

М. А. Аль Меселмани, М. А. Евсеева, А. В. Евсеев

Характеристика процессов митохондриального окисления в семенниках интактных крыс

УО «Гомельский государственный медицинский университет»,

Республика Беларусь

ГОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия

Минздравсоцразвития», Россия

В работе представлены и проанализированы результаты опытов по изучению процессов митохондриального окисления в ткани семенников интактных белых крыс. Помимо общих сведений о состоянии процессов тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в образцах ткани семенников на эндогенных и экзогенных субстратах (сукцинат, глутамат), получены и рассчитаны показатели, характеризующие особенности дыхания митохондрий в присутствии разобщителя (2,4-динитрофенол) и после добавления в среду инкубации ингибиторов электрон транспортной цепи (амитал натрия, малонат натрия). В опытах была подтверждена интактность изученных образцов ткани семенников крыс, которые обладали высоким уровнем дыхательной активности митохондрий, сопоставимым с таковой для митохондрий миокарда и печени. Высказано предположение о наличии в митохондриях семенников физиологических механизмов, обеспечивающих оперативный контроль над процессами тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи, что имеет большое значение для стабилизации её деятельности.

Ключевые слова: митохондриальное окисление, семенники, белые крысы.

Введение

В последние годы появились сведения, согласно которым смерть половых клеток может выступать в качестве дополнительного регулятора тестикулярной

функции [10]. Было показано, что клетки семеноносного эпителия существенно отличаются друг от друга по степени чувствительности к сигналам, формирующимся в ходе гибели сперматозоидов, а также к субстратам, необходимым для нормального протекания энергетических превращений в мужских половых клетках. Как установлено, сперматогонии, зрелые сперматозоиды и соматические клетки Сертоли характеризуются высокой активностью протекания в них гликолитических реакций, что обеспечивает заметный энергетический вклад [8]. В свою очередь, сперматоциты и сперматиды производят АТФ, преимущественно за счёт процессов митохондриального окислительного фосфорилирования (ОФ). Продукция АТФ, осуществляемая митохондриями, играет важную роль в регуляции скорости развития апоптоза мужских гамет, метаболизма энергии, процессов катаболизма в семенниках [710]

В литературе имеется большое количество косвенных подтверждений, указывающих на исключительную значимость митохондрий в реализации функций семенников. Это предопределяется высокой митотической активностью зародышевого эпителия семенников и соответствующим ей уровнем потребления этими клетками кислорода в реакциях митохондриального окисления. Не случайно нарушение митохондриального окисления в семенниках, которое обычно сопровождается образованием активных форм кислорода, приводит к снижению подвижности сперматозоидов и развитию мужского бесплодия [5]. В связи с этим изучение показателей, характеризующих активность процессов тканевого дыхания (ТД) и ОФ в ткани семенников при различных условиях, включая и воздействие радиации, позволяет оценить их функциональное состояние. Вместе с тем, как выяснилось, в литературе нет достоверных данных о нормальном течении процессов тканевого дыхания в митохондриях семенников интактных животных.

Целью исследования явилось изучение характеристик ТД и ОФ в ткани семенников интактных крыс.

Материалы и методы. Опыты выполнены на белых беспородных крысах-самцах весом 180-200 г. Все животные содержались на стандартном рационе вивария. После декапитации крыс, выделенные семенники охлаждали, промывали

физиологическим раствором натрия хлорида, освобождали от соединительной ткани и продавливали через плунжер с диаметром отверстий 0,5 мм. В полученных кусочках полярографическим методом с использованием электрода Кларка исследовали параметры митохондриального окисления в термостатируемой ячейке объемом 2 мл при температуре 25С° [3]. Все эксперименты проводили в условиях строго контроля температуры и времени. Количество белка в препаратах семенников определяли после их гомогенизации биуретовым методом [4].

