

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА СЕМЕННИКОВ КРЫС ПРИ ИНКОРОПОРАЦИИ ^{137}Cs

УДК 636.028:612.61.014.482

© М. А. Аль Меселмани¹, А. В. Евсеев², П. Д. Шабанов³¹ Гомельский государственный медицинский университет;² Смоленская государственная медицинская академия, Смоленск;³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

Ключевые слова:

семенники; митохондрия; окисление; инкорпорация ^{137}Cs ; белые крысы.

Резюме

В экспериментах на белых крысах полярнографическим методом с использованием электрода Кларка исследовали состояние энергетического обмена в семенниках при инкорпорации ^{137}Cs . Выявлены изменения скорости митохондриального дыхания во всех метаболических состояниях при окислении эндогенных и экзогенных субстратов, при разобщении окислительного фосфорилирования, снижении доли участия жирных кислот в энергетике тестикулярной ткани.

ВВЕДЕНИЕ

С момента аварии на Чернобыльской АЭС и до настоящего времени радиоизотоп цезия ^{137}Cs продолжает оставаться главным элементом, формирующим повышенный радиационный фон в зоне загрязнения [14]. Согласно литературным данным, семенники относят к органам, легко накапливающим этот элемент. Однако упоминания в литературе о радиоэкологических эффектах малых и сверхмалых доз ^{137}Cs на морфофункциональное состояние семенников встречаются довольно редко [5]. В настоящее время установлено, что ^{137}Cs снижает в крови уровень 17-эстрадиола, увеличивая при этом содержание кортикостероидов в семенниках. Также стало известным, что воздействие малых доз ^{137}Cs на организм приводит к нарушению тестикулярного и надпочечникового стероидогенеза [12].

Учитывая тропность ^{137}Cs к митохондриальному компартменту, с одной стороны [3], и, с другой стороны, высокую скорость протекания биологических процессов в семенниках, а значит, исключительную зависимость сперматогенеза от уровня энергообеспечения половых желёз самцов, есть основания полагать, что при инкорпорации ^{137}Cs велика вероятность повреждения гонад из-за дестабилизации в них реакций митохондриального окисления. Принимая во внимание известные последствия воздействия ^{137}Cs на организм [1, 3, 6], а также дефицит информации о состоянии процессов митохондриального окисления в семенниках после инкорпорации его малых доз, представлялось интересным изучить процессы тканевого дыхания (ТД) и окисли-

тельного фосфорилирования (ОФ) в ткани семенников после внутривидового введения крысам малых доз радиоцезия. Обозначенный аспект проблемы и явился целью настоящего исследования.

МЕТОДИКА

Опыты выполнены на 16 белых крысах-самцах линии Wistar массой 200–220 г. с соблюдением требований нормативных актов, принятых в международной практике лабораторного животноводства, таких как «Хельсинкская Декларация по гуманному обращению с животными» (1993), «Директивы Совета Европейского Сообщества по защите животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (1986).

Предварительно крыс делили на две группы по 8 особей — контрольную и опытную. Контрольная группа животных находилась на стандартном рационе вивария. Крысы опытной группы вскармливались в течение 30 дней радиоактивным кормом (сушеные белые грибы, накопившие ^{137}Cs), что обеспечивало уровень инкорпорации порядка 3300 Бк/кг.

Дозиметрический контроль осуществляли с помощью сцинтилляционного γ -спектрометра LP4900 В (Финляндия). После декапитации семенники быстро извлекали, охлаждали, промывали в физиологическом растворе NaCl, освобождали от соединительной ткани и продавливали через плунжер с диаметром отверстий 0,5 мм. В полученных кусочках ткани исследовали параметры митохондриального окисления полярнографическим методом с использованием электрода Кларка в термостатируемой ячейке объёмом 2 мл при температуре 25 °С [7]. Количество белка в образцах ткани определяли после их гомогенизации биуретовым методом [8].

Для оценки состояния ТД и ОФ определяли скорость поглощения O_2 кусочками ткани семенников на эндогенных (Vэнд) и экзогенных субстратах (сукцинат 5 мМ (Vяк), глутамат 5 мМ (Vглу)), а также после добавления разобщителя ОФ 2,4-динитрофенола (ДНФ) в количестве 100 мкМ (Vднф). Кроме того, выполняли ингибиторный анализ, используя блокатор I комплекса дыхательной цепи (ДЦ) амитал натрия 1 мМ (Vам) и ингибитор сукцинатдегидрогеназы малонат натрия 1 мМ (Vмал). Скорость потребления O_2 тканью семенников измеряли в нмоль $\text{O}_2/\text{мин} \times \text{мг}$ белка [3, 6, 7].

