



УДК 577.346+546.48/576.311.347:577.115.3

© 2011

Л. В. Грубская, В. М. Войцицкий, С. В. Хижняк

**Энергетическое состояние митохондрий энтероцитов тонкой кишки крыс после действия рентгеновского излучения низкой мощности**

*(Представлено академиком НАН Украины В. П. Кухарем)*

*Досліджено вплив іонізуючого випромінювання низької потужності (0,055 Гр/хв) при опроміненні у дозах 0,1, 0,5 й 1,0 Гр на метаболічний стан дихального ланцюга митохондрій слизової оболонки ентероцитів тонкої кишки. Встановлено порушення зв'язку процесів окисного фосфорилування в митохондріях, що виражались в роз'єднанні процесів дихання і фосфорилування, зниженні швидкості фосфорилування та пригніченні АТФ-гідролазних реакцій. Виявлені зміни спостерігаються впродовж усіх термінів дослідження та поглиблюються із зростанням поглинутої дози випромінювання.*

Ионизирующее излучение генерирует в клетках свободные радикалы [1], которые обуславливают окислительные повреждения макромолекул, проявляясь в нарушении функционального состояния клеток [2]. Энтероциты тонкого кишечника являются одной из основных мишеней действия ионизирующей радиации вследствие их высокой пролиферативной активности, и митохондрии играют ведущую роль в энергообеспечении их жизнедеятельности. Митохондриальная дисфункция вызывает широкий спектр дегенеративных, метаболических и онкологических заболеваний, а также ускоряет старение организма [3]. При повреждении митохондрий они являются главными клеточными генераторами реактивных форм кислорода, вызывающих при их избыточном образовании некроз клеток в результате развития окислительного стресса [3, 4]. Показано, что ионизирующая радиация в дозах (1–10 Гр) повышает продукцию активных форм кислорода [5], которые нейтрализуются митохондриальной антиоксидантной системой и они не вызывают повреждения митохондрий. Но после облучения мышей высокими дозами радиации (1–20 Гр) при исчерпании возможностей антиоксидантной системы и развитии окислительного стресса значительно снижаются скорости дыхания митохондрий печени в состояниях 3 и 4 без изменения отношения АДФ/О, т. е. эффективности синтеза АТФ [6]. Структурно-метаболическая теория Кузина [7], а также концепция мембранного механизма биологического действия ма-

лых доз Эйдуса [8] основываются на данных, которые показывают, что первичной мишенью действия радиации в малых дозах являются не ДНК, а именно клеточные мембраны. Использование изолированных митохондрий как объекта исследований позволяет оценить эффективность окисления основных промежуточных продуктов катаболизма питательных веществ, а также степень сопряжения окисления и фосфорилирования [9].

Целью данной работы было исследование интенсивности процессов дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий энтероцитов слизистой оболочки тонкого кишечника крыс при разовом действии ионизирующего излучения низкой мощности.

В опытах использовали белых беспородных крыс-самцов массой 180–200 г, которых выращивали в стандартных условиях вивария. Разовое облучение животных проводили на установке РУМ-17 с тубусом в дозах 0,1, 0,5 и 1,0 Гр при условиях: мощность дозы 55 мГр/мин, фильтр 0,5 мм Cu и 1 мм Al, сила тока 5 мА, напряжение 200 кВ, кожно-фокусное расстояние 100 см. Животных декапитировали через 1, 12 и 24 ч после облучения. Митохондрии слизистой оболочки тонкого кишечника выделяли методом дифференциального центрифугирования [9]. Содержание белка в исследуемых препаратах определяли методом Лоури (*O. H. Lowry et al.*, 1951). Интенсивность дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий регистрировали с помощью полярографа LP-7 в термостатированной кювете с использованием платинового электрода [9]. Среда инкубации содержала: 150 ммоль/л сахарозы, 5 ммоль/л *tris*-буфер, 50 ммоль/л KCl, 3 ммоль/л MgCl<sub>2</sub>, 5 ммоль/л KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub> (рН 7,4). В качестве субстратов окисления использовали сукцинат и малат в конечной концентрации 10 ммоль/л. Дыхание стимулировали добавлением 200 нмоль/л аденозиндифосфата (АДФ). По полученным полярограммам идентифицировали метаболические состояния митохондрий по Чансу [10] и рассчитывали скорость дыхания в этих состояниях: 2 — “свободное” ( $V_4^s$ ), 3 — АДФ-стимулируемое, или активное, дыхание ( $V_3$ ), 4 — “контролируемое” ( $V_4^{ATP}$ );  $V_{\Phi}$  — скорость фосфорилирования АДФ. Рассчитывали также скорость дыхания митохондрий в условиях разобщения окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофосфатом (2,4-ДНФ) —  $V_{\text{ДНФ}}$ , дыхательный контроль (ДК отношение  $V_3/V_4^{ATP}$ ), эффективность фосфорилирования добавленного АДФ — АДФ/О, а также показатель, характеризующий активность АТФ-гидролазных реакций митохондрий,  $V_4^s/V_4^{ATP}$ .