Для получения сведений о состоянии процессов ТД и ОФ выполняли тесты, в которых дыхание образцов ткани семенников происходило в присутствии эндогенных ($V_{энд}$) и экзогенных субстратов, таких как янтарная кислота (сукцинат) – $V_{як}$ и глутаминовая кислота (глутамат) – $V_{глу}$. Наряду с этим, рассчитывали ряд дыхательных коэффициентов, в частности, величину стимулирующего действия сукцината – $СД_{як} = V_{як}/V_{энд}$, глутамата – $СД_{глу} = V_{глу}/V_{энд}$ и 2,4-динитрофенола – $СД_{днф} = V_{днф}/V_{глу}$. Используя метод ингибиторного анализа, путем добавления в инкубационную среду ингибитора I комплекса дыхательной цепи амитала натрия ($V_{ам}$) и конкурентного ингибитора СДГ малоната натрия ($V_{мал}$), производили оценку соотношения основных субстратов митохондриального окисления, рассчитывали показатели амиталрезистентного дыхания – $АРД = V_{ам}/V_{энд}$ и малонатрезистентного дыхания – $МРД = V_{мал}/V_{ам}$. Также использовали разобщитель ОФ – 2,4-динитрофенол (2,4 ДНФ) для определения показателей $V_{днф}$ и $СД_{днф}$. Скорость потребления кислорода в ткани семенников измеряли в нмоль O_2 /мин/мг белка [1,2].

Результаты и обсуждение. Как установлено, образцы ткани семенников крыс сохраняли высокий уровень дыхательной активности митохондрий, которая была сопоставима с таковой для митохондрий миокарда и печени [1,2]. Это нашло подтверждение не только в ходе анализа полученных в опытах показателей ТД препаратов семенников на эндогенных субстратах, но также и в результате использования экзогенных субстратов окисления (табл. 1).

Табл. 1: Показатели тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования

семенниках (эндогенный и экзогенный субстраты)

| Параметры | Vэнд | Vяк | Vглу |
|------------|-----------|------------|-----------|
| Результаты | 3,19±0,02 | 5,32 ±0,31 | 4,79±0,29 |

Представленные в таблице результаты демонстрируют выраженную интенсивность протекания процессов ТД в семенниках, что хорошо коррелирует показателями их кровоснабжения [11].

Известно, что характеристики митохондриального дыхания, полученные в опытах с использованием полярографического метода, позволяют доказать с высокой степенью достоверности интактность изучаемых тканей [3]. При этом информативным является не только показатель интенсивности протекания процессов ТД на так называемом «аварийном» субстрате окисления – янтарной кислоте (Vяк), но также такой показатель, как коэффициент стимулирующего действия сукцината (СДяк). Оценивая с этих позиций степень интактности образцов ткани семенников крыс, необходимо подчеркнуть, что изученные препараты отличались очень малой степенью повреждения. В пользу этого свидетельствовала относительно небольшая разница в скоростях дыхания препаратов на эндогенных (Vэнд составила всего 3,19±0,02 нмоль O₂/мин/мг) и экзогенных субстратах (Vяк и Vглу соответственно составили 5,32±0,31 и 4,79±0,29 нмоль O₂/мин/мг).

Согласно полученным данным, динамика СДяк СДглу также представляла существенный интерес. Например, в присутствии сукцината скорость дыхания образцов ткани возрастала всего на 66%. В свою очередь, после введения в инкубационную среду глутамата скорость дыхания увеличивалась ещё на 46%. В итоге, показатели СДяк и СДглу составили 1,66±0,10 и 1,46±0,09, что, в соответствии с утвердившимися в биоэнергетике представлениями, вновь подтвердило высокую степень интактности изучаемых образцов ткани (табл. 2)

Табл. 2: Показатели тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования семенниках (коэффициенты действия экзогенных субстратов)

| | | |
|------------|-----------|-----------|
| Параметры | СДяк | СДглу |
| Результаты | 1,66±0,10 | 1,46±0,09 |

В дальнейшем метод ингибиторного анализа показал, что ткань интактных семенников является достаточно устойчивой к действию амитала натрия и малоната натрия, т.к. в их присутствии достоверных изменений в скорости протекания процессов митохондриального окисления не происходило (табл. 3.).

