

*Аль Меселмани. М.А.*

## **Воздействие инкорпорации $^{137}\text{Cs}$ на энергетические функции митохондрий семенников у крыс**

*Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»*

*г. Гомель, Республика Беларусь*

**Резюме:** В экспериментах полярографическим методом с использованием электрода Кларка исследовали состояние энергетического обмена в семенниках крыс при инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$ . 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, инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$ , белые крысы.

### **Введение:**

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  $^{137}\text{Cs}$ , 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]. Liaginskaia A.M. с соавт. показали, что доза аккумуляции  $^{137}\text{Cs}$  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 клетки, sustentocytes 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  $17\beta$ -эстрадиола и увеличивает уровень кортикостероидного гормона в семенниках, кроме того, воздействие малых доз  $^{137}\text{Cs}$  на взрослого влияет на модификацию метаболизма тестикулярных и надпочечных стероидогенезов [14].

Кроме того, в семенниках отмечаются нарушения митохондриального окисления и активация окислительного стресса. Митохондрии участвуют в  $\beta$ -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  $^{137}\text{Cs}$ , побудили нас изучить эти параметры.

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

#### Материалы 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  $^{137}\text{Cs}$ ) 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  $25\text{C}^\circ$  [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) определяли скорость поглощения кислорода кусочками ткани семенников на эндогенных ( $V_{\text{энд}}$ ) и экзогенных субстратах – 5мМ сукцината ( $V_{\text{як}}$ ) и 5мМ глутамата ( $V_{\text{глу}}$ ), а также разобщителя ОФ – 100 мкМ 2,4 динитрофенола ( $V_{\text{днф}}$ ). Кроме того, применяли ингибиторный анализ, используя ингибитор I комплекса ДЦ–1 мМ амитала натрия ( $V_{\text{ам}}$ ) и ингибитор сукцинатдегидрогеназы–1 мМ малоната натрия ( $V_{\text{мал}}$ ), скорость потребления кислорода кусочками ткани семенников измеряли в мг белка препаратах [5].  $\times \text{нмоль } \text{O}_2 / \text{мин}$

Наряду с этим, рассчитывали величину стимулирующего действия янтарной кислоты  $\text{СДяк} = V_{\text{як}} / V_{\text{энд}}$ , глутамата  $\text{СДглу} = V_{\text{глу}} / V_{\text{энд}}$ , и 2,4-динитрофенола  $\text{СДднф} = V_{\text{днф}} / V_{\text{глу}}$ , а также показатели амиталрезистентного дыхания ( $\text{АРД} = V_{\text{ам}} / V_{\text{энд}}$ ) и малонатрезистентного дыхания ( $\text{МРД} = V_{\text{мал}} / V_{\text{ам}}$ ), 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  $^{137}\text{Cs}$  (табл.1), которая сравнима с таковой для миокарда, печени и селезенки [1,2,4]

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

Параметры	Тканевое дыхание нмоль $\text{O}_2/\text{мин}\times\text{мг}$ белка	
	Контроль	Уровень инкорпорации 800 Бк/Кг
$V_{\text{энд}}$	$3,10\pm 0,18$	$4,85\pm 0,07^*$
$V_{\text{эк}}$	$5,88\pm 0,35$	$9,64\pm 0,12^{**}$
$V_{\text{глу}}$	$4,95 \pm 0,26$	$6,38\pm 0,71$
$V_{\text{диф}}$	$5,98 \pm 0,32$	$6,49\pm 0,71$
$\text{СД}_{\text{эк}}$	$1,91\pm 0,08$	$1,99\pm 0,01$
$\text{СД}_{\text{глу}}$	$1,56\pm 0,07$	$1,33\pm 0,05^*$
$\text{СД}_{\text{диф}}$	$1,21\pm 0,01$	$1,02\pm 0,02^*$

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

При условиях инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  с уровнем накоплением  $^{137}\text{Cs}$  в количестве 800 Бк/Кг наблюдали достоверное увеличение скорости дыхания кусочков семенников на эндогенных субстратах до  $4,85\pm 0,07$  нмоль  $\text{O}_2/\text{мин}/\text{мг}$  против  $3,10\pm 0,18$  нмоль мг белка в контроле, что на 56,5% больше, чем в контроле.  $\times\text{O}_2/\text{мин}$  Митохондриальное дыхание тканей семенников животных, получавших радионуклид  $^{137}\text{Cs}$ , 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  $6,38\pm 0,71$  мг белка соответственно против  $5,88\pm 0,35$  и  $4,95 \pm 0,26$  нмоль $\times$ нмоль  $\text{O}_2/\text{мин}$  мг белка в контроле, что на 64 % и 29 % больше, чем в контроле (табл.1,  $\times\text{O}_2/\text{мин}$  рис.1).

