

## ТКАНЕВОЕ ДЫХАНИЕ В СЕМЕННИКАХ КРЫС ПОСЛЕ ИНКОРПОРАЦИИ РАДИАКТИВНОГО $Cs^{137}$

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

*В экспериментах полярографическим методом с использованием электрода Кларка исследовали состояние энергетического обмена в семенниках крыс при инкорпорации  $Cs^{137}$ . Выявлена активация тканевого дыхания в присутствии эндогенных и экзогенных субстратов, но вызывало разобщение окисления и фосфорилирования. Также выявлено заметное снижение роли жирных кислот в энергетическом обмене тканей семенников.*

**Ключевые слова:** семенники, инкорпорации  $Cs^{137}$ , тканевое дыхание, белые крысы.

Al Meselmany M.A.

## TISSUE RESPIRATION OF TESTIS AFTER INCORPORATION $Cs^{137}$

*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  $Cs^{137}$ , shows activation of tissue respiration in addition of endogenous and exogenous substrates. with uncoupling of oxidative phosphorylation reactions, and decrease role of fatty acids in energy of testicular tissue.*

**Key words:** testis, incorporation  $Cs^{137}$ , tissue respiration, albino rats.

Данные литературы свидетельствует о том, что проблема изучения воздействия влияния инкорпорации  $^{137}Cs$  на мужскую репродуктивную систему является актуальной [4,6].

Отмечено, что сексуальная активность животных и людей, приживающих в загрязненной радиацией зоне, заметно снижается. Были проведены исследования изменений биохимических механизмов развития олигозооспермии у мужчин под действием малых доз длительного радиационного излучения вследствие аварии на ЧАЭС [7].

Некоторые авторы рассматривают семенники и процесс сперматогенеза как универсальную биологическую тест-систему, позволяющую оценивать воздействие различных видов облучения. В ходе этих опытов отмечено, что показателем выраженности радиационного поражения организма могут служить изменения морфофункционального состояния репродуктивной системы [4,6].

Исследования влияния на семенники  $^{137}Cs$  после его инкорпорации занимают в радиологии важное место.

Результаты исследований показали, что гонады очень чувствительны даже к незначительному уровню инкорпорации  $^{137}Cs$ . В зависимости от места накопления радионуклида возможно мутагенное повреждение сперматогенных клеток. Также является доказанным влияние такого рода воздействий на надпочечный стероидогенез [8]. А.М. Лягинская с соавт. (1998) и А.И. Лисенко с соавт. (2000) показали, что инкорпорация низких уровней  $^{137}Cs$  приводит к максимальному накоплению цезия в тестикулярной ткани. Материалы по изучению воздействия на семенники крыс-самцов при хронической инкорпорации  $^{137}Cs$  в малых количествах свидетельствуют о возникновении морфофункциональных нарушений в семенниках, тестикулярной гормональной модификации и снижении фертильности [8]. Важно отметить особую роль митохондрий в обеспечении здоровья клеток, тканей и органов. Имеются убедительные доводы в пользу мнения, что митохондриальная дисфункция лежит в основе большинства болезней человека [9,10].

Исходя из представленных сведений можно заключить, что к настоящему моменту нежелательные эф-

факты радиационного воздействия на организм в целом и семенники в частности изучены широко. Тем не менее, каких-либо убедительных данных о негативных последствиях влияния малых доз радиоактивного излучения на семенники и особенностях течения процессов митохондриального окисления в сперматоцитах после такого воздействия в литературе не обнаруживается. Митохондриальный компартмент клетки, как в данных литературе, обладает чрезвычайно высокой чувствительностью к проникающей радиации. С учётом того, что в семенниках процессы митохондриального окисления идут особенно интенсивно, имеются все основания предполагать возможность повреждения гонад даже в случае воздействия на организм малых доз радиоактивного излучения.

**Целью настоящего исследования** явилось изучение состояния тканевого дыхания семенников крыс в условиях инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$ .

#### Материалы и методы

Опыты проводились на 16 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)].

экспериментальных животных разделили на две группы по 8 животных, контрольную и подопытную группу. Животных подопытной группы при вскармливании в течение 30 дней радиоактивного корма (сушеных белых грибов с  $^{137}\text{Cs}$ ). Была сформирована подопытная группа с уровнем накопления  $^{137}\text{Cs}$  1300 Бк/Кг, контрольная группа животных находилась на стандартном рационе вивария.