Табл. 3. Влияние ингибиторов дыхательной цепи на процессы тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в интактных семенниках

| Параметр | Vэнд | Vам | АРД | Vмал | МРД |
|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Результат | 3,56±0,1 | 3,06±0,1 | 0,86±0,0 | 2,20±0,0 | 0,72±0,0 |

К наиболее достоверным и информативным показателям, дающим представление о качественной стороне протекания процессов митохондриального окисления в тканях, большинство исследователей относят баланс системы сопряжения ТД и ОФ, который в настоящем исследовании оценивали путем добавления в систему инкубации разобщителя этих процессов – 2,4-ДНФ [1,2]. Скорость тканевого дыхания препаратов или изолированных митохондрий в присутствии 2,4-ДНФ, а также показатель его стимулирующего действия (СДднф) позволяют объективно оценить степень сопряжения названных процессов.

Данные, представленные в табл. 4 также удостоверили интактность изученных образцов ткани семенников крыс, поскольку 2,4-ДНФ обеспечивал стимуляцию процессов ТД не менее чем на 33%. Коэффициент СДднф при этом составил 1,33±0,08, что говорит о хорошей реакционной способности изученных препаратов

Табл. 4: Показатели сопряжения процессов тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в интактных семенниках

| Параметры | Vэнд | Vднф | СДднф |
|------------|-----------|------------|-----------|
| Результаты | 3,34±0,35 | 6,31 ±0,16 | 1,33±0,08 |

Есть сведения о том, что высокая активность митохондриальной ткани семенников зависит от уровня содержания в них витамина Е (токоферол) и коэнзима Q (КоQ, убихинон), защищающего мембраны липидов от окислительно стресса [9]. Причём КоQ выполняет в электрон-транспортной цепи сразу две функции – переносчика протонов по дыхательной цепи и антиоксиданта, осуществляя непосредственный захват свободных радикалов, или же участвуя в регенерации токоферола [6]. С другой стороны, ранее обнаруженная в семенниках Ca²⁺-зависимая НАДФН оксидаза, обозначенная как НАДФН-5 или НОК5, как оказалось, в состоянии самостоятельно генерировать в клеточной среде супероксид-радикалы и участвовать в транспорте H⁺-ионов в ответ на появление цитозоле сперматоцитов свободного Ca²⁺, что, согласно мнению авторов, играет важную роль в биологии спермы [12].

Общеизвестно, что окисление янтарной кислоты в 6-й реакции цикла Кребса осуществляется с помощью сукцинатдегидрогеназы, характерными особенностям которой является её локализация на внутренней поверхности мембран митохондрий и независимость активности фермента от соотношения окисленной восстановленной форм никотинамидной дегидрогеназы (НАД/НАДН). Всё это позволяет сохранить энергосинтезирующую функцию митохондрий даже в условиях гипоксии и ишемии при нарушении НАД-зависимого дыхания клеток. Выполняя каталитическую функцию по отношению к циклу Кребса, янтарная кислота может оказывать прямое воздействие на клеточный метаболизм или влияя на транспорт свободного кислорода в ткани.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы, в соответствии с которыми глутамат играет важную роль в метаболических процессах и их регуляции, являясь также предшественником пептидов, белков, и нуклеотидов. Это объясняет факт наличия в эндотелиальных клетках крупных кровяных сосудов семенников высоких концентраций фермента γ -

глутамилтранспептидазы, который принимает участие в транспорте данной аминокислоты .

Глутаминовая кислота нередко фигурирует в центре многих физиологически и фармакологических исследований из-за важной плеiotропной роли в метаболизме и гомеостазе тканей. Отмечают её способность защищать структуру функции митохондрий, повышать их способность к потреблению кислорода и производству АТФ, поддерживать активность α -кетоглутаратдегидрогеназы и клеточного глутатиона. Это также способствует увеличению количества подходящих для производства энергии субстратов, но требует значительных затрат кислорода [11].

