

## 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<sub>1</sub> (BBBB), LDH<sub>2</sub> (BBBA), LDH<sub>3</sub> (BBAА), LDH<sub>4</sub> (BAAA) и LDH<sub>5</sub> (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 разплодни 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 изло-

женото 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

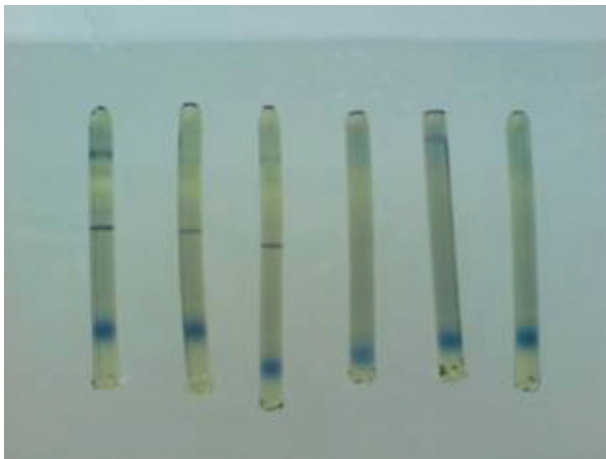
В експериментите бяха включени 24 еякулата от 12 клинично здрави кочове с нормално развити полови органи, изравнени по възраст, поставени при еднакъв режим на хранене, гледане и полово използване, съобразени с нормативните изисквания. Спермата бе получена през месец юли с помощта на изкуствена вагина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

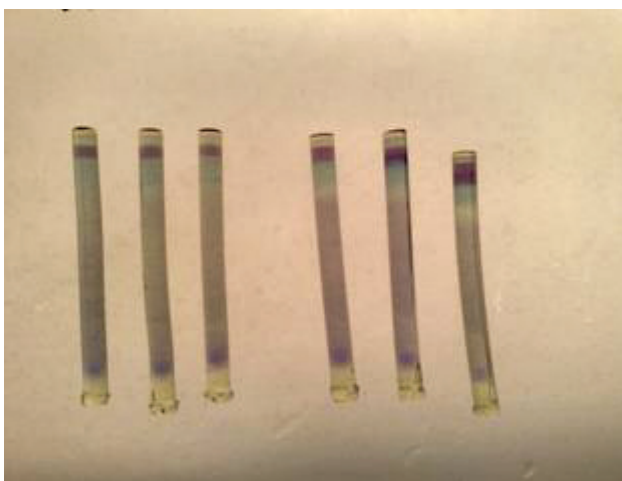
в тритоновите и водните екстракти беше определена чрез Автоматичен спектрофотометър – Mindrai BA 88.

### 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 по-светъл 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 *Bos 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	LDH- активност в тритонов екстракт
		U/mg. белтък	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

- Захариев, З.**, 1986. Проучвания върху биологичната пълноценност на семенна течност при видовете *Bos taurus* and *Ovis aries*, Дисертация ИБИР, София, 127-148.
- Йонков, Й.**, 1986. Цитохимично проучване на НАДН-ТР и лактатдеhidрогеназа в сперматозоиди на човек. Автореферат на дисертация, Медицински факултет, Варна, 14-23
- Йонков, Й., М. Събев, П. Цветкова**, 1999. Хистохимично изследване на лактатдеhidрогеназата в нормарни следпубертетни тестиси на човек. II Национален конгрес
- Цветкова, П.**, 2000. Постпаротиден орхид и инфертилитет. НФ Андрология. С, 65.
- Цветкова, П., Д. Цветков, М. Събев**, 1999. Сперматологични и ензимоцитохимични маркери на хроничен неспецифичен простатит и инфертилитет. Урология, 4,122-126.
- Allison, A. and E. Hartree**, 1996. Lysosomal nature of the acrosomes of ram spermatozoa. *Biochem. J.* III, 35-36.
- Apella, D. and C. Markert**, 1961. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6, 171.
- Blanco, A. and Zinkham W. H.**, 1963. Lactate dehydrogenase in human testis. *Science*, 153, 139-601
- 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)
- 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.)
- 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.
- Gavella, M. and Cvitkovic, P.**, 1985. Semen LDH-X deficiency and male infertility. *Arch. of Andrology*
- Goldberg E.**, 1974. The seminal fluid isoenzyme LDH-C in infertile men. *Biology of Reproduction Vol 18*, 120-121
- Mann, T.**, 1964. The biochemistry of semen and of the male reproductive track, Neuthuen, London, 187.
- 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.
- 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