

КОМПЮТЪРЕН СПЕРМОАНАЛИЗ НА ПРОТЕКТИВНАТА РОЛЯ НА СЕМЕННИ ПРОТЕИНИ ПРИ КОЧОВЕ ОТ ПОРОДАТА ЧЕРНОГЛАВА ПЛЕВЕНСКА
COMPUTER SPERM ANALYSIS OF THE PROTECTIVE EFFECT OF SEMINAL PLASMA PROTEINS FROM PLEVEN BLACKHEAD RAMS

Александър Куков^{1*}, Силвина Запрянова¹, Деница Даскалова¹, Жана Минчева¹,
Васко Герзилов^{2**}, Анастасия Нейчева³, Мария Иванова-Кичева¹, Георги Димов⁴
Alexander Kukov^{1*}, Silvina Zapryanova¹, Denitsa Daskalova¹, Jana Mincheva¹, Vasko Gerzilov^{2**},
Anastasia Neicheva³, Maria Ivanova-Kicheva¹, George Dimov⁴

¹Институт по биология и имунология на размножаването – БАН, София

²Аграрен университет – Пловдив

³Университет по хранителни технологии – Пловдив

⁴Агробиоинститут - София

¹Institute of Biology and Immunology of Reproduction – Bulgarian Academy of Sciences, Sofia

²Agricultural University – Plovdiv

³University of Food Technology – Plovdiv

⁴Agrobioinstitute – Sofia

*E-mail: dimitroff@abv.bg

**E-mail: gerzilov@abv.bg

Резюме

Направени са компютърен спермоанализ и имуноцитохимични изследвания на ефекта от приложение на селектирани семенни протеини при ниско температурно съхранение на сперматозоиди от коч. Установено е, че нискомолекулните семенни протеини протектират достоверно по-добре мотилитета на сперматозоидите (24,91% срещу 4,66% на прогресивно подвижните сперматозоиди, при $p < 0,001$). Също така се наблюдава, че при тези клетки е съхранена в по-висока степен скоростта на движение (33,23% срещу 1,9% на бързоподвижните сперматозоиди, при $p < 0,001$). Имуноцитохимично се визуализира прикрепяне на СП към ПМ в апикалния регион на главичката, тялото и опашката на сперматозоидите, което предполага, че по този начин може да се повлиява клетъчният виталитет. В селектираните чрез хроматография семинално-плазмени протеини с молекулна маса под 30 kDa се съдържат молекулни фактори, които имат протектиращ ефект върху сперматозоидите от коч при *in vitro* съхраняване при ниски температури.

Abstract

A sperm computer analysis and immunocytochemistry of separated seminal plasma proteins during low temperature storage of ram spermatozoa were carried out. It was found that low molecular weight seminal plasma proteins reliably protect the sperm motility (24.91% against 4.66% of progressively motile sperm at $p < 0.001$). It was also observed that the velocity of sperm cells from sample 11 was better than in sample 3 (respectively 33.23% against 1.9% of the high motile sperm at $p < 0.001$). Immunocytochemical analyses visualized that some of the seminal plasma proteins (SPPs) attached to the plasma membrane in the apical region of the head, midpiece and sperm tail. This gives us a good reason to suggest that these attached proteins may affect cell vitality. In conclusion, seminal plasma proteins with low molecular weight selected chromatographically contained molecular factors that could have protective effects on the ram sperm during *in vitro* storage at low temperatures.

Ключови думи: семенни протеини, подвижност, компютърен спермоанализ, сперматозоиди, *in vitro* съхраняване.

Kew words: seminal plasma proteins, motility, computer sperm analysis, spermatozoa, *in vitro* storage.

Абревиатура: СП - семенни протеини, ПМ – плазмена мембрана, СПл – семенна плазма.

Abbreviations: SPP – seminal plasma proteins, PM – plasma membrane.

ВЪВЕДЕНИЕ

Семенната плазма (СПл) съдържа богата гама от белтъци, аминокиселини, витамини, ензими, соли, въглехидрати, хормони и др. субстанции. СПл е смес от секретите на допълнителните полови жлези и на отделящия се, макар и в малко количество, секрет в надсеменника, семепровода и уретрата (Hafez et al., 1993). Контактът на сперматозоидите със СПл води до активиране на подвижността на гаметите. В плазмата има фактори, които играят съществена роля върху оплодителната способност на сперматозоидите (Fraser et al., 1996).

