

УДК 616.682-092.9

АКТИВНОСТЬ МИКРОСОМАЛЬНЫХ РЕДУКТАЗ ПРИДАТКОВ ЯИЧЕК КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КРИПТОРХИЗМЕ

¹Федорова М.В., ²Сагарадзе Г.Д., ²Федотов Д.А.,

²Попов В.С., ²Ефименко А.Ю., ³Проскурнина Е.В.

¹ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора», Москва,
e-mail: theklazontag@yandex.ru;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва,
georgysagaradze@gmail.com, feddan505@mail.ru, galiantus@gmail.com, AEfimenko@mc.msu.ru;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва,
e-mail: proskurnina@gmail.com

Мужское бесплодие является распространенной социальной и медицинской проблемой. Среди ключевых патогенетических факторов мужского бесплодия выделяют окислительный стресс. Одним из основных мест метаболизма активных форм кислорода являются цепи микросомального окисления – NADH-зависимая цепь цитохрома b5 и NADPH-зависимая цепь цитохрома P450. Нами проведено исследование активности цитохрома b5-редуктазы (CYB5R) и цитохрома P450-редуктазы (CYPOR) в сперматозоидах при экспериментальном двухстороннем абдоминальном крипторхизме у крыс при помощи оригинальной методики с использованием люцигенин-активированной хемилюминесценции со стимулами NADH и NADPH. Из хемилюминограмм определяли уровни стимулированной хемилюминесценции A_{NADH} и A_{NADPH} , которые отражают активность CYB5R и CYPOR. В исследование включены три группы крыс: интактные (контрольная группа), животные, которым моделировали крипторхизм, и животные, получавшие терапию кломифена цитратом после моделирования крипторхизма. У интактных крыс активность CYB5R и CYPOR была сопоставима по величине. Для группы животных с крипторхизмом, не получавших лечения, активность CYPOR была значимо ниже по сравнению с группой контроля, активность CYB5R в группе крипторхизма имела тенденцию к снижению. Терапия кломифена цитратом не приводила к восстановлению активности ферментов. Таким образом, экспериментальный крипторхизм приводит к необратимому снижению активности цепей микросомального окисления.

Ключевые слова: мужское бесплодие, экспериментальный крипторхизм, NADH-зависимая цитохром b5-редуктаза, NADPH-зависимая цитохром P450-редуктаза, активные формы кислорода, хемилюминесценция

ACTIVITY OF MICROSOMAL REDUCTASES IN RAT EPIDIDYMES IN EXPERIMENTAL CRYPTORCHIDISM

¹Fedorova M.V., ¹Sagaradze G.D., ¹Fedotov D.A.,

¹Popov V.S., ¹Efimenko A.Yu., ²Proskurnina E.V.

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, e-mail: theklazontag@yandex.ru;

²Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: georgysagaradze@gmail.com,
feddan505@mail.ru, galiantus@gmail.com, AEfimenko@mc.msu.ru;

³Research Centre for Medical Genetics, Moscow, e-mail: proskurnina@gmail.com

Male infertility is a common social and medical problem. Among the possible pathogenetic factors of male infertility one can mention oxidative stress. Microsomal oxidation chains, the NADH-dependent chain of cytochrome b5, and the NADPH-dependent chain of cytochrome P450, are one of the main participants of metabolism of the reactive forms of oxygen. The authors studied the activity of cytochrome b5-reductase (CYB5R) and cytochrome P450-reductase (CYPOR) in experimental bilateral abdominal cryptorchidism in rats using the original lucigenin-activated chemiluminescence technique with NADH and NADPH stimulation, respectively. The chemiluminogram was used to determine the levels of stimulated chemiluminescence of A_{NADH} and A_{NADPH} . The study included three groups of rats: intact (control group), animals with modelled cryptorchidism, and animals that received clomiphene citrate therapy after cryptorchidism modelling. In intact rats, the levels CYB5R and CYPOR activity were comparable. For the group of untreated animals with modelled cryptorchidism, the CYPOR activity was lower than in the control group; treatment with clomiphene citrate did not have any effect on this parameter. Taken together, experimental cryptorchidism leads to an irreversible decrease in the activity of microsomal oxidation chains.

Keywords: male infertility, experimental cryptorchidism, NADH-dependent cytochrome b5 reductase, NADPH-dependent cytochrome P450 reductase, reactive oxygen species, chemiluminescence

Мужское бесплодие является социальной значимой проблемой с частотой встречаемости в мире более 10%. Известно, что в половине случаев мужское бесплодие

является идиопатическим [1]; в некоторых исследованиях у пациентов в семенной жидкости обнаруживали маркеры окислительного стресса, что может свидетельство-

вать о значимой роли окислительного стресса в патогенезе мужского бесплодия [2].

