

УДК 577.346+546.48/576.311.347:577.115.3

С. В. Хижняк<sup>1</sup>✉, Л. К. Бездробна<sup>2</sup>, Л. І. Степанова<sup>3</sup>, В. С. Морозова<sup>1</sup>, В. М. Войціцький<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Державна установа “Національний науковий центр радіаційної медицини Національної академії медичних наук України”, вул. Мельникова, 53, м. Київ, 04050, Україна

<sup>2</sup>Інститут ядерних досліджень НАН України, пр-т Науки, 47, м. Київ, 03680, Україна

<sup>3</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 60, м. Київ, 01033, Україна

## **ОКИСНЕ ФОСФОРИЛЮВАННЯ В МІТОХОНДРІЯХ ЕНТЕРОЦИТІВ ТОНКОЇ КИШКИ ЗА ХРОНІЧНОЇ ТА РАЗОВОЇ ДІЇ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ НИЗЬКОЇ ПОТУЖНОСТІ**

**Мета роботи** – дослідження інтенсивності дихання та фосфорилювання в мітохондріях ентероцитів тонкої кишки щурів за хронічної та разової дії іонізуючого випромінювання низької потужності.

**Матеріали та методи досліджень.** Разове опромінення щурів рентгенівськими променями проводили на установці РУМ-17 (за потужності дози 0,055 Гр/хв) для отримання поглинених доз 0,1; 0,5 та 1,0 Гр. Функціональний стан мітохондрій оцінювали через 1 та 24 год після опромінення. Хронічне зовнішнє  $\gamma$ -опромінення (потужність дози 0,72 сГр/хв, до досягнення сумарної дози 0,3; 0,6 та 1,0 Гр) проводили на установці “ЕТАЛОН”, яка містила <sup>60</sup>Со. Інтенсивність дихальної та фосфорилуючої активності мітохондрій ентероцитів тонкої кишки оцінювали полярографічним методом.

**Результати.** Використання малату в якості екзогенного субстрату дозволило оцінити функціонування усіх ділянок електрон-транспортного ланцюга мітохондрій в умовах експерименту. Встановлено зростання інтенсивності дихання мітохондрій за всіх умов та термінів дослідження як реакція на опромінення. За хронічної дії іонізуючого опромінення проявляється часткове роз'єднання процесів спряження окислення та фосфорилювання, про що свідчить зниження величин показників ДК і АДФ/О, та зменшення ефективності фосфорилювання (зниження величини  $V_f$ ). За разового опромінення роз'єднання процесів спряження окислення та фосфорилювання не супроводжується змінами показника окисного фосфорилювання, однак характеризується зниженням величини відношення  $V_4^S/V_4^{ATP}$ .

**Висновки.** Результати проведених досліджень свідчать, що разова та хронічна дія іонізуючої радіації низької потужності призводить до зростання інтенсивності дихання та порушення процесу окисного фосфорилювання, внаслідок роз'єднання процесів спряження окислення та фосфорилювання. Причому, за хронічної дії іонізуючої радіації отримані зміни супроводжується пригніченням утворення АТФ із АДФ та  $F_n$ , оскільки не спостерігається змін АТФ-гідролізної активності мітохондрій. Виявлені функціональні порушення роботи мітохондрій ентероцитів за іонізуючої радіації можуть бути пов'язані зі структурно-функціональними змінами самого дихального ланцюга, активності як ферментів електрон-транспортного ланцюга, так і  $H^+$ -АТФази. Дія іонізуючої радіації низької потужності може призводити до порушення біоенергетичних функцій мітохондрій – одного з найбільш ранніх проявів клітинної дисфункції.

**Ключові слова:** іонізуюча радіація, низька потужність, разове та хронічне опромінення, мітохондрії, дихальний ланцюг, окисне фосфорилювання.

*Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2014. Вип. 19. С. 482–489.*

✉ Хижняк Світлана Володимирівна, e-mail: svetavh@mail.ru

S. V. Khyzhnyak<sup>1</sup>✉, L. K. Bezdobna<sup>2</sup>, L. I. Stepanova<sup>3</sup>, V. S. Morozova<sup>1</sup>, V. M. Voitsitskiy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Institution “National Research Center for Radiation Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Melnykov str., 53, Kyiv, 04050, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Nuclear Research of National Academy of Sciences of Ukraine, prospekt Nauky, 47, Kyiv, 03680, Ukraine

<sup>3</sup>Taras Shevchenko National University of Kyiv, Volodymyrska st., 60, Kyiv, 01033, Ukraine

## Oxidative phosphorylation in mitochondria of small-intestinal enterocytes at chronic and single exposure to low power ionizing radiation

**Objective** – to investigate the intensity of oxidation and phosphorylation processes in the small intestine enterocytes mitochondria of the rats under chronic and single exposure to ionizing radiation of low power.