■ Таблица 1. Показатели тканевого дыхания в семенниках крыс при уровне инкорпорации ^{137}Cs 3300 Бк/кг

Показатели	Тканевое дыхание нМ $\text{O}_2/\text{мин} \times \text{мг}$ белка	
	Контроль	Уровень инкорпорации 3300 Бк/кг
Vэнд	3,10±0,18	7,00±0,25**
Vяк	5,88±0,35	8,16±0,25**
Vглу	4,95±0,26	8,25±0,45**
Vднф	5,98±0,32	8,25±0,45*
СДяк	1,91±0,08	1,12±0,03**
СДглу	1,56±0,07	1,21±0,06*
СДднф	1,21±0,01	1,10±0,02*

Примечание. Достоверность различий по отношению к группе контроля: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$

Наряду с этим рассчитывали величину стимулирующего действия янтарной кислоты ($\text{СДяк} = \text{Vяк} / \text{Vэнд}$), глутамата ($\text{СДглу} = \text{Vглу} / \text{Vэнд}$), 2,4-ДНФ ($\text{СДднф} = \text{Vднф} / \text{Vглу}$), а также показатели амиталрезистентного дыхания ($\text{АРД} = \text{Vам} / \text{Vэнд}$) и малонатрезистентного дыхания ($\text{МРД} = \text{Vмал} / \text{Vам}$), характеризующие соответственно интенсивность окисления флавопротеидзависимых субстратов и вклад жирных кислот в энергетику исследуемой ткани. Перечисленные выше параметры ТД и ОФ достаточно полно характеризуют состояние энергетического обмена в различных тканях организма [1, 3, 6]. Кусочки тканей, как и тканевые срезы, наиболее предпочтительны для такого рода исследований, т. к. содержат эндогенные субстраты, АДФ и фосфат в достаточном количестве для обеспечения стартового уровня дыхательной активности митохондрий. Кроме того, сохранение в кусочках микроархитектуры ткани при минимуме повреждений является важным условием для объективного суждения о состоянии энергетического обмена в исследуемых образцах. Все перечисленные замечания позволяют более точно интерполировать полученные данные на условия существования ткани *in vivo* [1, 3, 6].

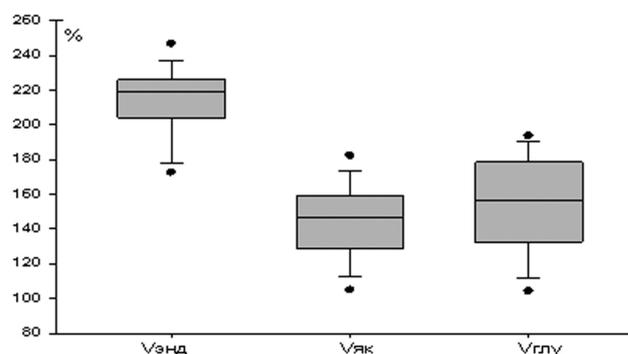
Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 5.0, Sigmaplot-11 с определением средних значений, стандартных ошибок, максимальных и минимальных отклонений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследования было подтверждено, что ткань семенников крыс действительно обладает высоким уровнем дыхательной активности митохондрий и высокой чувствительностью к воздействию инкорпорации ^{137}Cs (табл. 1), сравнимой с таковой для миокарда, печени и селезенки [1, 3, 6]. В свою очередь, в опытной группе крыс с уровнем накопления изотопа 3300 Бк/кг после добавления эндогенных и экзогенных субстратов скорость дыхания достоверно возрастала. Так, эндогенное дыхание достоверно ускорилось с $3,10 \pm 0,18$ нмоль $\text{O}_2/\text{мин} \times \text{мг}$ белка в контроле до $7,00 \pm 0,25$, т. е. на 125,8% (рис. 1).

