МИНИСТЕРСТВО
НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ"
BG051PO001-3.3.06-0052

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

Проектът се осъществява с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси" 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез "Европейския социален фонд"

„Изолиране и характеристика на zona pellucida във връзка с разработване на методи за контрацепция при женски кучета”.

д-р Десислава Градинарска

Асистент при секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите”

Институт по биология и имунология на размножаването „акад.К.Братанов”
Българска Академия на Науките

Научен ръководител: проф. д-р Мария Георгиева Иванова, дсн

Защо тази разработка е важна?

В последните години проблемът с безконтролното размножаване на кучетата е въпрос, който все още не е намерил решение и се нуждае от нови подходи и методи, които да имат реално практическо приложение.

Прилагането на кастрацията като метод е скъпо, трудоемко, понякога е рисково и много стопани имат морални съображения срещу извършването ѝ.

По подобен начин стои и въпросът с методите за контрол на репродуктивния цикъл чрез прилагане на хормонални инжективни и перорални препарати. Всички тези хирургични и нехирургични методи имат както положително, така и негативно въздействие върху организма на женските животни.

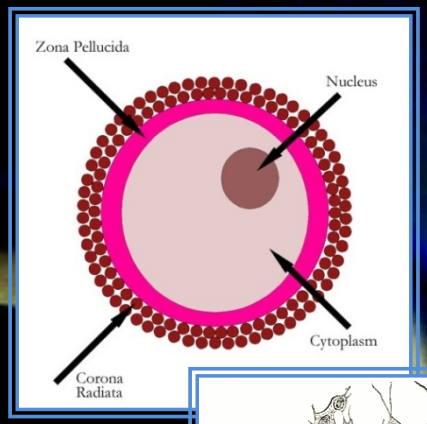
Това са фактори, които налагат търсенето и прилагането на иновативни подходи при решаването на проблема.

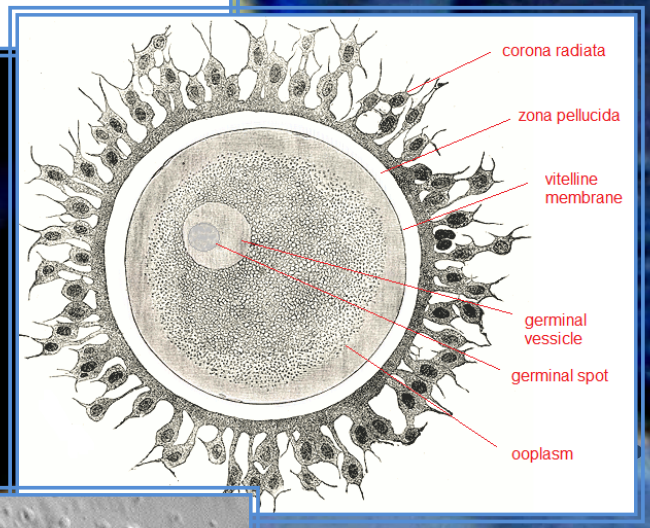
Използването на методи за постигане на контрацепция чрез имунизация е проучвано от редица автори. Тези методи са основани на принципа на преодоляване или възпрепятстване нормалното протичане на отделните етапи в процеса оплождане. Има постигнати резултати, но някои от тях са противоречиви.

По настоящем все още стои открит въпроса как да се осъществи контрацепция, която от една страна да има висока ефективност и от друга – да е с минимално вредни последствия за организма на животните.

В тази връзка е настоящето предложение за научна разработка по проектната програма.

Яйцеклетките при бозайниците са сходни с това, че те споделят основните структури

