

Аль Меселмани М.А.

Влияние γ – излучения на митохондриальное окисление в семенниках крыс

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

г. Гомель, Республика Беларусь

Резюме: в работе показано, что на 60-е сутки после однократного внешнего γ -облучения крыс-самцов в дозах 0,5 и 1,0 Гр изменяется активности митохондриальной дыхательной цепи, обнаруживаются разобщение окислительного фосфорилирования и изменение энергетического метаболизма в ткани семенников. Воздействие малых доз γ - облучения на энергическое состояние и процесс окислительного фосфорилирования является одной из причин дисфункции семенников.

Ключевые слова: семенники, митохондрия, окисление, малые дозы гаммы радиации, белые крысы.

Введение

Несмотря на то, что в течение века было проделано много исследований по изучению действия острого и хронического ионизирующего излучения на семенники, эта проблема остается актуальной и на современном этапе для медико-биологических исследований, принимая во внимание морфофункциональные изменения этого органа под воздействием малых доз радиационного облучения [3,4,13].

Изучение воздействия облучения проводилось в ходе различных клинических и экспериментальных исследований лучевой терапии, проводимой у пациентов со многими заболеваниями, в результате чего были обнаружены нарушения функций клеток Лейдига, которые продуцируются около 75% тестостерона. После тотального облучения всего организма при лечении в частности острой лимфобластной лейкемии наблюдается дисфункция клеток Лейдига и как следствие этого – нарушение нормального развития пубертатности у мальчиков [13]. Ионизирующее излучение вызывает окислительный стресс в семенниках и апоптоз, прежде всего, в зародышевых клетках [11]. По данным литературы, самая низкая доза 0,25 ГР приводит к увеличению риска вырождения, внутриклеточному лизису и дефектам митохондрий, а также к необратимым изменениям внутриклеточного гомеостаза, дистрофическим процессам, морфологическим и функциональным изменениям в тканях, которые происходят в течение нескольких часов после облучения.

Митохондрии чувствительны к радиации как при ранних, так и при последующих эффектах ионизирующего излучения на клетки, а уменьшение митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\psi$), активация кислородного потребления, по данным литературы, приводит к изменениям электрохимических, биохимических и оптических свойств изолированной митохондрии .

Важно, что митохондрии играют главную роль в образовании и биосинтезе гормона семенников [7], поэтому были сделана оценка связи функционального состояния семенников с митохондриями и вывод о том, что поражение митохондрии является одной из первичных причин дисфункции семенников. Перл и другие авторы считают, что фертильность сперматозоида зависит от митохондриального трансмембранного потенциала, который создается электронно-транспортной цепью и регулируется равновесием окисления АФК [14].

Очевидным, что так как митохондрия-органелла клетки, в которой происходит синтез АТФ – основного источника энергии играющее уникальную роль во всех стадиях развития семенников [16]. Данные литературы свидетельствуют о том, что семенники – очень активные метаболические органы, выполняющие сложную работу (сперматогенез – самый активный репликационный процесс, способный производить около 1000 спермиев в секунду). Разделения клетки, свойственные этому процессу, обеспечивают, соответственно, высокие уровни потребления кислорода зародышевым эпителием митохондрий. Данные литературы свидетельствуют об исключительной роли тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в семенниках в обеспечении необходимой для сперматогенеза и подвижности спермы энергией, поэтому сперматоциты и сперматиды отличаются содержанием большого количества митохондрий [6]. Митохондрии которые является главным источником АФК в клетках при нормальном функционировании 98% поступившего кислорода используют для окисления субстратов с образованием АТФ (главного энергетического субстрата клеток) и 2 % для синтеза АФК, который играет существенную роль во многих физиологических процессах ткани семенников, но увеличение АФК вызывает понижение внутритестикулярного тестостерона и патологические процессы в мужской репродуктивной системе. Эти процессы могут проявляться как в раке мочевого пузыря и простаты, так и в мужском бесплодии.