Взаимодействието на сперматозоидите със заобикалящата ги среда е важен фактор, който повлиява техния интегритет и оплодителната им способност (Manjunath et al., 2002). В последните години особено внимание се обръща на протеините от СПл и тяхната роля при клетъчната трансформация след еякулация. Количеството на протеини в СПл варира при различните видове бозайници и има важни ефекти върху функцията на сперматозоидите. Някои семенни протеини (СП) повлияват подвижността и преживяемостта им, както и могат да окажат влияние върху оплодителния потенциал (Cross et al., 1993; Mortarino et al., 1998; Strzerek et al., 2002). Няколко СП са описани като инфертилни фактори при коне (Brandon et al., 1999), бик (Bhargava et al., 1986) и човек (Audhya et al., 1987). СП участват в процеса на капацитация на сперматозоидите (Manjunath et al., 2002). Също така е установено, че прикрепянето на някои протеини към сперматозоидите може да забави капацитацията и акрозомната реакция (Fraser et al., 1996). Тези протеини са описани като „декапацитиращ фактор“ и могат да доведат до намаляване на оплодителния потенциал на гаметите *in vivo*. Затова „декапацити-ращите“ белтъци трябва да бъдат премахнати, модифицирани или „замаскирани“ преди началото на акрозомната реакция, което е важен процес за успешно оплождане. Killian et al. (1993) описват наличието на т.нар. „свързани с плодовитостта протеини“ („fertility-associated proteins“), които присъстват в СПл от бик и имат значение за фертилността на гаметите. Съществуват СП с цитотоксично действие, които повлияват левкоцитите в женския полов път и имат особено важно значение при оплождането. Доказано е, че компоненти на СПл притежават антиоксидантна функция, която предпазва сперматозоидите от действието на различните свободни радикали. Протеомните проучвания през последните години установиха, че някои белтъци от СПл може да се използват като маркери при различни заболявания на мъжката полова система.

Криоконсервацията на полови клетки от ценни животински видове и човек заема изключително важно място в областта на репродуктивната биология.

Успешното решаване на проблемите в това направление изисква непрекъснато усъвършенстване на технологиите за замразяване и размразяване. За да се намалят въздействията на вредните фактори върху клетките при съхраняване при ниски и ултраниски температури, се използват различни криопротектори. Изследванията в последните години показваха, че съществуват СП, които вероятно имат протективен ефект и предпазват половите клетки от увреждащото действие на ниските температури при температурен шок (Desnoyers et al., 2003; Barrios et al., 2005; Kukov et al., 2009). При изследвания на белтъци от СПл на коч Barrios и съавтори установяват, че протеини с молекулна маса около 14 и 20 kDa взаимодействат с клетъчната повърхност и имат протективен ефект при съхраняването на зрелите мъжки полови клетки при ниски температури (Barrios et al., 2000). Каква е биологичната и функционалната роля на белтъците от СПл върху протекцията на гаметите при ниски температури е все още спорен въпрос. В литературата има редица противоречиви данни, което поставя въпроса за търсене на СП с протективен ефект открит и актуален. Ниската оплодителна способност на сперматозоидите от коч след размразяване е фактор, който изисква търсене на алтернативи и нови, по-успешни подходи за съхраняване на сперматозоидите при ниски и ултраниски температури (Barrios et al., 2000).

Целта на настоящата работа е да се проучи чрез компютърен спермоанализ и имунохимични изследвания влиянието на фракционирани семенни протеини върху подвижността и преживяемостта на сперматозоиди от коч при *in vitro* съхранение при 5°C, както и да се визуализира способността на някои СП да „полепват“ по повърхността на половите клетки.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Събиране на семенен материал и обработка на пробите

Еякулатите са събрани чрез изкуствена вагина в стъклени чашки. За провеждане на експериментите използвахме еякулати, имащи нормални качествени показатели по спермограмата, според стандартните изисквания за работа от породата Черноглава плевенска. Всички използвани реагенти са от Sigma-Aldrich Co., освен ако не е споменато друго в текста.

Получаване на семенна плазма и сепариране на семенни протеини

СПл се изолира при центрофугиране на 2 ml сперма от коч на 2000 rpm, за 10 min при 4°C. Събира се супернатантата и се центрофугира отново на 12 000 rpm за 5 min, след което се филтрира през 0,22-µm мембрана (Milipore), съхранява се при -20°C или при



-80°C. Два ml от СПл се накапва в хроматографска колона 2,5x80 cm (Pharmacia LKB) за молекулноситово разделяне, като се използва гел Sephacryl S-100 high resolution (Sigma) и се еквилибрира с 50 mM Tris буфер (pH=7,8), съдържащ 0,15 M NaCl. Събрани са по 4 ml фракции при скорост 4 ml/min. Концентрацията на протеина е установена спектрофотометрично (Pharmacia Biotech, Ultrospec-200).