**Materials and methods.** The single irradiation of the rats with X-rays was performed using the RUM-17 equipment (at the dose of 0.055 Gy/min) for absorbed doses of 0.1; 0.5 and 1.0 Gy. The functional state of mitochondria was evaluated in 1 h and 24 h after irradiation. The chronic external  $\gamma$ -irradiation (at the dose rate of 0.72 cGy/min to achieve a total dose of 0.3; 0.6 and 1.0 Gy was performed using the “Etalon” equipment which contained <sup>60</sup>Co. The intensity of the oxidation and phosphorylation activity of the small intestine enterocytes mitochondria was assessed by the polarographic method.

**Results.** The use of malate as exogenous substrate allowed to assess the functioning of all areas of the electron transport chain of mitochondria in experimental conditions. The increase in the intensity of mitochondrial respiration was found in all conditions and terms of research in response to irradiation. In chronic ionizing radiation appears partial separation of interface processes of oxidation and phosphorylation, as evidenced by the decrease in value of the index control and ADP / O and reducing efficiency phosphorylation (decrease of value  $V_f$ ). For single exposure disconnection of coupling processes oxidation and phosphorylation were not accompanied by changes in the index of oxidative phosphorylation, however, was characterized by reduced ratio  $V_4^S/V_4^{ATP}$ .

**Conclusions.** Single and chronic exposure to low power of ionizing radiation leads to an increase in intensity of respiration and disruption of oxidative phosphorylation as a result of separation of interface processes of oxidation and phosphorylation. In chronic exposure received changes were accompanied by inhibition of ATP from ADP and  $F_N$  because no change of ATP hydrolase activity of mitochondria was noticed. The identified functional disruption of enterocytes mitochondria by ionizing radiation may be associated with structural and functional changes of the respiratory chain, activity both enzymes of electron transport chain and  $H^+$ -ATPase. Effects of ionizing radiation of low power can lead to disruption of mitochondrial bioenergetic function – one of the earliest manifestations of cellular dysfunction.

**Key words:** ionizing radiation, low power, single and chronic exposure, mitochondria, electron transport chain.

*Problems of radiation medicine and radiobiology. 2014;19:482-489.*

### ВСТУП

Перетворення енергії в клітині є одним з найважливіших чинників, що визначають життєдіяльність клітин. Енергетичне забезпечення всмоктування та гідролізу харчових продуктів в тонкій кишці головним чином здійснюється мітохондріями. Порушення функціонування мітохондрій може бути одним з визначальних механізмів, за якими реалізується уражувачий ефект різних факторів [1–3].

Враховуючи той факт, що в умовах сьогодення живі організми зазнають постійного впливу опромінення низької потужності, особливу увагу привертає вивчення енергетичного стану мітохондрій за тривалої дії іонізуючого випромінювання [4], у тому числі низької потужності [5].

### INTRODUCTION

The transformation of energy in the cell is one of the most important factors that determine the cells activity. The energy supply of the absorption and hydrolysis of food in the small intestine is mainly carried out by the mitochondria. The mitochondria dysfunction may be one of the key mechanisms by which the striking effect of various factors is realized [1–3].

Considering the fact that under present conditions the living organisms are exposed to the regular action of the radiation of low power, the study of the energy state of mitochondria by prolonged radiation exposure is of the most interest [4], including the ionizing radiation of low power [5].

Мета даної роботи полягала в дослідженні інтенсивності дихання та фосфорилування в мітохондріях ентероцитів тонкої кишки щурів за хронічної та разової дії іонізуючого випромінювання низької потужності.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях, що знаходились у стаціонарних умовах віварію. В кожній групі було вісім тварин. Експерименти проводились у відповідності до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

#### *Експеримент з хронічним опроміненням*

Тварин піддавали зовнішньому  $\gamma$ -опроміненню з потужністю дози 0,72 сГр/хв на установці "ЕТАЛОН", яка містила  $^{60}\text{Co}$  (Інститут ядерних досліджень НАН України). В залежності від тривалості терміну дослідження експериментальних тварин розподіляли на групи: К1 – контрольна; 1-ша група – тривалість дослідження 42 доби (сумарно поглинута доза 0,3 Гр); 2-га група – тривалість дослідження 84 доби (сумарно поглинута доза 0,6 Гр); 3-тя група – 145 діб (сумарно поглинута доза 1,0 Гр). Щурів декапітували після закінчення експерименту.

