

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ЦИНКСОДЕРЖАЩЕЙ КАРБОАНГИДРАЗЫ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ САМЦОВ КРЫС

Кузнецова М.Г., Ушакова М.В., Гудинская Н.И., Николаев А.А.

ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, e-mail: chimnik@mail.ru

Цель работы определить факторы, влияющие на активность цинксодержащей карбоангидразы репродуктивной системы самцов крыс в условиях воздействия низкоинтенсивного микроволнового излучения. Карбоангидраза играет важную роль в метаболизме семенной плазмы и созревании сперматозоидов. Активность карбоангидразы в водно-солевых экстрактах эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы, по нашим данным, колеблется в пределах $84,0 \pm 74,5$ ЕД/мл, что в пересчете на вес ткани составляет $336,0 \pm 298,0$ ЕД/мг. Исследована связь концентрации ионов цинка и полиаминов с активностью карбоангидразы. Активность карбоангидразы репродуктивной системы самцов крыс имеет сложную схему регуляции, очевидно, не исчерпывающуюся описанными нами факторами. На основании полученных результатов можно заключить, что роль различных регуляторов активности этого фермента изменяется в зависимости от степени активности карбоангидразы. Вероятно, высокие концентрации спермина лимитируют транскрипцию гена карбоангидразы, учитывая данные о функциях этого полиамина. Спермидин, вероятно, служит лимитирующим фактором на пострибосомальных этапах регуляции активности карбоангидразы, а путресцин и концентрация ионов цинка - взаимосвязанные факторы активации.

Ключевые слова: карбоангидраза, полиамины, концентрация ионов цинка, репродуктивная система самцов крыс.

REGULATING THE ACTIVITY OF THE ZINC-CONTAINING CARBONIC ANHYDRASE REPRODUCTIVE SYSTEM OF MALE RATS

Kuznetsova M.G., Ushakova M.V., Gudinskaya N.I., Nikolaev A.A.

Astrakhan State Medical University of Ministry of Health of Russia, Astrakhan, e-mail: chimnik@mail.ru

The purpose of the work to determine the factors influencing the activity of the zinc-containing carbonic anhydrase reproductive system of male rats under the effect of low intensity microwave radiation. Carbonic anhydrase plays an important role in the metabolism of the seminal plasma and sperm maturation. The activity of carbonic anhydrase in the water-salt extracts the epididymis and testes of rats in the control group according to our data ranges from $84,0 \pm 74,5$ U / ml., That based on the weight of the fabric is $336,0 \pm 298,0$ U / mg. The relation of the concentration of zinc ions and polyamines with carbonic anhydrase activity. Carbonic anhydrase activity of the reproductive system of male rats have a complex scheme of regulation is obviously not exhaustive factors described us. We can conclude from the results that the role of various regulators of the enzyme activity varies depending on the activity of the carbonic anhydrase. Probably, high concentrations of spermine limit the carbonic anhydrase gene transcription, given the data on the functions of the polyamine. Spermidine, is probably the limiting factor in the regulation stages post-translational modification carbonic anhydrase activity and putrescine concentration of zinc ions and activation factors are interrelated.

Keywords: carbonic anhydrase, polyamines, the concentration of zinc ions, reproductive system of male rats

Известно, что в репродуктивной системе самцов птиц, млекопитающих и человека велика активность цинксодержащей карбоангидразы [7]. Активность этого фермента оказывает влияние на созревание сперматозоидов, их количество и объем спермы [6]. Но нет сведений об изменении активности карбоангидразы под действием других постоянных компонентов репродуктивной системы, таких как ионы цинка и полиамины (путресцин, спермин и спермидин), которые активно влияют на сперматогенез. Дана лишь общая характеристика последствий изменения активности карбоангидразы на

морфофункциональное состояние органов репродуктивной системы самцов крыс, число сперматозоидов, их подвижность [4].