Цепи микросомального окисления цитохрома b5 и P450 являются ключевым звеном метаболизма лекарственных препаратов и эндогенных соединений, который протекает с участием активных форм кислорода (АФК). Таким образом, нарушения в работе этих систем тесно связаны с развитием окислительного или антиоксидантного стресса. NADH-зависимая цитохром b5-редуктаза (CYB5R) принимает участие в синтезе холестерина, элонгации жирных кислот, гидроксировании ксенобиотиков и стероидных гормонов, поддерживает в восстановленном состоянии аскорбат и коэнзим Q10 и защищает клетку от апоптоза [3]. CYB5R является цитозольным ферментом, который в присутствии NADH восстанавливает люцигенин, что сопровождается хемилюминесценцией. NADPH-зависимая цитохром P450-редуктаза (CYPOR) восстанавливает цитохром P450, цитохром b5, гемоксигеназу, сквален-монооксигеназу, 7-дегидрохолестерол редуктазу, при этом побочными продуктами являются супероксидный анион-радикал и пероксид водорода [4]. Исследований, посвященных изучению роли систем микросомального окисления в патогенезе бесплодия, немного, однако показано, что с идиопатическим бесплодием может быть связан полиморфизм гена CYP1A12A [5].

Одним из направлений лечения мужского бесплодия является применение кломифена цитрата, селективного модулятора эстрогенных рецепторов, приводящего к повышению уровня тестостерона за счет повышения уровня ЛГ и ФСГ [6]. Кломифена цитрат метаболизируется через систему цитохрома P450, таким образом измененная активность этой системы может влиять на эффективность терапии кломифена цитратом, с одной стороны, с другой – может представлять дополнительную терапевтическую мишень.

Цель исследования – изучить активность CYB5R и CYPOR в сперматозоидах при экспериментальном крипторхизме у крыс, в том числе после лечения кломифена цитратом, при помощи оригинальной методики люцигенин-активированной хемилюминесценции со стимулами NADH и NADPH соответственно.

Материалы и методы исследования

Животные. Для моделирования двухстороннего абдоминального крипторхизма были отобраны 25 крыс породы Wistar самцов в возрасте 3,5–4 месяца, стандартного веса. Эксперименты выполняли в соответ-

ствии с требованием Хельсинкского соглашения о гуманном обращении с животными.

Яички крыс через паховый канал вывели из мошонки в брюшную полость с помощью нити Prolene 4/0, атравматично фиксировали в области латеральных каналов к брюшной стенке. Через две недели удаляли лигатуру и яички низводили обратно.

Для дальнейшего эксперимента животные были разделены на группы. Контрольная группа включала 7 животных, в группе нелеченых животных (9 крыс) после низведения яичек лечебных мероприятий не проводили. Группе животных с терапией кломифена цитратом (Sigma, Германия) (9 крыс) после низведения яичек ежедневно в течение 2 месяцев с помощью инсулинового шприца интраперитонеально вводили 1,25 мг препарата в 1 мл физраствора.

Для оценки активности тканевых микросомальных редуктаз спустя 3 месяца после низведения в мошонку яички с придатками удаляли, придатки взвешивали и гомогенизировали в растворе 5%-ной глюкозы в соотношении ткань/раствор 1:10. При помощи дозатора отбирали 50 мкл взвеси и анализировали, как описано ниже.

Хемилюминесцентный протокол. Оценку активности микросомальных редуктаз сперматозоидов методом стимулированной хемилюминесценции проводили для обоих придатков в идентичных условиях – в параллельных кюветах на 12-канальном приборе Lum-1200 («ДИСофт, Россия»). В кювету хемилюминометра, содержащую раствор Хенкса (pH 4,1), стабилизированный HEPES (Sigma-Aldrich, США) и 200 мкМ люцигенина (динитрат 10,10'-диметил-9,9'-биакридиния) (Sigma, США), помещали 50 мг ткани и регистрировали спонтанную хемилюминесценцию в течение 10 минут, затем вносили NADH или NADPH (Sigma, США) и регистрировали ответ в течение не менее 20 мин. Из хемилюминограммы определяли уровни стимулированной хемилюминесценции A_{NADH} и A_{NADPH} (рис. 1), которые отражают активность NADH-зависимой цитохром b5-редуктазы и NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазы соответственно.