#### *Експеримент з гострим опроміненням*

Щурів опромінювали рентгенівськими променями на установці РУМ-17 за наступних умов: потужність дози 0,055 Гр/хв, фільтр 0,5 мм Cu та 1 мм Al, сила струму 5 мА, напруга 200 кВ, шкірно-фокусна відстань – 100 см. Експериментальні тварини були розподілені на групи відповідно до умов дослідження: К2 – контрольна; 4-та група – опромінення в дозі 0,1 Гр; 5-та група – опромінення в дозі 0,5 Гр; 6-та група – опромінення в дозі 1,0 Гр. Тварин декапітували через 1 та 24 год після опромінення.

Мітохондрії ентероцитів слизової оболонки тонкої кишки отримували за допомогою диференційного центрифугування згідно з [6]. Основною характеристикою функціонування мітохондрій є ефективність окисного фосфорилування. Інтенсивність дихальної та фосфорилуючої активності мітохондрій ентероцитів тонкої кишки оцінювали за зміною кількості  $\text{O}_2$  полярографічним методом, використовуючи в якості субстрату окислення малат. За отриманими полярограмами ідентифікували енергетичний стан мітохондрій за Чансом [7] і розраховували швидкість дихання в цих станах:  $V_4^S$  – інтенсивність дихання в стані 2 (до мітохондрій доданий екзогенний субстрат, але немає акцептору фосфату);  $V_3$  – інтен-

Purpose of this work was to investigate the intensity of oxidation and phosphorylation processes in the small intestine enterocytes mitochondria of the rats under chronic and single exposure to ionizing radiation of low power.

### MATERIALS AND METHODS

The study was conducted on white mongrel male rats that were kept at the standard vivarium conditions. The experiments were conducted in accordance with the Council of Europe Convention for the protection of vertebrate animals that were used for scientific purposes.

#### *The experiment with the chronic radiation*

Animals were exposed to external  $\gamma$ -irradiation at the dose rate of 0.72 cGy/min using the "Etalon" equipment which contained  $^{60}\text{Co}$  (Kiev Institute for Nuclear Research of NAS of Ukraine). Depending on the duration of the study experimental animals were divided into groups: group C1 is control; group 1 is study duration of 42 days (a total absorbed dose of 0.3 Gy); group 2 is study duration of 84 days (a total absorbed dose of 0.6 Gy); group 3 is 145 days (a total absorbed dose of 1.0 Gy). The rats were decapitated at the end of the experiment.

#### *The experiment with the single irradiation*

Rats were irradiated with X-rays using the RUM-17 equipment under the following conditions: the dose rate of 0.055 Gy/min, filter of 0.5 mm Cu and 1 mm Al, amperage of 5 mA, voltage of 200 kV, skin-focus distance of 100 cm. The experimental animals were divided into groups according to the research conditions: group C2 was control; group 4, 5 and 6 were irradiated at doses of 0.1 Gy, 0.5 Gy and 1.0 Gy respectively. The animals were decapitated in 1, 12 and 24 h after irradiation.

The small intestine enterocytes mitochondria were obtained by the differential centrifugation method [6]. The main characteristic of the mitochondria functioning is the oxidative phosphorylation efficiency. The intensity of the oxidation and phosphorylation activity of the small intestine enterocytes mitochondria was assessed by the change in the amount of  $\text{O}_2$  by polarographic method, using oxidation substrates of malate and succinate. With help of the obtained polarograms the energy state of mitochondria was identified by Chance [7] and the oxygen consumption in these states was calculated:  $V_4^S$ , the respiration rate in the state 2 (exogenous substrate is added, but there was no phosphate

сивність дихання в стані 3 (мітохондрії з субстратом окислення і АДФ);  $V_4^{ATP}$  – інтенсивність дихання в стані 4 (в системі вичерпується доданий акцептор фосфату, але концентрація субстратів окислення продовжує залишатися високою);  $V_f$  – швидкість фосфорилування мітохондрій; ДК – дихальний контроль ( $V_3/V_4^{ATP}$ ); АДФ/О – ефективність фосфорилування доданого АДФ, що відповідає коефіцієнту P/O;  $V_4^S/V_4^{ATP}$  – характеризує активність АТФ-гідролазних реакцій. Як субстрат окислення використовували малат (кінцева концентрація 10 мМ). Акцептором фосфору слугував АДФ (200 мкМ), роз'єднувачем дихання та фосфорилування – 2,4-динітрофенол (100 мкМ).