Митохондриальное дыхание в ткани семенников крыс, получавших ^{137}Cs , на экзогенных субстратах было более активным. В частности, при использовании сукцината происходило достоверное увеличение скорости дыхания до $8,16 \pm 0,25$ нмоль $\text{O}_2/\text{мин} \times \text{мг}$ белка, а на фоне глутамата — до $8,25 \pm 0,45$ соответственно, против $5,88 \pm 0,35$ и $4,95 \pm 0,26$ нмоль $\text{O}_2/\text{мин} \times \text{мг}$ белка в контроле, что на 38,8% и 66,7% больше. Последнее является закономерным, т. к. окисление сукцината в митохондриях ткани семенников, как известно, происходит в сочетании с активацией процессов восстановления компонентов ДЦ. В пользу этого свидетельствует достоверное снижение в опытной группе коэффициента стимулирующего действия сукцината и глутамата на 58,7% и 77,6% соответственно с $1,91 \pm 0,08$ и $1,56 \pm 0,07$ (контроль) до $1,12 \pm 0,03$ и $1,21 \pm 0,06$ нмоль $\text{O}_2/\text{мин} / \text{мг}$ белка. Это позволило высказать предположение о возможности накопления сукцината и глутамата внутри митохондрий, что, вероятно, обусловлено особенностями окисления сукцината и глутамата [13].

Применение разобщителя окислительного фосфорилирования 2,4-ДНФ привело к достоверному снижению коэффициента стимулирующего действия СДднф с $1,21 \pm 0,01$ до $1,10 \pm 0,02$, что на 9,1% меньше контрольного показателя (табл. 1). Результат указывает на наличие разобщения в системе окислительного фосфорилирования митохондрий клеток



■ Рисунок 1. Основные показатели тканевого дыхания (Vэнд, Vяк и Vглу) в семенниках крыс при уровне инкорпорации ^{137}Cs 3300 Бк/кг (%). Примечание. Достоверность различий по отношению к группе контроля: * — $p < 0,05$; ⊥ — минимум и максимум; ■ — границы интерквартильного размаха

■ Таблица 2. Влияние ингибиторов на тканевое дыхание в семенниках крыс при уровне инкорпорации ^{137}Cs 3300 Бк/кг

Показатели	Тканевое дыхание нМ $\text{O}_2/\text{мин} \times \text{мг}$ белка	
	Контроль	Уровень инкорпорации 3300 Бк/кг
Vэнд	3,25±0,22	6,37±0,41*
Vам	2,71±0,28	5,64±0,08*
Vмал	1,99±0,12	3,98±0,12*
АРД	0,81±0,01	0,77±0,04*
МРД	0,76±0,03	0,67±0,03*

Примечание. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

семенников при уровне инкорпорации 3300 Бк/кг и, следовательно, снижение эффективности энергообразования.

В таблице 2 представлены результаты ингибиторного анализа на фоне действия амилата натрия и малоната натрия. Как видно из таблицы, а также из рисунка 2, при уровне инкорпорации ^{137}Cs 3300 Бк/кг показатели Vам и Vмал превышали контрольные значения. При этом было отмечено 2-кратное увеличение Vмал. Следует отметить, что после инкорпорирования радиоцезия АРД и МРД достоверно снижались соответственно с $0,81 \pm 0,01$ и $0,76 \pm 0,03$ в контроле до $0,77 \pm 0,04$ и $0,67 \pm 0,03$, т.е. на 5% и 11,9% (табл. 2). Данные ингибиторного анализа позволили выявить снижение доли участия жирных кислот в энергетике тестикулярной ткани в условиях опыта, поскольку указанный уровень инкорпорации ^{137}Cs негативно влиял на показатели АРД и МРД (рис. 2).

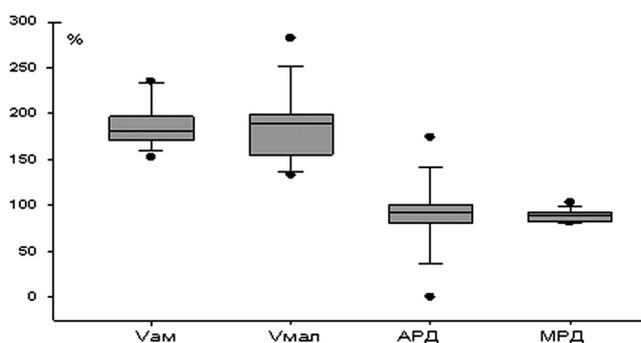
Принимая во внимание роль жирных кислот в энергообеспечении семенников [13, 17], полученные в наших опытах данные косвенно подтверждают возможность возникновения повреждений под влиянием радиоизотопа в ДЦ митохондрий и их мембранах. Всё это может приводить к спаду энергетического обмена и окислительному стрессу, который считают основной причиной нарушения гормональной функции семенников [9, 10, 11, 12].