Изучение нарушений, возникающих в семенниках млекопитающих под действием ионизирующих излучений, занимает одно из важнейших мест в радиобиологии, поскольку сперматогенный эпителий обладает способностью к непрерывному обновлению клеток, имеющих различную радиочувствительность, и является удобной моделью для исследования радиационных эффектов и оценки их последствий, которые могут вызвать бесплодие [10].

Таким образом анализ литературы свидетельствует об отсутствии данных о состоянии митохондриального окисления в тканях семенников при условиях воздействия низких доз гамма-облучения, что является предметом наших исследований.

В связи с этим, целью работы явилось изучение состояния митохондриального окисления ткани семенников экспериментальных животных в условиях внешнего низкодозового радиационного воздействия.

Материалы и методы:

Опыты проводились на белых крысах-самцах весом 180 – 200 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)].

Все животные (21), были разделены на 3 групп. Две группы однократно облучали на установке «ИГУР-1» в дозе 0,5 и 1 Гр (мощность дозы 0,92 Гр/мин) соответственно для забоя на 60 дней после облучения и одна группа была контрольная. Выделенные семенники, охлаждали, промывали в физиологическом растворе, освобождали от соединительно-тканых структур и продавливали через плунжер с диаметром отверстий 0,5мм.

В полученных таким образом кусочках ткани семенников исследовали параметры митохондриального окисления полярографическим методом с использованием электрода Кларка. В термостатируемой ячейке объемом 2 мл при температуре 25С° [2]. Все эксперименты проводились в условиях строгого контроля температуры и времени. Содержание белка в образцах определяли биуретовым методом после их гомогенизации.

Для получения более полной картины состояния тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования использовали пробы с дыханием кусочков ткани семенников на эндогенных (Vэнд) и экзогенных субстратах, используя в качестве последних янтарную кислоту (сукцинат) – Vяк и глутаминовую (глутамат) (Vглу) кислоту, а также разобшитель окислительного фосфорилирования – 2,4 динитрофенол (Vднф).

Используя амитал натрия –ингибитор I комплекс дыхательной цепи и малонат натрия – ингибитор сукцинатдегидрогеназы для оценки соотношения субстратов МО, скорость потребления кислорода кусочками ткани семенников измеряли в нмоль мг белка [1].×O₂/мин

С этим рассчитывали величину стимулирующего действия янтарной кислоты - $СДяк = Vяк / Vэнд$, Глутамата $СДглу = Vглу / Vэнд$, Амитаала $АРД = Vам / Vэнд$, Малоната $МРД = Vмал / Vам$, и 2,4- динитрофенола - $СДднф = Vднф / Vглу$. Результаты обрабатывали программой Statistica 5.0.

Результаты и обсуждение :

Исследования показали, что ткань семенников белых крыс обладает высокой скоростью митохондриального окисления и высоко чувствительна к действию малых доз внешнего облучения (табл. 1).

Согласно результатам работы, после фракционированного внешнего облучения в дозах 0,5 и 1,0 Гр выявлены существенные изменения показателей тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в ткани семенников животных.

Через 60 суток после однократного облучения при дозах 0,5 и 1,0 Гр достоверна возростала скорость дыхания кусочков семенников на эндогенных субстратах с $5,62 \pm 0,55$ в контроле соответственно до $7,37 \pm 1,00$ и $10,92 \pm 1,19$ мг белка что на 31,4% и 94,3 % больше, чем в контроле (табл. 1).×нмоль O₂/мин
Таблица 1 Показатели ТД семенников крыс после γ- облучения в дозах 0,5 Гр и 1,0Гр на 60-е сутки .