Целью нашей работы стало исследование активности цинксодержащей карбоангидразы и ее связь с уровнем полиаминов и ионов цинка в ткани репродуктивной системы половозрелых самцов крыс.

Материалы и методы. Экспериментальная часть исследования включала в себя 418 самцов белых крыс линии Wistar. Возраст крыс составлял 6-7 месяцев (половозрелые особи). Масса тела крыс была 180-240 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Во избежание влияния сезонных различий в реакциях на экспериментальные воздействия все исследования проводились в осенне-зимний период года. Забор семенников и эпидидимисов у крыс проводили под эфирным наркозом (экспериментальные исследования проводились в строгом соответствии с Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным).

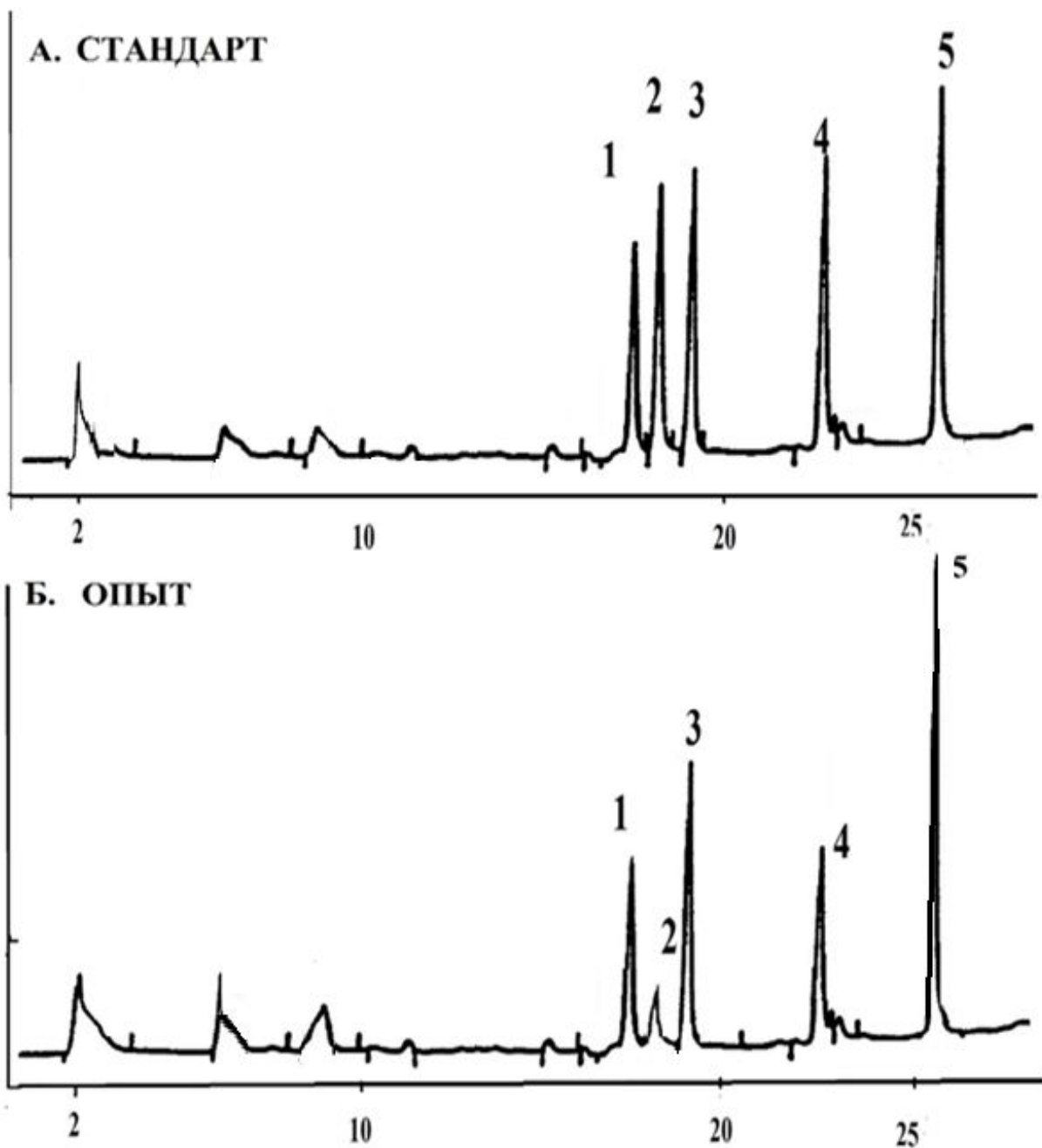
Объектами нашего исследования были водно-солевые экстракты эпидидимисов и семенников половозрелых самцов белых крыс. Экстракты готовили на трис-солянокислом буфере $\text{pH} = 7.6$ в соотношении вес/объем 1/5, после четырехкратного замораживания, оттаивания и центрифугирования при 8000 g в течение 50 мин., пробы замораживали и хранили при $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ до исследования.

