

УДК 57.017.7:[616.341:611.018.25]:614.876

<https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-2-10>



Изменение уровня эндогенного дыхания слизистой тонкого кишечника в различные сроки после облучения

Н. С. Мышковец

Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Беларусь

Резюме

Цель исследования. Изучить уровень эндогенного дыхания слизистой тонкого кишечника экспериментальных животных после воздействия внешнего облучения в дозе 0,5 и 1,0 Гр.

Материалы и методы. Исследование было проведено на белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г. Животных однократно облучали на установке «ИГУР-1», источник ¹³⁷Cs, мощность дозы 0,92 Гр/мин. Изучение параметров тканевого дыхания проводили полярографическим методом на устройстве «Record-4» (РФ) в ячейке объемом 2 мл закрытым платиновым электродом Кларка при 25 °С.

Результаты. Показано, что изменения дыхательной активности с течением времени носят немонотонный характер. Это подтверждает высокую чувствительность тонкого кишечника к радиационному воздействию.

Заключение. Уровень эндогенного дыхания слизистой тонкого кишечника может являться одним из критериев оценки энергетического статуса ткани после облучения.

Ключевые слова: тонкий кишечник, митохондриальное окисление, внешнее облучение

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена без финансирования.

Для цитирования: Мышковец Н.С. Изменение уровня эндогенного дыхания слизистой тонкого кишечника в различные сроки после облучения. *Проблемы здоровья и экологии*. 2023;20(2):72–77. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-2-10>

Changes in the level of endogenous respiration of the small intestine mucosa at various times after irradiation

Nadeja S. Myshkavets

Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Abstract

Objective. To study the level of endogenous respiration of the small intestine mucosa of experimental animals after exposure to external irradiation at a dose of 0.5 and 1.0 Gy.

Materials and methods. The study was conducted on white male outbred rats weighing 180–200 g. The animals were irradiated once in the “IGUR-1” unit, ¹³⁷Cs source, dose rate 0.92 Gy/min. The parameters of tissue respiration were studied by polarographic method using Record-4 device (RF) in a 2 ml cell with a closed platinum Clark electrode at 25°C.

Results. It was shown that changes in respiratory activity over time are non-monotonous. This confirms the high sensitivity of the small intestine to radiation exposure.

Conclusion. The level of endogenous respiration of the small intestine mucosa can be one of the criteria for assessing the energy status of the tissue after irradiation.

Keywords: small intestine, mitochondrial oxidation, external irradiation

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Funding. Study was conducted without sponsorship.

For citation: Myshkavets NS. Changes in the level of endogenous respiration of the small intestine mucosa at various times after irradiation. *Health and Ecology Issues*. 2023;20(2):72–77. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-2-10>

Введение

Известно, что ткани с активной пролиферацией и высоким уровнем энергетического обмена особенно чувствительны к радиационному воздействию. Слизистая тонкого кишечника характеризуется интенсивным кровоснабжением, оксигенацией и содержанием большого числа митохондрий в различных клеточных структурах стенки (энтероциты, лимфоидные образования, клетки гладкой мускулатуры и др.), поэтому относится к радиочувствительным тканям. В течение первых дней после облучения в ткани кишечника возникают существенные повреждения: расстройства микроциркуляции, изменения в строении ворсинок и крипт, развивается ряд структурных и метаболических нарушений апикальной и базолатеральной мембран энтероцитов, что может привести к некрозу и появлению эрозий слизистой [1–3]. Как следствие, нарушается основная функция кишечного эпителия — переваривание и всасывание питательных веществ, что влечет «энергетический голод» других органов и тканей, соответственно, изменение ряда гомеостатических показателей организма в целом.