Статистическая обработка. Статистическую обработку проводили при помощи пакета STATISTICA (StatSoft, США). Использовали критерий Шапиро – Уилка для оценки нормальности распределения. Описательную статистику приводили в виде медианы и межквартильного размаха. Различия между группами оценивали по непараметрическому критерию Манна – Уитни (уровень значимости $p = 0,05$).

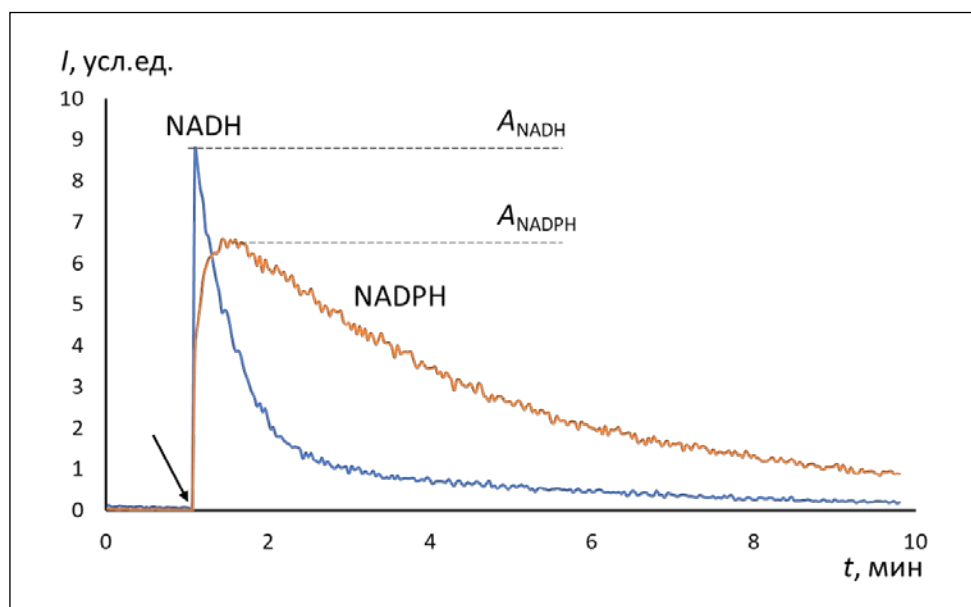


Рис. 1. Хемиллюминограммы NADH- и NADPH-зависимого ответа гомогената тканей придатков яичек крыс из контрольной группы; момент добавления стимулов указан стрелкой, приведен принцип определения амплитуд

Результаты исследования и их обсуждение

В исследовании применен метод люцигенин-активированной хемиллюминесценции суспензии клеток в присутствии стимулов – восстановительных эквивалентов NADH и NADPH, которая, согласно данным литературы, вызвана продукцией супероксидного анион-радикала, образующегося в результате восстановления люцигенина NADH-зависимой цитохром b5-редуктазой и NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазой [7, 8].

По критерию Шапиро – Уилка, основная часть данных не подчиняется закону

нормального распределения ($p < 0,05$), поэтому описательную статистику приводили в виде медианы и межквартильного размаха. В итоге были получены две совокупности данных, отражающие: а) активность NADPH-зависимой цитохром 450-редуктазы, б) активность NADH-зависимой цитохром b5-редуктазы сперматозоидов (таблица, рис. 2).

Интенсивности NADH- и NADPH-стимулированного ответа у интактных крыс были сопоставимы по величине, однако кинетика NADH-зависимой хемиллюминесценции развивалась существенно быстрее (рис. 1).

Амплитуды стимулированной хемиллюминесценции A_{NADH} и A_{NADPH} по группам животных

Группа	A_{NADH} , усл. ед.		A_{NADPH} , усл. ед.	
	Медиана	Межквартильный размах	Медиана	Межквартильный размах
Контроль	3,80	2,01	3,85	4,48
Экспериментальный крипторхизм без терапии	3,37	2,87	1,60	0,90
Экспериментальный крипторхизм после терапии кломифеном	1,78	2,15	1,86	0,66

