ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

ИЗСЛЕДВАНЕ НА LDH–X И МОТИЛИТЕТА ПРИ СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ ВИДА *OVIS ARIES*

РОСЕН СТЕФАНОВ, БОЙКО ГЕОРГИЕВ, ДИМИТРИНА КАЧЕВА,
ПАУЛИНА ТАУШАНОВА, МИХАИЛ ЧЕРВЕНКОВ, ЕЛЕНА КИСТАНОВА
Институт по биология и имунология на размножаването, БАН – София

Редица изследвания върху LDH и някои оксиредуктази свързват тези ензими с биологичните качества на сперматозоидите при *in vitro* съхранение (**Цветкова и кол.,** 1999**; Цветкова,** 2000**; Allison et al.,** 1996). В сперматозоидите LDH е локализирана в плазмолемата, в митохондриалния апарат и аксонемата **(Mann,** 1964**)** и е свързана с подвижността **(Йонков,** 1986**)** и оплодителната им способност**. (Tosic and Walton ;** 1946, **Йонков и кол.,**1999**).** Съществуват задълбочени изследвания върху изоензимния спектър на LDH и значението на някои нейни изоензими за биологичната пълноценност на сперматозоидите (**Brancaccio et al.,** 2006). Според **Apella and Markert (**1961) от двата типа субединици се образуват следните изоензими на LDH: LDH_1 (BBBB), LDH_2 (BBBA) LDH_3 (BBAA), LDH_4 (BAAA) и LDH_5 (AAAA). **Blanco and Zinkham** (1963**)** и **Goldberg** (1974) установяват в семенниците на човек шести изоензим на LDH от съвсем друг тип. Той е характерен за половата сфера, установява се след настъпването на половата зрялост и се контролира от отделен ген **(Burgos et al.,** 1979**).**

При селскостопанските разплодници коч и бик също е установена изоформата LDH-X, която играе съществена роля при зреенето на сперматозоидите в надсеменника и при движението им в женския полов апарат. От изложеното дотук, се вижда, че специфичният за половата система ензим LDH-X може да се използва като специфичен биомаркер за функционалното състояние на мъжките гамети при различни биологични видове, което определя и целта на настоящото изследване, а именно да се установи връзка между активността на LDH-X в сперматозоиди от коч и техния мотилитет.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

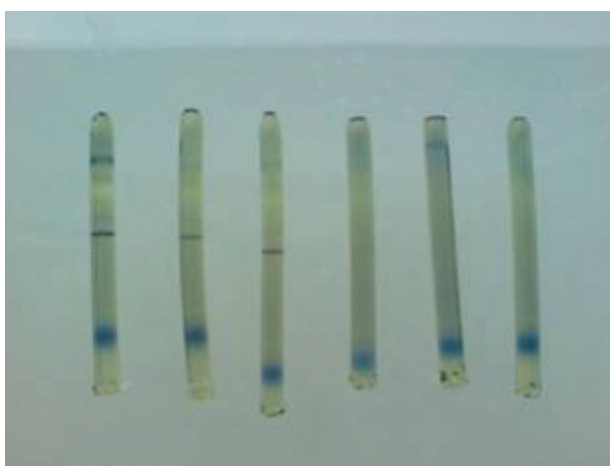
В експериментите бяха включени 24 еякулата от 12 клинично здрави кочове с нормално развити полови органи, изравнени по възраст, поставени при еднакъв режим на хранене, гледане и полово използване, съобразени с нормативните изисквания. Спермата бе получена през месец юли с помощта на изкуствена вагина и бе разредена в среда 6 А за по нататъшно изследване.

