„Izoenzymy dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w plemnikach i tkankach ryb”
mgr Jadwiga Gronczewska

Niewiele jest wiadomo na temat funkcjonowania izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej (LDH, EC 1.1.1.27) w plemnikach ryb w porównaniu do ich ekspresji w tkankach somatycznych. LDH jest końcowym enzymem beztlenowej fazy oddychania (glikolizy), katalizującym odwracalną reakcję przekształcania pirogronianu w mleczan, przy udziale dwunukleotydu nikotynamidoadeninowego (NAD) jako koenzymu. Pirogronian powstający z rozkładu glukozy w warunkach tlenowych ulega całkowitemu utlenieniu do dwutlenku węgla i wody w mitochondriach. W warunkach beztlenowych np. podczas intensywnej pracy mięśni pirogronian jest redukowany do mleczanu. Reakcja jest bardzo istotna, gdyż zapewnia regenerację NAD niezbędnego do podtrzymania procesu glikolizy i produkcji ATP.

U ryb i innych kręgowców LDH jest tetramerem o masie cząsteczkowej około 140 kD. Podjednostki LDH kodowane są przez trzy niealleliczne geny (*Ldh-A*, *Ldh-B* i *Ldh-C*), których produkty po przypadkowej agregacji tworzą homo- i heterotetrameryczne izo- i allenzymy LDH. Częstotliwość występowania poszczególnych form w tkankach zależy od aktywności genów kontrolujących syntezę podjednostek i możliwości ich agregacji. Izoenzymy LDH różnią się właściwościami kinetycznymi i fizykochemicznymi i wykazują wyraźną ekspresję tkankową.

Ryby narażone są na zmiany czynników środowiska zewnętrznego, jak temperatura, światło, ciśnienie, zasolenie oraz ilość rozpuszczonych gazów, czy różnego typu zanieczyszczenia. Obecność różnorodnych form izoenzymów u ryb stwarza większe możliwości katalityczne, które mogą stawić czoło tym zmianom, mając również wpływ na wewnątrzkomórkowe środowisko i działające w nim szlaki enzymatyczne. Plemniki to wysoce wyspecjalizowane komórki, które w swoim rozwoju przechodzą różne stany metaboliczne, i szczególnie są narażone na zmiany środowiskowe. Podczas spermatogenezy większość energii kierowana jest głównie w proces biosyntezy. Dojrzałe plemniki zapotrzebowanie na ATP przełączają z procesu biosyntezy na ruch warunkujący zapłodnienie. Te dwa okresy oddzielone są okresem spoczynkowym, który charakteryzuje się niską wydajnością metaboliczną. Różnorodność reprodukcji wpływa na różnice w budowie plemników, a także na ekspresję niektórych enzymów, szczególnie zaangażowanych w homeostazę ATP. U większości ryb aparat ruchowy plemników jest zablokowany w płynie nasiennym gonad. Dopiero kontakt ze środowiskiem zewnętrznym (woda słodka, morska)

powoduje odblokowanie ich ruchliwości. U ryb słodkowodnych jak i morskich ruchliwość plemników może być rezultatem niespecyficznych hipo- lub hiperosmotycznych zmian, wpływających na zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów. Wśród wielu zanieczyszczeń chemicznych, na które są narażone organizmy wodne, tributylocyna (TBT) jest związkiem trwałym i toksycznym, stymuluje zaburzenia endokrynologiczne u ryb, wpływa na zmniejszenie ruchliwości i żywotności plemników i ulega bioakumulacji. Była najczęstszą pochodną cynoorganiczną stosowaną od około 1950 roku w farbach przeciwporostowych do malowania kadłubów łodzi, statków, rur, wież chłodniczych i wodnych systemów chłodniczych, jako fungicyd w tekstyliach, papierniach, rolnictwie, a także w browarach. Pod zbiorczą nazwą TBT kryje się kilka związków, których cechą wspólną jest obecność kationu TBT w strukturze. Jako przykład można wymienić wodorek, chlorek, wodorotlenek TBT. Pomimo zakazu stosowania TBT, nadal występuje w środowisku wodnym, a największe jego stężenie odnotowano w wodach przybrzeżnych, portach, stoczniach i osadach dennych. Plemniki są szczególnie narażone na zmiany środowiskowe. Do odpowiedniego funkcjonowania wymagają dopływu energii w postaci ATP. Produkcja ATP może być wspomagana dzięki reakcji katalizowanej przez LDH. Wcześniejsze badania wykazały, że utrzymanie dobrego poziomu ATP w plemnikach ryb jest ściśle związane z dobrą ruchliwością. Jako miarę magazynowania energii w puli nukleotydów adeninowych w żywych komórkach zaproponowano ładunek energetyczny adenylanów (AEC).

$$AEC=[ATP]+½[ADP]/[ATP]+[ADP]+[AMP].$$

Wiele wcześniejszych badań potwierdziło, że fizjologiczna wartość AEC w komórkach somatycznych waha się od 0,8 do 0,95.