Ряд собственных исследований, а также анализ литературных данных показал, что метаболической основой повреждения клеток и тканей ионизирующим излучением является нарушение процессов тканевого дыхания [4–6]. Это обусловлено тем, что главным фактором негативного радиационного воздействия является образование активных форм кислорода [7], а в митохондриях локализуются основные кислородзависимые процессы клетки. Кроме того, митохондрии характеризуются высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот в составе фосфолипидов, радиационно-индуцированное окисление которых приводит к изменению структурно-функционального состояния мембран [1, 2].

Уровень эндогенного дыхания ткани является интегральным показателем, позволяющим оценить количественное соотношение внутримитохондриальных субстратов, целостность мембран, активность транспортных систем, дегидрогеназ и дыхательной цепи в целом.

Цель исследования

Изучить уровень эндогенного дыхания слизистой тонкого кишечника экспериментальных животных в различные сроки после воздействия однократного внешнего облучения в дозе 0,5 и 1,0 Гр.

Материалы и методы

Исследования проводились на белых лабораторных беспородных крысах-самцах массой

180–200 г. Животные содержались на стандартном рационе вивария согласно установленным нормам. Были сформированы две опытные группы животных, которых подвергали однократному общему облучению в дозах 1,0 и 0,5 Гр, и контрольная группа интактных животных. Облучение животных проводили на установке «ИГУР-1», источник ^{137}Cs , мощность дозы составляла 0,92 Гр/мин. Животных каждой группы в количестве 6–8 особей выводили из эксперимента путем мгновенной декапитации на 3-, 10-, 30-, 40-, 60- и 90-е сутки после облучения.

При проведении экспериментов были соблюдены требования, регламентированные международными рекомендациями и правилами Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях, от 22 сентября 2010 г.

Образцы ткани для исследования контрольных и облученных крыс получали из тонкой кишки, которую изолировали (первые 10 см от желудка), отмывали охлажденным физиологическим раствором, выворачивали «наизнанку», делили на равные отрезки (1,5–2 мм). Изучение уровня эндогенного дыхания проводили полярографическим методом на устройстве «Record 4» (РФ) закрытым платиновым электродом Кларка в термостатируемой ячейке объемом 2 мл при 25 °С [8]. Для характеристики состояния энергетического обмена исследуемой ткани определяли скорость потребления кислорода фрагментами кишечника на эндогенных субстратах ($V_{\text{энд}}$), которую выражали в нмоль $\text{O}_2/\text{мин}\cdot\text{мг}$ белка. Количество повторностей измерений составляло 4–5 на каждое животное. Содержание белка в предварительно гомогенизированных образцах ткани тонкого кишечника определяли биуретовым методом, который основан на образовании в щелочной среде комплекса пептидных связей с ионами двухвалентной меди, окрашенного в фиолетовый цвет.

Полученные данные были обработаны статистически с использованием программы Excel и отражены в таблице в виде средних значений с указанием статистической ошибки для средних значений. Сравнение средних разных выборок проводили с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни (программа GraphPad Prism 4).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования динамики эндогенного дыхания слизистой оболочки тонкого кишечника в различные сроки после облучения представлены в таблице 1.

Таблица 1. Интенсивность дыхания препаратов тонкого кишечника на эндогенных субстратах (Vэнд) в различные сроки после облучения

Table 1. Respiration rate of small intestine preparations on endogenous substrates (V_{энд}) at various times after irradiation

Сутки	Контроль	Доза облучения 0,5 Гр	Доза облучения 1,0 Гр
3-и	10,08 ± 2,07	5,60 ± 1,62*	6,46 ± 0,92*
10-е		10,53 ± 2,48	14,87 ± 3,84
30-е		9,13 ± 1,25	7,16 ± 1,19
40-е		14,58 ± 1,09**	13,96 ± 1,49*
60-е		15,49 ± 3,27*	13,33 ± 1,91
90-е		10,52 ± 3,29	14,66 ± 1,76*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Наблюдается достоверное угнетение изучаемого параметра на 3-и сутки в обеих опытных группах, нормализация уровня тканевого дыхания — на 10-е в группе животных, облученных в дозе 0,5 Гр. Отмечается тенденция к повторному снижению следуемого показателя в обеих группах на 30-е сутки эксперимента, которая сменяется стимуляцией дыхательной активности через 40 дней после облучения. В группе с дозой облучения 0,5 Гр через 90 дней отмечена нормализация показателя Vэнд, а во второй опытной группе уровень эндогенного дыхания оставался повышенным по сравнению с контролем на 60-е и 90-е сутки эксперимента.