Експериментальні дані обробляли загальноприйнятими методами статистики. Розраховували значення середньоарифметичних величин (M), їх середньоарифметичне відхилення (m) і помилку середнього ( $\sigma$ ). Розрахунки і побудову графіків проводили за допомогою пакетів програм Microsoft Excel v.2007 і Origin 6.0. Достовірність відмінностей між показниками дослідної та контрольної груп оцінювали за t-критерієм Ст'юдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Використання малату в якості екзогенного субстрату дозволяє оцінити функціонування усіх ділянок електрон-транспортного ланцюга мітохондрій в умовах експерименту. Результати проведених досліджень свідчать, що за хронічної дії іонізуючої радіації (зі зростанням терміну опромінення від 42 до 145 діб) підвищується швидкість дихання в станах 2 та 4 відповідно на 40–90 % та 60–80 % відносно контролю. Водночас, величина показника швидкості в стані 3 знижується в середньому на 16 % відносно контролю. Встановлено пригнічення фосфорилуючої активності мітохондрій ентероцитів: величина показника  $V_f$  знижується на 30 та 46 % відповідно через 84 та 145 діб впливу іонізуючої радіації (табл. 1). Виявлено зниження коефіцієнту дихального контролю (ДК) за дії іонізуючого випромінювання протягом 42, 84 та 145 діб відповідно на 43, 51 та 54 %, а також величини АДФ/О через 84 та 145 діб відповідно на 27 та 41 % відносно контролю (табл. 1).

Отримані дані свідчать, що за хронічної дії іонізуючого випромінювання низької потужності (сумарна поглинута доза від 0,3 до 1,0 Гр) відбуваються порушення роботи електрон-транспортного ланцюга, про що свідчать зміни інтенсив-

acceptor);  $V_3$ , the respiration rate in the state 3 (in the present of the oxidation substrate and ADP);  $V_4^{ATP}$ , the respiration rate in the state 4 (the phosphate acceptor was exhausted, but the substrate concentration was still high);  $V_p$ , the phosphorylation rate of mitochondria; RCI, the respiratory control index ( $V_3/V_4^{ATP}$ ); ADP/O, the phosphorylation efficient of added ADP, which corresponds to the P/O ratio;  $V_4^S/V_4^{ATP}$  described the activity of ATP-hydrolase reactions. As oxidation substrates malate and succinate were used (final concentration 10 mM). The phosphorus acceptor was ADP (200 mkM), the uncoupler of oxidation and phosphorylation was 2,4-dinitrophenol (100 mkM).

The experimental data were processed by the generally accepted methods of the variation statistics. Values of the arithmetic mean (M), their arithmetic mean deviation (m) and the average error (s) were calculated. Calculations and graphing was performed using the software package Microsoft Excel v.2007 and Origin 6.0. Significant statistical differences between control and experimental groups were evaluated using the unpaired Student's t-test.

## RESULTS AND DISCUSSION

Using the malate as exogenous substrate allows to evaluate the functioning of all sections of the electron transport chain in mitochondria under the experimental conditions. Results of the research shows that at the chronic exposure to ionizing radiation the respiration rate in the state 2 and 4 increases by 40–90 % and 60–80 % respectively (with the increasing of exposure duration from 42 to 145 days) relatively to the control values. Simultaneously, the value of the rate parameter in the state 3 is reduced on average by 16 % relatively to the control value. The phosphorylation activity of the enterocytes mitochondria decreases: the value of the  $V_p$  parameter is reduced by 30 and 46 % respectively in 84 days and 145 days under the ionizing radiation influence (Table 1). The decrease of the respiratory control index (RCI) under the ionizing radiation influence during 42, 84 and 145 days by 43, 51 and 54 % respectively, and the reducing of the ADP/O value in 84 and 145 days respectively by 27 and 41 % relatively to the control values were registered (Table 1).

The obtained results suggest that under the chronic ionizing radiation of low power (total absorbed dose from 0.3 Gy to 1.0 Gy) the dysfunction of the electron transport chain is occurred, that is evidenced by the changes in the intensity of

ності дихання та фосфорилування мітохондрій ентероцитів тонкої кишки. Причому, зростання  $V_4^{ATP}$  може свідчити про підвищення проникності мембран мітохондрій для іонів, особливо для іонів водню, які створюють  $\Delta\mu_{H^+}$  [8]. Інформативними параметрами є показники  $V_\phi$ , ДК і АДФ/О, які зазнають суттєвого зниження за опромінення в сумарно поглинутій дозі 0,6 Гр (84 доби) та 1,0 Гр (145 діб). Тобто відмічається порушення фосфорилуючої активності мітохондрій ентероцитів тонкої кишки. Оскільки відношення  $V_4^S/V_4^{ATP}$ , яке визначає активність АТФ-гідролазної реакції за даних умов не змінюється, це, в свою чергу, може свідчити, що основний внесок в реалізацію дії іонізуючої радіації на інтенсивність фосфорилування мітохондрій вносить пригнічення процесу спряження окислення та фосфорилування, а не зміни ферментативної активності  $H^+$ -АТФази.

