

М.А. Аль Меселмани

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИНКОРПОРАЦИИ ^{137}Cs НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ МИТОХОНДРИЙ СЕМЕННИКОВ У КРЫС

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

В экспериментах полярографическим методом с использованием электрода Кларка исследовали состояние энергетического обмена в семенниках крыс при инкорпорации ^{137}Cs . Выявлены изменения скорости митохондриального дыхания во всех метаболических состояниях при окислении как эндогенных субстратов, так и экзогенных субстратов, вызывающих разобщение окислительного фосфорилирования. Это может привести к развитию стойкого низкоэнергетического состояния, по которому можно судить о дисфункции репродуктивного здоровья человека и животных.

Ключевые слова: семенники, митохондрия, окисление, инкорпорация ^{137}Cs , белые крысы.

M. A. Almeselmani

INFLUENCE INCORPORATION ^{137}Cs ON FUNCTIONS ENERGYETIC OF MITOCHODRI IN THE TESTIS OF RATS

In experiments investigated a condition of a power exchange in the testis rats by the polarographic method with the use of Clark electrode upon incorporation ^{137}Cs . Changes of speed in all metabolic conditions are revealed at oxidation, such as endogenous substrates, and exogenous substrates. Causing uncoupling of oxidative phosphorylation. Perhaps lead to development of a persistent low-energy condition which it can be possible to explain dysfunction of reproductive health of the person and animals.

Key words: testis, mitochondria, oxidation, incorporation ^{137}Cs , albino rats.

В настоящее время на загрязненных территориях проживает свыше 1,5 миллиона человек, из них большинство подвержены влиянию малых доз радиации. Из-за последствий Чернобыльской катастрофы количество заболеваний раком резко возросло в Беларуси, Украине и России.

Несмотря на то, что факт воздействия малых доз радиации неоднократно описан в литературе, до настоящего время остаются не до конца выясненными механизмы их действия на организм, и в частности, на репродуктивное здоровье человека. В Беларуси продолжается реализация государственных чернобыльских программ. Приоритетами государственной политики в области преодоления последствий катастрофы на ЧАЭС являются такие направления, как сохранение и улучшение здоровья населения, проживающего на загрязненных территориях, улучшение условий жизни, а также реабилитация пострадавших территорий.

Решение данной проблемы в определенной степени связано с улучшением демографической ситуации в Республике Беларусь, которая в настоящее время представляет потенциальную угрозу устойчивому экономическому развитию Белорусского государства и его национальной безопасности в целом. Исследования, проводимые в этом направлении, будут способствовать предотвращению развития негативных демографических процессов, стабилизации демографической ситуации и созданию предпосылок для роста населения.

В условиях сложившейся демографической ситуации в Республике Беларусь и других европейских странах становится очевидным, что проблема влияния радиации на репродуктивную систему человека является одной из важных, требующей проведения исследований в данной области медицины [3,6,8,9].

Особое внимание в этом плане привлекает получение радиационных эффектов в репродуктивной системе самцов млекопитающих, семенники которых очень чувствительны к малым дозам инкорпорации ^{137}Cs , что может привести к мутагенному повреждению сперматогенных клеток, а также оказать воздействие на надпочечный стероидогенез [3,8,14]. Некоторые авторы рассматривают семенники и процесс сперматогенеза как универсальную биологическую тест-систему, позволяющую оценивать эффекты различных видов облучения [3,8,13]. Liaginskaja A.M. с соавт. показали, что доза аккумуляции ^{137}Cs в семенниках в 2,0-3,0 раза выше средней итоговой дозы [15].