Следует отметить, что в результате метаболических реакций все виды внутриклеточных энергетических трансформаций, в конечном счёте, аккумулируются в АТФ. В круговороте энергии именно АТФ является связующим звеном процессов, протекающих с выделением или потреблением энергии, и основным соединением, определяющим энергетическое состояние клеток организма. Основная масса АТФ образуется в результате окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи митохондрий (в так называемом митохондриальном компартменте) и лишь незначительная – в результате субстратного фосфорилирования (внемитохондриальный компартмент). Согласно данным литературы, производство АТФ посредством гликолиза или окислительного фосфорилирования является главным источником энергии для поддержания различных функций спермы [78], что способствует увеличению количества подходящих для производства энергии субстратов, но требует значительных затрат кислорода [11].

Образование в ходе сперматогенеза высокодефферинцированных клеток, предопределяет высокий уровень потребления кислорода митохондриями клеток зародышевого эпителия. В свою очередь, митохондриальное потребление кислорода зависит от активности митохондриальной электронной транспортной цепи и АТФ-синтетазы, которые образуют систему ОФ. Установлено, что чем выше активность четырех дыхательных комплексов электрон-транспортной цепи

тем значительней подвижность спермы [9]. Следует отметить, что помимо ОФ для сохранения подвижности спермы также необходимо отсутствие каких-либо повреждений в структуре гена mt ДНК [5].

Исходя из полученных данных, можно высказать предположение о наличии в митохондриях семенников оперативных физиологических механизмов, обеспечивающих контроль над процессами ТД и ОФ в дыхательной цепи, что имеет большое значение для стабилизации ее непрерывной деятельности.

Заключение. Таким образом, в ходе исследования установлено, что образцы ткани семенников интактных крыс обладают высоким уровнем митохондриально-дыхательной активности. Последнее нашло подтверждение не только в процессе изучения показателей тканевого дыхания препаратов на эндогенных субстратах ($V_{энд}$), но также и при использовании экзогенных субстратов окисления – сукцината ($V_{як}$) и глутамата ($V_{глу}$).

Литература

1. Грицук, А. И. Митохондриальное окисление и ультраструктура миокарда при инкорпорации радионуклидов цезия / Т. Г. Матюхина [и др.] // Авиакосмич. и экол. медицина. 2002. № 2. С. 40–44.
2. Грицук, А. И. Тканевое дыхание печени крыс при облучении в сверхмалых дозах инкорпорированными радионуклидами цезия / А. И. Грицук, С. М. Сергеев, А. Н. Коваль // Авиакосмич. и экол. медицина. 2002. № 5. С. 60–62.
3. Кондрашова, М. Н. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / М. Н. Кондрашова, А. А. Ананенко. М., 1973. С. 106–119.
4. Кочетков, Г. А. Практическое руководство по энзимологии / Г. А. Кочетков. М., 1980. 220 с.
5. Amaral, A. The Expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm / A. Amaral [et al.] // Human Reproduction. 2007. Vol. 22, № 6. P. 1585–1596.
6. Carlos, M. Enhanced mitochondrial testicular antioxidant capacity in Goto-

Kakizaki diabetic rats: role of coenzyme Q / M. Carlos, B. Palmeira [et al.] // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2001. Vol. 281, № 3. P. 317–318.

7. Erkkila, K. Regulation of human male germ cell death by modulators of ATP production / K. Erkkila [et al.] // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2006. Vol. 290, № 6. P. 1145–1154.

8. Harris, R. A. Carbohydrate metabolism I: major metabolic pathways and their control / R. A. I. Harris [et al.] // Biochemistry with clinical correlations. New York: Wiley-Liss, 2002. P. 597–664.

9. [Lewin, A.](#) The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function / H. [Lay](#). // Mol. Aspects Med. 1997. Vol. 18. P. 213–219.

10. Pentikainen, V. Male germ cell apoptosis / V. Pentikainen [et al.] // Endocr. Devel. 2003. № 5. P. 56–80.

11. Roland, H. The hypoxic testis and post-meiotic expression of PAS, domain proteins / A. Wenger, H. Roland [et al.] // Seminars in Cell & Developmental Biology. 2005. Vol. 16. P. 547–553.

12. Sabeur, K. Characterization of NADPH-oxidase 5 in equine testis and spermatozoa / K. Sabeur, B. A. Ball // Reproduction. 2007. Vol. 134. P. 263–270