



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



Тема на дисертацията: *Анализ на биологично активни субстанции и спермално плазмени протеини с цел усъвършенстване на методите за криоконсервация със сперма от биволи*

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

Дейността ми по проекта ще е свързана с образователна подготовка и провеждане на научно-експериментална изследвания по една от подзадачите на разработваната от мен дисертационна тема. Предвиждат се изследвания върху:

“Имуноцитохимична локализация на спермално плазмени протеини, с доказан протективен ефект при сперматозоиди от биволи.”

Асистент Ирина Кирилова

Задочен докторант, секция “Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите”

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

Значимост на темата

Отглеждането на бивола в световен и национален мащаб е важно за животновъдството. За България популацията от биволи е на границата на заплашените от изчезване видове. Това определя актуалността на проблема.

Предимствата за отглеждане на този вид са:

1. Производство на биологична продукция /мляко, месо и др./ със специфични качества и висока пазарна стойност;
2. Сигурна пазарна ниша и практически неограничен пазар при слаба конкуренция в страните от ЕС;
3. Качествени показатели на получаваните храни и хр.продукти, свързани със здравеопазването и поддържането живота на човек ;
4. Вековни традиции в отглеждането на биволи в различни райони на България;
5. Подходящи почвено-климатични условия за развъждане на този домашен вид.

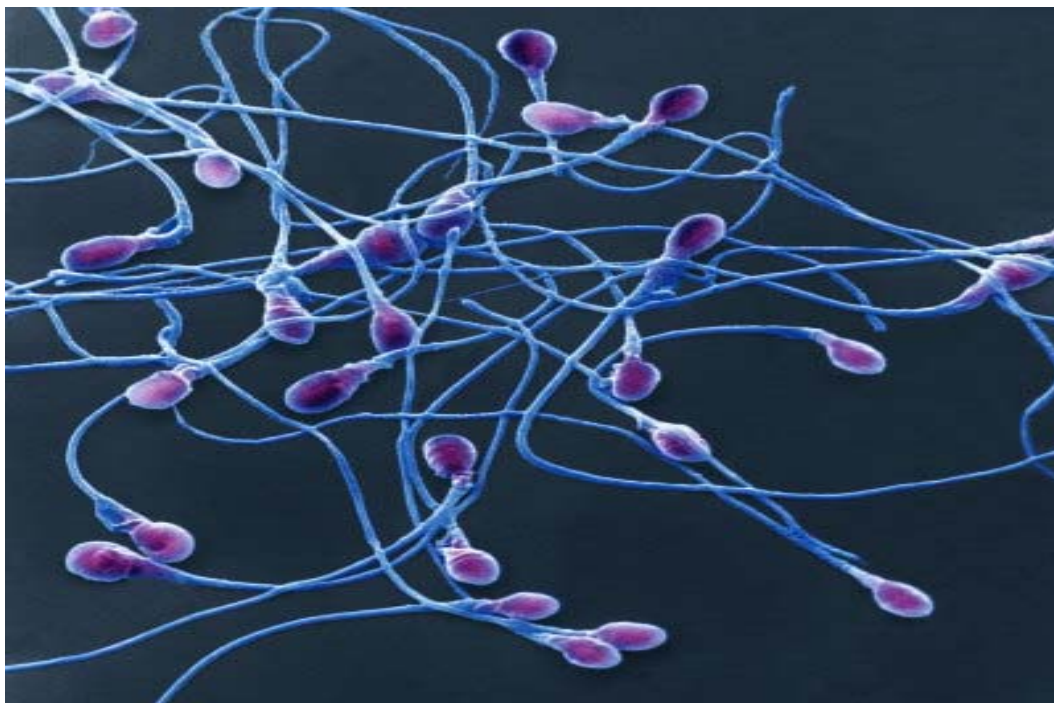


От казаното може да се прецени изключително големия интерес към този вид животни и тяхното размножаване.

Има редица трудности при размножаването на биволи и използването на ИО със замразена сперма. Все още има проблеми със:

- Средите за замразяване и размразяване;
- Цялостаната биотехнология за криоконсервация и размразяване;
- Ниската оплодителна способност на сперматозоидите след криоконсервация;

В резултат на тези проблеми структурната цялост и функционална активност на сперматозоидите е нарушена.



Тези данни ни накараха да насочим усилията си към решаване на някои от нерешените въпроси, свързани с криоконсервация на сперма от биволи.