Параметры	Дозы облучения		
	Контроль	0,5Гр	1,0Гр
Vэнд	5,62±0,55	7,37±1,00	10,92±1,19**
Vяк	9,94 ±1,15	10,08±0,83	18,12±3,04*
Vглу	8,10±0,37	8,91±0,64	14,54±0,62*
Vднф	9,22 ±0,20	9,55±1,16	13,81±2,37
СДяк	2,11± 0,27	1,63±0,32	1,65±0,17
СДглу	1,42± 0,10	1,28±0,05	1,33±0,05
СДднф	1,21±0,08	1,06±0,04	1,06±0,11

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

Сходные изменения обнаружены при использовании экзогенных субстратов сукцинита и глутамата. Так возрастали обе Vяк, Vглу соответственно до $10,08 \pm 0,83$ мг белка в контроле, и $8,91 \pm 0,64$ при дозе 0,5 Гр против $8,10 \pm 0,37$ нмоль O₂/мин что на 1,5% и 10% больше, чем в контроле. Наиболее выраженный характер изменений регистрировали с увеличением дозы облучения (1,0) Гр в присутствии этих субстратов. Так, отмечали достоверно рост скорости дыхания Vяк и Vглу до мг белка что на 82,3% и 79,5% больше, чем $\times 18,12 \pm 3,04$ и $14,54 \pm 0,62$ нмоль O₂/мин в контроле, а также увеличение дыхания в семенниках в присутствии разобщителя окислительного фосфорилирования -2,4- ДНФ с $9,22 \pm 0,20$ в контроле до $9,55 \pm 1,16$ мг белка для групп облучённых животных в дозах 0,5 и $13,81 \pm 2,37$ нмоль O₂/мин 1,0 Гр, что на 3,6% и 49,8% больше, чем в контроле. Все это свидетельствует об увеличении окисления фосфорилирования в семенниках при этих условиях (табл. 1).

Снижение показателя коэффициента стимулирующего действия сукцината (СДяк) с $2,11 \pm 0,27$ в контроле соответственно до $1,63 \pm 0,32$ и $1,65 \pm 0,17$ в группах опытных животных, что на 22,7% и 21,8% меньше, чем в контроле, свидетельствует о возрастании роли сукцината в энергетике МХ семенников и активности СДГ, сопровождением возрастания внутримитохондриального пула сукцината в МХ облучённых семенниках.

Недостоверное снижение коэффициента (СДглу) в группах опытных животных свидетельствует об увеличении пула эндогенного глутамата в Мх ткани семенников, и может объяснить значительную роль аминокислоты глутамата как источника энергии для клеток семенников [12].

Метаболизм янтарной кислоты и глутамата в тканях семенников при дозе 0,5 Гр на 60-е сутки отражает наличие внутримитохондриальных изменений этих субстратов, а также активация β-жирных кислот. Как показывают данные таблицы 2, отмечаются существенные достоверные увеличения таких параметров, как Vам и Vмал.

Таблица 2 Показатели влияния ингибиторов на ТД семенников крыс после γ-облучения в дозах 0,5 Гр и 1,0Гр на 60-е сутки

Параметры	Контроль	0,5Гр	1,0Гр
Vэнд	5,77±0,24	7,39±0,39**	10,33±0,53*
Vам	4,15±0,22	6,57 ±0,39**	8,49 ±1,35
Vмал	2,74±0,15	5,04±0,49**	7,75 ±1,45*
АРД	0,72±0,04	0,80±0,02	0,74±0,14
МРД	0,66±0,02	0,69±0,06	0,75±0,05

Результаты введения в систему специфических ингибиторов АМ и МАЛ указывают тенденцию к увеличению показателей АРД и МРД на 60-е сутки после однократного облучения при дозах 0,5 и 1,0 Гр. Так, в дозе 0,5 Гр показатель АРД и МРД возрасли до 0,80±0,02 и 0,69±0,06 соответственно по сравнению с 0,72±0,04 и 0,66±0,02 в контроле, что на 11,13% и 4,6% больше, чем в контроле. Это свидетельствует также о значении изменений в системе FAD-зависимого дыхания, однако, существенный рост коэффициента МРД на этом фоне характеризует важность значения жирных кислот в энергетике семенников (табл. 1) [66,16].

Описанная метаболическая картина, характерная для 60-х суток после облучения отмечается наличием разобщения ОФ, о чем свидетельствует снижение коэффициента СДднф до 1,06±0,04 для обеих групп животных против 1,21±0,08 в контроле, что на 12,4% меньше, чем в контроле.

