

УДК: [576,311,347:546,36]-092.9

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

Аль Меселмани М.А.

**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.

**Abstract:** In the experiments there has been investigated the condition of a power exchange in rats' testis by the polarographic method using Clark electrode upon incorporation  $^{137}\text{Cs}$ . The mitochondrial breathing speed changes in all metabolic conditions are revealed at oxidation of both endogenous and exogenous substrates causing uncoupling of oxidative phosphorylation. It may lead to the development of a persistent low-energy condition that can explain a reproductive health dysfunction of people and animals.

**Keywords:** testis, mitochondria, oxidation, incorporation  $^{137}\text{Cs}$ , albino rats.

### 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 времени 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 аккумуляирования  $^{137}\text{Cs}$  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, суспендоциты 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  $^{137}\text{Cs}$  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)].

Животных 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 25С° [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 (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 инги-

битор сукцинатдегидрогеназы—1 мМ малоната натрия ( $V_{\text{мал}}$ ), скорость потребления кислорода кусочками ткани семенников измеряли в нмоль  $\text{O}_2/\text{мин}\times\text{мг}$  белка препаратах [5].

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±0,18	4,85±0,07*
$V_{\text{як}}$	5,88±0,35	9,64±0,12**
$V_{\text{глу}}$	4,95 ±0,26	6,38±0,71
$V_{\text{днф}}$	5,98 ±0,32	6,49±0,71
$\text{СДяк}$	1,91± 0,08	1,99±0,01
$\text{СДглу}$	1,56±0,07	1,33±0,05*
$\text{СДднф}$	1,21±0,01	1,02±0,02*

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

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±0,07 нмоль  $\text{O}_2/\text{мин}/\text{мг}$  против 3,10±0,18 нмоль  $\text{O}_2/\text{мин}\times\text{мг}$  белка в контроле, что на 56,5% больше, чем в контроле. 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±0,12, глутамата – до 6,38±0,71 нмоль  $\text{O}_2/\text{мин}\times\text{мг}$  белка соответственно против 5,88±0,35 и 4,95 ±0,26 нмоль  $\text{O}_2/\text{мин}\times\text{мг}$  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  $\text{СДднф}$  с 1,21±0,01 до 1,02±0,02, что на 15,7 % меньше, чем в контроле. Разобщение 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  $\text{СДглу}$  с 1,56±0,07 в контроле до 1,33±0,05 (на 14,8 % ниже контрольных значений) в подопытной группе животных (табл. 1). Повышение коэффициента действия сукцината  $\text{СДяк}$  с 1,91± 0,08 в контроле до 1,99±0,01 у подопытной группы животных может быть связано, по мнению авторов с снижением внутримитохондриального пула субстрата сукцината [10].

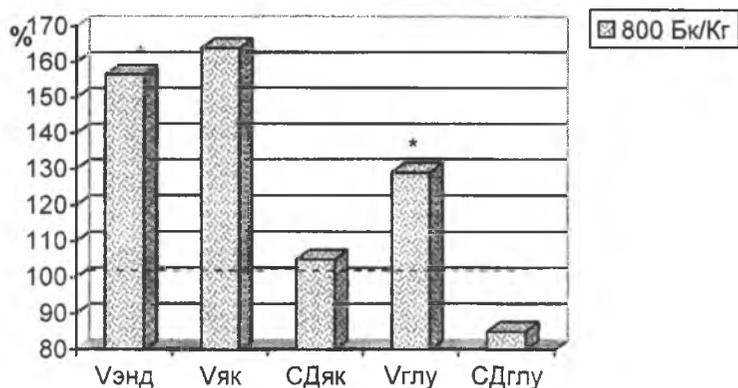


Рисунок 1 – Показатели митохондриального дыхания в тканях семенников при инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$  в количестве 800 Бк/кг

Очевидно, что в группе животных при данном уровне инкорпорации радионуклида, в результате ингибиторного анализа с введением в систему специфических ингибиторов амита натрия (АМ) и малоната натрия (МАЛ) позволили выявить увеличение скорости дыхания ткани семенников при окислении амиталом. Так, отмечается увеличение  $V_{ам}$  с  $2,71 \pm 0,23$  нмоль  $\text{O}_2/\text{мин} \times \text{мг}$  белка в контроле до  $3,41 \pm 0,23$  нмоль  $\text{O}_2/\text{мин} \times \text{мг}$  белка, что на 25,9 % больше, чем в контроле (табл. 2).

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

Параметры	Тканевое дыхание нМ $\text{O}_2/\text{мин.мг}$	
	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 амитапрезистентного 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 акти-

вация 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, вызванному 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 инкорпорации  $^{137}\text{Cs}$ / А. Абдулкадер // Проблемы здоровья и экологии. - 2007. - №14. –С.145-149.
2. Грицук, А. И. Митохондриальное окисление и ультраструктура миокарда при инкорпорации радионуклидов цезия / Т. Г. Матюхина, А. Н. Коваль, и д // 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. Радиозэкология. – 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 условия повышенного радиационного фона / В.П. Мамина // Радиационная биология. Радиозэкология. – 2005. – Т.45, №1. – С 91–95.
9. Попов, Е.Г. Рецепция андрогенов в семенниках крыс: анализ эффектов инкорпорированных  $^{137}\text{Cs}$ , LI и внешнего облучения / Попов Е.Г, Куц Ф.И., Белоусов О.Л. // Вестн НАН Беларуси Сер. б1ял. 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. – Москва, 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, Elise. In vivo effects of chronic contamination with 137 cesium on testicular and adrenal steroidogenesis / Elise 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, Paul Lee. Metabolic strategy of boar spermatozoa revealed by a metabolomic characterization / Paul Lee. Wai-Nang, S. Marin [et.al] // FEBS Lett. – 2003. – Vol.554, №3. – P 342–346.

Гомельский государственный  
университет им. Ф. Скорины

Поступило 26.04.11

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