Экспериментальные данные обрабатывали общепринятыми методами вариационной статистики. Данные представлены в виде среднего значения со среднеквадратичной ошибкой среднего ( $M \pm m$ ). Количество животных во всех группах  $n = 8$ . Достоверность отличий между показателями опытной и контрольной групп оценивали по  $t$ -критерию Стьюдента.

Как следует из полученных данных, приведенных в табл. 1, после дозы 0,1 Гр скорость свободного окисления субстрата ( $V_4^s$ ) достоверно не изменялась относительно контроля во все сроки исследования. Пятикратное увеличение поглощенной дозы вызвало противоположно направленные изменения  $V_4^s$ : через 1 ч скорость свободного окисления сукцината падала в 2 раза, через 12 ч — возвращалась к норме, а через 24 ч — увеличивалась в 1,5 раза по сравнению с контролем. Дальнейшее повышение поглощенной дозы приводило к росту  $V_4^s$  через 12 и 24 ч на 50 и 83% соответственно. Скорости активного окисления субстрата ( $V_3$ ) и эффективность фосфорилирования АДФ (АДФ/О) достоверно не изменялись во всем дозовом диапазоне в течение всего периода исследования. Скорость контролируемого окисления ( $V_4^{ATP}$ ) увеличивалась практически дозозависимо (различия в отклонениях значений этого параметра от контроля между группами недостоверны): через 12 и 24 ч после дозы 0,1 Гр, через 24 ч после дозы 0,5 Гр и во все сроки исследования после макси-

Таблиця 1. Показатели интенсивности дыхательной и фосфорилирующей способности митохондрий клеточно-слизистой оболочки тонкой кишки после действия ионизирующей радиации (субстрат — сукцинат)

Время после облучения, ч	$V_4^s$ , мккатом $O_2$ / мин · мг белка	$V_3$ , мккатом $O_2$ / мин · мг белка	$V_4^{ATP}$ , мккатом $O_2$ / мин · мг белка	$V_\Phi$ , мкмоль АДФ / мин · мг белка	$V_{днФ}$ , мккатом $O_2$ / мин · мг белка	ДК	АДФ/О	$V_4^s/V_4^{ATP}$
Поглощенная доза, 0,1 Гр								
1	$0,008 \pm 0,002$	$0,038 \pm 0,003$	$0,016 \pm 0,002$	$0,100 \pm 0,008$	$0,051 \pm 0,005$	$2,38 \pm 0,31^*$	$1,67 \pm 0,17$	$0,50 \pm 0,06^*$
12	$0,010 \pm 0,002$	$0,041 \pm 0,005$	$0,020 \pm 0,003^*$	$0,084 \pm 0,009^*$	$0,042 \pm 0,004$	$2,05 \pm 0,26^*$	$1,42 \pm 0,15$	$0,55 \pm 0,06^*$
24	$0,016 \pm 0,003$	$0,044 \pm 0,005$	$0,024 \pm 0,003^*$	$0,094 \pm 0,006^*$	$0,055 \pm 0,004$	$1,83 \pm 0,20^*$	$1,64 \pm 0,14$	$0,67 \pm 0,08^*$
Поглощенная доза, 0,5 Гр								
1	$0,006 \pm 0,001^*$	$0,025 \pm 0,003$	$0,014 \pm 0,002$	$0,096 \pm 0,009$	$0,046 \pm 0,004$	$1,79 \pm 0,21^*$	$1,42 \pm 0,18$	$0,43 \pm 0,05^*$
12	$0,009 \pm 0,002$	$0,030 \pm 0,003$	$0,015 \pm 0,002$	$0,071 \pm 0,008^*$	$0,041 \pm 0,005$	$2,00 \pm 0,23^*$	$1,36 \pm 0,16$	$0,60 \pm 0,07^*$
24	$0,018 \pm 0,002^*$	$0,039 \pm 0,004$	$0,026 \pm 0,003^*$	$0,100 \pm 0,009$	$0,049 \pm 0,005$	$1,50 \pm 0,17^*$	$1,49 \pm 0,15$	$0,69 \pm 0,08^*$
Поглощенная доза, 1,0 Гр								
1	$0,010 \pm 0,002$	$0,038 \pm 0,004$	$0,023 \pm 0,003^*$	$0,070 \pm 0,008^*$	$0,042 \pm 0,004^*$	$1,65 \pm 0,18^*$	$1,36 \pm 0,14$	$0,44 \pm 0,05^*$
12	$0,018 \pm 0,002^*$	$0,049 \pm 0,005$	$0,027 \pm 0,003^*$	$0,064 \pm 0,005^*$	$0,037 \pm 0,003^*$	$1,82 \pm 0,19^*$	$1,32 \pm 0,16$	$0,67 \pm 0,08^*$
24	$0,022 \pm 0,003^*$	$0,042 \pm 0,004$	$0,025 \pm 0,003^*$	$0,096 \pm 0,009$	$0,052 \pm 0,004$	$1,68 \pm 0,15^*$	$1,43 \pm 0,15$	$0,68 \pm 0,11^*$

