, самая низкая доза 0,25 Гр приводит к увеличению риска вырождения, внутриклеточному лизису и дефектам митохондрий, а также к необратимым изменениям внутриклеточного гомеостаза, дистрофическим процессам, морфологическим и функциональным изменениям в тканях, которые происходят в течение нескольких часов после облучения.

Митохондрии чувствительны к радиации как при ранних, так и при последующих эффектах ионизирующего излучения на клетки, а уменьшение митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\psi$), активация кислородного потребления, по данным литературы, приводит к изменениям электрохимических, биохимических и оптических свойств изолированной митохондрии.

Важно, что митохондрии играют главную роль в образовании и биосинтезе гормона семенников [7], поэтому была сделана оценка связи функционального состояния семенников с митохондриями и вывод о том, что поражение митохондрии является одной из первичных причин дисфункции семенников.

Перл и другие авторы считают, что фертильность сперматозоида зависит от митохондриального трансмембранного потенциала, который создается электронно-транспортной цепью и регулируется равновесием окисления АФК [14].

Очевидным, что так как митохондрия-оранелла клетки, в которой происходит синтез АТФ – основного источника энергии играющее уникальную роль во всех стадиях развития семенников [16]. Данные литературы свидетельствуют о том, что семенники – очень активные метаболические органы, выполняющие сложную работу (сперматогенез – самый активный репликационный процесс, способный производить около 1000 спермиев в секунду). Разделения клетки, свойственные этому процессу, обеспечивают, соответственно, высокие уровни потребления кислорода зародышевым эпителием митохондрий. Данные литературы свидетельствуют об исключительной роли тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в семенниках в обеспечении необходимой для сперматогенеза и подвижности спермы энергией, поэтому сперматозоиды и сперматиды отличаются содержанием большого количества митохондрий [6]. Митохондрии которые являются главным источником АФК в клетках при нормальном функционировании 98% поступившего кислорода используют для окисления субстратов с образованием АТФ (главного энергетического субстрата клеток) и 2% для синтеза АФК, который играет существенную роль во многих физиологических процессах ткани семенников, но увеличение АФК вызывает понижение внутриклеточного тестостерона и патологические процессы в мужской репродуктивной системе. Эти процессы могут проявляться как

в раке мочевого пузыря и простаты, так и в мужском бесплодии.

Изучение нарушений, возникающих в семенниках млекопитающих под действием ионизирующих излучений, занимает одно из важнейших мест в радиобиологии, поскольку сперматогенный эпителий обладает способностью к непрерывному обновлению клеток, имеющих различную радиочувствительность, и является удобной моделью для исследования радиационных эффектов и оценки их последствий, которые могут вызвать бесплодие [10].

Таким образом анализ литературы свидетельствует об отсутствии данных о состоянии митохондриального окисления в тканях семенников при условиях воздействия низких доз гамма – облучения, что является предметом наших исследований.

В связи с этим, целью работы явилось изучение состояния митохондриального окисления ткани семенников экспериментальных животных в условиях внешнего низкодозового радиационного воздействия.

Материал и методы

Опыты проводились на белых крысах-самцах весом 180 – 200 г. При этом соблюдались все требования нормативных актов, принятых в международной практике лабораторного животноводства [Хельсинкская Декларация по гуманному обращению с животными (1975, пересмотр. 1993), Директивы Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (1986)].

Все животные (21), были разделены на 3 групп. Две группы однократно облучали на установке «ИГУР-1» в дозе 0,5 и 1 Гр (мощность дозы 0,92 Гр/мин) соответственно для забоя на 60 дней после облучения и одна группа была контрольная. Выделенные семенники, охлаждали, промывали в физиологическом растворе, освобождали от соединительнотканых структур и продавливали через плунжер с диаметром отверстий 0,5мм.

В полученных таким образом кусочках ткани семенников исследовали параметры митохондриального окисления полярографическим методом

с использованием электрода Кларка. В термостатируемой ячейке объемом 2 мл при температуре 25°C [2]. Все эксперименты проводились в условиях строгого контроля температуры и времени. Содержание белка в образцах определяли биуретовым методом после их гомогенизации.

Для получения более полной картины состояния тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования использовали пробы с дыханием кусочков ткани семенников на эндогенных (Vэнд) и экзогенных субстратах, используя в качестве последних янтарную кислоту (сукцинат) – Vяк и глутаминовую (глутамат) (Vглу) кислоту, а также разобциатель окислительного фосфорилирования – 2,4 динитрофенол (Vднф).

Используя амитал натрия – ингибитор I комплекс дыхательной цепи и малонат натрия – ингибитор сукцинатдегидрогеназы для оценки соотношения субстратов MO, скорость потребления кислорода кусочками ткани семенников измеряли в нмоль O₂/мин/мг белка [1].

С этим рассчитывали величину стимулирующего действия янтарной кислоты – CДяк = Vяк / Vэнд, Глутамата CДглу = Vглу / Vэнд, Амиталя APД = Vам / Vэнд, Малоната MPД = Vмал / Vам, и 2,4-динитрофенола – CДднф = Vднф / Vглу.