Задачите ни са:

- Проучване ролята на протеини от спермална плазма и БАВ върху състоянието на сперматозоиди при нискотемпературно съхранение;
- Оптимизиране на методите за съхранение на гамети и състав и използване на протективни среди;
- Подобряване на резултатите от криоконсервацията чрез оптимално съхраняване структурната и функционална цялост на сперматозоидите от биволи.



До настоящия етап сме провели следните изследвания:

1. Сравнителен хроматографски профил на протеини от спермална плазма и анализ на хроматограми от видове с различна криотолератност на гаметите.
2. Роля на сепарирани липопротеини от яйчен жълтък върху морфологията и функционалните параметри на сперматозоиди от биволи при нискотемпературно съхранение.
3. Характеристика на взаимодействия на протеини от яйчен жълтък и протеини от спермална плазма от биволи чрез HPLC анализ.
4. Характеристика на селектираните белтъци, с доказан протективен ефект чрез SDS-PAGE електрофореза и 2Д електрофореза.
5. Изпитване на биологично активни субстанции, протектиращи сперматозоиди от биволи срещу осмотичен стрес при криоконсервация.

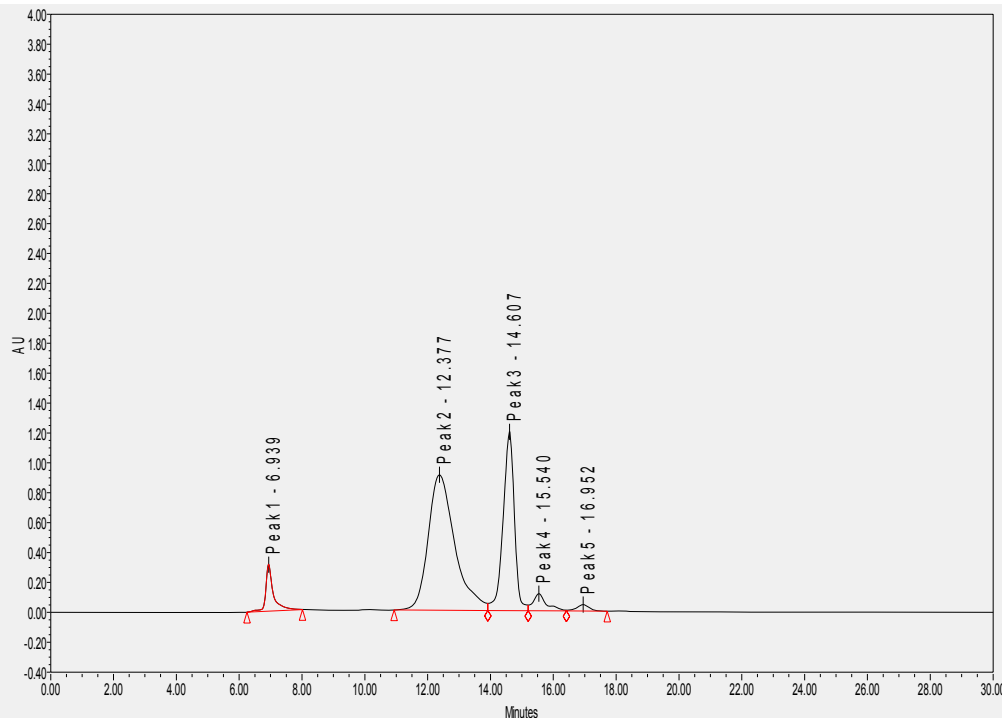
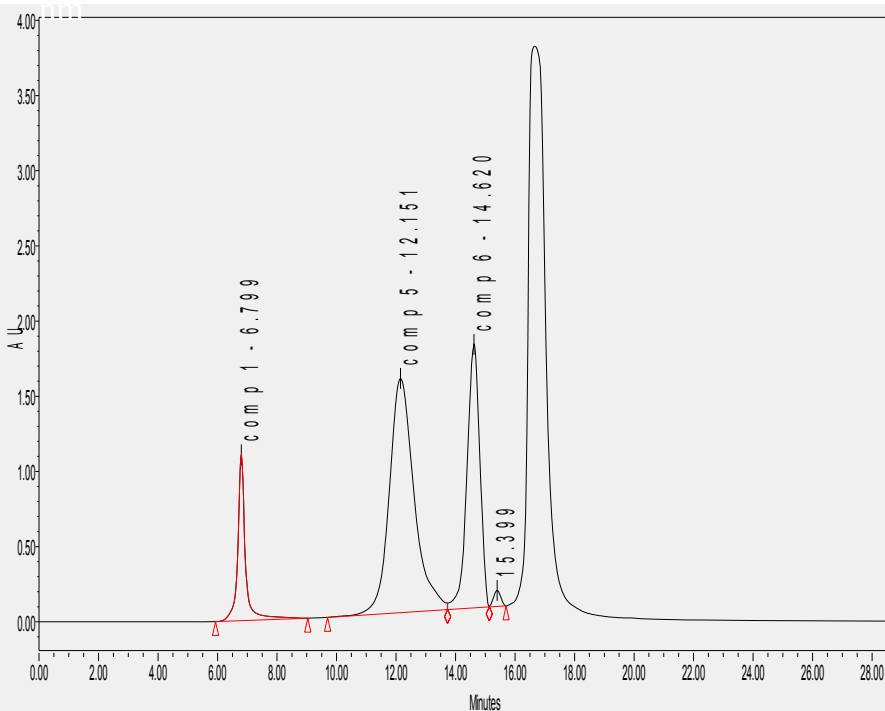