Примечание. Контроль:  $V_4^s$  —  $0,012 \pm 0,002$ ;  $V_3$  —  $0,036 \pm 0,005$ ;  $V_4^{ATP}$  —  $0,011 \pm 0,002$ ;  $V_\Phi$  —  $0,120 \pm 0,009$ ;  $V_{днФ}$  —  $0,057 \pm 0,006$ ; ДК —  $3,27 \pm 0,34$ ; АДФ/О —  $1,76 \pm 0,16$ ;  $V_4^s/V_4^{ATP}$  —  $1,09 \pm 0,09$ .

\*  $p \leq 0,05$  отклонение относительно контроля.

мальной дозы. Динамика изменения интенсивности фосфорилирования АДФ ( $V_{\text{ф}}$ ) зависела как от дозы, так и времени после облучения. После дозы 0,1 Гр значение  $V_{\text{ф}}$  через 1 ч не отличалось от контроля, а через 12 и 24 ч — снижалось на 30 и 22% соответственно. После дозы 0,5 Гр наблюдалось более выраженное снижение значения  $V_{\text{ф}}$  (на 40%) только через 12 ч, а после максимальной дозы — аналогичное по величине — через 1 и 12 ч. Скорость дыхания в состоянии разобщения ( $V_{\text{ДнФ}}$ ) не отличалась от контрольного значения после малых доз (0,1–0,5 Гр) во все сроки и снижалась в среднем на 45% только после дозы 1,0 Гр через 1 и 12 ч. Дыхательный контроль в изученном диапазоне доз через 1 ч после облучения снижался дозозависимо на 27, 45 и 50% соответственно. В более поздние сроки падение ДК было практически одинаковым после всех доз. Значение показателя, отражающего активность АТФ-гидролазных реакций митохондрий ( $V_4^s/V_4^{\text{АТФ}}$ ), снижалось в среднем на 40% относительно контроля практически независимо от времени и полученной дозы.

Анализ наших результатов свидетельствует о том, что во все сроки исследования отмечаются нарушения метаболического состояния митохондрий энтероцитов слизистой оболочки тонкой кишки, зависящие от поглощенной дозы ионизирующей радиации. Наблюдаются разнонаправленные изменения скорости дыхания в состоянии 2 ( $V_4^s$ ), а также увеличение скорости дыхания в контролируемом состоянии ( $V_4^{\text{АТФ}}$ ) и снижение скорости фосфорилирования ( $V_{\text{ф}}$ ).

Поскольку скорость потребления кислорода митохондриями в состоянии 2, направленная на поддержание электрохимического градиента, определяется только протонной утечкой, то снижение скорости окисления сукцината через 1 ч после поглощенной дозы 0,5 Гр может указывать на ее уменьшение. Напротив, увеличение значения  $V_4^s$ , которое наблюдается при этой дозе через 24 ч и при дозе 1 Гр — через 12 и 24 ч, может быть результатом увеличения утечки протонов. Это является косвенным признаком структурно-функциональных изменений внутренней мембраны митохондрий, вызванных ионизирующим излучением.

Ограничение, накладываемое на электронный транспорт хемиосмотическим градиентом, называется дыхательным контролем. Митохондрии осуществляют дыхательный контроль до тех пор, пока они могут ограничивать электронный транспорт с помощью градиента. Если градиент уничтожается повреждением мембран, дыхательный контроль устраняется и электронный транспорт может идти свободно. Следовательно, снижение величины ДК после радиационного воздействия указывает на падение электрохимического градиента на внутренней мембране митохондрий.