Исследование показало высокий уровень дыхательной активности фрагментов слизистой тонкого кишечника у животных контрольной группы, которая составила $10,08 \pm 2,07$ нмоль O₂/мин×мг белка (таблица 1). Кишечник относится к тканям с высокой скоростью пролиферации, основную массу клеток составляют цилиндрические клетки крипт и ворсинок, 50 % которых находятся в состоянии митоза, 30 % — созревают, остальная часть — зрелые клетки, которые по мере достижения верхушки ворсинки слущиваются в кишечное пространство [9]. Для постоянно делящихся клеток характерны интенсивное тканевое дыхание, высокая активность ферментов цикла Кребса, цитохромов, а также процессов синтеза ДНК и РНК. Анализ литературных данных показал, что митохондрии слизистой кишечника отличаются высокой эффективностью процесса окислительного фосфорилирования, поэтому кишечная слизистая по уровню тканевого дыхания близка к параметрам печени и миокарда [10]. Это объясняет высокий уровень эндогенного дыхания кишечника интактных животных. Необходимо также отметить, что исследование проводилось на тканевых фрагментах, окислительный метаболизм которых наиболее полно соответствует реальным условиям функционирования органа в целом. Кроме того, это свидетельствует в пользу

высокой интактности препарата, поскольку принято считать, что для препаратов с малыми механическими повреждениями характерно интенсивное эндогенное дыхание [11].

На 3-и сутки после радиационного воздействия отмечается достоверное снижение скорости эндогенного дыхания кишечника: с $10,08 \pm 2,07$ нмоль O₂/мин×мг белка в контроле до $5,60 \pm 1,62$ нмоль O₂/мин×мг белка при облучении животных в дозе 0,5 Гр, которое сменяется ее нормализацией на 10-е сутки. При более интенсивном радиационном воздействии: в дозе 1,0 Гр скорость дыхательной активности на эндогенных субстратах также уменьшается, но степень снижения менее выраженная ($6,46 \pm 0,92$ нмоль O₂/мин×мг белка).

Значительное и достоверное угнетение скорости эндогенного дыхания в ранние сроки после облучения в обеих группах облученных животных может быть связано, прежде всего, с уменьшением количества клеток слизистой кишечника, поскольку известно, что наиболее активно дышащие, криптогенные клетки кишечного эпителия обладают высокой радиочувствительностью, которая близка к таковой для стволовых кроветворных клеток [9]. Динамика пострадиационного изменения количества клеток кишечного эпителия складывается из первоначального уменьшения их количества (1–2-е сутки) и последующего восстановления в более поздние сроки наблюдения [9, 12, 13]. При радиационном воздействии в стенке кишечника животных резко стимулируются пероксидные процессы, в частности активируется аскорбат-зависимое перекисное окисление липидов (ПОЛ), которые сопровождаются образованием конечных продуктов перекисного окисления (малонового диальдегида) и снижением содержания фосфолипидов, нарушением целостности мембран и угнетением систем транспорта ионов. Примечательно, что максимальные сдвиги показателей ПОЛ наблюдаются на 3-и сутки после облучения [1].

