

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 составных процессах 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 ограниченный 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.

M. A. Almeselmani, M. A. Evseyeva, A. V. Evseyev

THE CHARACTERISTICS OF MITOCHONDRIAL OXIDATION PROCESSES IN THE TESTIS OF INTACT RATS

The article make clear 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 some peculiar characteristics of mitochondrial breathing in rat testis after adding into incubation medium of a chaotropic agent (2,4 dinitrophenol) and after using of electron-transport chain inhibitors (amital sodium, malonate sodium) tissue on endogenous and exogenous substrates were found and calculated. In experiments was confirmed intact condition of studied samples of rat testis that demonstrate high level of mitochondrial oxidative activity comparable with mitochondria of myocardium and liver. It was suggested that testis mitochondria possess physiological mechanisms that provide quick control under mitochondrial oxidative processes and phosphorylation in an electron-transport chain that important for controlling of 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, сперматозоиды 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 [7,10].

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.

Материал и методы

Опыты выполнены на белых беспородных крысах-самцах весом 180-200 г. Все животные содержались на стандартном рационе вивария. После декапигации 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 Кларна 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 (Уэнд) и экзогенных субстратов, таких как янтарная кислота (сукцинат) – Уяк и глутаминовая кислота (глутамат) – Углу. Наряду с этим, рассчитывали ряд дыхательных коэффициентов, в частности, величину стимулирующего действия сукцината – СДяк=Уяк/Уэнд, глутамата – СДглу=Углу/Уэнд и 2,4-динитрофенола – СДдиф =Уднф/Углу. Используя метод ингибиторного анализа, путем добавления в инкубационную среду ингибитора I

комплекса дыхательной цепи амита-
ла натрия (V_{am}) и конкурентного инги-
битора СДГ малоната натрия ($V_{мал}$),
производили оценку соотношения ос-
новных субстратов митохондриально-
го окисления, рассчитывали показате-
ли амиталрезистентного дыхания – $APD = V_{am}/V_{энд}$ и мало-
натрезистентного дыхания – $MPD = V_{мал}/V_{am}$. Также исполь-
зовали разобщитель ОФ – 2,4-динитрофенол (2,4-ДНФ) для
определения показателей $V_{днф}$ и $СДднф$. Скорость потреб-
ления кислорода в ткани семенников измеряли в нмоль O_2 /
мин/мг белка [1,2].

Результаты и обсуждение

Как установлено, образцы ткани се-
менников крыс сохраняли высокий уров-
ень дыхательной активности митохонд-
рий, которая была сопоставима с таковой
для митохондрий миокарда и печени [1,2].
Это нашло подтверждение не только в
ходе анализа полученных в опытах пока-
зателей ТД препаратов семенников на
эндогенных субстратах, но также и в результате использова-
ния экзогенных субстратов окисления (табл. 1).

Представленные в таблице результаты демонстрируют вы-
раженную интенсивность про-
текания процессов ТД в семен-
никах, что хорошо коррелирует
с показателями их крово-
снабжения [11].

Известно, что характери-
стики митохондриального дыха-
ния, полученные в опытах с использованием полярографи-
ческого метода, позволяют доказать с высокой степенью до-
стоверности интактность изучаемых тканей [3]. При этом ин-
формативным является не только показатель интенсивности
протекания процессов ТД на так называемом «аварийном»
субстрате окисления – янтарной кислоте ($V_{як}$), но также та-
кой показатель, как коэффициент
стимулирующего действия сукцина-
та ($СДяк$). Оценивая с этих позиций
степень интактности образцов тка-
ни семенников крыс, необходимо
подчеркнуть, что изученные препа-
раты отличались очень малой степе-
нью повреждения. В пользу этого свидетельствовала относи-
тельно небольшая разница в скоростях дыхания препаратов
на эндогенных ($V_{энд}$ составила всего $3,19 \pm 0,02$ нмоль O_2 /
мин/мг) и экзогенных субстратах ($V_{як}$ и $V_{глу}$ соответственно
составили $5,32 \pm 0,31$ и $4,79 \pm 0,29$ нмоль O_2 /мин/мг).

Согласно полученным данным, динамика $СДяк$ $СДглу$ так-
же представляла существенный интерес. Например, в присут-
ствии сукцината скорость дыхания образцов ткани возрастала
всего на 66%. В свою очередь, после введения в инкуба-
ционную среду глутамата скорость дыхания увеличивалась
ещё на 46%. В итоге, показатели $СДяк$ и $СДглу$ составили
 $1,66 \pm 0,10$ и $1,46 \pm 0,09$, что, в соответствии с утвердившими-
ся в биоэнергетике представлениями, вновь подтвердило
высокую степень интактности изучаемых образцов ткани
(табл. 2).