Полиакриламидна гел-електрофореза

За разделяне и идентифициране на белтъчните фракции е използвана полиакриламидна гел-електрофореза (SDS-PAGE) при редуциращи условия. Пет µg от пробите се смесват 5:1 v/v с буфер за проби (20% glycerol, 10% SDS, 0,2 M Tris-HCl, 10 mM β-mercaptoethanol, and 0,1% bromophenol blue), след което се нагряват до 95°C на водна баня в продължение на 5 min. От така приготвените проби се нанасят по 20 ml в стартовете на гела. Електрофоретичното разделяне се осъществява при напрежение 150 V, при стайна температура. За определяне на молекулната маса на разделяните белтъци използвахме стандартен белтъчен маркер с молекулни тегла от 6,5 kDa до 200 kDa.

Сребърно оцветяване

Полиакриламидният (ПАА) гел се инкубира за 30 min във фиксиращ разтвор. Премахва се фиксиращият разтвор и се добавя сенситизиращ разтвор, гелът се инкубира 30 min. Следва трикратно промиване по 5 min с дестилирана вода. Към ПАА-гела се прибавя сребърен разтвор - инкубиране 20 min. След трикратно промиване с дестилирана вода се добавя разтвор за проявяване за 2-5 min. Реакцията се стопира с разтвор, съдържащ EDTA-Na₂H₂O (3,65 g EDTA-Na₂H₂O в 250 ml dH₂O), след което се извършва трикратно промиване с дестилирана вода.

Подготовка на пробите и предизвикване на температурен шок при сперматозоиди от коч

След получаване на еякулатите и отчитане на първоначалната подвижност пробите се разделят на две равни части и се разреждат 1:6 със среда за съхранение (натриев цитрат – 2,8 g, лактоза – 0,4 g, захароза – 0,4 g, pH=6,8). Пробите се центрофугират двукратно на 2500 rpm за 5 min при стайна температура. На една от пробите се премахва супернатантата и по този начин се отстранява семенната плазма (K-), другата проба се оставя, без да се промива - K+ (контрола с цяла СПл). Пробата без СПл се ресуспендира в среда за съхранение. От тази проба се прибавя по 25 µl клетъчна суспензия в отделни епендорф епруветки, това са съответно проби 3, 4, 6, 8, 11 и 15. На всички проби се добавят по 50 µl от среда за съхранение, съдържаща 6% глицерин. Към проби 3, 4, 6, 8, 11 и 15 се прибавят

50 µl от фракции СП 3, 4, 6, 8, 11 и 15. Към K+ и K- (контрола без СПл) се добавят по 50 µl среда за съхранение. Температурният шок се предизвика, като сперматозоидите първо се инкубираха при 20°C за 5 минути, след това се прехвърлиха при 5°C за 20 минути, а накрая се инкубираха при 20°C за 10 минути (по Barrios et al., 2000). След вземане на проба за изследване сперматозоидите се поставиха при 5°C за 24 часа. По този начин се постига охлаждане на пробите и се съхраняват в продължение на един до два дни.

Изследване на подвижността на сперматозоиди след температурен шок чрез компютърен спермоанализатор

За определяне на първоначалната подвижност на сперматозоидите, както и на мотилитета им, след температурния шок се използва анализаторът Sperm Class Analyzer, Micropticum, Spain. При изследванията бяха използвани предметни стъкла и покривни стъкла с размери 18x18 mm и обем на капката 10 µl, а също така и камерки Leja 20 с обем на капката 2 µl. Преди изследванията пробите се разреждаха 1:20. Поставиха се съответните филтри и софтуерът се нагласи за работа със сперматозоиди от коч. В нашия случай работихме със софтуера „Motility and Concentration“, който дава информация само за параметрите на движение и концентрация на клетките.

Изследване на локализацията на семинално-плазмени протеини по повърхността на сперматозоидите чрез имуноцитохимия

За провеждане на имуноцитохимичното изследване беше получено поликлонално антителио срещу семенни протеини от коч (rabbit polyclonal anti ram-SP proteins antibody). За имунизация на зайците бяха използвани 500 µg СП, разтворени в пълен адювант на Фройнд. След 15 дни животните бяха реимунизирани със същата доза антиген, разтворен в непълен адювант на Фройнд. Антисерумът беше получен 15 дни след втората имунизация чрез центрофугиране на 10 ml кръв от заек. Иmunният серум беше анализиран чрез ELISA тест. Проби, съдържащи 1x10⁶ клетки в 100 µl среда, бяха фиксирани за 10 минути с 4%-ов формалдехид. След двукратно промиване със студен PBS клетките бяха накапани върху покривни стъкла. След изсъхване стъклата бяха промити двукратно с PBS. Неспецифичните места за свързване бяха блокирани с 5%-ов NGS (нормален кози серум) в PBS (150 µl) за 30 минути при 37°C. Пробите бяха инкубирани с първо антителио (1:200 anti ram-SP proteins antibody), разрежено в PBS/5%-ов NGS за 2 часа на стайна температура. След промиване 3x10 минути в PBS пробите бяха инкубирани за 1 час при стайна температура със 100 µl (1:400) goat anti-rabbit IgG