Резултатите от проведения HPLC анализ показват специфични различия в хроматографските профили на изследваните проби. Диференцират се 5 ясно обособени пика. Спектрофотометрично е установено, че протеините в тях варират от 5 КДа до 500 КДа.

При еякулатите с добра криотолерантност – група А и при тези с понижена криотолерантност- група Б, се забелязват различия в състава и количеството на протеините в СП.

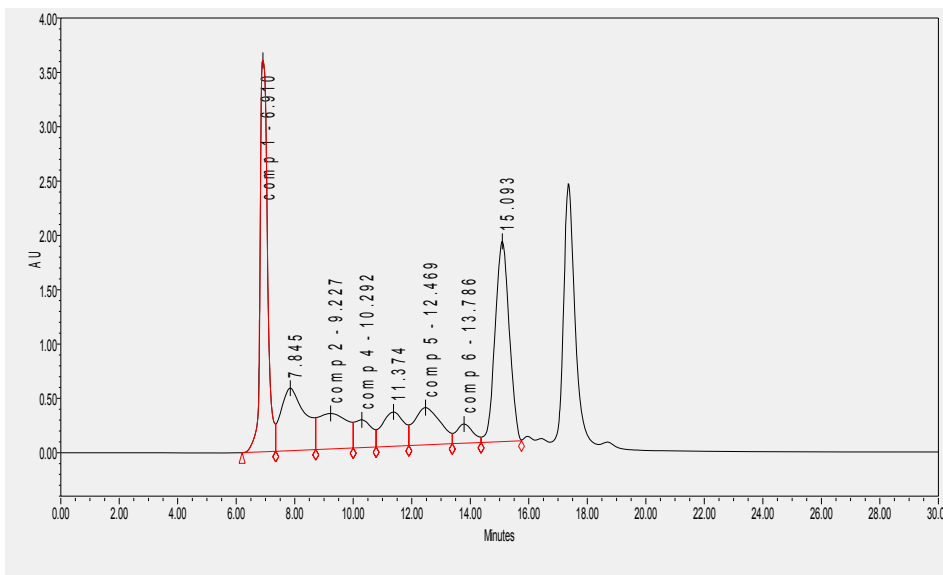
В група А има ясно изразени пикове от протеини на 12.151 мин и на 14.620 мин, докато в гр. Б те са в ниска степен на поглъщане на светлината, което говори за ниска концентрация.

Също така, в група А има добре изразен пик между 16 и 18 мин, който в група Б почти липсва. Тази група протеини съответства на протеини с молекулна маса между 6.4 и 14 кДа.



