

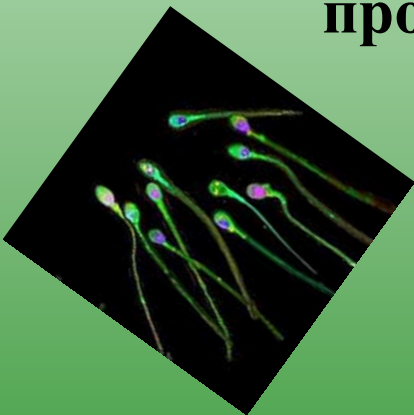


ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”

BG051PO001-3.3.06 -0059

ФУНДАМЕНТАЛНО И ПРИЛОЖНО ОБУЧЕНИЕ НА ДОКТОРАНТИ, ПОСТДОКТОРАНТИ, СПЕЦИАЛИЗАНТИ И МЛАДИ
УЧЕНИ В ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНИ БИОЛОГИЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ И ИНОВАЦИОННИ БИОТЕХНОЛОГИИ

Изолиране и идентифициране на спермално плазмени протеини, участващи в процеса капацитация



Д-р Деница Даскалова

Гл.асистент в секция ” Репродуктивни биотехнологии и криобиология на
гаметите”

Институт по биология и имунология на размножаването “акад. Кирил
Братанов”

Българска Академия на Науките

Проучванията в областта на репродуктивната биология и биотехнологии, свързани с ролята на спермално плазмените протеини (СПП) са от голям интерес в последните години.

Целта на тези проучвания е разкриване на механизмите, отговорни за оптималното запазване на биологичната пълноценност на половите клетки, до момента на тяхното аплициране в женския полов апарат.

Провеждането на изследвания върху биологичната роля на определени протеини от семиналната плазма (СП) върху функциите на сперматозоидите, свързани с процесите капацитация и при съхранение и криоконсервация на гаметите са важни от гледна точка оптимизиране на репродуктивните биотехнологии.

СП е комплекс от секрецията на мъжките полови жлези и играе важна роля за съзряването на сперматозоидите (JobimM et al 2004). Ролята на СП при сперматозоиди от бозайници до голяма степен е въпрос с много различни мнения от страна на учените (Marcelo G et al 2012). Има редица изследвания за инхибиторния и стимулиращ ефект на някои СПП върху сперматозоидите. Някои автори, считат че СП при бик (Maxwell и др. 1996), коч (Ashworth et al. 1994; Graham 1994; Maxwell et al. 1996) и нерез (Maxwell et al. 1996) е отговорна за подържането на подвижността и жизнеспособността на сперматозоидите.

Установено е, че добавянето на СП в замразено-размразени сперматозоиди от коч, подобряват подвижността, интегритетът на акрозомата и функционирането на митохондриите (Maxwell et al. 2007; Rebolledo et al. 2007) и увеличават устойчивостта на сперматозоите от нерез (Pursel et al. 1973; Herná ndez et al. 2007).

Съществуват противоположни на тези мнения за ролята на СП. Авторите Morrier et al. 2003, Moore et al. 2005, Dominguez et al. 2008 изказват мнение, че добяването на СП не влияе върху качествените показатели на замразено-рамразени сперматозоиди от коч и жребец. Други автори считат, че инкубирането на сексирани сперматозоиди със СП има отрицателно влияние върху качеството на семенната течност (Maxwell et al. 2007).

За нас интерес представлява мнението, че СП съдържа фактори, които играят съществена роля върху мотилитета, оплодителната способност и участват в процеса капацитация на сперматозоидите. Такива изследвания има при нерез, бик, коч, жребец и плъхове (Metayer et al. 2001, Klinefelter et al. 2002, Manjunath P et al, 2002, Strzezek et al. 2005).