Определение цинка. К 2 мл исследуемого экстракта добавляли 0,1 мл 10% NaOH и 0,2 мл 1%-ного раствора дитизона в четыреххлористом углероде. В отрицательном контроле добавляли 2 мл дистиллированной воды, в положительном контроле - 2 мл 20 мкмоль раствора сульфата цинка (молярная концентрация стандартного раствора сульфата цинка). Пробы фотометрировали при 535 нм [2]. Расчет концентрации катионов цинка в пробе проводили по формуле: $C_{\text{Zn}} = 20 \text{ мкмоль} \times \text{ОП}_{535} \text{ Пробы} / \text{ОП}_{535} \text{ Стандарта}$, где $\text{ОП}_{535} \text{ Пробы}$ - оптическая плотность пробы, измеренная при 535 нм; $\text{ОП}_{535} \text{ Стандарта}$ - оптическая плотность стандартного 20 микромолярного раствора сульфата цинка, измеренная при 535 нм.

Определение карбоангидразы [7]. Способ основан на реакции дегидратации бикарбоната с удалением образующейся в результате дегидратации двуокиси углерода при интенсивном барботировании реакционной среды освобожденным от оксида углерода воздухом и одновременной регистрацией скорости изменения pH. Реакцию инициируют быстрым введением раствора субстрата - бикарбоната натрия (10 мМ) в реакционную смесь, содержащую исследуемый образец. При этом происходит увеличение pH на 0,01-0,05 ед. Образцы (10,0-50,0 мг) эпидидимисов и семенников половозрелых самцов белых крыс гомогенизировали, центрифугировали при 4500 g в течение 30 мин. при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, и супернатант

разбавляют дважды дистиллированной воды при 4 °С до объема, который позволил бы измерить время реакции. Активность карбоангидразы определяют по изменению начального значения pH от 8,2 до 8,7 в реакции дегидратации CO₂. Электрометрически измеряют скорость накопления гидроксильных ионов с использованием чувствительного программируемого pH-метра (InoLab pH 7310), сопряженного с ПК. По сдвигу pH от 8,2 до 8,7, как функции от времени на линейном участке, учитывают активность фермента. Рассчитывали среднее время (Т) для 4 измерений. Время изменения pH при спонтанной гидратации CO₂ в среде без образца принимали за контроль. Активность карбоангидразы выражали в ферментных единицах (ЕД) на мг влажной ткани по уравнению: $ЕД = 2 (T_0 - T) / (T_0 \times \text{мг ткани в реакционной смеси})$, где T₀ = среднее время для 4 измерений чистого раствора 4 мл охлажденной, насыщенной углекислотой, бидистиллированной воды.