Зростання інтенсивності дихання мітохондрій ентероцитів тонкої кишки спостерігається уже за ранніх термінів експерименту, що розглядається як реакція мітохондрій на опромінення. Збільшення тривалості хронічного дослідження призводить до подальших порушень функціонування мітохондрій і це стосується інтенсивності дихання та спряження процесу окисного фосфорилування, як зміни швидкості окислення та фосфорилування.

the oxidation and phosphorylation processes of the small intestine enterocytes mitochondria. Moreover, the increase of the  $V_4^{ATP}$  parameter may indicate the increased permeability of mitochondrial membranes to ions, especially hydrogen ions that create  $\Delta\mu_{H^+}$  [8]. The  $V_\phi$ , RCI and ADP/O are informative indices being decreased significantly under irradiation at the total absorbed dose of 0.6 Gy (84 days) and 1.0 Gy (145 days). I.e. there are serious deviations of the phosphorylation activity of the small intestine enterocytes mitochondria. At the same time, the  $V_4^S/V_4^{ATP}$  ratio that defines the activity of the ATP-hydrolase reaction does not change under these conditions. This, in turn, may testify that the inhibition of the coupling of the oxidation and phosphorylation makes the main contribution to the effect of ionizing radiation on the intensity of mitochondria phosphorylation, rather than changes in the enzyme activity of  $H^+$ -ATPase.

The increase of respiration intensity of the small intestine enterocyte mitochondria has been already observed in the early stages. This may be interpreted as mitochondria response to irradiation. The prolongation of chronic experiment leads to further deviations of mitochondria functioning. The last is true for breach of the coupling of the oxidative phosphorylation processes and the changes in respiration intensity and oxidation and phosphorylation rate.

**Таблиця 1**

**Інтенсивність дихальної та фосфорилуючої активності мітохондрій ентероцитів тонкої кишки за хронічної дії іонізуючої радіації,  $M \pm m$ ,  $n = 8$**

**Table 1**

**The intensity of the oxidation and phosphorilation activity of the small intestine enterocytes mitochondria under the chronic ionizing radiation,  $M \pm m$ ,  $n = 8$**

Показники Indices	K1 (контроль) C1 (Control)	Група / Group 1	Група / Group 2	Група / Group 3
		опромінення в дозі 0,3 Гр 0.3 Gy total absorbed dose	опромінення в дозі 0,6 Гр 0.6 Gy total absorbed dose	опромінення в дозі 1,0 Гр 1 Gy total absorbed dose
$V_4^S$	0,010 ± 0,001	0,014 ± 0,002*	0,015 ± 0,003*	0,019 ± 0,003*
$V_3$	0,034 ± 0,003	0,028 ± 0,002*	0,029 ± 0,002*	0,028 ± 0,003*
$V_4^{ATP} / V_4^{ATP}$	0,010 ± 0,001	0,016 ± 0,001*	0,017 ± 0,002*	0,018 ± 0,004*
$V_\phi / V_\phi$	0,096 ± 0,007	0,090 ± 0,005	0,067 ± 0,004*	0,052 ± 0,003*
ДК / RCI	3,40 ± 0,13	1,75 ± 0,14*	1,65 ± 0,13*	1,56 ± 0,13*
АДФ/О // ADP/O	2,58 ± 0,18	2,44 ± 0,14	1,89 ± 0,12*	1,53 ± 0,09*
$V_4^S/V_4^{ATP}$ // $V_4^S/V_4^{ATP}$	0,90 ± 0,05	0,88 ± 0,04	0,89 ± 0,05	1,01 ± 0,04

Примітка.  $V_4^S$  – інтенсивність дихання в стані 2;  $V_3$  – інтенсивність дихання в стані 3;  $V_4^{ATP}$  – інтенсивність дихання в стані 4;  $V_\phi$  – швидкість фосфорилування мітохондрій; ДК – дихальний контроль ( $V_3/V_4^{ATP}$ ); АДФ/О – ефективність фосфорилування доданого АДФ;  $V_4^S/V_4^{ATP}$  – характеризує активність АТФ-гідролазних реакцій.

\* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю.

Note.  $V_4^S$ , the respiration rate in the state 2;  $V_3$ , the respiration rate in the state 3;  $V_4^{ATP}$ , the respiration rate in the state 4;  $V_\phi$ , the phosphorylation rate of mitochondria; RCI, the respiratory control index ( $V_3/V_4^{ATP}$ ); ADP/O, the phosphorylation efficient of added ADP;  $V_4^S/V_4^{ATP}$  describes the activity of ATP-hydrolase reactions.