W świetle powyższych faktów, celem moich badań w ramach pracy doktorskiej była identyfikacja i izolacja izoenzymów LDH z plemników i innych tkanek wybranych gatunków ryb, oraz wyznaczenie ich właściwości fizykochemicznych i katalitycznych, ponadto określenie wpływu TBT na aktywność LDH w plemnikach w porównaniu do tkanki somatycznej, oraz wpływu metabolitów na bioenergetykę plemników na wybranym przykładzie.

Badania w ramach pracy doktorskiej rozpoczęto od określenia aktywności LDH i kilku innych enzymów w plemnikach śledzia (*Clupea harrengus*) jako przedstawiciela gatunku słonowodnego, oraz karpia (*Cyprinus carpio*) i suma afrykańskiego (*Clarias gariepinus*), reprezentujących środowisko słodkowodne.

Uzyskane wyniki wykazały, że aktywność LDH w plemnikach śledzia była niska, a w plemnikach suma i karpia była około 10 i 14 razy wyższa. Natomiast aktywność innych enzymów (CK, MDH, IDH, ME G-6-PDH) była wyższa w plemnikach śledzia niż w plemnikach karpia i suma. To sugeruje, w przypadku śledzia, strategię biochemicznej adaptacji do metabolizmu w warunkach wysokiego poziomu tlenu [**1**]. W celu identyfikacji izoenzymów LDH u śledzia, karpia i suma w plemnikach, i czterech tkankach somatycznych (mięśniu szkieletowym, sercu, oku i wątrobie) zastosowano poziomą elektroforezę w 14 % żelu skrobiowym przeprowadzoną w warunkach natywnych. U śledzia wykazała ona obecność dwóch izoenzymów LDH-B_4 i LDH-A_2B_2 w plemnikach, sercu, oku i wątrobie oraz izoenzymu LDH-A_4 w mięśniu szkieletowym, wątrobie oraz niewielką aktywność tej formy w sercu i oku [**1**] [**2**]. U karpia w większości tkanek wzór elektroforetyczny LDH składał się maksymalnie z dziewięciu izoenzymów. Liczba izoenzymów LDH w plemnikach przypominała ekspresję w oku karpia. W mięśniu szkieletowym karpia zaobserwowano dwa główne miejsca aktywności LDH, które są wynikiem dominującej aktywności locus *Ldh-A*. Duża liczba izoenzymów jest konsekwencją poliploidyzacji podczas ewolucji tego gatunku. Natomiast jeden izoenzym LDH-B_4 obecny w plemnikach suma przypominał ekspresję w wątrobie i sercu, gdzie aktywność locus *Ldh-B* jest najwyższa, a w przypadku serca pojawiło się pięć izoenzymów - produktów *Ldh-A* i *Ldh-B* [**2**]. Aby uzyskać czyste formy obu izoenzymów LDH z plemników śledzia zastosowano złoże 5'-AMP-Sepharose 4B, a następnie DEAE-Sepharose. Frakcje zawierające izoenzymy LDH-B_4 i LDH-A_2B_2 połączono oddzielnie, zagęszczono w worku próżniowym i 40% glicerolu w 0,1 M buforze Na-fosforanowym, pH 7,1. Tak przygotowane preparaty przechowywano w – 20 ^{o}C. Izoenzym LDH-A_4 z mięśnia szkieletowego śledzia uzyskano po zastosowaniu oczyszczania na złożu DEAE-Sepharose, 5'-AMP-Sepharose 4B, Oxamate-agarose [**1**] Zagęszczono i przechowywano w taki sam sposób jak izoenzymy z plemników. Analizę czystości otrzymanych preparatów wykonano za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE), która wykazała obecność pojedynczych prążków we wszystkich oczyszczonych formach izoenzymów [**1**]. Dla otrzymanych izoenzymów określono kilka właściwości kinetycznych wykonanych w wyznaczonym uprzednio optimum pH dla reakcji redukcji pirogronianu. Badania wykazały największe podobieństwo między izoenzymami LDH- A_2B_2 i LDH-B_4. Izoenzym LDH-A_2B_2 wykazał najwyższe powinowactwo do pirogronianu, LDH-B_4 pośrednie, a najniższe izoenzym LDH-A_4. Podobnie hamowanie reakcji przez wysokie

