

Характеристика процессов митохондриального окисления в семенниках интактных крыс

М.А. Аль Меселмани

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

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 таковым 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 ее деятельности.

Ключевые слова: митохондриальное окисление, семенники, белые крысы.

The characteristics of mitochondrial oxidation processes in the testis of intact rats

M.A. Almeselmani

Educational establishment «Gomel State Medical University»

The article presents and analyses the results of experiments in which processes of mitochondrial oxidation in intact albino rat testis tissue were studied. Besides common information about processes of mitochondrial oxidation and phosphorylation in testis tissue samples on endogenous as well as exogenous substrates, some peculiar characteristics of mitochondrial breathing in rat testis after adding into incubation medium a chaotropic agent (2,4-dinitrophenol) and after using electron-transport chain inhibitors (amital sodium, malonate sodium) were found and calculated. In the experiments intact condition of the studied samples of rat testis that demonstrate high level of mitochondrial oxidative activity comparable with mitochondria of myocardium and liver was confirmed. It was suggested that testis mitochondria possess physiological mechanisms that provide quick control over mitochondrial oxidative processes and phosphorylation in an electron transport chain which is important for controlling its stable functioning.

Key words: mitochondrial oxidation, testis, albino rats.

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 счет 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 [7, 10].

В литературе имеется большое количество косвенных подтверждений, указывающих на исключительную значимость митохондрий в реализации функций семенников. Это определяется 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 тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в ткани семенников интактных крыс.

Материал 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 25°C [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 ($V_{\text{энд}}$) и экзогенных субстратов, таких, как янтарная кислота (сукцинат) – $V_{\text{як}}$ и глутаминовая кислота (глутамат) – $V_{\text{глу}}$. Наряду с этим, рассчитывали ряд дыхательных коэффициентов, в частности, величину стимулирующего действия сукцината – $\text{СДяк} = V_{\text{як}}/V_{\text{энд}}$, глутамата – $\text{СДглу} = V_{\text{глу}}/V_{\text{энд}}$ и 2,4-динитрофенола – $\text{СДДнф} = V_{\text{днф}}/V_{\text{глу}}$. Используя метод ингибиторного анализа, путем добавления в инкубационную среду ингибитора I комплекса дыхательной цепи амитала натрия ($V_{\text{ам}}$) и конкурентного ингибитора СДГ малоната натрия ($V_{\text{мал}}$), производили оценку соотношения основных субстратов митохондриального окисления, рассчитывали показатели амиталрезистентного дыхания – $\text{АРД} = V_{\text{ам}}/V_{\text{энд}}$ и малонатрезистентного дыхания – $\text{МРД} = V_{\text{мал}}/V_{\text{ам}}$. Также использовали разобщитель ОФ – 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ) для определения показателей $V_{\text{днф}}$ и СДДнф . Скорость потребления

кислорода в ткани семенников измеряли в нмоль $\text{O}_2/\text{мин}/\text{мг}$ белка [1–2].

Результаты и их 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).

Представленные в табл. 1 результаты демонстрируют выраженную интенсивность протекания процессов ТД в семенниках, что хорошо коррелирует с 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 ($V_{\text{як}}$), 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 ($V_{\text{энд}}$ составила всего $3,19 \pm 0,02$ нмоль $\text{O}_2/\text{мин}/\text{мг}$) и экзогенных субстратах ($V_{\text{як}}$ и $V_{\text{глу}}$ соответственно составили $5,32 \pm 0,31$ и $4,79 \pm 0,29$ нмоль $\text{O}_2/\text{мин}/\text{мг}$).

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 еще на 46%. В итоге, показатели СДяк и СДглу составили $1,66 \pm 0,10$ и $1,46 \pm 0,09$, что, в соответствии с утвердившимися в биоэнергетике представлениями, вновь подтвердило высокую степень интактности изучаемых образцов ткани (табл. 2).

Таблица 1

Показатели тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в семенниках (эндогенный и экзогенный субстраты)

Параметры	$V_{\text{энд}}$	$V_{\text{як}}$	$V_{\text{глу}}$
Результаты	$3,19 \pm 0,02$	$5,32 \pm 0,31$	$4,79 \pm 0,29$

Таблица 2

**Показатели тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в семенниках
(коэффициенты действия экзогенных субстратов)**

Параметры	СД _{як}	СД _{глу}
Результаты	1,66±0,10	1,46±0,09

Таблица 3

**Влияние ингибиторов дыхательной цепи на процессы тканевого дыхания
и окислительного фосфорилирования в интактных семенниках**

Параметры	V _{энд}	V _{ам}	АРД	V _{мал}	МРД
Результаты	3,56±0,19	3,06±0,15	0,86±0,02	2,20±0,08	0,72±0,02

Таблица 4

**Показатели сопряжения процессов тканевого дыхания
и окислительного фосфорилирования в интактных семенниках**

Параметры	V _{энд}	V _{днф}	СД _{днф}
Результаты	3,34±0,35	6,31±0,16	1,33±0,08

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

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 (СД_{днф}) позволяют объективно оценить степень сопряжения названных процессов.

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

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 окислительного стресса [9]. Причем 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 в 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 особенностями которой являются ее локализация на внутренней поверхности мембран митохондрий и независимость активности фермента от соотношения окисленной и восстановленной форм никотинамидной дегидрогеназы (НАД/НАДН). Все 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 влиять 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 физиологических и фармакологических исследований из-за важной плейотропной роли в метаболизме и гомеостазе тканей. Отмечают ее способность защищать структуру и 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 счете, 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 [7–8], что способствует увеличению количества подходящих для производства энергии субстратов, но требует значительных затрат кислорода [11].

Образование в ходе сперматогенеза высокодифференцированных 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 значительнее 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 митохондриальной дыхательной активности. Последнее нашло подтверждение не только в процессе изучения показателей тканевого дыхания препаратов на эндогенных субстратах (Vэнд), но также и при использовании экзогенных субстратов окисления – сукцината (Vяк) и глутамата (Vглу).

ЛИТЕРАТУРА

1. Грицук, А.И. Митохондриальное окисление и ультраструктура миокарда при инкорпорации радионуклидов цезия / А.И. Грицук [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. Сергеенко, А.Н. Коваль // *Авиакосмич. и экол. медицина*. – 2002. – № 5. – С. 6–62.
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. – 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. Harris [et al.] // *Biochemistry with clinical correlations*. – N. Y.: Wiley-Liss, 2002. – P. 597–664.
9. Lewin, A. The effect of coenzyme Q₁₀ on sperm motility and function / A. Lewin // *Mol. Aspects Med.* – 1997. – Vol. 18. – P. 213–219.
10. Pentikainen, V. Male germ cell apoptosis / V. Pentikainen [et al.] // *Endocr. Dev.* – 2003. – № 5. – P. 56–80.
11. Roland, H. The hypoxic testis and post-meiotic expression of PAS, domain proteins / 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.

Поступила в редакцию 07.02.2011. Принята в печать 29.04.2011

Адрес для корреспонденции: г. Гомель, ул. Ланге, д. 5, УО «ГТМУ», e-mail: drmmouhand78@inbox.ru – Аль Меселмани М.А.