Една от известните хипотези за механизма на действие на СП е свързана, че специфични компоненти от нея, по-специално протеините. Счита се, че някои от СПП адсорбират върху ПМ на еякулирания сперматозоид. По този начин се подпомага преминаването им през женския репродуктивен тракт. Тези компоненти изглежда имат важна функция за поддържането на стабилността ПМ до настъпването на капацитацията. Някои автори ги определят като декапацитиращи фактори (Muino-Blanco T et al 2008). В същото време в СП има фактори, които редуцират стабилността на ПМ и съответно повлияват върху оплодителната способност. Такива изследвания са правени при бик (Fraser L et al. 1996) и нерез (Caballero S et al. 2005) *in vitro*.

От анализа на данни при говеда, основните протеини, които се свързват с капацитацията са Bovine seminal plasma (BSP proteins: BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP 30-kDa) proteins. Предполага се, че тези протеини имат афинитет на свързване и стимулират ефлукса на холестерола, плазмалогена, сфингомиелина, ФС и на ФХ от ПМ. Така се индуцира капацитация. Смята се, че BSP-A1/A2 и BSP 30-kDa стимулират специфично ФЛ ефлукс до 29.56%. За разлика от тях, BSP-A3 има малко по-слаб и по-бавен ефект върху капацитацията. Като цяло авторите считат, че всичките тези протеини вземат участие в процеса капацитация (Therien I. et al 1999, Lusignan Marie-France et al. 2007).

Разкриването на механизмите на взаимодействие сперматозоид-протеини може да покаже верния път за контрол на уврежданията на сперматозоидите, които настъпват при *in vitro* третиране. Въпреки наличието на редица изследвания върху процеса капацитация, определянето на биологичната ролята на определени протеини от СП, свързани с този процес е важна и се нуждае от допълнителни анализи.



Желанието ми да участвам в този проект се основава на направени от нас редица проучвания в тази област и получените резултати, както и на защитеният от мен дисертационен труд.

В наши изследвания установихме, че някои СПП от нерез имат протективен ефект при нискотемпературно съхранение на сперматозоиди. Така например, СПП с pI 7.35 и 19 kDa и pI 7.35 и 16 kDa pI 5.20 и 18 kDa са сходни с групата на спермадхезините, а протеинът с pI 4.50 и 26 kDa е сходен на протеин от групата на ретинол свързващите протеини. Тези протеини и протеините с pI 4.30 и 26 kDa и pI 5.85 и 29 kDa, са кандидати за протекторни агенти при нискотемпературно съхранение на сперма от нерез.

Настоящите ми интереси са за доразработване на темата за ролята СПП, свързани с процеса капацитация.

За провеждане на изследванията ще бъдат използвани следните методи:

- методи за изолиране на СПП, чрез Gel Permeation Chromatography ;**
- биологичен опит за установяване на протеини от СП, които могат да имат положителен ефект и да индуцират капацитация при сперматозоиди;**
- SCA анализ върху морфология, ПМ и ДНК интегритет, функция на митохондрии;**
- 2Д електрофореза.**



ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”

BG051PO001-3.3.06 -0059

ФУНДАМЕНТАЛНО И ПРИЛОЖНО ОБУЧЕНИЕ НА ДОКТОРАНТИ, ПОСТДОКТОРАНТИ, СПЕЦИАЛИЗАНТИ И МЛАДИ УЧЕНИ В ИНТЕРДИСЦИПЛИНАРНИ БИОЛОГИЧНИ НАПРАВЛЕНИЯ И ИНОВАЦИОННИ БИОТЕХНОЛОГИИ

Материали, които ще бъдат закупени по проекта:

- **FLUKA Sodiom phosphate monobasic anhydrous puriss for HPLC;**
- **SIAL Di-sodium hydrogen phosphate dodecadrate, crystallizer;**
- **Пипети, типчета, ръкавици, епендорфки и др.;**
- **Стъкла, гребени и други консумативи за SDS-PAGE;**
- **Calcium Ionophore A23187;**
- **Lectin from Pisum Sativum - FITC labeled FITC;**
- **Ann V- FITC kit;**
- **Sperm Blue uninvtasal solution;**
- **Halomax DNA fragmentation kit и др;**