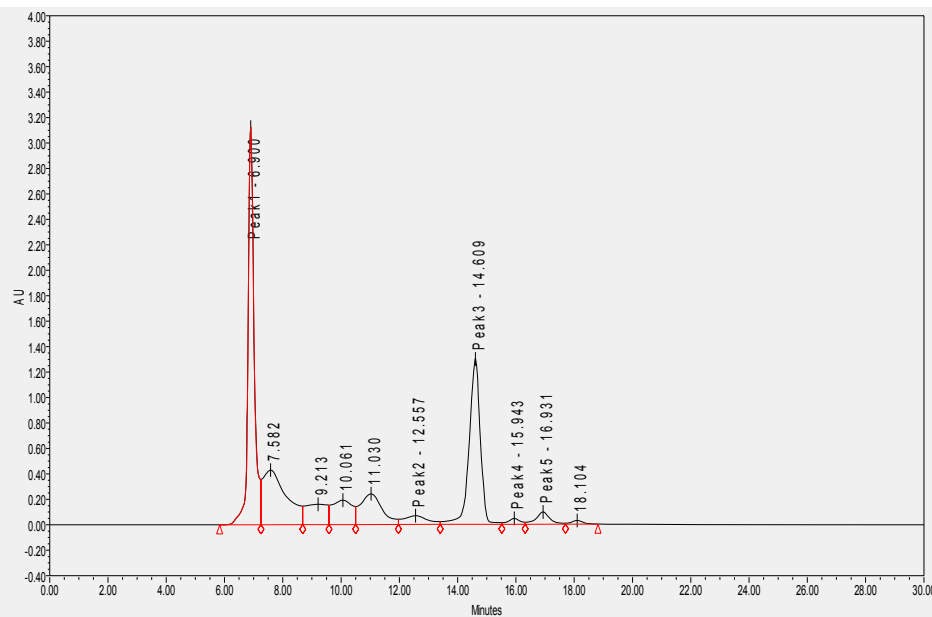
Фигура 1. Хроматографски профил на сепарирани семинално плазмени протеини от бивол при дължина на вълната 280 nm, А- еякулат с добра криотолерантност на сперматозоидите и Б – еякулат с понижена криотолерантност на сперматозоидите.

Резултатите от HPLC на протективната среда – леки фракции и цял жълтък, показват богато присъствие на протеини. В хроматограмите са обособени 9 добре изразени пика. В среда, обогатена с леки фракции – пикът на протеини с големи молекулни тегла на 15 943 – е в минимални количества, а пикът на 18.10 – почти липсва.



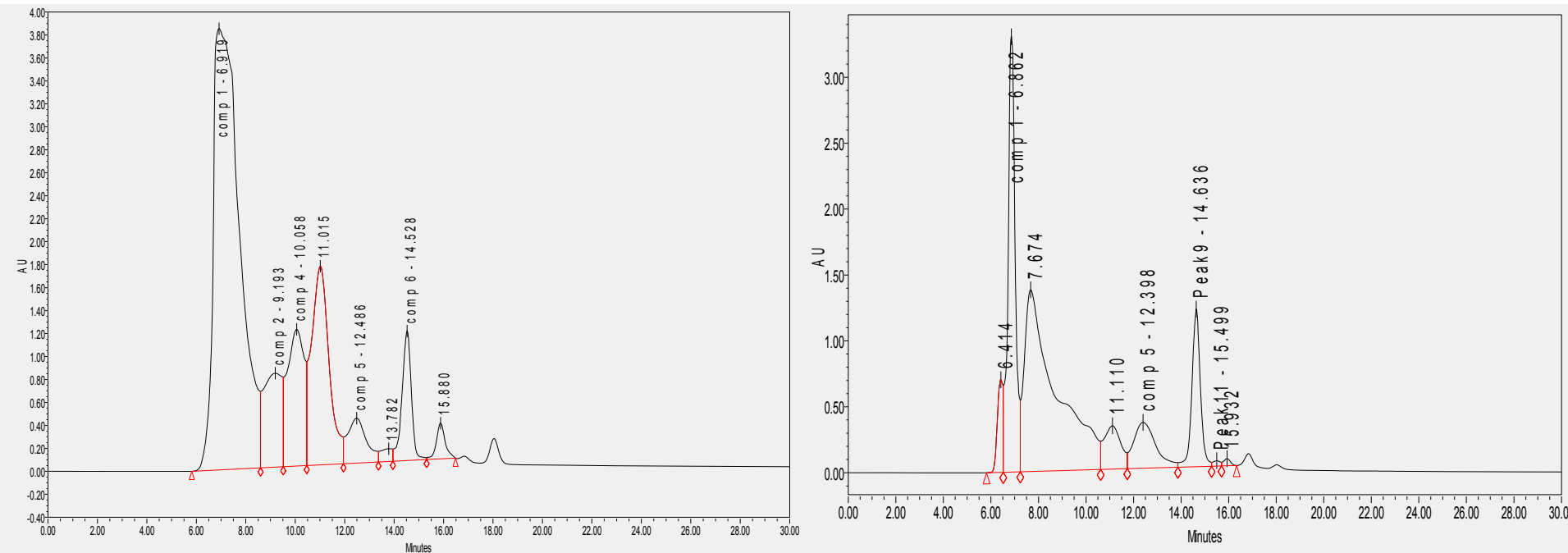
А-цял жълтък

Фигура 3. Хроматографски профил на протеини от протективната среда при дължина на вълната 280 nm.