За сперматологичните изследвания, с цел определяне мотилитета на сперматозоидите, бе използван Sperm Class Analyzer (Microptic Systems). Електрофоретичният профил на LDH-X беше определян във водно – и тритон-разтворими екстракти на сперматозоиди от коч чрез използване на дискова електрофореза по Дейвис с 7.5%-ов полиакриламиден гел. Биохимичната активност на ензима LDH – X

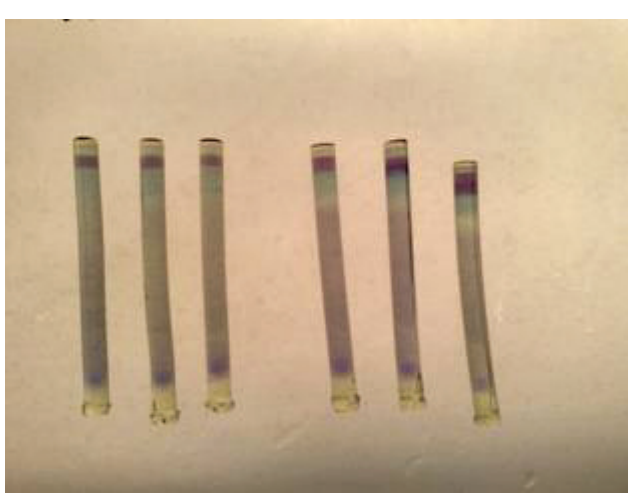
в тритоновите и водните екстрати беше определена чрез Автоматичен спектрофотометър – Mindrai BA 88.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

На фиг. 1 и фиг. 2 са представени електрофоретичните профили на водно- и тритонразтворими екстракти на сперматозоиди от вида *Ovis aries*.



Фиг. 1. **Електрофоретичен профил на LDH-X на водноразтворими екстракти на еякулати от вида *Ovis aries***



Фиг. 2. **Електрофоретичен профил на LDH-X на тритонразтворими екстракти на еякулати от вида *Ovis aries.***

LDH-X се проявява на електрофореграмите под формата на разлята тъмна ивица на посветъл фон (фиг. 1 и 2.). Така получените резултати потвърждават становището на редица автори, че в сперматозоидите на бозайниците се открива основно изоензим LDH--X **(Blanco and Zinkham,** 1963**; Goldberg ,**1974**).**

В табл.1 са представени стойностите по отношение на мотилитета и LDH-активността на сперматозоидите във воден и тритонов екстракт от еякулати с висок и нисък процент сперматозоиди с праволинейно-настъпателни движения. От данните в нея се вижда, че при еякулатите с по-висок процент подвижни сперматозоиди е установена по-висока активност на LDH—X както при водните, така и при тритоновите екстракти. Тази зависимост между активността на LDH в половите клетки и тяхната подвижност подкрепя съществуваща в литературата хипотеза, че тестис-специфичният за бозайниците изоензим LDH-X има важно значение за функционалния статус на сперматозоидите **(Blanco and Zinkham,** 1963). LDH-X е един от регулаторните ензими, включени в метаболитните процеси, необходими за мотилитета и фертилитета (**Gavella and Cvitkovic,** 1985**).** Този ензим играе важна метаболитна роля в спермалната капацитация **(O'Flaherty et al.,** 2002; **Duan and Goldberg**, 2003). Авторите доказват, че инхибирането на LDH-активността блокира процеса на капацитация, което води до понижаване на оплодителната способност. Като имаме предвид тези и други съществуващи в литературата данни **(Brooks,** 2001**)** можем да предположим, че една от главните причини за ниската заплодяемост при замразена сперма от коч е загубата на LDH-активността при голям процент от сперматозоидите след криоконсервация. **Захариев (**1984) също доказва връзката между активността на LDH-X, мотилитета и фертилитета на сперматозоидите от *Boss taurus* и *Ovis aries*. Неговите изследвания демонстрират и значението на ензима за транспорта на мъжките гамети в женския полов апарат.

Таблица 1. **Мотилитет и LDH- X активност на сперматозоидите във воден и тритонов екстракт от: еякулати с висок (А) и с нисък (В) процент сперматозоиди с праволинейно-настъпателни движения**

Варианти	Мотилитет %	LDH- активност във воден екстракт U/mg. белтък	LDH- активност в тритонов екстракт U/mg. белтък
А	32.34	1.049±0.4	0.161±0.32
В	14.32	0.458±0.29	0.089±0.28

ИЗВОД

При еякулатите с по-висок процент подвижни сперматозоиди е установена по-висока LDH -активност както при водните, така и при тритоновите екстрати.