Дозиметрический контроль проводился на сцинтиляционном гамма-спектрометре LP4900 В (Финляндия) еженедельно, что позволило оценивать динамику накопления радионуклидов. Оценку поглощённых доз рассчитывали по содержанию  $^{137}\text{Cs}$  в тушках крыс. 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 [3]. Все эксперименты проводились в условиях строгого контроля температуры и времени. Количество белка в образцах ткани семенников определяли биуретовым методом, предварительно гомогенизируя их [5].

Для оценки состояния тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования (далее ТД и ОФ) определяли скорость поглощения кислорода кусочками ткани семенников на эндогенных (Вэнд) и экзогенных субстратах – 5мМ сукцината (Вяк) и 5мМ глутамата (Вглу), а также разобшителя ОФ – 100 мкМ 2,4 динитрофенола (Вднф). 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 O<sub>2</sub>/минхмг белка препаратах [1].

Наряду с этим, рассчитывали величину стимулирующего действия янтарной кислоты СДяк = Вяк/Вэнд, глутамата СДглу = Вглу/Вэнд, и 2,4-динитрофенола СДднф = Вднф/Вглу, а также показатели амиталрезистентного дыхания (АРД = Vам/ Вэнд) 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 [1]. Кусочки тканей, как и тканевые срезы, наиболее предпочтительны для такого рода исследований, т.к. как содержат эндогенные субстраты, АДФ и фосфат в достаточном количестве для обеспечения высокой дыхательной активности митохондрий. Более того, сохранение микроархитектуры, свойственной для кусочков ткани, имеющих минимальные повреждения, является важным условием для объективной оценки состояния энергетического обмена в исследуемой ткани. Эти обстоятельства дают основания для обоснованной интерполяции полученных результатов к условиям существования ткани *in vivo* [1].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программ Statistica 5.0, SigmaPlot-11, с определением средних значений, стандартной ошибки, максимальных и минимальных значений.

#### Результаты и обсуждение

Данные, представленные в таблице 1, свидетельствуют о высокой чувствительности митохондриального окисления ткани семенников белых крыс к действию инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$ , и свидетельствуют о высокой дыхательной активности ткани семенников при этом уровне накопления. Достоверно прирост скорости дыхания ткани семенников при использовании обоих эндогенных и экзогенных субстратов для подопытной группы животных с уровнем накопления в количестве 1300 Бк/кг (табл.1,рис.1). наблюдается достоверное возрастание эндогенного дыхания на 80,3% до 5,59±0,57 нмоль O<sub>2</sub>/минхмг белка против 3,10±0,18 нмоль O<sub>2</sub>/минхмг белка в контроле. Сходная направленность изменений выявлена и при использовании экзогенных субстратов – сукцината и глутамата: наблюдается повышение скорости дыхания на 43,7% при использовании сукцината (8,45±0,78 нмоль O<sub>2</sub>/минхмг белка для животных при уровне накопления в количестве 1300 Бк/кг против 5,88 ±0,35 нмоль O<sub>2</sub>/минхмг белка в контроле)(табл.1,рис.1).

**Таблица 1** – Показатели тканевого дыхания ткани семенников при уровне инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  в количестве 1300 Бк/кг (n=6÷8)

Параметры	Тканевое дыхание нМ O <sub>2</sub> / мин.мг	
	Контроль	Уровень инкорпорации 1300 Бк/Кг
Вэнд	3,10±0,18	5,59±0,57*
Вяк	5,88±0,35	8,45±0,78*
Вглу	4,95 ±0,26	8,07±0,26*
Вднф	5,98 ±0,32	8,36±0,25**
СДяк	1,91± 0,08	1,52±0,03*
СДглу	1,56±0,07	1,67±0,02
СДднф	1,21±0,01	1,04±0,01

Следовательно, можно отметить увеличение значе- ния янтарной кислоты в энергетике ткани семенников и повышение активности сукцинатдегидрогеназы за счет относительного роста внутримитохондриального пула сукцината. В пользу этого предположения свиде- тельствует также достоверное снижение коэффициента стимулирующего действия сукцината на 20,4% с  $1,91 \pm 0,08$  в контроле до  $1,52 \pm 0,03$  в группе эксперимен- тальных животных (табл.1). что говорит о повышении концентрации янтарной кислоты в митохондриях.