Поскольку нарушения энергетического обмена лежат в основе патогенеза многих заболеваний, знание механизма функционирования цикла Кребса позволит врачу провести правильную коррекцию метаболических нарушений.

Возможно заключить, что обнаруженные изменения отражают адаптивный ответ клеток и ткани семенников.

Заключение:

Таким образом, анализ полученных данных в настоящей работе свидетельствует о высокой чувствительности митохондриального окисления ткани семенников к действию однократной дозы гамма излучения, которые проявляются в виде изменения параметров дыхания, стимуляции β- окисления жирных кислот, разобщения в системе сопряжения тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в семенниках, и являются патогенетическим обоснованием возникновения существенных нарушений морфофункционального состояния мужской репродуктивной системы при условиях внешнего облучения.

Литература

1. Грицук, А. И. Характеристика митохондрий и ультраструктура миокарда крыс в условиях продолжительной инкорпорации радионуклидов ¹³⁷Cs / А. И. Грицук [и др.] // Авиакосмическая и экол. медицина. 2002. № 4. С. 50–55.
2. Кондрашова, М. Н. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / М. Н. Кондрашова, А. А. Ананенко. М., 1973. С. 106–119.

3. 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.
4. Попов, Е. Г. Роль исходного состояния ткани коры надпочечников в результате действия внешнего облучения на её структуру-функциональное состояние и андроген рецепторное взаимодействие / Е. Г. Попов, Е. Ф. Конопля, Н. В. Бансцкин // Радиационная биология. Радиоэкология. 2005. Т. 45, № 1. С. 46–50.
5. Andrew, S. Effect of myxothiazol on Leydig cell steroidogenesis: inhibition of luteinizing hormone-mediated testosterone synthesis but stimulation of basal steroidogenesis / S. Andrew [et al.] // Endocrinology. 2007. Vol. 148, № 6. P. 2583–2590.
6. Gavazza, M. B. The effect of alpha-tocopherol on lipid peroxidation of microsomes and mitochondria from rat testis / M. B. Gavazza, A. Catala // Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2006. Vol. 74, № 4. P. 247–254.
7. Gehlot, P. Alterations in oxidative stress in testes of swiss albino Mice by aloe vera leaf extract after gamma irradiation / P. Gehlot, D. Soyalka, P. K. Goyal // Pharmacologyonline. 2007. № 1. P. 359–370.
8. Hay-Yan, J. Direct maldi-ms analysis of cardiolipin from rat organs sections / J. Hay-Yan, [et al.] // J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 2007. Vol. 18, № 3. P. 567–577.
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. Freund, I. Testicular function in eight patients with seminoma after unilateral orchidectomy and radiotherapy / I. Freund [et. al] // International Journal Of Andrology. 2008. Vol. 10, № 2. P. 447–455.
11. Ji-Sun, Parkb. Differential expression of Prx I and II in mouse testis and their up-regulation by radiation / Ji-Sun Parkb [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002. Vol. 296, №2. P. 337–342.
12. Kaiser, G. R. Metabolism of amino acids by cultured rat Sertoli cells / G. R. Kaiser [et al.] // Metabolism clinical and experimental. 2005. Vol. 54, № 4. P. 515–521.
13. Kamischke, A. Gonadal protection from radiation by GnRH antagonist or recombinant human FSH: a controlled trial in a male nonhuman primate (*Macaca fascicularis*) / A. Kamischke [et al.] // J. Endocrinology. 2003. Vol. 179, № 2. P. 183–194.
14. Perl, A. Transaldolase is essential for maintenance of the mitochondrial transmembrane potential and fertility of spermatozoa / A. Perl [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. 2007. Vol. 103. P. 14813–14818.
15. Fedortseva, R. The special cell effects and somatic consequences of exposure to low-dose radiation, / R. Fedortseva [et al.] // Budapest, Hungary. Material., Conference. 2007. P. 29.
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.