Согласно литературным данным, размножаясь, количество клеток кишечного эпителия на 5-е сутки после облучения в два раза превышают норму, а к 10-м суткам количество клеток нормализуется [9]. Это хорошо согласуется с нашими экспериментальными данными, которые показывают, что у животных, облученных в дозе 0,5 Гр, на 10-е сутки происходит нормализация дыхательной активности, при этом показатель $V_{энд}$ практически соответствует контрольному значению — $10,53 \pm 2,48$ нмоль $O_2/мин \times мг$ белка (рисунок 1). В группе животных, облученных в дозе 1,0 Гр, на 10-е сутки наблюдается стимуляция дыхательной активности — с $10,08 \pm 2,07$ нмоль $O_2/мин \times мг$ белка в контроле до $14,87 \pm 3,84$ нмоль $O_2/мин \times мг$ белка (рисунок 1). Вероятно, это связа-

но с усилением репаративных процессов, с увеличением кровоснабжения и оксигенации кишечника в указанные сроки после облучения. Есть также все основания полагать, что при данном воздействии активируется фагоцитоз — процесс, обеспечивающий элиминацию погибших клеток и их отдельных структур. Фагоцитоз, как известно, сопровождается «респираторным взрывом» — резким (2-3-кратным) увеличением поглощения кислорода фагоцитирующими клетками [7].

Общая динамика уровня эндогенного дыхания слизистой кишечника (в % от контроля) представлена на графике (рисунок 1), который отражает немонотонный характер зависимости изучаемого параметра в различные сроки после облучения.

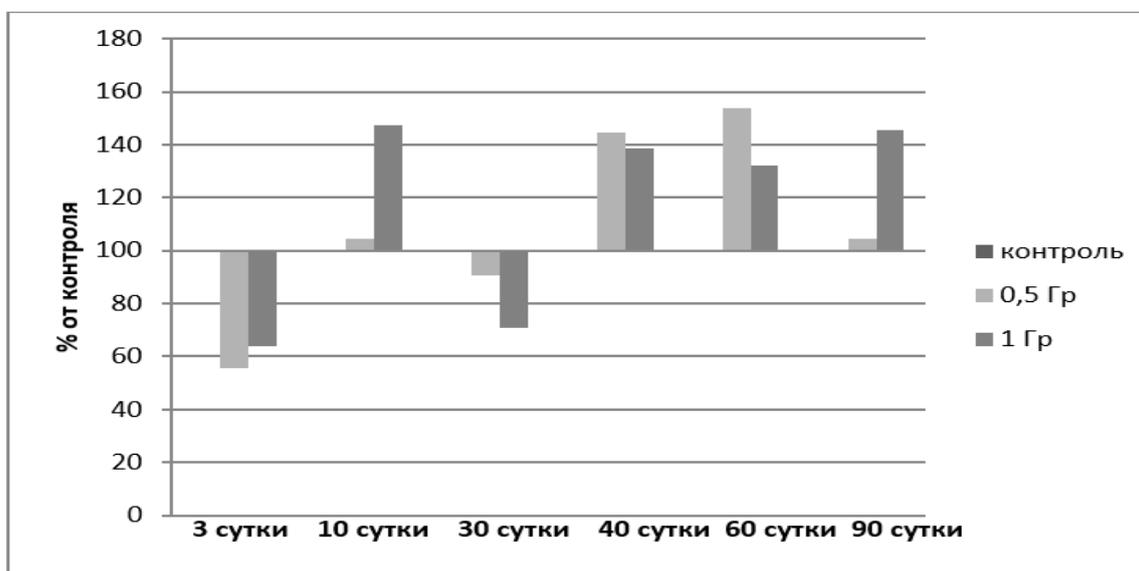


Рисунок 1. Динамика уровня эндогенного дыхания слизистой кишечника (в % от контроля)
 Figure 1. Dynamics in endogenous respiration of the intestinal mucosa (in % of control)