Последнее сопровождается не только торможением становления структурных и цитохимических свойств фолликулярного и сперматогенного эпителия, но и развитием в его клетках деструктивных изменений, приводящих к нарушению сперматогенеза и продукции тестостерона [9,13]. Установлено, что интерстициальные клет-

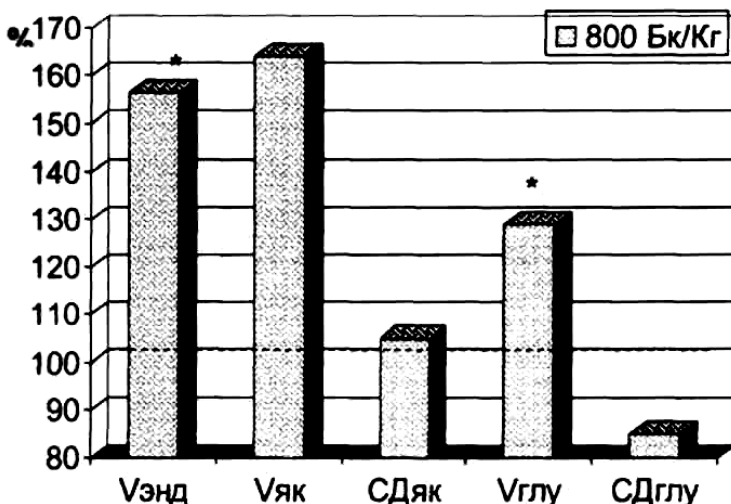


Рис. 1. Показатели митохондриального дыхания в тканях семенников при инкорпорации ^{137}Cs в количестве 800 Бк/кг

ки, суспензии более устойчивы к воздействию малых доз радиации, нежели мужские половые клетки. Последние по чувствительности к малым дозам радиации находятся в прямой зависимости от степени их дифференцировки.

По данным современных исследований цезий уменьшает уровень циркулирующего 17 – эстрадиола и увеличивает уровень кортикостероидного гормона в семенниках, кроме того, воздействие малых доз ^{137}Cs на взрослого влияет на модификацию метаболизма тестикулярных и надпочечных стероидогенов [14].

Кроме того, в семенниках отмечаются нарушения митохондриального окисления и активация окислительного стресса. Митохондрии участвуют в β -окислении жирных кислот, окислительном фосфорилировании, ЦТК, что обеспечивает клетку энергией. Этот процесс обеспечивает, соответственно, высокие уровни потребления кислорода митохондриями клеток зародышевого эпителия, что негативно отражается на сперматогенезе и гормонообразовании в семенниках [17].

Данные литературы свидетельствуют об исключительной роли тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в семенниках для обеспечения энергией процесса сперматогенеза и подвижности сперматозоидов. Однако недостаточная информация о состоянии митохондриального окисления в тканях семенников при инкорпорации малых доз ^{137}Cs , побудили нас изучить эти параметры.

В связи с этим, целью работы явилось изучение влияния инкорпорированного ^{137}Cs на состояние тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования (ТД и ОФ) семенников белых крыс.

Материал и методы

Опыты проводились на белых крысах-самцах массой 200 – 220 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)].

Животные разделили на две группы, контрольную группу, и подопытную группу, животные подопытной группы при вскармливании в течение 30 дней радиоактивного корма (сушеных белых грибов с ^{137}Cs) была сформирована подопытная группа с накоплением радионуклида в организме животных в количестве 800 Бк/Кг, контрольная группа животных находилась на стандартном рационе вивария.

Дозиметрический контроль проводился на сцинтилляционном гамма-спектрометре LP4900 В (Финляндия). После забоя животных путем декапитации, извлеченные семенники охлаждали, промывали в физиологическом растворе, освобождали от соединительной ткани и продавливали через плунжер с диаметром отверстий 0,5 мм. Затем в полученных кусочках ткани семенников исследовали параметры митохондриального окисления полярографическим методом с использованием электрода Кларка в термостатируемой ячейке объемом 2 мл при температуре 25°C [5]. Все эксперименты проводились в условиях строгого контроля температуры и времени. Количество белка в образцах ткани семенников определяли биуретовым методом, предварительно гомогенизируя их [7].

Для оценки состояния тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования (далее ТД и ОФ) определя-

ли скорость поглощения кислорода кусочками ткани семенников на эндогенных (Vэнд) и экзогенных субстратах – 5мМ сукцината (Vяк) и 5мМ глутамата (Vглу), а также разобшителя ОФ – 100 мкМ 2,4 динитрофенола (Vднф). Кроме того, применяли ингибиторный анализ, используя ингибитор I комплекса ДЦ – 1 мМ амитала натрия (Vам) и ингибитор сукцинатдегидрогеназы – 1 мМ малоната натрия (Vмал), скорость потребления кислорода кусочками ткани семенников измеряли в нмоль O₂/мин/мг белка препаратах [5].