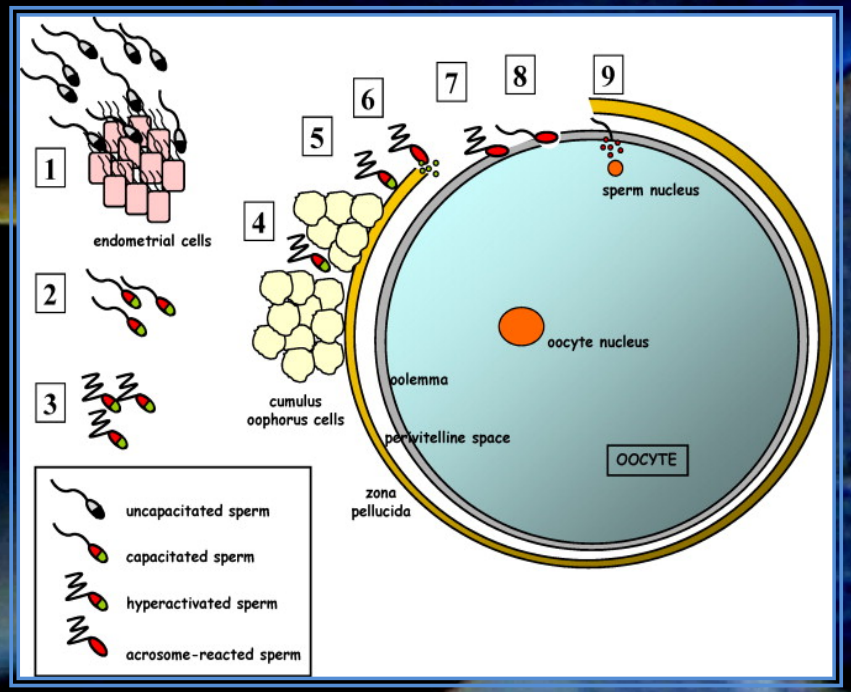




- Яйцеклетката се състои от ядро (*germinal vesicle*) и ядърце (*germinal spot*), обградени от цитоплазма (ооплазма) и плазмена мембрана (ооплема).
- Периферно яйцеклетката е заобиколена от неклетъчен гликопротеинен слой (zona pellucida) и клетъчен слой, съставен от кумулусни клетки (corona radiata).
- За да може да се осъществи оплождане, сперматозоидът трябва да премине през тези слоеве в яйцеклетката.

http://pryorwild.wordpress.com/2010/01/13/january-12-2010-how-does-pzp-work-part-2-pzps-function/

Сперматозоидите преминават през няколко фази преди да станат готови да оплодят яйцеклетката



(1)Взаимодействие с ендометриалните клетки в репродуктивния тракт на женското животно;

(2)Капацитация;

(3)Хиперактивация;

(4)Пенетрация през клетките на corona radiata;

(5)**Прикрепяне на сперматозоидите към zona pellucida;**

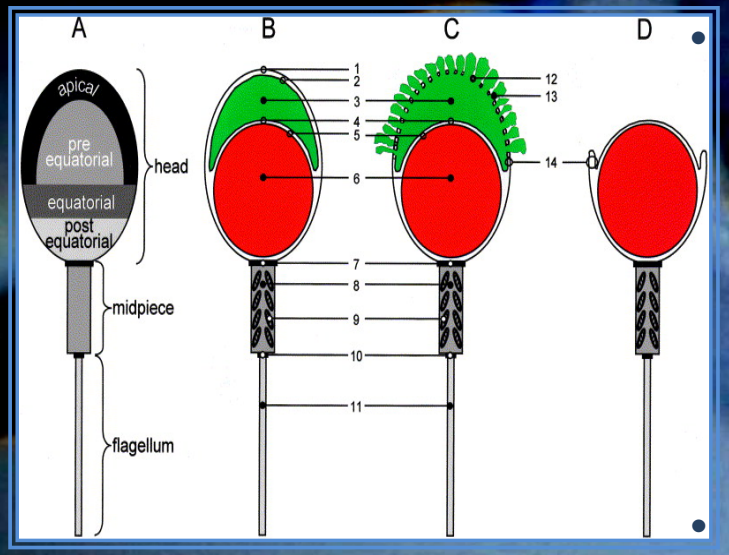
(6)Акрозомна реакция;

(7)Прикрепяне на сперматозоидите към оолемата;

(8)Сливане на сперматозоидната цитоплазмена мембрана с тази на яйцеклетката;

(9)Попадане на сперматозоидното ядро в яйцеклетка.