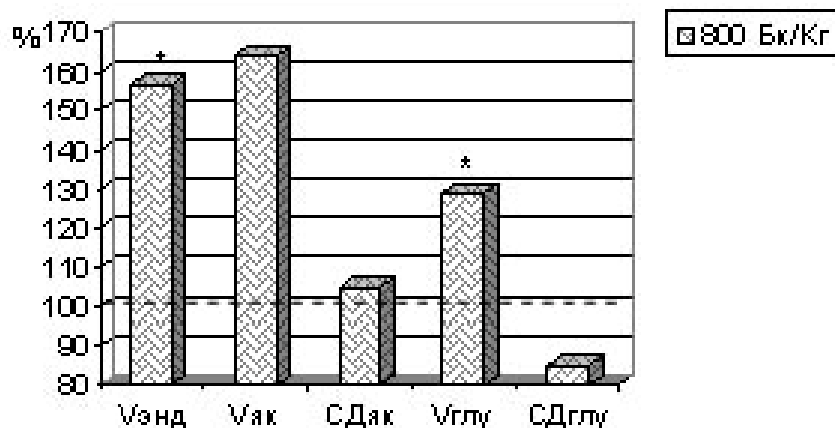


Рис. 1. Показатели митохондриального дыхания в тканях семенников при инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  в количестве 800 Бк/кг

Описанная метаболическая картина характеризуется разобшением ОФ в митохондриях семенников, что подтверждается достоверным снижением коэффициента СДнф с  $1,21 \pm 0,01$  до  $1,02 \pm 0,02$ , что на 15,7% меньше, чем в контроле. Разобшение окислительного фосфорилирования, по-видимому, выступают 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% ниже контрольных значений) в подопытной группе животных (табл.1). Повышение коэффициента действия сукцината СДяк 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, мг белка в контроле дохотмечается увеличение  $V_{ам}$  с  $2,71 \pm 0,28$ , нмоль  $\text{O}_2$ /мин мг белка, что на 25,9 % больше, чем в контроле (табл.× $3,41 \pm 0,23$  нмоль  $\text{O}_2$ /мин 2).

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

Параметры	Тканевое дыхание нМ $\text{O}_2$ / мин.мг	
	Контроль	Уровень инкорпорации 800 Бк/Кг
$V_{энд}$	$3,25 \pm 0,22$	$4,95 \pm 0,09^*$
$V_{ам}$	$2,71 \pm 0,28$	$3,41 \pm 0,23^*$
$V_{мал}$	$1,99 \pm 0,12$	$2,01 \pm 0,20$
АРД	$0,81 \pm 0,01$	$0,69 \pm 0,04^*$
МРД	$0,76 \pm 0,03$	$0,58 \pm 0,03^*$

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

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

#### Выводы

Таким образом, исследования показали, что система митохондриального окисления семенников животных отличается высокой чувствительностью к действию внутреннего облучения, вызванного инкорпорацией основного дозообразующего радионуклида «постчернобыльского» пространства –  $^{137}\text{Cs}$ , что хорошо согласуется с представлениями о высокой радиочувствительности семенников к действию малых доз радиации. Полученные результаты позволяют сделать заключение, о том что введение радионуклида  $^{137}\text{Cs}$  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 –  $^{137}\text{Cs}$ , что, в конечном итоге, может привести к развитию стойкого низкоэнергетического состояния и формированию дисфункции репродуктивного здоровья человека и животных.

#### Литература

1. Альжабар, А. Митохондриальное окисление селезёнки крыс в условиях Проблемы здоровья и экологии. 2007. № 14.// А. Абдулкадер /инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  С. 145–149.

2. 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.
3. Карпенко, Н. А. Сексуальная функция самцов крыс, подвергнутых действию комплекса факторов зоны отчуждения ЧАЭС / Н. А. Карпенко // Радиационная биология. Радиоэкология. 2000. Т. 40, № 1. С. 86–91.
4. 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 экол. медицина. 2002. № 5. С. 60–62.
5. Кондрашова, М. Н. Руководство по изучению биологического окисления полярнографическим методом / М. Н. Кондрашова, А. А. Ананенко. М., 1973. С. 106–119.
6. Конопля, Е. Ф. Отдаленные эффекты внешнего облучения репродуктивной системы половозрелых крыс-самцов / Е. Ф. Конопля, О. Л. Федосенко // Проблемы здоровья и экологии. 2008. № 18. С. 117–119.
7. Кочетков, Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетков. М., 1980. 220 с.
8. Мамина, В. П. Оценка цитофизиологического состояния семенников мелких млекопитающих, обитающих в условиях повышенного радиационного фона / В. П. Мамина // Радиационная биология. Радиоэкология. 2005. Т. 45, № 1. С. 91–95.
9. Попов, Е. Г. Рецепция андрогенов в семенниках крыс: анализ эффектов инкорпорированных  $^{137}\text{Cs}$ ,  $\text{Li}$  и внешнего облучения / Е. Г. Попов, Ф. И. Куц, О. Л. Белоусов // Весці НАН Беларусі Сер. біял. навук. 2001. № 2. С. 95–99.
10. Саакян, И. Р. Участие митохондрий печени в адаптационных 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  $^{137}\text{Cs}$  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  $^{137}\text{Cs}$  / 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.

Репозиторий БГМУ