Наряду с этим, рассчитывали величину стимулирующего действия янтарной кислоты СДяк = Vяк/Vэнд, глутамата СДглу = Vглу/Vэнд, и 2,4-динитрофенола СДднф = Vднф/Vглу, а также показатели амиталрезистентного дыхания (АРД = Vам/Vэнд) и малонатрезистентного дыхания (МРД = Vмал/Vам), характеризующие соответственно интенсивность окисления флавопротеидзависимых субстратов и вклад жирных кислот в энергетику исследуемой ткани. Перечисленные выше-параметры ТД и ОФ позволяют достаточно полно охарактеризовать состояние энергетического обмена ткани [2].

Результаты обрабатывали программой Statistica 5.0.

Результаты и обсуждение

Как следует из данных, приведенных в табл.1, ткань семенников белых крыс отличалась высоким уровнем дыхательной активности митохондрий и высокой чувствительностью к воздействию инкорпорации ^{137}Cs (табл.1), которая сравнима с таковой для миокарда, печени и селезенки [1,2,4].

При условиях инкорпорации ^{137}Cs с уровнем накоплением ^{137}Cs в количестве 800 Бк/Кг наблюдали достоверное увеличение скорости дыхания кусочков семенников на эндогенных субстратах до $4,85 \pm 0,07$ нмоль O₂/мин/мг против $3,10 \pm 0,18$ нмоль O₂/мин/мг белка в контроле, что на 56,5% больше, чем в контроле. Митохондриальное дыхание тканей семенников животных, получавших радионуклид ^{137}Cs , было более активировано на экзогенных субстратах – сукцината и глутамата. Так, в этих условиях происходило достоверное увеличение скорости дыхания митохондрий при использовании сукцината до $9,64 \pm 0,12$, глутамата – до $6,38 \pm 0,71$ нмоль O₂/мин/мг белка соответственно против $5,88 \pm 0,35$ и $4,95 \pm 0,26$ нмоль O₂/мин/мг белка в контроле, что на 64 % и 29 % больше, чем в контроле (табл.1, рис.1).

Описанная метаболическая картина характеризуется разобщением ОФ в митохондриях семенников, что подтверждается достоверным снижением коэффициента СДднф с $1,21 \pm 0,01$ до $1,02 \pm 0,02$, что на 15,7% меньше, чем в контроле. Разобщение окислительного фосфорилирования, по-видимому, выступает свободные жирные кислоты, образующиеся при липолизе триацилглицеридов и фосфолипидов [11], а также может быть обусловлено повреждением внутренних мембран митохондрий [11,12].

Следствием этого могло явиться увеличение внутримитохондриального пула субстрата, в частности, глутамата. Это подтверждается снижением коэффициента СДглу с $1,56 \pm 0,07$ в контроле до $1,33 \pm 0,05$ (на 14,8%

□ Оригинальные научные публикации

Таблица.1 Показатели тканевого дыхания ткани семенников при инкорпорации ^{137}Cs в количестве 800 Бк/Кг (n=6+8)

Параметры	Тканевое дыхание нмоль O_2 /минмг белка	
	Контроль	Уровень инкорпорации 800 Бк/Кг
V_{max}	3.10±0.18	4.85±0.07*
V_{min}	5.88±0.35	9.64±0.12**
$V_{\text{ср}}$	4.95 ±0,26	6.38±0,71
$V_{\text{ср}}$	5,98 ±0,32	6,49±0,71
$\text{CD}_{\text{ср}}$	1,91± 0,08	1,99±0,01
$\text{CD}_{\text{ср}}$	1,56±0,07	1,33±0,05*
$\text{CD}_{\text{ср}}$	1,21±0,01	1,02±0,02*

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

ниже контрольных значений) в подопытной группе животных (табл.1). Повышение коэффициента действия сукцината $\text{CD}_{\text{ср}}$ с $1,91 \pm 0,08$ в контроле до $1,99 \pm 0,01$ у подопытной группы животных может быть связано, по мнению авторов с снижением внутримитохондриального пула субстрата сукцината [10].