\* –  $p \leq 0,05$  relatively to the control values.

Дослідження інтенсивності дихальної та фосфорилюючої активності мітохондрій ентероцитів тонкої кишки за разової дії іонізуючої радіації низької потужності показало наступне. Встановлено (табл. 2), що в умовах проведення експерименту при використанні малату як субстрату дихання, величина показника  $V_4^S$  в ранній термін після опромінення (1 год) вірогідно не змінюється, водночас через 24 год після опромінення спостерігається збільшення показника  $V_4^S$  в середньому від 55 до 91 % зі зростанням дози опромінення (від 0,1 до 1,0 Гр). Подібна тенденція спостерігається і у зміні швидкості дихання в стані 3, зростання величини показника  $V_3$  через 24 год після опромінення у досліджуваних дозах становить 20–35 %. Інтенсивність дихання в стані 4 ( $V_4^{ATP}$ ) зростає в середньому на 58 % відносно контролю через 1 год після опромінення, а через 24 год – це зростання становить у середньому 2 рази.

В умовах експерименту швидкість фосфорилування ( $V_\Phi$ ) практично не змінюється (табл. 2). Водночас, спостерігається зменшення величини ДК в середньому на 38 та 50 % відповідно за опромінення в дозах 0,1; 0,5 та 1,0 Гр незалежно від терміну після опромінення (1 чи 24 год). Значення коефіцієнту АДФ/О вірогідно знижується на 59 та 28 % через 1 та 24 год за опромінення в дозі 1,0 Гр. Зниження вели-

The study of the respiration and phosphorylation activity of the small intestine enterocytes mitochondria under a single exposure to ionizing radiation of low power showed the following results. It was found (Table 2) that under conditions of the experiment using the malate as oxidation substrate the  $V_4^S$  value early after radiation (1 h) does not change significantly, while in 24 h after the radiation impact the increase of  $V_4^S$  value on average by 55 to 91 % with the dose increasing (from 0.1 to 1 Gy) is observed. A similar trend is observed in the change in the respiration rate in the state 3, the increase of the  $V_3$  parameter in 24 h after irradiation is 20–35 %. The respiration rate in the state 4 ( $V_4^{ATP}$ ) increases on average by 58 % relatively to control value in 1 h after irradiation, and in 24 hours this rising is on average 2 times.

In the experiment conditions the phosphorylation rate ( $V_\Phi$ ) does not change significantly (Table. 2). However, the RCI value decreases on average by 38 and 50 % respectively under the irradiation at the doses of 0.1, 0.5 and 1.0 Gy irrespective to the time after irradiation (1 or 24 h). The value of the ADP/O coefficient significantly reduces by 59 and 28 % in 1 h and 24 h after the irradiation at the

**Таблиця 2**

**Інтенсивність дихальної та фосфорилюючої активності мітохондрій ентероцитів тонкої кишки за разової дії іонізуючої радіації,  $M \pm m$ ,  $n = 7-8$**

**Table 2**

**The intensity of the oxidation and phosphorylation activity of the small intestine enterocytes mitochondria under a single ionizing radiation,  $M \pm m$ ,  $n = 7-8$**

Показники Indices	K1 (контроль) C1 (Control)	Група / Group 1	Група / Group 2	Група / Group 3
		опромінення в дозі 0,3 Гр 0.3 Gy total absorbed dose	опромінення в дозі 0,6 Гр 0.6 Gy total absorbed dose	опромінення в дозі 1,0 Гр 1 Gy total absorbed dose
$V_4^S$	0,011 ± 0,002	а) 0,010 ± 0,002 б) 0,017 ± 0,003*	а) 0,009 ± 0,002 б) 0,019 ± 0,003*	а) 0,014 ± 0,002 б) 0,021 ± 0,002*
$V_3$	0,034 ± 0,003	а) 0,035 ± 0,003 б) 0,042 ± 0,004*	а) 0,037 ± 0,002 б) 0,041 ± 0,004	а) 0,040 ± 0,003 б) 0,046 ± 0,004*
$V_4^{ATP} / V_4^{ATP}$	0,012 ± 0,002	а) 0,018 ± 0,002* б) 0,020 ± 0,002*	а) 0,019 ± 0,002* б) 0,024 ± 0,003*	а) 0,022 ± 0,003* б) 0,027 ± 0,003*
$V_\Phi / V_\Phi$	0,110 ± 0,008	а) 0,090 ± 0,007 б) 0,097 ± 0,006	а) 0,091 ± 0,008 б) 0,12 ± 0,009	а) 0,088 ± 0,006* б) 0,100 ± 0,008
ДК / RCI	3,4 ± 0,20	а) 2,09 ± 0,21* б) 2,10 ± 0,24*	а) 1,60 ± 0,22* б) 1,83 ± 0,17*	а) 1,82 ± 0,26* б) 1,70 ± 0,18*
АДФ/О // ADP/O	2,58 ± 0,19	а) 2,56 ± 0,21 б) 2,55 ± 0,26	а) 1,96 ± 0,20* б) 2,42 ± 0,26	а) 1,71 ± 0,16* б) 1,96 ± 0,21*
$V_4^S / V_4^{ATP} // V_4^S / V_4^{ATP}$	0,92 ± 0,08	а) 0,56 ± 0,04* б) 0,85 ± 0,08	а) 0,47 ± 0,05* б) 0,79 ± 0,14	а) 0,64 ± 0,05* б) 0,78 ± 0,10