Определение полиаминов. Образцы (100–200 мг) эпидидимисов и семенников половозрелых самцов белых крыс гомогенизировали, суспендировали в 1 мл 0.2 нормальной перхлорной кислоты, чтобы извлечь свободные полиамины, и центрифугировали. К 100 мкл надосадочной жидкости добавляли 110 мкл 1.5 М карбонат натрия и 200 мкл дансил хлорида (раствор 7.5 мг/мл в ацетоне; «Сигма», Мюнхен, Германия). Кроме того, добавляли 10 мкл 0.5 мМ диаминогексана в качестве внутреннего стандарта. После 1 часа инкубации при 60 °С в темноте были добавлены 50 мкл раствора пролина (100 мг/мл), чтобы связать свободный дансил хлорид. Затем дансилпроизводные полиаминов (далее – DNSC-полиамины) экстрагировали толуолом, сублимировали в вакуумном испарителе и растворяли в метаноле. Хроматография выполнялись на колонке с обращеннофазным носителем LC 18 (Supelco), в системе высокоэффективной жидкостной хроматографии (Dionex), состоящей из градиентного смесителя (модель Р 580), автоматического инжектора (ASI 100) и детектора флуоресценции (RF 2000). Полиамины элюировали в линейном градиенте от 70% до 100% (v/v) метанола в воде при скорости потока 1 мл/мин и определяли на длине волны возбуждения 365 нм и длине волны эмиссии 510 нм. Данные проанализировали, используя программное обеспечение Dionex Chromeleon, и квантификация выполнялась с калибровочными кривыми, полученными из смеси чистых веществ (рис. А).



Высокоэффективная хроматография DNSC-полиаминов:

А - хроматограмма стандартной смеси DNSC-полиаминов; Б – хроматограмма DNSC-полиаминов одного из образцов ткани эпидидимиса и семенников самцов крыс. 1 - путресцин; 2 - кадаверин; 3 - гександиамин (внутренний стандарт); 4 - спермидин; 5 - спермин. По оси абсцисс время в минутах, по оси ординат - флюоресценция.

Ненумерованные пики – не идентифицированные примеси

Результаты исследования и обсуждение. Как известно [4], карбоангидраза играет важную роль в метаболизме семенной плазмы и созревании сперматозоидов. Активность карбоангидразы в водно-солевых экстрактах эпидидимисов и семенников крыс контрольной группы, по нашим данным, колеблется в пределах $84,0 \pm 74,5$ ЕД/мл, что в пересчете на вес

ткани составляет $336,0 \pm 298,0$ ЕД/мг. Столь высокая активность фермента может быть объяснена важной физиологической ролью. Для сравнения: уровень активности этого фермента в других тканях этих же животных значительно ниже (табл. 1), кроме цельной крови, в которой известна высокая активность карбоангидразы эритроцитов. Однако обращает на себя внимание очень широкий разброс значений активности карбоангидразы эпидидимисов и семенников, коэффициент вариации которой составляет более 150% (табл. 1).

Таблица 1

Активность карбоангидразы в тканях половозрелых самцов

Ткани самцов крыс	Активность фермента, ЕД	Число наблюдений	Коэффициент вариации, %
Печень	$26,2 \pm 3,4$	51	59,5
Почки	$59,2 \pm 5,1$	53	41,3
Ткань мозга	$19,2 \pm 3,1$	36	34,8
Мышечная ткань	$132,2 \pm 10,4$	58	33,4
Слизистая желудочно-кишечного тракта	$18,2 \pm 2,1$	42	54,1
Эпидидимисы и семенники	$336,0 \pm 98,0$	69	157,0
Цельная кровь	$782,0 \pm 29,0$	39	16,2

Это свидетельствует о влиянии на активность фермента неучтенных факторов. Существует два обстоятельства, которые объясняют эту особенность. Во-первых, известно, что биологически активные амины, и в том числе полиамины спермидин и спермин, способны активировать карбоангидразу [1]. Именно репродуктивная система самцов является наиболее богатым источником спермина и спермидина [3]. Поэтому мы провели параллельное определение концентрации полиаминов в водно-солевых экстрактах эпидидимисов и семенников самцов крыс [5]. Полиамины спермидин, спермин и путресцин были проанализированы ВЭЖХ, как описано в методах. Показано, что в ткани эпидидимиса и семенников самцов крыс выявлены спермин, спермидин и путресцин (рис. Б).