Вместе с тем, в последующие сроки наблюдения, на 30-е сутки, отмечается тенденция к повторному снижению уровня тканевого дыхания, величина $V_{энд}$ составила $9,13 \pm 1,25$ нмоль $O_2/мин \times мг$ белка и $7,16 \pm 1,19$ нмоль $O_2/мин \times мг$ белка соответственно для групп животных, облученных в дозах 0,5 и 1,0 Гр. Процессы восстановления популяции клеток крипты и ворсинок тонкого кишечника происходят за счет неповрежденных стволовых и так называемых полустволовых клеток [9, 12]. Ответной реакцией на ионизирующее излучение является задержка митозов в неповрежденных клетках и апоптоз с последующей элиминацией в поврежденных [14]. Показано, что апоптоз в кишечных клетках связан с высоким отношением белков BAX:Bcl-2. Данные белки также влияют на восприимчивость крипто-

генных клеток к p53-зависимому апоптозу в ответ на радиационно-индуцированное повреждение ДНК, что обеспечивает гомеостаз ткани и защищает ее от развития рака [15].

В более поздние сроки после облучения, на 40-е сутки в обеих опытных группах наблюдается достоверная стимуляция тканевого дыхания, исследуемый показатель составил $14,58 \pm 1,09$ нмоль $O_2/мин \times мг$ белка и $13,96 \pm 1,49$ нмоль $O_2/мин \times мг$ белка в группах с дозой облучения 0,5 и 1,0 Гр. Данная тенденция достигает максимума к 60-м суткам в группе, облученной в дозе 0,5 Гр ($15,49 \pm 3,27$ нмоль $O_2/мин \times мг$ белка) и нормализуется к 90-м. Во второй опытной группе повышенный уровень митохондриальной активности сохраняется как на 60-е, так и на 90-е сутки.

Заключение

Полученные данные подтверждают высокую чувствительность тонкого кишечника к радиационному воздействию. Наблюдаемые изменения уровня эндогенного дыхания с течением времени носят немонотонный характер: отмечено двухфазное увеличение показателя эндогенного дыхания — на 10-е и 40-е сутки. Вероятно, обнаруженные изменения дыхательной активности слизистой кишечника связаны с радиационно-индуцированным изменением агрегатного состоя-

ния и проницаемости клеточных, в том числе и митохондриальных мембран, а также изменением концентрации и количественного соотношения эндогенных субстратов тканевого дыхания. Наблюдаемые изменения в энергетическом статусе кишечной слизистой в сочетании с другими факторами риска могут формировать предпосылки для развития или усугубления патологии желудочно-кишечного тракта под действием ионизирующего облучения.

Список литературы / References

1. Хижняк С.В., Степанова Л.И., Грубская Л.В., Войццкий В.М. Функциональное состояние цепи переноса электронов митохондрий энтероцитов тонкого кишечника крыс после общего внешнего воздействия ионизирующей радиации низкой мощности дозы. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2013;53(6):592-597.

Khizhnyak SV, Stepanova LI, Grubskaya LV, Wojcicki VM. Functional state of the electron transfer chain of mitochondria of rat small intestine enterocytes after general external exposure to low-dose ionizing radiation. *Radiation biology. Radioecology*. 2013;53(6):592-597. (In Russ.).

2. Zhirnov VV, Khizhnyak SV, Voitsitskiy VM. The effects of ultra-low dose β -radiation on the physical properties of human erythrocyte membranes. *International Journal of Radiation Biology*. 2010;86(6):499-506.

DOI: <https://doi.org/10.3109/09553001003717167>

3. Хижняк С.В., Прохорова А.А., Степанова Л.И., Войццкий В.М. Функционирование антиоксидантной системы в клетках эпителия тонкого кишечника при действии ионизирующей радиации с низкой мощностью дозы. *Радиационная биология. Радиоэкология*. 2011;51(6):684-688.

Khizhnyak SV, Prokhorova AA, Stepanova LI, Wojcicki VM. Functioning of the antioxidant system in the epithelial cells of the small intestine under the action of ionizing radiation with a low dose rate. *Radiation biology. Radioecology*. 2011;51(6):684-688. (In Russ.).

4. Грицук А.И., Мрочек А.Г. Цезий, митохондрии и проблемы кардиологии. *Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук*. 2008;(4):63-76.