Очевидно, что в группе животных при данном уровне инкорпорации радионуклида, в результате ингибиторного анализа с введением в систему специфических ингибиторов амитала натрия (АМ) и малоната натрия (МАЛ) позволили выявить увеличение скорости дыхания ткани семенников при окислении амиталом. Так, отмечается увеличение $V_{\text{ам}}$ с $2,71 \pm 0,23$ нмоль O_2 /минмг белка в контроле до $3,41 \pm 0,23$ нмоль O_2 /минмг белка, что на 25,9 % больше, чем в контроле (табл. 2).

В то же время, при этих условиях наблюдалось достоверное снижение амиталрезистентного дыхания (АРД) до $0,69 \pm 0,04$ против $0,81 \pm 0,01$ в контроле, что на 14,8% меньше, чем в контроле. Выявлено также достоверное снижение коэффициента малонатрезистентного дыхания до $0,58 \pm 0,03$ против $0,76 \pm 0,03$ в контроле, что на 23,7% меньше, чем в контроле. Это свидетельствует о снижении влияния жирных кислот в тканях семенников инкорпорированных животных (табл. 2).

Резюмируя вышесказанное, можно отметить, что изменения дыхательной активности в митохондриях тканей семенников при поступлении радионуклида в организм и инкорпорации в дозе 800 Бк/Кг сопровождаются выраженным разобщением ОФ. Об этом свидетельствуют результаты проб ТД и ОФ, полученные с ис-

Таблица. 2 Показатели влияния ингибиторов на ТД в семенниках крыс при инкорпорации ^{137}Cs в количестве 800 Бк/кг (n=6+8)

Параметры	Тканевое дыхание нМ O_2 / мин.мг	
	Контроль	Уровень инкорпорации 800 Бк/Кг
$V_{\text{ма}}$	3,25±0,22	4,95± 0,09*
$V_{\text{ам}}$	2,71±0,28	3,41±0,23*
$V_{\text{ма}}$	1,99±0,12	2,01±0,20
АРД	0,81±0,01	0,69±0,04*
МРД	0,76±0,03	0,58±0,03*

пользованием разобщителя 2,4 ДНФ (табл.1).

Полученные данные позволяют предположить о повреждении в дыхательной цепи и мембранах митохондрий, а также отражают снижение резервов жирных кислот в мембранах митохондрий тканей семенников вследствие воздействия инкорпорации ^{137}Cs [12,16].

Принимая во внимание важную роль ЖК в энергообеспечении активно функционирующих тканей семенников [16], отметим, что такое снижение может сопровождаться значительным спадом эффективности энергетического обмена.

Представленные данные свидетельствуют об активизации скорости дыхания в митохондриях семенников. В частности при окислении в присутствии эндогенных и экзогенных субстратов, существенно разобщается окислительное фосфорилирование. Выявленная активация дыхания в митохондриях семенников крыс, инкорпорированных ^{137}Cs , на наш взгляд может быть связана с диссипативным, неэкономным типом энергии, который проявляется в виде резкой стимуляции дыхательной активности тканей семенников.

Наши данные находятся в соответствии с данными, указывающими на очень высокую чувствительность семенников к окислительному стрессу, вызываемому действием вредных и экологических факторов [3,6,8].

Таким образом, исследования показали, что система митохондриального окисления семенников животных отличается высокой чувствительностью к действию внутреннего облучения, вызванного инкорпорацией основного дозообразующего радионуклида «постчернобыльского» пространства – ^{137}Cs , что хорошо согласуется с представлениями о высокой радиочувствительности семенников к действию малых доз радиации. Полученные результаты позволяют сделать заключение, о том что введение радионуклида ^{137}Cs приводит к активации дыхания при всех метаболических состояниях, а также к изменениям функционирования митохондрий семенников. Кроме того, получен результат, свидетельствующий о том, что митохондрии тканей семенников обладают высокой чувствительностью к действию внутреннего облучения, вызванного инкорпорацией основного дозообразующего радионуклида «постчернобыльского» пространства – ^{137}Cs , что, в конечном итоге, может привести к развитию стойкого низкоэнергетического состояния и формированию дисфункции репродуктивного здоровья человека и животных.