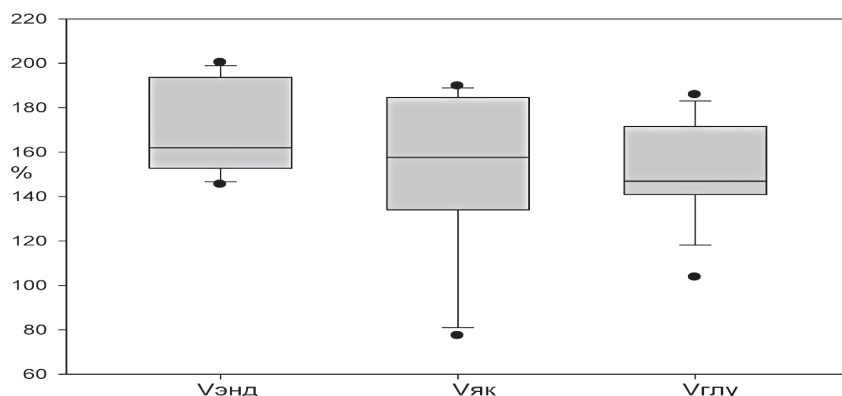


Рисунок 1 – Показатели ТД (Vэнд, Vяк и Vглу) в семенниках в % при уровне инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  в количестве 1300 Бк/кг

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

└ -Минимум и максимум, □ -Границы интерквартильного размаха.

Дыхательная активность в семенниках в присут- ствии глутамата также активировалась – достовер- но увеличивался показатель Vглу с  $4,95 \pm 0,26$  нмоль  $\text{O}_2/\text{мин}\cdot\text{мг}$  белка в контроле до  $8,07 \pm 0,26$  нмоль  $\text{O}_2/\text{мин}\cdot\text{мг}$  белка в группе подопытных животных (табл.1), а также наблюдалась тенденция к росту ско- рости дыхания в присутствии разобщителя окисли- тельного фосфорилирования – 2,4 ДНФ с  $5,98 \pm 0,32$  в контроле до  $8,36 \pm 0,25$  нмоль  $\text{O}_2/\text{мин}\cdot\text{мг}$  белка для подопытной группы при данном воздействии. Возмож- но, увеличение коэффициента стимулирующего дей- ствия глутамата с  $1,56 \pm 0,07$  в контроле до  $1,67 \pm 0,02$  в группе животных при уровне инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  в количестве 1300 Бк/кг может отражать снижение эндогенного пула глутамата в матриксе митохондрий клеток семенников, о чем свидетельствует значитель- ное увеличение скорости его окисления (Vглу) (табл.1, рис.1). Данные анализа степени сопряженности процессов окисления и фосфорилирования в митохон- дриях семенников при поступлении в организм  $^{137}\text{Cs}$  в количестве 1300 Бк/кг показали, что после добав- ления в среду инкубации 2,4-ДНФ наблюдалось уси- ление дыхательной активности митохондрий в семен- никах животных. В этой группе крыс Vднф достоверна увеличивался на 39,7% с  $5,98 \pm 0,32$  нмоль  $\text{O}_2/\text{мин}\cdot\text{мг}$  белка в контроле до  $8,36 \pm 0,25$  нмоль  $\text{O}_2/\text{мин}\cdot\text{мг}$  белка в группе подопытных животных (табл.1). Следует от- метить, что, анализируя изменение показателя Сднф, наблюдается отчётливая тенденция к его понижению с  $1,21 \pm 0,01$  (в контроле) до  $1,04 \pm 0,01$  (-14,1%) в группе экспериментальных животных (табл.1), что указывает на появление лабильности в процессах сопряжения окисления и фосфорилирования в митохондриях кле-

ток семенников. Следует отметить, что увеличение пула янтарной кислоты субстрата окисления в прин- ципе предполагает в условиях инкорпорации радиону- клидов  $^{137}\text{Cs}$  увеличение энергетического и пластиче- ского потенциала клетки, что вполне может выступать в качестве процесса быстрой адаптации [2]. Также имеются сведения, что увеличение дыхательной ак- тивности клетки в присутствии сукцината (показатель Vяк) может быть связано с активацией мембранного транспорта янтарной кислоты.