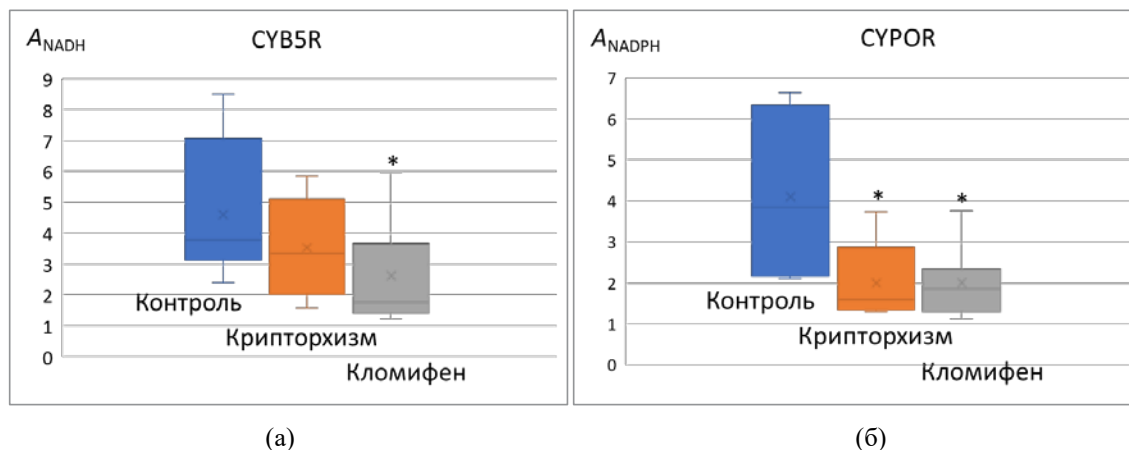


Рис. 2. Гистограммы (а) NADH- и (б) NADPH-зависимого ответа гомогенатов тканей придатков яичек крыс из контрольной группы (Контроль), из групп с моделированием экспериментального крипторхизма без лечения (Крипторхизм) и после лечения кломифеном (Кломифен)

По активности CYB5R группы контроля и крипторхизма не различались значимо, хотя медиана в последней оказалась ниже. Значимые различия по NADH-зависимому ответу были получены для групп животных с моделированием экспериментального крипторхизма без лечения и после терапии кломифеном ($p = 0,05$). Значимые различия по NADPH-зависимому ответу были получены для группы контроля по сравнению как с группой моделирования экспериментального крипторхизма ($p = 0,03$), так и группой животных с крипторхизмом, которым проводили терапию кломифеном ($p = 0,03$).

Таким образом, экспериментальный крипторхизм приводит к снижению активности как CYB5R, так и CYPOR, причем влияние на CYPOR было более выраженным. Терапия кломифеном не приводила к восстановлению активности CYB5R и CYPOR.

Для исследования активности CYB5R и CYPOR была выбрана модель бесплодия, обеспечивающая повреждение нескольких типов клеток яичка, но при этом являющаяся обратимой. Экспериментальная модель крипторхизма связана с воздействием на клетки семенников повышенной температуры в брюшной полости крысы, приводящей к нарушениям активности ряда ферментов, участвующих в дифференцировке клеток сперматогенного эпителия, уменьшается экспрессия специфической для яичек Na⁺/K⁺-АТФазы, регулирующей подвижность и капацитацию сперматозоидов [9]. Гипертермия пагубно воздействует на клетки Сертоли и стероидогенез в клет-

ках Лейдига, в которых к увеличивается продукция эстрадиола и снижается продукция тестостерона, что нарушает физиологию сперматогенеза [10]. При крипторхизме также развивается окислительный стресс, являющийся одной из причин сниженной продукции тестостерона. Окислительный стресс при крипторхизме коррелировал с повышенным уровнем апоптоза и изменениями в экспрессии генов, вовлеченных в энергетический и липидный метаболизм и стрессорный ответ [11].

Система цитохрома *b5* является важнейшим участником функционирования в клетках Лейдига. В частности, CYB5R участвует в поддержании на необходимом уровне коэнзима Q10 в восстановленной форме, являясь, таким образом, частью антиоксидантной системы. Изменение активности CYB5R сперматозоидов при крипторхизме может свидетельствовать об истощении этой системы, возможно, вследствие внутриклеточного окислительного стресса. Либо, наоборот, снижение активности этой системы может быть одной из причин окислительного стресса.

CYPOR вместе с цитохромом P450 является компонентом микросомального ферментного комплекса ароматазы, который в семенниках млекопитающих локализован в клетках Лейдига, Сертоли и в сперматозоидах [12]. Ароматаза участвует в конечном этапе необратимого синтеза эстрогенов из андрогенов, резервуарами для которых из-за высокого содержания липидов являются митохондрии. Окислительный стресс, который развивается при митохондриальной дисфункции, пагубно влияет на эндо-

плазматический ретикулум [13], при этом образуются белки с дефектной структурой, что приводит к снижению функции сперматозоидов или апоптозу [14]. В группе экспериментального крипторхизма снижение активности СУРОР было более выраженным, чем СУВ5R, что свидетельствует о большей чувствительности этой системы к нарушению условий созревания сперматозоидов. Возможно, причиной снижения активности СУРОР является окислительный стресс, развивающийся при крипторхизме и приводящий к окислительной модификации белков [15].