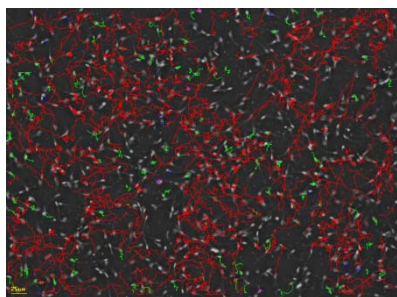
Б - леки фракции

Комбинирането на СПП с протени от протективната среда, дават нов хроматографски профил, визуализиращ специфично и много различно преразпределение на протеините. При сравняване на профилите от двете хроматограми (СПП и протеини от протективната среда) се очертава нов пик на 9.193, който не присъства в нито една от двете проби. При среда обогатена само с леки фракции този пик е изместен на 7.674. Това изместване на профила на хроматограмата и сформиранието на нови пикове, липсващи в семиналната плазма и протективната среда, вероятно се дължи физико-химично преразпределение на протеините, което води до възникването на нови взаимодействия между тях и сформиранието на нови структури.

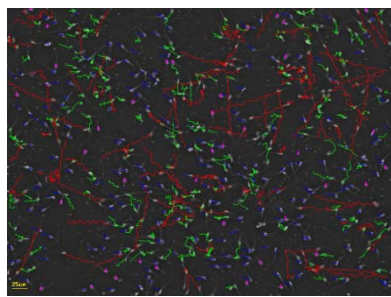


Фигура 4. Представяне на резултатите от HPLC анализът на:
1. СПП+Протективна среда, съдържаща цял жълтък.
2. СПП+Протективна среда с леки фракции на жълтък.
при дължина на вълната 280 nm

- **Различията, касаещи процента на клетки с прогресивно-настъпателно движение, който при еякулатите с добра криотолерантност е в пъти по-голям (почти 3 пъти) е за сметка на тези, които са статични или имат не прогресивно движение.**
- **Термично резистентният тест показва най-значими различия в криотолераността на сперматозоидите на 240-тата минута от съхранението след размразяване. При еякулатите с добра криотолерантност – група А, сперматозоидите с прогресивно движение са 43.58 ± 2.23 , докато в група Б са едва 10.6 ± 1.35 ($p < 0.001$).**

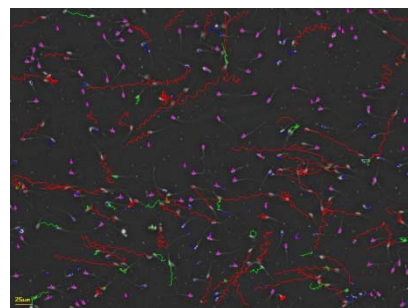


група А

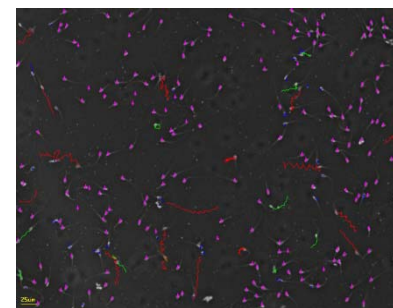


група Б

Термично резистентен тест



група А



група Б

Colour legend

* Rapid progressive motility (type a)

* Slow progressive motility (type b)

* Non-progressive motility (type c)

* Immotile

Изводи:

- Хроматографският анализ на протеини от спермална плазма от биволи показва различия в протеиновия профил, изразени в хроматограмите на еякулати с добра и с ниска криотолерантност на сперматозоидите.
- HPLC резултатът от комбинирането на спермална плазма и протективна среда с жълтък, показва сформирание на пик, съставен от нови биоконплексни структури. Този пик е специфичен фенотипен белег за еякулати от биволи с добра криотолерантност на сперматозоидите.

ИЗПИТВАНЕ НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ КОМПОНЕНТИ И АНТИОКСИДАНТИ ВЪРХУ МОТИЛИТЕТА, ПРЕЖИВЯЕМОСТТА И СКОРОСТНИТЕ ПАРАМЕТРИ НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ БИВОЛИ СЛЕД КРИОКОНСЕРВАЦИЯ

С резултатите от настоящите изследвания се предлага метод за оптимизиране на криоконсервацията на сперма от биволи чрез използване на биологично активни субстанции

Опитите са проведени с еякулати, замразени в гранули и пайети.