У здоровых половозрелых самцов крыс уровень спермина $5,962 \pm 4,091$ мкг/г ткани, спермидина $3,037 \pm 3,32$ мкг/г ткани, путресцина $2,678 \pm 1,82$ мкг/г ткани, и соотношение спермин/спермидин $1,88-2,91$. Причем, по нашим данным, значительным колебаниям подвержен как уровень спермидина, так и уровень спермина (в меньшей степени). Корреляционный анализ показал достоверную положительную связь ($r=+0,3$) уровней спермина и спермидина, и соответственно спермидина и путресцина ($r=+0,42$). Видимо, это

обстоятельство является одним из факторов, влияющих на высокую дисперсность результатов определения активности карбоангидразы.

Другим регулятором активности карбоангидразы может служить уровень цинка в репродуктивной ткани половозрелых самцов крыс. По нашим данным, уровень иона цинка колеблется в широких пределах, от 3,2 до 36,7 мкг/г ткани суммарного препарата семенников и эпидидимисов половозрелых самцов крыс.

Корреляционный анализ уровня цинка с уровнями спермина, спермидина и активностью карбоангидразы показал разные уровни положительной связи концентрации ионов цинка с этими метаболитами. Ничтожный уровень связи выявлен со спермином (+0,14). При использованном числе наблюдений эта корреляция недостоверна ($p \geq 0,1$). Выявлена достоверная положительная корреляция уровня ионов цинка с концентрацией путресцина (+0,42) и концентрацией спермидина (+0,39). Ожидаемо высокая положительная корреляция (+0,63) выявлена и между концентрацией ионов цинка и активностью карбоангидразы.

На следующем этапе мы постарались объединить концентрацию цинка и уровень полиаминов, как факторы регуляции активности карбоангидразы. При анализе вариационных рядов совместного определения концентрации ионов цинка, полиаминов и активности карбоангидразы выявлены некоторые закономерности. Показано, что из 69 проведенных исследований по уровню активности карбоангидразы можно выделить три группы:

1-я группа - высокая активность от 435 до 372 ЕД (число наблюдений 37),

2-я группа - низкая активность от 291 до 216 ЕД (число наблюдений 17),

3-я группа - очень низкая активность от 177 до 143 ЕД (число наблюдений 15).

При ранжировании уровней полиаминов и концентрации ионов цинка с этими группами выявилась интересная особенность, которая не проявлялась при анализе вариационных рядов. Максимальные концентрации спермина (в среднем $9,881 \pm 0,647$ мкг/г ткани) связаны с третьей группой наблюдений с очень низкой активностью карбоангидразы, а минимальные (в среднем $2,615 \pm 1,130$ мкг/г ткани) со второй группой с низкой активностью фермента.

Наибольшее число наблюдений связано с первой группой с высоким уровнем активности карбоангидразы, в этой группе концентрации спермина близки к средним значениям (в среднем $4,675 \pm 0,725$ мкг/г ткани).

Сложную связь с активностью карбоангидразы проявляет концентрация ионов цинка. В первой группе активности карбоангидразы (табл. 2) концентрация ионов цинка также выше значений в других группах (в среднем $14,11 \pm 7,25$ мкг/г ткани). Далее концентрация

ионов цинка падает в соответствии с падением активности карбоангидразы, но это падение не пропорционально. Если во второй группе активность карбоангидразы снижается по сравнению с первой на 49,6% а в третьей на 60,35%, то снижение концентрации ионов цинка происходит во второй группе на 23%, а в третьей на 39%.