Примітка. Позначення як на рис. 1; а) та б) відповідно - 1 та 24 год після разової дії іонізуючої радіації.

Note. Legend as in Table 1; a) and b), respectively, in 1 and 24 h after a single exposure to ionizing radiation.

чин показників ДК та АДФ/О свідчить про порушення процесу спряження окиснення та фосфорилування. Водночас, відношення  $V_4^S/V_4^{ATP}$  достовірно зменшується через 1 год після опромінення в середньому на 39 % в умовах опромінення при усіх досліджуваних дозах.

Отримані дані свідчать, що разова дія іонізуючого випромінювання низької потужності (від 0,1 до 1,0 Гр) характеризується додозалежним порушенням роботи електрон-транспортного ланцюга мітохондрій ентероцитів тонкої кишки. Зростання інтенсивності дихання мітохондрій ентероцитів тонкої кишки спостерігається уже за ранніх термінів експерименту. Зниження величини показника ДК та коефіцієнта АДФ/О, зі зростанням дози опромінення, свідчить про порушення процесу спряження окиснення та фосфорилування, що пов'язано з порушеннями транспорту електронів і протонів у дихальному ланцюзі, які можуть бути обумовлені зміною активності ферментів дихального ланцюга чи процесу переносу електронів від субстратів окиснення внаслідок структурних змін в дихальному ланцюзі [9]. Слід відмітити, що зменшення коефіцієнту  $V_4^S/V_4^{ATP}$  в ранні терміни після опромінення, вказує на пригнічення АТФ-гідролазної активності мітохондрій тонкої кишки і може бути пов'язано зі структурними перебудовами ферменту  $H^+$ -АТФази.

## ВИСНОВОК

Результати проведених досліджень свідчать, що разова та хронічна дія іонізуючої радіації низької потужності призводить до зростання інтенсивності дихання та порушення процесу окисного фосфорилування, що визначається в першу чергу роз'єднанням процесів спряження окиснення та фосфорилування. Причому, з підвищенням дози опромінення зміни досліджуваних параметрів поглиблюються. За хронічної дії іонізуючої радіації пригнічення процесу окисного фосфорилування ймовірно обумовлюється зменшенням утворення АТФ із АДФ та  $P_n$ , оскільки не спостерігається змін АТФ-гідролазної активності мітохондрій. Виявлені порушення процесу спряження окисного фосфорилування в мітохондріях ентероцитів за разової дії опромінення можуть свідчити як про пошкодження електрон-транспортного ланцюга за рахунок пошкодження певних ділянок цього ланцюга чи порушень роботи оксидоредуктаз, так і про структурні перебудови ферменту  $H^+$ -АТФази. Дія іонізуючої радіації низької потужності може призводити до порушення біоенергетичних функцій мітохондрій – одного з найбільш ранніх проявів клітинної дисфункції.

dose of 1.0 Gy. The decrease of the RCI and ADP/O values indicates a disruption of the coupling of the oxidation and phosphorylation processes. At the same time, the  $V_4^S/V_4^{ATP}$  ratio reduces in 1 h after irradiation on average by 39 % in the irradiation conditions at all studied doses.

The obtained results indicate that the effect of single exposure to ionizing radiation of low power (0.1 to 1.0 Gy) is characterized by a dose-dependent deviation of electron transport chain of the small intestine enterocytes mitochondria. The increase of respiration intensity there was observed just at the early stages of experiment. The reducing of the RCI and ADP/O values with radiation dose increase indicates a disruption of the coupling of oxidation and phosphorylation processes, which is associated with interruption of the electron and proton transport in respiratory chain. This interruption may be caused by the changes in enzyme activity of the respiratory chain or by the changes in electron transfer process from oxidation substrates due to structural changes in respiratory chain [9]. It should be noted that the reduction of the  $V_4^S/V_4^{ATP}$  coefficient at the early stages after irradiation indicates the inhibition of the ATP-hydrolase activity of the small intestine enterocytes mitochondria and may be associated with the structural alterations of the  $H^+$ -ATP-ase enzyme.