Последнее весьма ве- роятно, т.к. окисление сукцината в митохондриях тканей семенников, как известно, происходит в сочета- нии с активацией процессов вос- становления компонентов дыха- тельной цепи.

В таблице 2 приведена данные ингибиторного анализа при введе- нии амитала и малоната. Последу- ющий анализ продемонстрировал формирование тенденций к сниже- нию показателей АРД и МРД на фоне достоверного усиления показателя Vам, который увеличивался почти на 60%. Отмечается снижение (АРД) с  $0,81 \pm 0,01$  в контроле до  $0,76 \pm 0,04$  (-6,2%) и МРД с  $0,76 \pm 0,03$  до  $0,64 \pm 0,07$  (-15,8%) соответственно для группы животных при поступле- нии и накоплении в организме  $^{137}\text{Cs}$  в количестве (1300 Бк/Кг) (табл. 2, рис. 2). Полученные данные позво-

лили предположить, что в сложившейся метаболической ситуации доля участия в энергетическом обмене жирных кислот начинала снижаться табл. 2, рис. 2).

В указанных условиях эксперимента снижение коэф- фициента стимулирующего действия сукцината (СДяк) на 20,4% после инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  в количестве 1300 Бк/кг (табл.1) наряду с результатами ингибиторного анализа свидетельствовало об увеличении внутримитохондриального пула сукцината и повышении его роли в энергетике клеток семенников.

Таблица. 2 Показатели влияния ингибиторов на ТД в семенниках крыс при уровне инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  в количестве 1300 Бк/кг (n=6÷8).

Параметры	Тканевое дыхание нМ $\text{O}_2/\text{мин}\cdot\text{мг}$	
	Контроль	Уровень инкорпора- ции 1300 Бк/Кг
Vэнд	$3,25 \pm 0,22$	$5,71 \pm 0,11^*$
Vам	$2,71 \pm 0,28$	$4,33 \pm 0,26^*$
Vмал	$1,99 \pm 0,12$	$2,73 \pm 0,29$
АРД	$0,81 \pm 0,01$	$0,76 \pm 0,04$
МРД	$0,76 \pm 0,03$	$0,64 \pm 0,07$

Полученные данные, в целом, подтвердили сведения о высокой чувствительности системы тканевого дыха- ния и окислительного фосфорилирования семенников к воздействию  $^{137}\text{Cs}$  даже при уровне инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  в количестве 1300 Бк/кг. Это нашло подтверждение в показателях интенсивности дыхания митохондрий как на эндогенных, так и на экзогенных субстратах. Мож- но предположить наличие повреждений в дыхательной

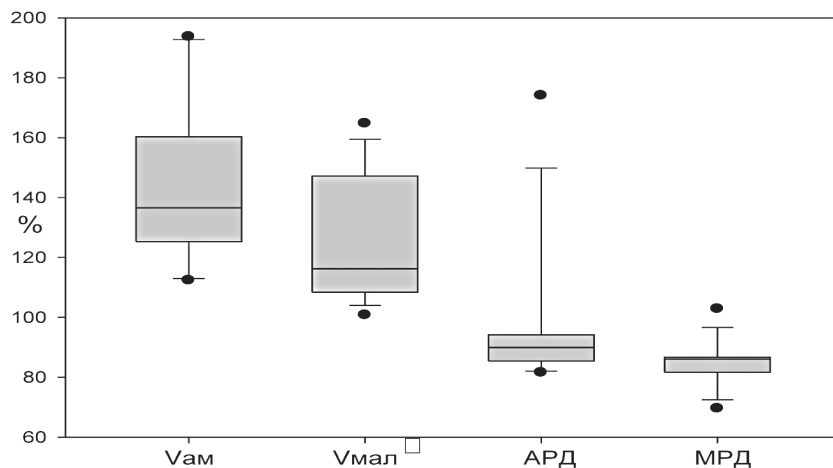


Рисунок 2 – Влияние ингибиторов на ТД (показатели Vam и Vmal) в семенниках в % при уровне инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  в количестве 1300 Бк/кг

цепи и мембранах митохондрий и отражают понижение резервов жирных кислот в мембранах митохондрий ткани семенников, как следствие инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  метаболической ситуации, складывающейся в этих условиях, что указывает на снижение роли жирных кислот в тканях семенников при данном воздействии. Увеличение скорости окисления в митохондриях можно расценивать как следствие повышение активности ферментов дыхательной цепи [9,10]. Понижение СДДНФ свидетельствует об уменьшении резервных возможностей дыхательной цепи митохондрий, а выраженное нарушение процессов сопряжения позволяет предположить наличие повреждений в дыхательной цепи и мембранах митохондрий.