В дальнейшем метод ингибиторного анализа показал, что
ткань интактивных семенников является достаточно устойчи-
вой к действию амитала натрия и малоната натрия, т.н. 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, большин-

Таблица 1: Показатели тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в семенниках (эндогенный и экзогенный субстраты)

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

ство исследователей относят баланс
системы сопряжения ТД и ОФ, кото-
рый в настоящем исследовании оце-
нивали путем добавления в систему
инкубации разобщителя этих процес-
сов – 2,4-ДНФ [1,2]. Скорость ткане-
вого дыхания препаратов или изолированных митохондрий в
присутствии 2,4-ДНФ, а также показатель его стимулирующе-
го действия ($СДднф$) позволяют объективно оценить степень
сопряжения названных процессов.

Данные, представленные в табл. 4 также удостоверили
интактность изученных образцов ткани семенников крыс, по-
скольку 2,4-ДНФ обеспечивал стимуля-
цию процессов ТД не менее чем на 33%.
Коэффициент $СДднф$ при этом составил
 $1,33 \pm 0,08$, что говорит о хорошей реак-
ционной способности изученных препа-
ратов.

Есть сведения о том, что высокая ак-
тивность митохондриальной ткани се-
менников зависит от уровня содержа-
ния в них витамина Е (токоферол) и коэнзима Q (КоQ, убихи-
нон), защищающего мембраны липидов от окислительного
стресса [9]. Причём КоQ выполняет в электрон-транспортной

**Таблица 2: Показатели тканевого ды-
хания и окислительного фосфорилирова-
ния в семенниках (коэффициенты действия
экзогенных субстратов)**

Параметры	$СДяк$	$СДглу$
Результаты	$1,66 \pm 0,10$	$1,46 \pm 0,09$

**Таблица 3. Влияние ингибиторов дыхательной цепи на про-
цессы тканевого дыхания и окислительного фосфорилирова-
ния в интактных семенниках**

Параметры	$V_{энд}$	$V_{ам}$	APD	$V_{мал}$	MPD
Результаты	$3,56 \pm 0,19$	$3,06 \pm 0,15$	$0,86 \pm 0,02$	$2,20 \pm 0,08$	$0,72 \pm 0,02$

цепи сразу две функции – пе-
реносчика протонов по дыха-
тельной цепи и антиоксиданта,
осуществляя непосредственный
захват свободных радикалов,
или же участвуя в регенерации
токоферола [6]. С другой сторо-
ны, ранее обнаруженная в семенниках Ca^{2+} -зависимая
НАДФН оксидаза, обозначенная как НАДФН-5 или НОК5, как
оказалось, в состоянии самостоятельно генерировать в кле-
точной среде супероксид-радикалы и участвовать в транспорте
 H^+ -ионов в ответ на появление в цитозоле сперматоцитов
свободного Ca^{2+} , что, согласно мнению авторов, играет важ-
ную роль в биологии спермы [12].

Общеизвестно, что окисление
янтарной кислоты в 6-й реакции цик-
ла Кребса осуществляется с помо-
щью сукцинатдегидрогеназы, харак-
терными особенностями которой
является её локализация на внут-
ренней поверхности мембран митохондрий и независимость
активности фермента от соотношения окисленной и восста-
новленной 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, ян-
тарная кислота может оказывать прямое воздействие на кле-
точный метаболизм или влиять на транспорт свободного кис-
лорода в ткани.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными
литературы, в соответствии с которыми глутамат играет важ-
ную роль в метаболических процессах и их регуляции, явля-
ясь также предшественником пептидов, белков, и нуклеоти-
дов. Это объясняет факт наличия в эндотелиальных клетках
крупных кровяных сосудов семенников высоких concentra-
ций фермента γ -глутамилтранслептидазы, который принима-
ет участие в транспорте данной аминокислоты.

Глутаминовая кислота нередко фигурирует в центре мно-
гих физиологических и фармакологических исследований из-
за важной плейотропной роли в метаболизме и гомеостазе
тканей. Отмечают её способность защищать структуру и функ-
ции митохондрий, повышать их способность к потреблению
кислорода и производству АТФ, поддерживать активность α -

■ Оригинальные научные публикации

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 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-синтазы, 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 митондриях семенников оперативных физиологических механизмов, обеспечивающих контроль над процессами ТД и ОФ в дыхательной цепи, что имеет большое значение для стабилизации ее непрерывной деятельности.

Таким образом, в ходе исследования установлено, что об-

разцы 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 (Vсук) и глутамата (Vглу).

Литература

1. Грицук, А. И. Митохондриальное окисление и ультраструктура миокарда при инкорпорации радионуклидов азота / Г. 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. Аваненко. 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 tessicular 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. Lavon // Mol. Aspects Med. 1997. Vol. 16. 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 / 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.

Получено 11.02.2011 г.