## CONCLUSIONS

The results of the research show that the single and chronic exposure to ionizing radiation leads to the increase of respiration intensity and disruption of oxidative phosphorylation as a result of the uncoupling of oxidation and phosphorylation processes. With dose increase changes of studied parameters become deeper. In chronic exposure to ionizing radiation inhibition of oxidative phosphorylation process is likely driven by a decrease in the formation of ATP from ADP and  $P_n$  because there are no change of ATP hydrolase activity of mitochondria. The revealed functional abnormalities of the small intestine enterocytes mitochondria under the influence of ionizing radiation may be associated with structural and functional changes of the respiratory chain, and with changes in the activity of both the enzymes of the electron transport chain and the  $H^+$ -ATP-ase. The influence of the ionizing radiation of low power may lead to the disruption of the mitochondria bioenergetic function that is one of the earliest manifestations of cellular dysfunction.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кудряшов Ю. Б. Радиационная биофизика (ионизирующее излучение) / Ю. Б. Кудряшов. – М. : Физматлит, 2004. – 448 с.
2. Ентероцити тонкої кишки і радіація / М. Є. Кучеренко, С. В. Хижняк, Р. З. Вексларський, В. М. Войцицький. – К. : Фітосоціоцентр, 2003. – 176 с.
3. Структурно-функциональное состояние митохондриальных мембран печени облученных крыс / Н. Г. Миронова, В. И. Древаль, Л. В. Сичевская, Е. В. Загородняя // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2000. – Т. 40, вып. 2. – С. 138–141.
4. Эйдус Л. Х. Мембранный механизм биологического действия малых доз / Л. Х. Эйдус. – М. : ИТЭФ РАН, 2001. – 81 с.
5. Zhirnov V. The effects of ultra-low dose  $\beta$ -radiation on the physical properties of human erythrocyte membranes / V. Zhirnov, S. Khyzhnyak, V. Voitsitskiy // Int. J. Radiat. Biol. – 2010. –V. 86, Iss. 6. – P. 499–506.
6. Практикум по биохимии : учебное пособие / под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – М. : Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
7. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / под ред. Г. М. Франка. – М. : Наука, 1973. – 78 с.
8. Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure / M. Benderitter, L. Vincent-Genod, A. Berroud [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. – 1999. – Vol. 75. – P. 1043–1053.
9. Грубская Л. В. Влияние ионизирующего излучения низкой мощности на состояние цепи переноса электронов митохондрий энтероцитов тонкой кишки крыс / Л. В. Грубская, В. М. Войцицкий, С. В. Хижняк // Укр. біохім. журн. – 2012. – Т. 84, № 1. – С. 34–41.

## REFERENCES

1. Kudrjashov YuB. [Radiation biophysics (ionizing radiation)]. Moskva: Fizmatlit; 2004. 448 p. Russian.
2. Kucherenko NE, Khizhnjak SV, Veksljars'kij RZ, Voitsitskiy VM. [Enterocytes of the small intestine and radiation]. Kyiv: Fitosotsiotsentr; 2003. 176 p. Ukrainian.
3. Mironova NG, Dreval' VI, Sichevskaja LV, Zagorodnjaja EV. [Structural and functional state of the liver mitochondrial membranes of irradiated rats]. Radiats Biol Radioecol. 2000;40(2): 138-41. Russian.
4. Eidus LKh. [Membrane mechanism of biological effects of low doses]. Moskva: Institute for Theoretical and Experimental Physics; 2001. 81 p. Russian.
5. Zhirnov V, Khyzhnyak S, Voitsitskiy V. The effects of ultra-low dose  $\beta$ -radiation on the physical properties of human erythrocyte membranes. Int J Radiat Biol 2010;86(6):499-506.
6. Severin SE, Solov'eva GA [Workshop on Biochemistry]. Moskva: MSU press; 1989. 509 p. Russian.
7. Frank GM [Study Guide of biological oxidation by polarographic method]. Moskva: Nauka;1973. 78 p. Russian.
8. Benderitter M, Vincent-Genod L, Berroud A, et al. Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure. Int J Radiat Biol 1999;75:1043-53.
9. Grubskaja LV, Voitsitskiy V, Khyzhnyak S. [The effect of the ionizing radiation of low power on the state of the mitochondria electron transport chain of the small intestine enterocytes of the rats]. Ukr. Biokhim. Zh. 2012;84(1):34-41. Russian.

Стаття надійшла до редакції 18.08.2014

Received: 18.08.2014