Установлено, что стимулирующий эффект инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  практически прекращается и возникают признаки её повреждающего влияния на энергетику клеток семенников, что подтверждается снижением чувствительности митохондрий к присутствию экзогенных субстратов (сукцината и глутамата), а также появлением признаков разобщения между процессами окисления и фосфорилирования.

Данные о стимуляции дыхательной активности в тканях семенников соответствуют результатам, свидетельствующим об увеличении дыхательной активности миокарда и печени, при малых дозах инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  [1]. Биохимические изменения, обусловленные дефектами митохондрий, проявляются нарушением транспорта митохондриальных субстратов, патологией утилизации субстратов, дефектами дыхательной цепи и недостаточным накоплением и передачей энергии [9,10]. Наши данные находятся в соответствии с данными, указывающими на очень высокую чувствительность семенников к окислительному стрессу, вызванному действием вредных и экологических факторов [2,4,6]. С учетом этого, отметим, что нарушения митохондриального окислительного фосфорилирования, вызванного внутренним облучением, может являться ведущим фактором в патогенезе пострадиационного бесплодия людей и животных, переживших кратковременное воздействие малых доз проникающей радиации в результате аварий или по причине проживания в непосредственной близости к объектам и предприятиям, относящимся к категории радиоопасных [4,6].

## Выводы

Система тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования семенников крыс обладает высокой чувствительностью к действию инкорпорированного  $^{137}\text{Cs}$ .

В семенниках при уровне инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  в количестве 1300 Бк/кг выявлена активация тканевого дыхания в присутствии эндогенных и экзогенных субстратов. Эта активация протекает с признаками разобщения процессов окисления и фосфорилирования (согласно динамике изменения коэффициента СДДНФ).

В тканях семенников опытных крыс было выявлено заметное снижение роли жирных кислот в энергетическом обмене (согласно динамике уменьшения АРД и МРД).

## Литература

1. Грицук, А. И. Митохондриальное окисление и ультраструктура миокарда при инкорпорации радионуклидов цезия / Т. Г. Матюхина, А. Н. Коваль, и др. // *Авиакосмическая и экологическая медицина*. – 2002. – № 2. – С. 40–44.
2. Евсеев, А.В. Гипоксия и антиоксиданты / А.В. Евсеев // *Метаболические корректоры гипоксии* / П.А. Шабанов [и др.]; под. ред. А.Б. Белевитина. – СПб., 2010. – С. 347–456.
3. Кондрашова М.Н., Ананенко А.А. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. – М., 1973. – С. 106–119.
4. Конопля, Е.Ф. Состояние репродуктивной системы и печени крыс-самцов и их потомства после фракционированного облучения в малой дозе // *Радиационная биология. Радиоэкология*. – 2003. – Т.43, №2. – С. 221–222.
5. Кочетков, Г.А. Практическое руководство по энзимологии. – М. – 1980. – 220 с.
6. Попов, Е.Г. Рецепция андрогенов в семенниках крыс: анализ эффектов инкорпорированных  $^{137}\text{Cs}$ , Li и внешнего облучения / Е.Г. Попов Ф.И., Куц, О.Л. Белюсов // *Вестні НАН Беларусь / Сер. біял. навук.* – 2001. – №2. – С.95–99.
7. Трифонова, Ю.П. Диагностика и коррекция нарушения мужской фертильности в зависимости от состояния вильнорадикальных процессов: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.01.06 / Ю.П. Трифонова; Ин-т урологии АМН Украины. – Киев, 2005. – 18 с.
8. Grignard, E. In vivo effects of chronic contamination with  $^{137}\text{cesium}$  on testicular and adrenal steroidogenesis / Elise Grignard [et.al] // *Arch Toxicol.* – 2008. – Vol.82, №9. – P.583–589.
9. Hüttemann, M. I. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease / M. I. Hüttemann [et.al] // *J Bioenerg Biomembr.* – 2008. – Vol.40, №5. – P.445–456.
10. 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 20.06.2013 г.