Gritsuk AI, Mrochek AG. Caesium, mitochondria and problems of cardiology. *Vesci NAS Belarussi. Ser. med. navuk*. 2008;(4):63-76. (In Russ.).

5. Грицук Н.А. Митохондриальное окисление в кардиомиоцитах и электрокардиографические показатели у крыс при инкорпорации ^{137}Cs . *Весті НАН Беларусі. Сер. мед. навук*. 2009;(3):63-67.

Gritsuk NA. Mitochondrial oxidation in cardiomyocytes and electrocardiographic parameters in rats during incorporation of ^{137}Cs . *Vesci NAS Belarussi. Ser. med. navuk*. 2009;(3):63-67. (In Russ.).

6. Яськова Н.С. Изменения энергетического обмена тонкого кишечника на десятые сутки после гамма-облучения. *Проблемы здоровья и экологии*. 2007;(4):141-145.

DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2007-4-4-31>

Yaskova NS. Changes in the energy metabolism of the small intestine on the tenth day after gamma irradiation. *Health*

and Ecology Issues. 2007;(4):141-145. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2007-4-4-31>

7. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002 Jan;82(1):47-95.

DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>

8. Франк Г.М. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. Москва, РФ: Наука; 1973.

Frank GM. Guidelines for the study of biological oxidation by polarographic method. Moscow, RF: Nauka; 1973. (In Russ.).

9. Chwalinski S, Potten CS. Radiation-induced mitotic delay: duration, dose and cell position dependence in the crypts of the small intestine in the mouse. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1986 May; 49(5):809-819.

DOI: <https://doi.org/10.1080/09553008514553011>

10. Ugolev AM, Zaripov BZ, Jesuitova NN, Gruzdkov AA, Rybin IS, Voloshenovich MI, et al. A revision of current data and views on membrane hydrolysis and transport in the mammalian small intestine based on a comparison of techniques of chronic and acute experiments: Experimental re-investigation and critical review. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Physiology*. 1986;85(4):593-612.

DOI: [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(86\)90269-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(86)90269-0)

11. Мохова Е.Н. Дыхание митохондрий в тканевых препаратах. Регуляция энергетического обмена и физиологическое состояние организма. Москва, РФ: Наука; 1978.

Mokhova EN. Mitochondrial respiration in tissue preparations. Regulation of energy metabolism and the physiological state of the body. Moscow, RF: Nauka; 1978. (In Russ.).

12. Martin K, Potten CS, Roberts SA, Kirkwood TB. Altered stem cell regeneration in irradiated intestinal crypts of senescent mice. *J Cell Sci*. 1998 Aug;111(16):2297-2303.

DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.111.16.2297>

13. Potten CS, Owen G, Roberts SA. The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *Int J Radiat Biol*. 1990 Jan;57(1):185-199.

DOI: <https://doi.org/10.1080/09553009014550431>

14. Lindsay KJ, Coates PJ, Lorimore SA, Wright EG. The genetic basis of tissue responses to ionizing radiation. *Br J Radiol*. 2007 Sep;80(1):2-6.

DOI: <https://doi.org/10.1259/bjr/60507340>

15. Potten CS, Wilson JW, Booth C. Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium. *Stem Cells*. 1997;15(2):82-93.

DOI: <https://doi.org/10.1002/stem.150082>

Информация об авторе / Information about author

Мышкова Надежда Сергеевна, преподаватель кафедры биологической химии, УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2713-9438>

e-mail: jasjan@mail.ru

Nadeja S. Myshkavets, Lecturer at the Department of Biological Chemistry, Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2713-9438>

e-mail: jasjan@mail.ru

Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Мышковац Надежда Сергеевна
e-mail: jasjan@mail.ru

Nadeja S. Myshkavets
e-mail: jasjan@mail.ru

Поступила в редакцию / Received 19.01.2023

Поступила после рецензирования / Accepted 07.04.2023

Принята к публикации / Revised 30.05.2023