След размразяване е изпитано е влиянието на:

Витамин С;

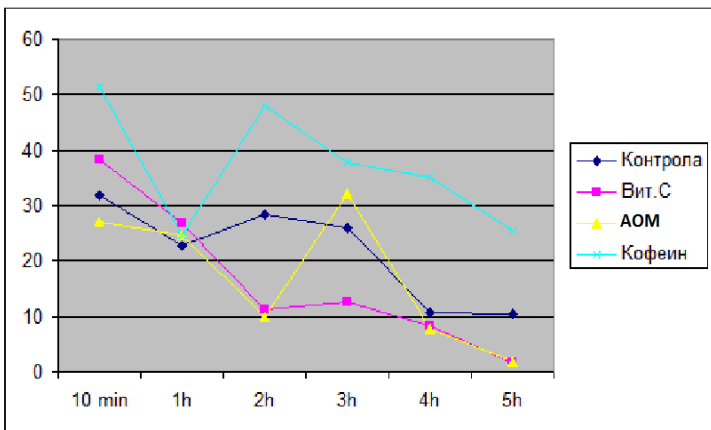
Антиоксидантен микс - АОМ (L-Glutathione, N-Acetyl Cysteine, витамин Е, витамин С, калций, селен и цинк);

Coffeine

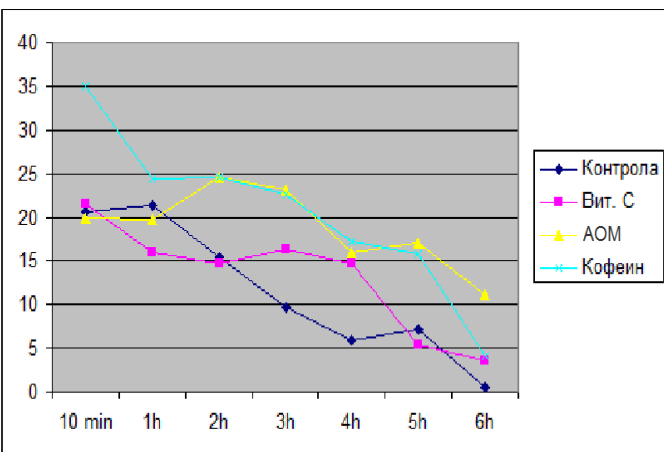
Контрола

Всички проби се подлагат на терморезистентен тест за преживяемост на гаметите.

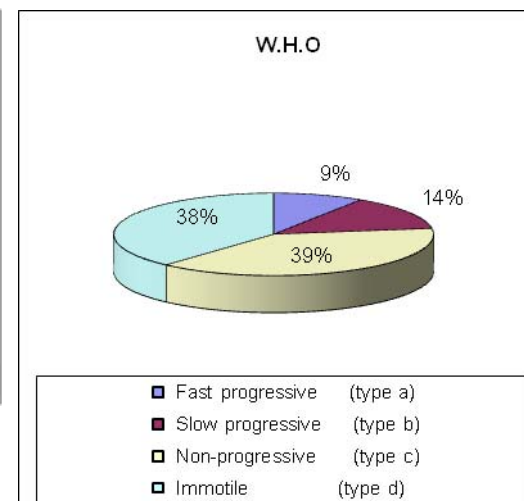
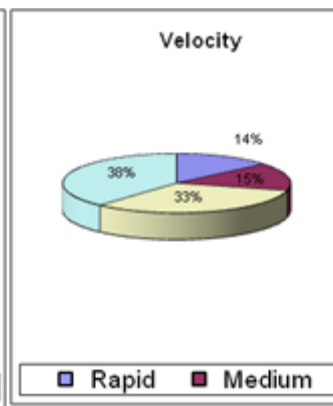
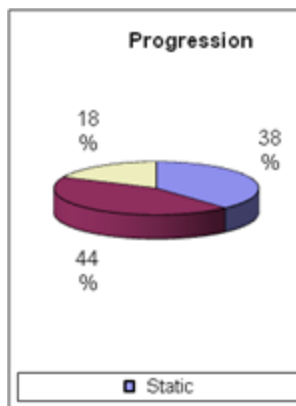
Сперматологичните параметри – мотилитет и скоростни параметри са анализирани със SCA в началото на опита и през един час до 6-я час от размразяването.



