

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}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}Cs). Была сформирована подопытная группа с уровнем накопления ^{137}Cs 1300 Бк/Кг, контрольная группа животных находилась на стандартном рационе вивария.

Дозиметрический контроль проводился на сцинтилляционном гамма-спектрометре LP4900 В (Финляндия) еженедельно, что позволило оценивать динамику накопления радионуклидов. Оценку поглощённых доз рассчитывали по содержанию ^{137}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 O₂/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 минимум повреждений, 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}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 O₂/минхмг белка против 3,10±0,18 нмоль O₂/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 O₂/минхмг белка для животных при уровне накопления в количестве 1300 Бк/кг против 5,88 ±0,35 нмоль O₂/минхмг белка в контроле)(табл.1,рис.1).

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

Параметры	Тканевое дыхание нМ O ₂ / 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.

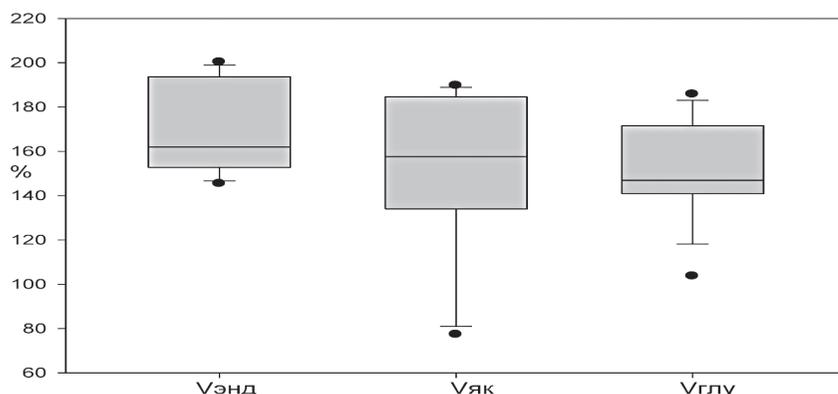


Рисунок 1 – Показатели ТД (Vэнд, Vяк и Vглу) в семенниках в % при уровне инкорпорации ^{137}Cs в количестве 1300 Бк/кг

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}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}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}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}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}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.

В указанных условиях эксперимента снижение коэф- фициента стимулирующего действия сукцината (СДяк) на 20,4% после инкорпорации ^{137}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}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}Cs даже при уровне инкорпорации ^{137}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

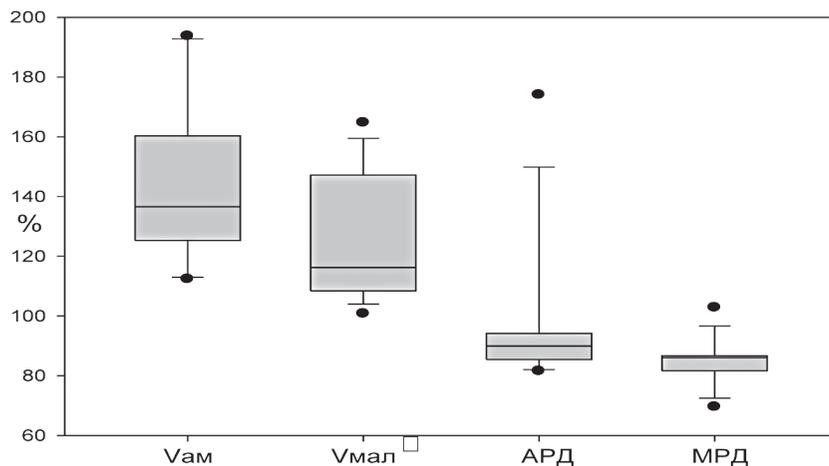


Рисунок 2 – Влияние ингибиторов на ТД (показатели Vam и Vmal) в семенниках в % при уровне инкорпорации ^{137}Cs в количестве 1300 Бк/кг

цепи и мембранах митохондрий и отражают понижение резервов жирных кислот в мембранах митохондриях ткани семенников, как следствие инкорпорации ^{137}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 СДДФ 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}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}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}Cs .

В семенниках при уровне инкорпорации ^{137}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 СДДФ).

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 // Радиация, 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}Cs , Li и внешнего облучения / Е.Г. Попов Ф.И., Куц, О.Л. Белоусов // Весці 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.