Следует отметить, что в наших опытах по мере увеличения содержания радиоцезия в семенниках дыхательная активность митохондрий повышалась, но протекала с нарушением процессов сопряжения ОФ. Последнее было подтверждено особенностями динамики коэффициента СДднф. Так, при известном уровне инкорпорации ^{137}Cs в образцах ткани повышение дыхательной активности митохондрий проявлялось в виде ускорения Vэнд, Vяк и Vглу. В последующем стимулирующий эффект облучения практически полностью прекращался, возникали признаки его негативного влияния на энергетику клеток семенников, что выражалось в снижении чувствительности митохондрий к присутствию обоих экзогенных субстратов, а также признаками разобщения между процессами окисления и фосфорилирования. На наш взгляд, феномен активации дыхания в митохондриях семенников облучённых крыс, мог быть обусловлен диссипативным, неэкономным

типом энергопродукции, вызванным чрезмерной стимуляцией митохондриального дыхания в ткани половых желёз.

Полученные в ходе исследования результаты хорошо согласуются с данными литературы, в соответствии с которыми глутамат играет важную роль в регуляции метаболических процессов, одновременно являясь предшественником пептидов, белков и нуклеотидов [13, 15, 16]. Это также объясняет факт наличия в эндотелиальных клетках крупных кровяных сосудов семенников высокой концентрации γ -глутамилтранспептидазы, принимающей участие в транспорте данной аминокислоты [15, 16].

Таким образом, инкорпорацию радиоцезия даже в малых дозах следует рассматривать исключительно как негативное явление. Это связано с формированием в присутствии ^{137}Cs тенденции к снижению резервных возможностей митохондрий семенников по осуществлению их дыхательной функции, даже несмотря на высокие базовые показатели общей дыхательной активности. Ограничение резервных возможностей дыхательной цепи митохондрий, а также обнаруженное нами ухудшение сопряжения процессов окислительного фосфорилирования при поступлении в организм радионуклида, позволяют прогнозировать более грубые нарушения со стороны тканевого дыхания в семенниках с возможностью развития в этой ткани гипоксических, стрессорных и токсических процессов [4]. При этом следует подчеркнуть, что разобщение окислительного фосфорилирования, лабильность



■ Рисунок 2. Влияние ингибиторов на тканевое дыхание в семенниках крыс при уровне инкорпорации ^{137}Cs 3300 Бк/кг (%). * — $p < 0,05$; \perp — минимум и максимум; \square — границы интерквартильного размаха

системы его сопряжения не обязательно являются прямым следствием изученного патологического состояния [2].

ВЫВОДЫ

Система митохондриального окисления семенников крыс тонко реагирует на воздействие внутреннего низкодозового облучения, вызванного инкорпорацией основного радионуклида «постчернобыльского» пространства ^{137}Cs , что полностью согласуется с имеющимися представлениями о высокой чувствительности данной ткани к радиации.

По достижении уровня инкорпорации ^{137}Cs в количестве 3300 Бк/кг процессы тканевого дыхания в семенниках заметно активируются, что подтверждается динамикой изменений основных показателей дыхательной функции митохондрий (Вэнд, Вяк, Углу, Уднф). Тем не менее, в соответствии с изменениями коэффициента СДднф, эта активация осуществляется в митохондриях с признаками разобщения процессов окисления и фосфорилирования.

При уровне инкорпорации ^{137}Cs в семенниках крыс в количестве 3300 Бк/кг, согласно изменениям (уменьшению) показателей АРД и МРД, заметно снижается доля участия жирных кислот в энергетике тестикулярной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Альжабар А., Абдулкадер А.* Митохондриальное окисление селезёнки крыс в условиях инкорпорации ^{137}Cs // Пробл. здоровья и экологии. — 2007. — № 14. — С. 145–149.
2. *Андреев А. Ю., Кушнарёва Ю. Е., Старков А. А.* Метаболизм активных форм кислорода в митохондриях // Биохимия. — 2005. — Т. 70, № 2. — С. 200–214.
3. *Грицук А. И., Матюхина Т. Г., Коваль А. Н.* и др. Митохондриальное окисление и ультраструктура миокарда при инкорпорации радионуклидов цезия // Авиакосмич. экол. медицина. — 2002. — № 2. — С. 40–44.
4. *Евсеев А. В.* Острая гипоксия: механизмы развития и коррекция антиоксидантами. — СПб: Элби-СПб, 2008. — 224 с.
5. *Карпенко Н. А., Карпенко Н. А.* Сексуальная функция самцов крыс, подвергнутых действию комплекса факторов зоны отчуждения ЧАЭС // Радиационная биология. Радиоэкология. — 2000. — Т. 40, № 1. — С. 86–91.
6. *Коваль А. Н., Сергеенко С. М., Грицук А. И.* Тканевое дыхание печени крыс при облучении в сверхмалых

дозах инкорпорированными радионуклидами цезия // Авиакосмич. экол. медицина. — 2002. — № 5, С. 60–62.