Фигура 1. Сравнителен анализ на прогресивно подвижните сперматозоиди при замразяване в гранули (n=8).



Фигура 3. Сравнителен анализ на прогресивно подвижните сперматозоиди при замразяване в пайети (n=8).



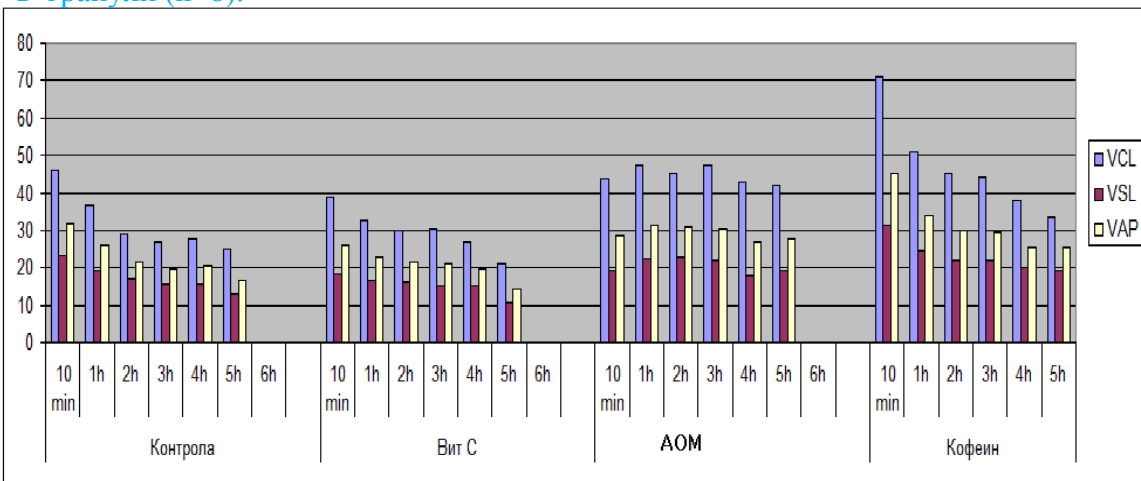
За гранули

При биотехнологията на замразяване на сперма от биволи под формата на гранули добри резултати дава присъствието на кофеин в дози от 5 mg/ml, добавен към средата за размразяване.