Преминаването на сперматозоидите през различните фази до момента на оплождането е съпроводено със съществени повърхностно мембранни трансформации и с вътреклетъчни биохимични изменения, които се контролират от специфични клетъчни сигнални пътища



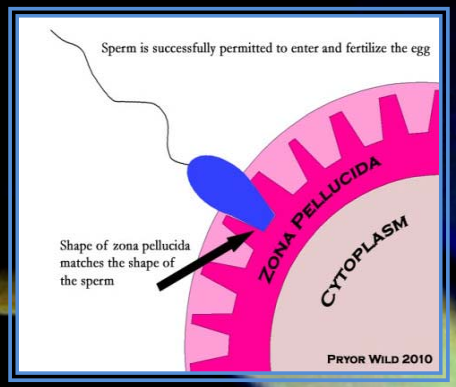
Eric M Flesch, Barend M Gadella , 2000, Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization

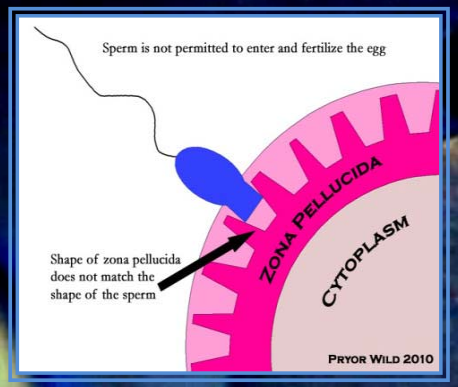
Сперматозоидите са поляризирани клетки с глава, камшичка и средна част. Главата на сперматозоида има четири функционални области: апикална, пре-екваториална, екваториална и пост-екваториална (A). Акрозомата (3) е разположена апикално на ядрото (6) (B).

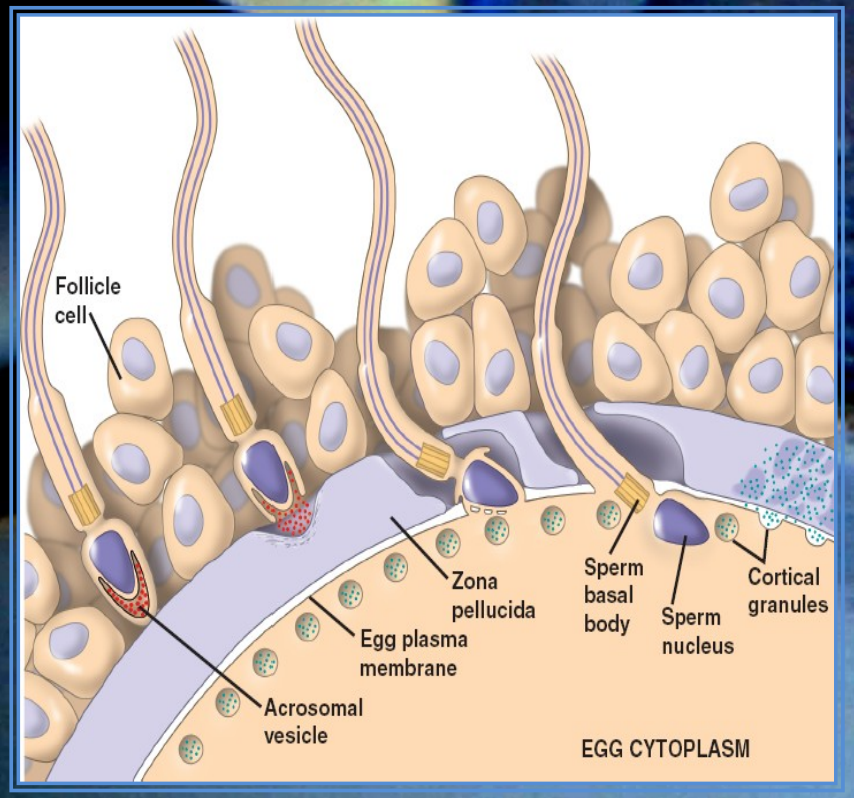
След прикрепването на сперматозоида към яйцеклетката се неговата апикална плазмена мембрана (1) се слива с подлежащата външна акрозомна мембрана (2) на много места (C). Акрозомното съдържание (хидролитични ензими) се излива в околната среда, което позволява на сперматозоидите да разтопят неклетъчната обвивка (ZP) на яйцеклетката.

След като акрозомната реакцията е завършена, вътрешната акрозомна мембрана(4) образува континуум (14) с останалата плазмената мембрана (5)(D).