stężenie pirogronianu jest wyższe w przypadku LDH- A_2B_2, a najniższe dla izoenzymu LDH-A_4. Wyniki pomiaru termostabilności przeprowadzone dla poszczególnych izoezymów, wskazały izoenzym LDH-A_4 jako najbardziej termolabilny, a największą termostabilność osiągnął izoenzym LDH-B_4 tracąc aktywność powyżej 70 ^oC [**1**].

Zanieczyszczenia, na jakie narażone są organizmy wodne wpływają negatywnie na ich stan fizyczny i ma to odzwierciedlenie w złym funkcjonowaniu enzymów w różnych szlakach enzymatycznych. Doświadczenia, wykonano z wykorzystaniem oczyszczonej formy LDH-A_4 z mięśnia szkieletowego oraz LDH-B_4 z plemników śledzia. Wyniki wykazały zależność aktywności LDH od stężenia TBT w środowisku inkubacyjnym [**2**, **3**]. Bezpośrednio po dodaniu 10 μM TBT aktywność LDH A_4 spadła do 65%, w ciągu 30 minut do 30% [**3**]. Zaobserwowano hamowanie aktywności LDH wraz ze wzrostem stężenia TBT i czasu inkubacji. Większą aktywność (45%) w tych samych warunkach zachował izoenzym LDH-B_4 z plemników śledzia. Natomiast dziewięć izoenzymów LDH z plemników karpia zachowało 75% aktywności enzymatycznej [**2**]. W celu ochrony przed negatywnym wpływem TBT na aktywność dehydrogenazy mleczanowej przetestowano albuminę bydlęcą (BSA), dodając do mieszaniny inkubacyjnej. Uzyskane wyniki wskazały, że dodanie BSA w stężeniu 10 μg ml^{-1} jest w stanie chronić aktywność LDH-A_4 do stężenia 30 μM TBT. Przy stężeniu 100 μM TBT w obecności 10 μg ml^{-1} BSA obserwowano 90% aktywności enzymu [**3**].

Plemniki przechodząc różne stany metaboliczne potrzebują dobrego poziomu ATP, który jest mierzony wartością ładunku energetycznego adenylanów. W pracy zbadano wpływ kilku substratów egzogennych (tj. glicyna, seryna, alanina, glukoza, glicyna plus mleczan plus pirogronian, mleczan plus pirogronian) na wartość ładunku energetycznego adenylanów (AEC) dla plemników suma. Uzyskane dane dowiodły, że pirogronian i mleczan są istotnymi metabolitami dla bioenergetyki plemników suma, ponieważ utrzymują AEC w dobrym stanie 0,78 po 120 h inkubacji, zbliżonym do stanu fizjologicznego. Wśród badanych substratów egzogennych glicyna wydaje się być najmniej korzystna (0,09) dla utrzymania wartości AEC [**2**].

Wyniki omówione w pracach wchodzących w skład rozprawy doktorskiej rzucają więcej światła dla lepszego zrozumienia funkcji LDH w plemnikach i tkankach ryb i jego roli w metabolizmie komórki:

- LDH-A_2B_2 i LDH-B_4 w plemnikach śledzia, LDH-B_4 w plemnikach suma potwierdzają lepsze przystosowanie do warunków tlenowego metabolizmu.
- LDH-A_4 z mięśnia śledzia jest najbardziej hamowanym izoenzymem przez TBT.
- Oba substraty reakcji LDH (pirogronian i mleczan) utrzymują ładunek energetyczny adenylanów (AEC) w plemnikach suma w zakresie wartości fizjologicznych.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

1. **Gronczewska J**, Ziętara MS, Biegniewska A, Skorkowski EF. 2003. Enzyme activities in fish spermatozoa with focus on lactate dehydrogenase isoenzymes from herring *Clupea harengus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 134, 399-406

2. **Gronczewska J**, Skorkowski EF. 2020. Lactate dehydrogenase in fish spermatozoa and its role in sperm cell bioenergetics. *Indian Journal of Experimental Biology*, 58, 7-13

3. **Gronczewska J**, Biegniewska A, Ziętara MS, Skorkowski EF. 2004. Inhibition by tributyltin of herring skeletal muscle lactate dehydrogenase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 137, 307-311