За пайети

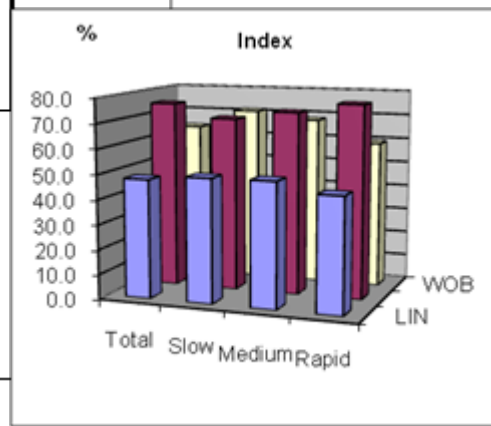
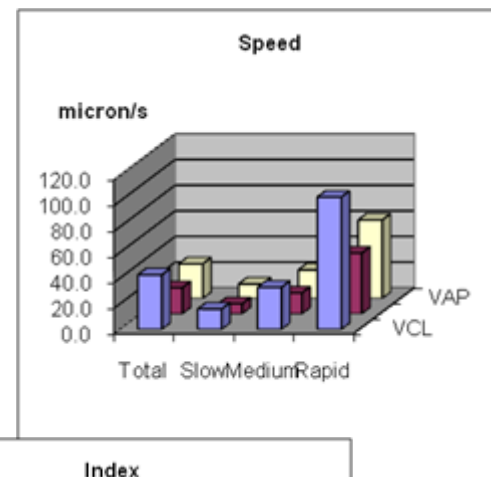
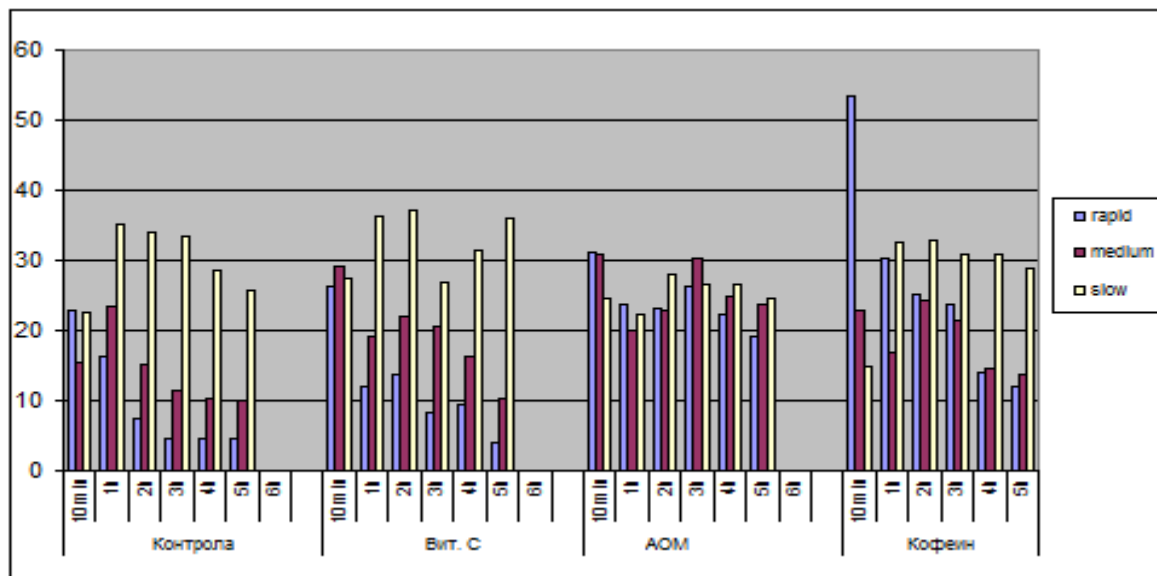
При биотехнологията на замразяване на сперма от биволи в пайети, добавянето на антиоксидантен микс - L-Glutathione, N-Acetyl Cysteine, витамин E, витамин C, калций, селен и цинк, в доза 1 mg/ml, към среда за размразяване на спермата е гарант за получаване на добри резултати при използването в практиката за изкуствено осеменяване.

Фигура 1. Анализ върху ролята на биологично активни субстанции и антиоксиданти върху скоростни параметри на сперматозоиди от биволи, замразени в гранули (n=8).



В настоящите изследвания се доказва, че АОМ защитава сперматозоидите от пероксидация и вредното действие на ROS. Протектира началния мотилитет и скоростните параметри - VCL, VSL и VAP, в достоверно по високи граници.

Фигура 2. Анализ върху ролята на биологично активни субстанции и антиоксиданти върху скоростни параметри на сперматозоиди от биволи, замразени в пайети (n=8).



Предстоящите изследвания, свързани с проектната програма включват:

- 1.Получаване на поликлонален серум срещу спермално плазмени протеини с доказан протективен ефект.
- 2.Характеристика на получения имунен серум.
- 3.Провеждане на имуноцитохимичен анализ за локализация на СПП върху ПМ на сперматозоиди от биволи.
- 4.Анализ на интегритета на ПМ чрез Анексин V тест.

Разкриването на специфични региони, към които има афинитет на свързване на тези протеини, би спомогнало да се изгради хипотеза за механизма на протекция и за участие в сигнални пътища, контролиращи структурната цялост на гаметите.

За провеждането на изследванията се предвижда работа със следните методи:

- Имунизация на зайци със селектирани след HPLC протеини, за които е доказано, че имат протективен ефект, по определена схема (концентрация на протеина 200 µg/ml в присъствието на пълен или непълен адювант на Фройнд).
- Обработка на кръвта и добиване на серум.
- Тестиране на имунен заешки серум за наличие на поликлонално антиСПП антитяло чрез индиректен ензим-свързан имуносорбентен тест - ELISA .
- Индиректна имунофлуоресценция на сперматозоиди за определяне специфична локализация на протеините с доказан протективен ефект.
- Директна имунофлуоресценция на интергиртета на ПМ чрез Annexin V тест – Sigma.

Необходими химикали:

- Na_2CO_3 ,
- NaHCO_3 ,
- KH_2PO_4 ,
- KCl ,
- NaCl
- Anti rabbit IgG goat
- Anti rabbit IgG peroxidase
- Annexin V-Cy3 Apoptosis Detection Kit with Sytox
- Bovine serum
- Leja slides 20 micron



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



Благодаря за вниманието