Результаты обрабатывали программой Statistica 5.0.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что ткань семенников белых крыс обладает высокой скоростью митохондриального окисления и высоко чувствительна к действию малых доз внешнего облучения (табл. 1).

Согласно результатам работы, после фракционирования

Таблица 1 Показатели ТД семенников крыс после γ -облучения в дозах 0,5 Гр и 1,0Гр на 60-е сутки.

Параметры	Дозы облучения		
	Контроль	0,5Гр	1,0Гр
Vэнд	5,62±0,55	7,37±1,00	10,92± 1,19**
Vяк	9,94 ±1,15	10,08±0,83	18,12±3,04*
Vглу	8,10±0,37	8,91±0,64	14,54±0,62*
Vднф	9,22 ±0,20	9,55±1,16	13,81±2,37
СДяк	2,11± 0,27	1,63±0,32	1,65±0,17
СДглу	1,42± 0,10	1,28±0,05	1,33±0,05
СДднф	1,21±0,08	1,06±0,04	1,06±0,11

Примечание: здесь и далее: достоверность различий по отношению к контрольной группе * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$.

ного внешнего облучения в дозах 0,5 и 1,0 Гр выявлены существенные изменения показателей тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в ткани семенников животных.

Через 60 суток после однократного облучения при дозах 0,5 и 1,0 Гр достоверно возростала скорость дыхания кусочков семенников на эндогенных субстратах с 5,62±0,55 в контроле соответственно до 7,37±1,00 и 10,92± 1,19 нмоль O₂/мингмг белка что на 31,4% и 94,3 % больше, чем в контроле (табл. 1).

Сходные изменения обнаружены при использовании экзогенных субстратов сукцинита и глутамата. Так возростали обе Vяк, Vглу соответственно до 10,08±0,83 и 8,91±0,64 при дозе 0,5 Гр против 8,10±0,37 нмоль O₂/мингмг белка в контроле, что на 1,5% и 10% больше, чем в контроле. Наиболее выраженный характер изменений регистрировали с увеличением дозы облучения (1,0) Гр в присутствии этих субстратов. Так, отмечали достоверно рост скорости дыхания Vяк и Vглу до 18,12±3,04 и 14,54±0,62 нмоль O₂/мингмг белка что на 82,3% и 79,5% больше, чем в контроле, а также увеличение дыхания в семенниках в присутствии разобшителя окислительного фосфорилирования-2,4-ДНФ с 9,22 ±0,20 в контроле до 9,55±1,16 и 13,81±2,37 нмоль O₂/мингмг белка для групп облучённых животных в дозах 0,5 и 1,0 Гр, что на 3,6% и 49,8% больше, чем в контроле. Все это свидетельствует об увеличении окисления фосфорилирования в семенниках при этих условиях (табл. 1).

Снижение показателя коэффициента стимулирующего действия сукцината (СДяк) с 2,11± 0,27 в контроле соответственно до 1,63±0,32 и 1,65±0,17 в группах опытных животных, что на 22,7% и 21,8% меньше, чем в контроле, свидетельствует о возрастании роли сукцината в энергетике МХ семенников и активности СДГ, сопровождением возрастания внутримитохондриального пула сукцината в МХ облучённых семенниках.

Недостоверное снижение коэффициента (СДглу) в группах опытных животных свидетельствует об увеличении пула эндогенного глутамата в Мх ткани семенников, и может объяснить значительную роль аминокислоты глутамата как источника энергии для клеток семенников [12].

Метаболизм янтарной кислоты и глутамата в тканях се-

Таблица 2 Показатели влияния ингибиторов на ТД семенников крыс после γ -облучения в дозах 0,5 Гр и 1,0Гр на 60-е сутки.

Параметры	Контроль	0,5Гр	1,0Гр
Vэнд	5,77±0,24	7,39±0,39**	10,33±0,53*
Vам	4,15±0,22	6,57 ±0,39**	8,49 ±1,35
Vмал	2,74±0,15	5,04±0,49**	7,75 ±1,45*
АРД	0,72±0,04	0,80±0,02	0,74±0,14
МРД	0,66±0,02	0,69±0,06	0,75±0,05

менников при дозе 0,5 Гр на 60-е сутки отражает наличие внутримитохондриальных изменений этих субстратов, а также активация β – жирных кислот. Как показывают данные таблицы 2, отмечаются существенные достоверные увеличения таких параметров, как Vам и Vмал.

Результаты введения в систему специфических ингибиторов АМ и МАЛ указывают тенденцию к увеличению показателей АРД и МРД на 60-е сутки после однократного облучения при дозах 0,5 и 1,0 Гр. Так, в дозе 0,5 Гр показатель АРД и МРД возростали до 0,80±0,02 и 0,69±0,06 соответственно по сравнению с 0,72±0,04 и 0,66±0,02 в контроле, что на 11,13% и 4,6% больше, чем в контроле. Это свидетельствует также о значении изменений в системе FAD-зависимого дыхания, однако, существенный рост коэффициента МРД на этом фоне характеризует важность значения жирных кислот в энергетике семенников (табл. 1) [66,16].