Таблица 2

Соотношение концентрации полиаминов и ионов цинка с активностью карбоангидразы

Группы активности карбоангидразы, ЕД	Средняя концентрация спермина, мкг/г ткани	Средняя концентрация спермидина, мкг/г ткани	Средняя концентрация путресцина, мкг/г ткани	Средняя концентрация ионов цинка, мкг/г ткани
Первая 403,5±19,7	4,675±0,725	4,113±1,652	3,716±0,48	24,11±9,25
Вторая 203,5 ±38,1	2,615±1,130	6,821±0,794	2,678±1,820	18,56±8,63
Третья 160,0 ±29,8	9,881±0,647	1,862±0,984	0,981±0,631	14,82±7,25

Это свидетельствует о дополнительных факторах влияния на активность этого фермента. Несколько иначе выглядит динамика концентрации путресцина (табл. 2). Уровень этого полиамина падает опережающими темпами, и в третьей группе сравнения уровень путресцина ниже в среднем почти на 74%. Динамика уровня спермидина отличается тем, что «выскакивающие» значения концентрации этого полиамина связаны в первую очередь со второй группой уровня активности карбоангидразы. При высокой активности этого фермента (группа 1) концентрация спермидина немного выше средней по всем наблюдениям, а в третьей группе почти в 4 раза ниже концентрации во второй группе.

Таким образом, активность карбоангидразы репродуктивной системы самцов крыс имеет сложную схему регуляции, очевидно, не исчерпывающуюся описанными нами факторами. На основании полученных результатов можно заключить, что роль различных регуляторов активности этого фермента изменяется в зависимости от степени активности карбоангидразы. Вероятно, высокие концентрации спермина лимитируют транскрипцию гена карбоангидразы, учитывая данные о функциях этого полиамина [5]. Спермидин, вероятно, служит лимитирующим фактором на пострибосомальных этапах регуляции активности карбоангидразы, а путресцин и концентрация ионов цинка взаимосвязанные факторы активации.

В этих условиях оценка влияния внешних факторов (в том числе изменяющих репродуктивную функцию) на активность карбоангидразы, как одного из важных звеньев метаболизма репродуктивной системы самцов млекопитающих, становится не только важным, но и довольно сложным процессом, требующим большого количества контролей и

многосторонней оценки.

Список литературы

1. Бойко О.В. Методические аспекты использования солянокислых спермина и спермидина для идентификации уропатогенной микрофлоры / О.В. Бойко, А.А. Терентьев, А.А. Николаев // Проблемы репродукции. – 2010. – № 3. – С. 77-79.
2. Ильина О.С. Изменение содержания цинка в крови человека при сахарном диабете типа I и особенности гипогликемического действия цинкосодержащего комплекса инсулин-хондроитинсульфат : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2012. – 24 с.
3. Луцкий Д.Л. Белковый спектр эякулятов различной фертильности / Д.Л. Луцкий, А.А. Николаев, Л.В. Ложкина // Урология. – 1998. – № 2. – С. 48-52.
4. Николаев А.А. Активность ферментов спермоплазмы в эякулятах различной фертильности / А.А. Николаев, Д.Л. Луцкий, В.А. Бочановский, Л.В. Ложкина // Урология. – 1997. – № 5. – С. 35.
5. Плосконос М.В. Определение полиаминов в различных биологических объектах / М.В. Плосконос, А.А. Николаев, А.А. Николаев // Астраханская гос. мед. акад. – Астрахань, 2007. – 118 с.
6. Полунин А.И. Использование препарата цинка в лечении мужской субфертильности / А.И. Полунин, В.М. Мирошников, А.А. Николаев, В.В. Думченко, Д.Л. Луцкий // Микроэлементы в медицине. – 2001. – Т. 2. – № 4. – С. 44-46.
7. Haggis G.C., Gortos K. Carbonic anhydrase activity of the reproductive tract tissues of male rats and its relationship to semen production // J. Fert. Reprod. – 2014. - V. 103. - P. 125-130.