ZP играе важна роля при оплождането при бозайниците



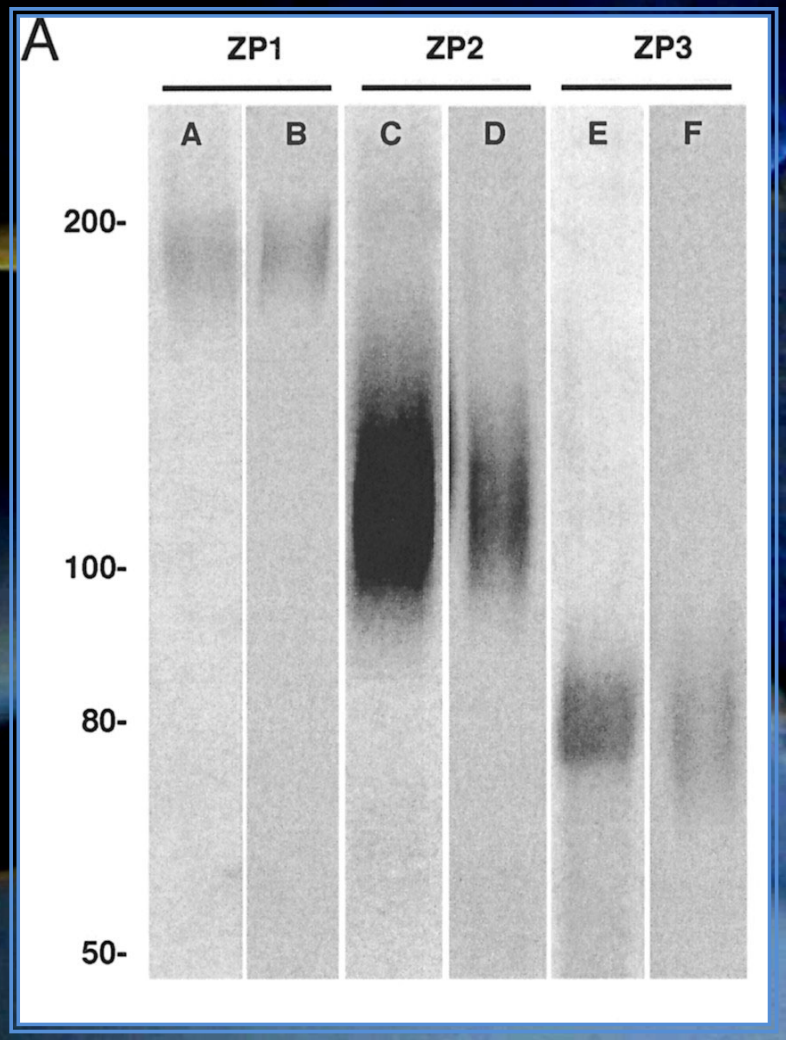




http://bio1151b.nicerweb.net/Locked/media/ch47/

- ZP участва при видово-специфичното разпознаване и прикрепяне на сперматозоидите към ооцита;
- Индуцира акрозомна реакция;
- Предотвратява полиспермията;
- Осигурява протекция за предимпланатционния бластоцист.

Гликопротеините на zona pellucida



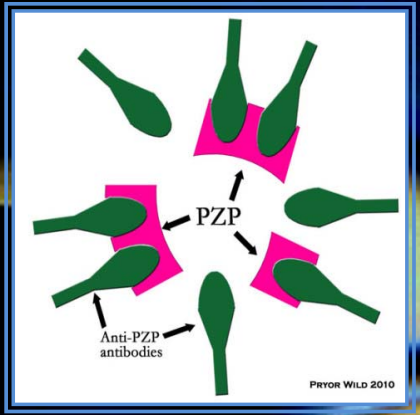
Candace L. Kerr et al., 2002, Characterization of Zona Pellucida Glycoprotein 3 (ZP3) and ZP2 Binding Sites on Acrosome-Intact Mouse Sperm

ZP при бозайниците е съставена от три основни гликопротеина – **ZP1, ZP2 и ZP3**. Установено е при различни видове бозайници чрез SDS-PAGE.

Нашето внимание е насочено към гликопротеините на ZP. Тези гликопротеини са анализирани от редица автори и са кандидати антигени при разработването на имуноконтрацептивни ваксини.