Описанная метаболическая картина, характерная для 60-х суток после облучения отмечается наличием разобшения ОФ, о чем свидетельствует снижение коэффициента СД_{днф} до 1,06±0,04 для обеих групп животных против 1,21±0,08 в контроле, что на 12,4% меньше, чем в контроле.

Поскольку нарушения энергетического обмена лежат в основе патогенеза многих заболеваний, знание механизма функционирования цикла Кребса позволит врачу провести правильную коррекцию метаболических нарушений.

Таким образом, анализ полученных данных свидетельствует о высокой чувствительности митохондриального окисления ткани семенников к действию однократной дозы гамма излучения, которые проявляются в виде изменения параметров дыхания, стимуляции β -окисления жирных кислот, разобшения в системе сопряжения тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в семенниках, и являются патогенетическим обоснованием возникновения существенных нарушений морфофункционального состояния мужской репродуктивной системы при условиях внешнего облучения.

Литература

1. Грицук, А. И. Характеристика митохондрий и ультраструктура миокарда крыс в условиях продолжительной инкорпорации радионуклидов ¹³⁷Cs / А. И. Грицук [и др.] // Авиакосмическая и экол. медицина. 2002. № 4. С. 50 – 55.
2. Кондрашова, М. Н. Руководство по изучению биологического окисления полярнографическим методом / М. Н. Кондрашова, А. А. Ананенко. М., 1973. С. 106 – 119.
3. Коноля, Е. Ф. Отдаленные эффекты внешнего облучения репродуктивной системы половозрелых крыс-самцов / Е. Ф. Коноля, О. Л. Федосенко // Проблемы здоровья и экологии. 2008. № 18. С. 117 – 119.
4. Попов, Е. Г. Роль исходного состояния ткани коры надпочечников в результате действия внешнего облучения на её структурно-функциональное состояние и андроген рецепторное взаимодействие / Е. Г. Попов, Е. Ф. Коноля, Н. В. Бансцин // Радиационная биология. Радиозоология. 2005. Т. 45, № 1. С. 46 – 50.
5. Andrew, S. Effect of myxothiazol on Leydig cell steroidogenesis: inhibition of luteinizing hormone-mediated testosterone synthesis but stimulation of basal steroidogenesis / S. Andrew [et al.] // Endocrinology. 2007. Vol. 148, № 6. P. 2583 – 2590.
6. Gavazza, M. B. The effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from rat testis / M. B. Gavazza, A. Catala // Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2006. Vol. 74, № 4. P. 247 – 254.
7. Gehlot, P. Alterations in oxidative stress in testes of swiss albino Mice by aloe vera leaf extract after gamma irradiation / P. Gehlot, D. Soyai, P. K. Goyal // Pharmacologyonline. 2007. № 1. P. 359 – 370.
8. Hay-Yan, J. Direct maldi-ms analysis of cardiolipin from rat organs sections / J. Hay-Yan, [et al.] // J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 2007. Vol. 18, № 3. P. 567 – 577.
9. Huttemann, M. I. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease / M. I. Huttemann, [et al.] // J Bioenerg Biomembr. 2008. Vol. 40, № 5. P. 445 – 456.

□ Оригинальные научные публикации

10. Freund, I. Testicular function in eight patients with seminoma after unilateral orchidectomy and radiotherapy / I. Freund [et al.] // International Journal Of Andrology. 2008. Vol. 10, № 2. P. 447 – 455.

11. Ji-Sun, Parkb. Differential expression of Ptx I and II in mouse testis and their up-regulation by radiation / Ji-Sun Parkb [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002. Vol. 296, №2. P. 337 – 342.

12. Kaiser, G. R. Metabolism of amino acids by cultured rat Sertoli cells / G. R. Kaiser [et al.] // Metabolism clinical and experimental. 2005. Vol. 54, № 4. P. 515 – 521.

13. Kamischke, A. Gonadal protection from radiation by GnRH antagonist or recombinant human FSH: a controlled trial in a male nonhuman primate (*Macaca fascicularis*) / A. Kamischke [et al.] // J. Endocrinology.

2003. Vol. 179, № 2. P. 183 – 194.

14. Perl, A. Transaldolase is essential for maintenance of the mitochondrial transmembrane potential and fertility of spermatozoa / A. Perl [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. 2007. Vol. 103. P. 14813 – 14818.

15. Fedortseva, R. The special cell effects and somatic consequences of exposure to low-dose radiation, / R. Fedortseva [et al.] // Budapest, Hungary. Material., Conference. 2007. P. 29.

16. Vazquez-Memije, M. Respiratory chain complexes and membrane fatty acids composition in rat testis mitochondria throughout development and ageing / M. Vazquez-Memije [et al.] // Exp. Gerontol. Jun. 2005. Vol. 40, № 6. P. 482 – 490.

Поступила 19.07.2010 г.