ЛИТЕРАТУРА

1. Захариев, З., 1986. Проучвания върху биологичната пълноценност на семенна течност при видовете Bos taurus and Ovis aries, Дисертация ИБИР, София, 127-148.

2. Йонков, Й., 1986. Цитохимично проучване на НАДН-ТР и лактатдехидрогеназа в сперматозоиди на човек. Автореферат на дисертация, Медицински факултет, Варна, 14-23

3. Йонков, Й., М. Събев, П. Цветкова, 1999. Хистохимично изследване на лактатдехидрогеназата в нормарни следпубертетни тестиси на човек. II Национален конгрес

4. Цветкова, П., 2000. Постпаротиден орхид и инфертилитет. НФ Андрология. С, 65.

5. Цветкова, П., Д. Цветков, М. Събев, 1999. Сперматологични и ензимоцитохимични маркери на хроничен неспецифичен простатит и инфертилитет. Урология, 4,122-126.

6. Allison, A. and E. Hartree, 1996. Lysosomol nature of the acrosomes of ram spermatozoa. Biochem. J. III, 35-36.

7. Apella, D. and C. Markert, 1961. Biochem. Biophis. Res. Communs., 6, 171.

8. Blanco, A. and Zinkham W. H., 1963. Lactatedehydrogenase in human testis. Science,153, 139-601

9. Brancaccio, F., M. Limongelli and N. Maffulli, 2006. Monitoring of serum enzymes in sport British Journal of Sports Medicine; 40:96-97;
Brooks G. A., 2001. Lactate shuttles in Nature Biochem. Soc. Trans. 30, (258–264)

10. Burgos, C., N. Gerez de Burgos, C. Coronel and A. Blanco, 1979. Substrate specificity of lactate dehydrogenase isoenzyme C, from human spermatozoa and a possible selective assay. J Repard Fertil. 55, 101-108.)

11. Duan, C., Goldberg E., 2003. Inhibition of lactate dehydrogenase C4 (LDH-C4) blocks capacitation of mouse sperm in vitro.Cytogenet Genome Res, 103:352-359.

12. Gavella, M. and Cvitkovic, P.,1985. Semen LDH-X deficiency and male infertility. Arch. of Andrology

13. Goldberg E., 1974. The seminal fluid izoenzyme LDH-C in infertile men. Biology of Reproduction Vol 18, 120-121

14. Mann, T., 1964. The biochemistry of semen and of the male reproductive track, Neuthuen, London, 187.

15. O'Flaherty, C. M., N. B. Beoriequi and M. T. Beconi, 2002. Lactate dehydrogenase –C4 is involved in heparinapd NADH – dependent bovine sperm capacitation (Abstract), Andrologia, , 34, 91.

16. Tosic, Y. and Walton, A.,1946. Formation of hydrogen peroxide by spermatozoa and its inhibitory effect on respiration. Nature, 158, 485.

RESEARCH ON LDH-X AND SPERM MOTILITY IN *OVIS ARIES* SPECIES

R. Stefanov, B. Georgiev, D. Kacheva, P. Taushanova, M. Chervenkov, E. Kistanova
Institute of Biology and Immunology of Reproduction, BAS – Sofia

SUMMARY

Current study established relationship between LDH-X activity and motility in ram spermatozoa. In the experiment were used 12 ejaculates from 6 clinically healthy rams, equilibrated on age, feeding and farming. Sperm parameters was determined on Sperm Class Analyzer (Microptic Systems). The biochemical activity and electrophoretical profile of LDH-X were investigated in water and Triton X-100 soluble extract from ram spermatozoa. The obtained results shown, that ejaculates with higher percent motile spermatozoa had higher activity of LDH-X.

rossenstefanov@yahoo.com