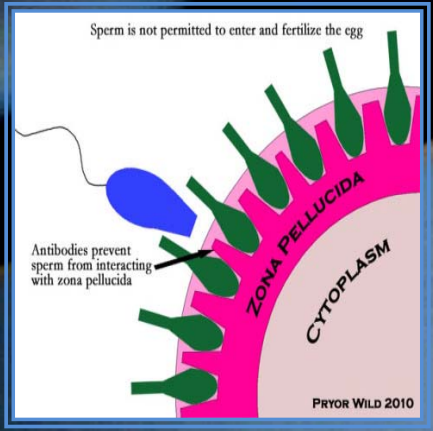
Приложимостта на ZP гликопротеините за имуноконтрацепция е демонстрирана в края на 70-те години на миналия век, когато мишки, имунизирани с топлинно разтворени ZP от хамстер произвели антитела срещу ZP, индуцирщи инфертилитет (Gwatkin et al., 1977).

Имуноконтрацептивен потенциал на нативни ZP гликопротеини



Имунологичната характеристика на ZP гликопротеини показва, че антителата, образувани срещу свинска ZP (pZP), имат високостепенна кръстосана реакция спрямо човешка ZP в сравнение с антителата срещу ZP катерици (Sacco et al., 1981).

Доказано е, че активна имунизация на женски зайци с топлинно разтворена pZP води до блокиране на фертилитета (Wood et al., 1981), като в последващите изследвания на имунизирани животни е доказано, че блокът е необратим. Проведени са подобни изследвания при котки (M. Nakoka et al., 1995) и други видове.



Морфологични и функционални промени

Хистологичното изследване на яйчниците на имунизираните животни разкрива деструкция на ооцитите във всички зрели фоликули и тежко изчерпване на наличните незрели фоликули (Skinner et al., 1984).

При женски кучета, имунизирани със свински pZP е установен удължен проеструс и еструс. Хистологично е доказанно изчерпване на ооцитите в яйчниците и наличие на абнормален хормонален профил и фоликулярна атрезия (Mahi-Brown et al., 1982).

Тези изследвания демонстрират, че имунизацията с топлинно разтворени pZP води до блокиране на фертилитета, който обаче по-скоро се дължи на овариална дистрофия, отколкото на блокиране на оплождането.

Наблюдаваните странични ефекти вероятно се дължат на нежелани примеси от други яйчникови протеини, които присъстват в топлинно разтворения ZP препарат.

В последствие са разработени процедури за пречистване на ZP гликопротеини от други яйчникови протеини (*Yurewicz et al., 1987)*, както и пречистване на индивидуални pZP гликопротеини от нативен източник (Sacco et al., 1987).

Ефекти от имунизацията с пречистени pZP

- Имунизирането с пречистена pZP първоначално довежда до нарушаване на фоликулогенезата и секрецията на яйчниковите стероидни хормони, но 10-15 месеца след имунизацията, въпреки първоначално високите анти-pZP титри, имунизираните животни показали възстановяване на овариалните функции, послеващо спада в титрите (*Saimiri sciureus* - Sacco et al., 1987; *Macaca Radiata* - Bagavant et al., 1994).

- В противовес на горните анализи е следването, проведено от Mahi-Brown et al., 1988, което показа, че използването на пречистени pZP гликопротеини значително намалява страничните ефекти върху овариалната функция и има минимални увреждания на яйчниците.

В наши дни работата по проблема продължава в следните основни насоки :

- Влияние на адювантите върху овариалната дисфункция *(Mahi-Brown et al., 1985; Upadhyay et al., 1989; Sacco et al., 1989; Govind and Gupta, 2000; Govind et al., 2002; Srivastava et al., 2002)*

- Рекомбинантни ZP протеини и ефикасността им за индуцирането на инфертилитет *(Schwoebel et al., 1992; VandeVoort et al., 1995; Paterson et al., 1998; Kerr et al., 1999; Kaul et al., 1997; Gupta et al., 1997; Jethanandani et al., 1998; Govind et al., 2002; Martinez and Harris, 2000)*

- Имуногенни сиснтетични пептиди, базирани на ZP гликопротеини *(Luo et al., 1993, Bagavant et al., 1993; Afzalpurkar and Gupta, 1997; Hinsch et al., 1998; Govind et al., 2000; Sivapurapu et al., 2002; Lou et al., 1995; Sivapurapu et al., 2002; Bagavant et al., 1997; Paterson et al., 1998, 1999; Kaul et al., 2001, Hinsch et al., 1998; Hasegawa et al., 2002; Sun et al., 1999; Afzalpurkar et al., 1997a; Afzalpurkar et al., 1997b; Sivapurapu et al., 2003; Paterson et al., 2000)*

- Перспективни бъдещи насоки – живи рекомбинантни вектори; ДНК ваксини.