Необходимо подчеркнуть, что уже через 1 ч после облучения наблюдается разобщение процессов дыхания и фосфорилирования, а также угнетение активности АТФ-гидролазных реакций митохондрий, по-видимому, вследствие нарушения транспорта электронов и протонов в дыхательной цепи митохондрий. Это может быть обусловлено изменениями в активности ферментов дыхательной цепи и процессе переноса электронов от субстрата окисления [11]. Наблюдаемое угнетение активности АТФ-гидролазных реакций митохондрий ( $V_4^s/V_4^{\text{АТФ}}$ ), вероятно, обусловлено структурными изменениями  $\text{H}^+$ -АТФазы [12].

Таким образом, согласно полученным результатам, можно сделать вывод о том, что угнетение процесса окислительного фосфорилирования в митохондриях энтероцитов свидетельствует как о повреждении электрон-транспортной цепи митохондрий, так и о нарушении сопряжения с определенными участками этой цепи реакций фосфорилирования, что может быть связано с потерей цитохрома  $c$  или же с нарушением работы оксидоредуктаз [13]. Поэтому, как показывают данные проведенных исследований, действие ионизиру-

щей радиации в малых дозах вызывает структурно-функциональные перестройки в мембранах митохондрий, сохраняющиеся длительное время после облучения, что, учитывая их ведущую роль в энергообеспечении и поддержании ионного гомеостаза клеток, может вызывать нарушения их функциональной активности.

1. Yamaguchi S., Sakurada S., Nagumo M. Role of intracellular SOD in protecting human leukemic and cancer cells against superoxide and radiation // *Free Radic. Biol. Med.* – 1994. – **17**, No 5. – P. 389–395.
2. Spitz D. R., Azzam E. I., Li J. J., Gius D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying concept in stress response biology // *Cancer Metastasis Rev.* – 2004. – **23**, No 3/4. – P. 311–322.
3. Balaban R. S., Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging // *Cell.* – 2005. – **120**, No 4. – P. 483–495.
4. Kowaltowski A. J., de Souza-Pinto N. C., Castilho R. F., Vercesi A. E. Mitochondria and reactive oxygen species // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – **47**, No 4. – P. 333–343.
5. Leach J. K., Van Tuyle G., Lin P. S. et al. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen // *Cancer Res.* – 2001. – **61**, No 10. – P. 3894–3901.
6. Hwang J. J., Lin G. L., Sheu S. C., Lin F. J. Effect of ionizing radiation on liver mitochondrial respiratory functions in mice // *Chin. Med. J. Engl.* – 1999. – **112**, No 4. – P. 340–344.
7. Кузин А. М. Структурно-метаболическая теория в радиобиологии. – Москва: Наука, 1988. – 300 с.
8. Эйдус Л. Х. Мембранный механизм биологического действия малых доз. – Москва: Наука, 2001. – 250 с.
9. *Практикум по биохимии* / Под ред. Н. В. Северина, Л. Н. Соловьевой. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 389 с.
10. *Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом* / Под ред. И. М. Франка. – Москва: Наука, 1973. – 78 с.
11. Чеботарев Е. Е., Барабой В. А., Дружина В. А., Рудаков Н. А., Иванов И. Ф., Сутковой Д. А. Окислительные процессы при гамма-нейтронном облучении организма. – Киев: Наук. думка, 1986. – 216 с.
12. Войцицький В. М., Хижняк С. В., Клепко А. В. та ін. Процеси окиснення та фосфорилування в мітохондріях ентероцитів тонкої кишки щурів за хронічної дії іонізуючої радіації та кадмію // *Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка. Біологія.* – 2004. – № 42./43. – С. 7–9.
13. Skulachev V. P. Damage of mitochondria // *Free Radic. Biol. Med.* – 2000. – **29**. – P. 1056–1059.

*Институт биоорганической химии  
и нефтехимии НАН Украины, Киев  
Национальний університет біоресурсів  
и природопользовання, Киев  
УНЦ “Институт биологии” Киевского национального  
университета им. Тараса Шевченко*

*Поступило в редакцию 21.12.2010*

**L. V. Grubska, V. M. Voitsitskiy, S. V. Hyzhnyak**

### **The energetic state of rat’s small intestine mitochondria under exposure to X-ray ionizing radiation with low intensity**

*Influence of low-intensity ionizing radiation with single dose ( $0.055 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$ ) in doses of 0.1, 0.5, and 1.0 Gy on a metabolic state of the respiratory chain of rat’s small intestine mitochondria is investigated. The damage of relations of the oxidative phosphorylation processes in mitochondria, which is expressed in the uncoupling of the processes of respiration and phosphorylation and in a decline of the phosphorylation rate and the activity of ATP- hydrolase reactions, is established. These changes are observed at all time of research and intensified with a growth of the radiation absorbed dose.*