Литература

- Альжабар, А. Митохондриальное окисление селезенки крыс в условиях инкорпорации ^{137}Cs / А. Абдулкадер // Проблемы здоровья и экологии. 2007. № 14. С. 145 – 149.
- Грицук, А. И. Митохондриальное окисление и ультраструктура миокарда при инкорпорации радионуклидов цезия / Т. Г. Матюхина (и др.) // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2002. № 2. С. 40 – 44.
- Карпенко, Н. А. Сексуальная функция самцов крыс, подвергнутых действию комплекса факторов зоны отчуждения ЧАЭС / Н. А. Карпенко / Радиационная биология. Радиозондология. 2000. Т. 40. № 1. С. 86 – 91.
- Коваль, А. Н. Тканевое дыхание печени крыс при облучении в сверхмалых дозах инкорпорированными радионуклидами цезия / А. Н. Коваль, С. М. Сергеев, А. И. Грицук // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2002. № 5. С. 60 – 62.
- Кондрашова, М. Н. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / М. Н. Кондрашова, А. А. Анащенко. М., 1973. С. 106 – 119.
- Конюля, Е. Ф. Отдаленные эффекты внешнего облучения репродуктивной системы половозрелых крыс-самцов / Е. Ф. Конюля, О. Л. Федосенко // Проблемы здоровья и экологии. 2008. № 18. С. 117 – 119.
- Кочетков, Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетков. М., 1980. 220 с.

Оригинальные научные публикации □

8. Мамина, В. П. Оценка цитофизиологического состояния семенников мелких млекопитающих, обитающих в условиях повышенного радиационного фона / В. П. Мамина // Радиц. биология. Радиозкология. 2005. Т. 45, № 1. С. 91 – 95.
9. Попов, Е. Г. Рецепция андрогенов в семенниках крыс: анализ эффектов инкорпорированных ^{137}Cs , L1 и внешнего облучения / Е. Г. Попов, Ф. И. Куц, О. Л. Белоусов // Вестн. НАН Беларуси Сер. биол. наук. 2001. № 2. С. 95 – 99.
10. Саакян, И. Р. Участие митохондрий печени в адапционных реакциях организма при пересадке сердца у крыс / И. Р. Саакян // Вопросы медицинской химии. М., 1981. Т. 27 (6). С. 755 – 759.
11. Branka, D. Does occupational exposure to low-dose ionizing radiation induce cell membrane damage / D. Branka, S. Vesna // Arch. Oncol. 2004. Vol. 12, № 4, P. 197 – 199.
12. Grace, J. Mitochondrial dysfunction, persistently elevated levels of reactive oxygen species and radiation-induced genomic instability / J. Grace, Kim Krish Chandrasekaran and William F. Morgan // Mutagenesis. 2006. № 6. P. 361 – 367.
13. Grafstro, M. G. Rat testis as a radiobiological in vivo model for radionuclides. Radiation protection / M. G. Grafstro [et al.] // Dosimetry. 2006. Vol. 118, № 1. P. 32 – 42.
14. Grignard, E. In vivo effects of chronic contamination with ^{137}Cs on testicular and adrenal steroidogenesis / E. Grignard [et al.] // Arch Toxicol. 2008. Vol. 82, № 9, P. 583 – 589.
15. Liaginskaia, A. M. Kinetics of metabolism and mechanisms of formation of absorbed doses in the mouse testis from incorporated ^{137}Cs / A. M. Liaginskaia, V. A. Osipov, S. I. Dement'ev // Radiats Biol Radioecol. 1998. Vol. 38, № 1. P. 27 – 30.
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.
17. Wai-Nang, P. L. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization / Paul Lee Wai-Nang [et al.] // FEBS Lett. 2003. Vol. 554, № 3. P. 342 – 346.

Поступила 24.06.2010 г.