Изследвания при кучета

От направения анализ се показва, че пред нас стоят открити въпросите:

- дали използването на хомоложна dZP при кучета ще даде по-добри резултати с по- висока ефективност, в сравнение с pZP?

- дали могат да бъдат избегнати странични ефекти, дължащи се при употребата на pZP.

За сега няма конкретни данни за постигнати убедителни резултати при работа с хомоложна ZP при кучета.

Нашата цел

Настоящият проект за научни изследвания има за цел да разработи моделна схема за контрацепция при женски кучета чрез контрол на прикрепящата способност на сперматозоидите към zona pellucida и блокиране in vitro оплождането на яйцеклетки, както и да се анализират възможностите за имунологична обусловена контрацепция чрез хомоложна dZP.

Предвиждат се провеждане на опити по следните задачи:

- Изолиране и пречистване на zona pellucida от кучета (dZP);
- Хроматографско сепариране на протеини от ZP;
- Получаване и характеристика на поликлонален серум срещу избрана група протеини от ZP;
- Опити за in vitro контролиране на прикрепящата способност на сперматозоиди от кучета към ZP.

Материали и методи

1. Събиране на яйчници чрез метода на хирургична кастрация и съхраняване на събраните яйчници при -80°C;
2. Изолиране на яйцеклетки и обработка на материалите за получаване на чисти *zona pellucida*:
   - Размразяване и смилане на яйчниците в изолационен буфер (10mM натриев фосфат, pH 7.4, 125 mM натриев хлорид, 3 mM натриев цитрат, 2 mM EDTA, 3mM натриев азид) за спукване на фоликулите и освобождаване на яйцеклетките в буфера;
   - Сепариране на ооцитите от останалите остатъчни фоликулните клетки чрез промиване през серия от сита (210 µm и 148µm) и събиране на голите ооцити на 74µm сито;
   - Хомогенизиране на ооцитната суспензия и сепариране на освободените zonae pellucidae на 41µm сито; съхраняване на събраните ZP при -20°C върху ситото;
   - Разтваряне на ZP чрез поставяне на ситото в 5 ml of 5 mM ammonium bicarbonate, pH 8.2, при 70°C за 30 min;
   - Отстраняване на контаминиращите частици и липидни капки чрез филтриране през 0.45 µm филтър.

Метериал и методи

3. Сепариране на фракции гликопротеини чрез HPLC;
4. Спектрофотометрично определяне на белтъчно съдържание;
5. Характеристика на получените фракции чрез SDS-PAGE;
6. Имунизация на зайци за получаване на поликлонален серум срещу селектирана фракция протеини;
7. Получаване и характеристика на имунния серум;
8. Сепариране на яйцеклетки за in vitro процедури;
9. Провеждане на in vitro опит за определяне прикрепящата способност на сперматозоидите в присъствие на антитяло срещу zona pellucida.

Очаквани резултати

- Получаване на заешки поликлонален серум срещу гликопротеини от ZP на кучета
- Получаване на биологични данни за проникващата способност на сперматозоиди от кучета към zona pellucida в условия на in vitro съхранение в присъствие на имунен серум.

Химикали и материали, които ще бъдат закупени по проекта:

- Натриев хлорид
- Натриев цитрат
- EDTA
- Натриев азид
- Амониев бикарбонат
- Акриламид
- Бисакриламид
- Tris
- Амониев персулфат
- Temed
- Глицин
- Натриев додецил сулфат
- Адреванти – пълен и непълен на Фройнд
- 41µm сито
- 0.45 µm мембранен филтър
- Предфилтри Millipore AP 20
- Игли (18-22G)
- Спринцовки (1cc, 2cc, 5cc)
- O-phenylenediamine
- Водороден пероксид
- Натриев хидрогенкарбонат
- Динатриев карбонат
- Tween-20

ОБРАЗОВАНИЕТО И
ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ"
BG051PO001-3.3.06 -0059

Благодаря за вниманието!

Инвестира във вашето бъдеще