В целом в модели экспериментального крипторхизма активность обеих микросомальных редуктаз была снижена, что может стать мишенью новых терапевтических подходов. Терапия кломифеном не оказала благоприятного эффекта на активность СУВ5R и СУРОР, видимо, это повреждение при крипторхизме является необратимым.

Заключение

Нарушение температурного режима созревания сперматозоидов при экспериментальном крипторхизме приводит к снижению активности микросомальных редуктаз сперматозоидов, причем фермент СУРОР, участвующий в синтезе эстрогенов, более чувствителен к гипертермии. Вероятно, одной из причин снижения активности СУВ5R и СУРОР является окислительный стресс, развивающийся при крипторхизме. Несмотря на то, что модель крипторхизма считается обратимой, активность микросомальных редуктаз не восстанавливается при терапии кломифена цитратом, что делает целесообразным рассмотрение возможного сочетанного применения кломифена цитрата с антиоксидантной терапией или иной терапией, направленной на восстановление активности микросомальных редуктаз.

Список литературы

1. Sudhakar D.V.S., Shah R., Gajbhiye R.K. Genetics of Male Infertility – Present and Future: A Narrative Review. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2021. Vol. 14. No. 3. P. 217–227.
2. Dutta S., Majzoub A., Agarwal A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. *Arab Journal of Urology*. 2019. Vol. 17. No. 2. P. 87–97.
3. Elahian F., Sepehrizadeh Z., Moghimi B., Mirzaei S.A. Human cytochrome b5 reductase: structure, function, and potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2014. Vol. 34. No. 2. P. 134–143.
4. Wisniewska A., Jagiello K., Mazerska Z. [NADPH-cytochrome P450 reductase, not only the partner of cytochrome P450]. *Postepy Biochemii*. 2009. Vol. 55. No. 3. P. 272–278.
5. Fang J., Wang S., Wang H., Zhang S., Su S., Song Z., Deng Y., Qian J., Gu J., Liu B., Cao J., Wang Z. The Cytochrome P4501A1 gene polymorphisms and idiopathic male infertility risk: a meta-analysis. *Gene*. 2017. Vol. 535. No. 2. P. 93–96.
6. Rodriguez K.M., Pastuszak A.W., Lipshultz L.I. Enclomiphene citrate for the treatment of secondary male hypogonadism. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2016. Vol. 17. No. 11. P. 1561–1567.
7. Baker M.A., Krutskikh A., Curry B.J., McLaughlin E.A., Aitken R.J. Identification of cytochrome P450-reductase as the enzyme responsible for NADPH-dependent lucigenin and tetrazolium salt reduction in rat epididymal sperm preparations. *Biology of Reproduction*. 2004. Vol. 71. No. 1. P. 307–318.
8. Baker M.A., Krutskikh A., Curry B.J., Hetherington L., Aitken R.J. Identification of cytochrome-b5 reductase as the enzyme responsible for NADH-dependent lucigenin chemiluminescence in human spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 2005. Vol. 73. No. 2. P. 334–342.
9. Thundathil J.C., Rajamanickam G.D., Kastelic J.P., Newton L.D. The effects of increased testicular temperature on testis-specific isoform of Na⁺/K⁺-ATPase in sperm and its role in spermatogenesis and Sperm Function. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012. Vol. 47. Suppl. 4. P. 170–177.
10. Schulster M., Bernie A., Ramasamy R. The role of estradiol in male reproductive function. *Asian Journal of Andrology*. 2016. Vol. 18. No. 3. P. 435.
11. Ahotupa M., Huhtaniemi I. Impaired detoxification of reactive oxygen and consequent oxidative stress in experimentally cryptorchid rat testis. *Biology of Reproduction*. 1992. Vol. 46. No. 6. P. 1114–1118.
12. Blakemore J., Naftolin F. Aromatase: Contributions to Physiology and Disease in Women and Men. *Physiology*. 2016. Vol. 31. No. 4. P. 258–269.
13. Kotwicka M., Skibinska I., Jendraszak M., Jedrzejczak P. 17beta-estradiol modifies human spermatozoa mitochondrial function in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*. 2016. Vol. 14. No. 1. P. 50.
14. Inceoglu B., Bettaieb A., Haj F.G., Gomes A.V., Hammock B.D. Modulation of mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress are key mechanisms for the wide-ranging actions of epoxy fatty acids and soluble epoxide hydrolase inhibitors. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*. 2017. Vol. 133. P. 68–78.
15. Zeeshan H.M., Lee G.H., Kim H.R., Chae H.J. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. Vol. 17. No. 3. P. 327.