7. *Кондрашова М. Н., Ананенко А. А.* Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. — М., 1973. — С. 106–119.
8. *Кочетков Г. А.* Практическое руководство по энзимологии. — М., 1980. — 220 с.
9. *Agarwal A., Prabakaran S., Allamaneni S. S.* Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a metaanalysis // *Reprod. Biomed. Online.* — 2006. — Vol. 12, N 5. — P. 630–633.
10. *Aydemir B.* The Influence of oxidative damage on viscosity of seminal fluid in infertile men // *J. of Andrology.* — 2008. — Vol. 29, N 1. — P. 41–46.
11. *Gehlot P., Soyol D., Goyal P. K.* Alterations in oxidative stress in testes of swiss albino Mice by aloe vera leaf extract after gamma irradiation // *Pharmacology on line.* — 2007. — N 1. — P. 359–370.
12. *Grignard E.* In vivo effects of chronic contamination with $^{137}\text{cesium}$ on testicular and adrenal steroidogenesis // *Arch. Toxicol.* — 2008. — Vol. 82, N9. — P. 583–589.
13. *Kaiser G. R.* Metabolism of amino acids by cultured rat Sertoli cells // *Metabolism clinical and experimental.* — 2005. — Vol. 54, N 4. — P. 515–521.
14. *Morita N.* Measurement of the whole-body ^{137}Cs in residents around the Chernobyl nuclear power plant // *Radiat. Prot. Dosimetry.* — 2005. — Vol. 113. — P. 326–329.
15. *Sallese M.* The G-protein coupled receptor kinase GRK4 regulates metabotropic glutamate receptor signaling in cerebellar purkinje cells // *FASEB J.* — 2000. — Vol. 14, N 15. — P. 2569–2580.
16. *Storto M.* Expression of metabotropic glutamate receptors in the rat and human testis // *J. Endocrinology.* — 2001. — Vol. 170, N 1. — P. 71–78.
17. *Vazquez-Memije M.* Respiratory chain complexes and membrane fatty acids composition in rat testis mitochondria throughout development and ageing // *Exp. Gerontol. Jun.* — 2005. — Vol. 40, N 6. — P. 482–490.

ENERGY METABOLISM IN RAT TESTIS AFTER ^{137}CS INCORPORATION

Al Meselmany M. A., Yevseyev A. V., Shabanov P. D.

◆ **Summary:** Testis tissue energy metabolism was investigated in experiments on albino rats by the polarographic method with using of Clark electrode upon ^{137}Cs incorporation. Speed changes are revealed in all metabolic conditions such as oxidation under endogenous and exogenous substrates, uncoupling of oxidative phosphorylation, and decrease share of the fatty acids role in testicular tissue energy production.

◆ **Key words:** testis; mitochondria; oxidation; ^{137}Cs incorporation; albino rats.

◆ Информация об авторах

Аль Меселмани Моханад Али — соискатель кафедры биохимии. УО «Гомельский государственный медицинский университет». РБ, 246000, Гомель, ул. Ланге, д. 5. E-mail: drmohanad@hotmail.com.

Евсеев Андрей Викторович — д.м.н., профессор кафедры нормальной физиологии. Смоленская государственная медицинская академия. 214019, Смоленск, ул. Крупской, д. 28. E-mail: hypoxia@yandex.ru.

Шабанов Петр Дмитриевич — д.м.н., профессор, профессор, заведующий кафедрой фармакологии. Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, д. 6. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

Al Meselmani Mokhanad Ali — Fellow, Dept. of Biochemistry. Gomel State Medical University. 246000, Gomel, Lange St., 5, Belarus. E-mail: drmohanad@hotmail.com.

Yevseyev Andrey Viktorovich — Dr. Med. Sci., Professor of the Department of Normal Physiology. Smolensk State Medical Academy. 214019, Smolensk, Krupskaya St., 28. E-mail: hypoxia@yandex.ru.

Shabanov Petr Dmitriyevich — Dr. of Med. Sci. (Pharmacology), Professor and Head, Department of Pharmacology. Kirov Military Medical Academy. 197376, St. Petersburg, Acad. Lebedev St., 6. E-mail: pdshabanov@mail.ru.