peroxidase antibody в PBS/5%-ов NGS, промити 4x10 минути с PBS и оставени да изсъхнат на стайна температура. След изсъхване пробите бяха включени в глицерин, покрити с покривно стъкло и наблюдавани на конфокален микроскоп Leica TCS SPE, Leica Microsystems. Две контроли бяха приготвени за наблюдение. При първата контрола липсва първото антитяло (+ СП; + второ антитяло), а при втората липсват СП (+ първо антитяло; + второ антитяло). Контролите бяха негативни.

За провеждане на експериментите са използвани еякулати със следните параметри: концентрация – $2,5-4 \times 10^9$ клетки/ml; подвижни сперматозоиди – $90,88 \pm 4,14\%$; мъртви – до 10% ; рН= 6,4-7,0.

РЕЗУЛТАТИ

Резултати след молекулноситовата хроматография на семенни протеини

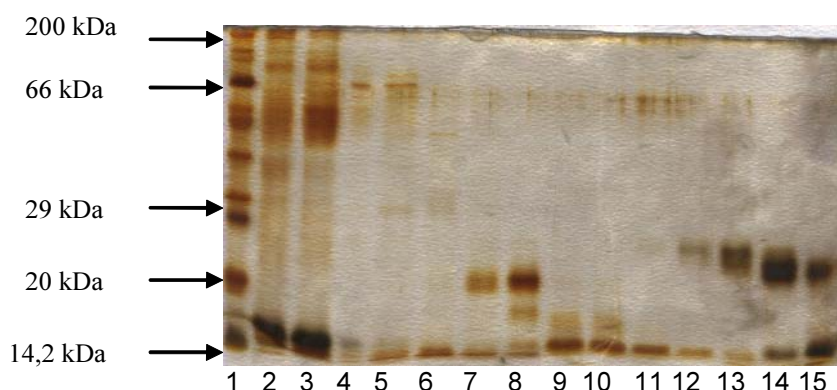
След проведената електрофореза се установи, че протеините с висока молекулна маса (ММ) са доминиращи във фракции 2, 3, 4, 5, 6, докато фракции от 7 до 15 съдържат повече протеини с молекулна маса под 30 kDa (фиг. 1). Установи се, че във фракциите 2, 3, 4, 5 и 6 се наблюдават бандове на белтъци с ММ около и над 66 kDa. В някои от тези фракции се наблюдават малко количество нискомолекулни белтъци. Фракции 2, 4 и 6 съдържат белтъци с ММ, по-голяма от 45 kDa. Фракции 10 и 11 съдържат белтъци с много ниска ММ, под 14 kDa. Във фракции 13, 14 и 15 се открояват 2 банда на белтъци с ММ около 20 kDa и на такива с ММ около 14 kDa. Концентрацията на протеините беше определена спектрофотометрично и варира от 0,121 mg/ml във фракция 13 до 1,026 mg/ml във фракция 3.

Получено е разделяне на СП, като в първите фракции преобладават белтъците с висока ММ, а в следващите фракции се откриват само белтъци с по-ниска от 30 kDa молекулна маса.

Резултати за подвижността на сперматозоидите след охлаждане, получени чрез компютърен спермоанализатор

В таблица 1 са представени данните за прогресивната подвижност на сперматозоиди, инкубирани със сепарирани СП след предизвикването на температурен шок. Резултатите показват, че процентът на статичните сперматозоиди е най-висок при проби К-, 3 и 4, а най-нисък – съответно при проби 8, 11 и 15, като разликата между проба 3 и 11 е статистически достоверна ($p < 0,05$). Процентът на прогресивно подвижните сперматозоиди е най-висок в проби 11 и 15 (респективно $24,91 \pm 6,39$ и $24,82 \pm 4,32$), а най-нисък – в проби 3 и 6 (съответно $4,66 \pm 1,56$ и $3,7 \pm 1,75$). Не се наблюдават достоверни разлики в броя на не-прогресивно подвижните сперматозоиди от изследваните проби.

След съхраняване при 5°C за 24 часа пробите бяха анализирани на спермоанализатора и резултатите са представени в таблица 2. Процентът на статичните сперматозоиди беше най-висок в К- и в проби 3, 4 и 6, а най-малък брой неподвижни сперматозоиди се наблюдаваха в проби К+ и 11. Най-висок брой прогресивно подвижни сперматозоиди бяха отчетени в проби 8 и 11 (респективно $6,1 \pm 0,64$ и $7,65 \pm 2,29$), най-нисък процент прогресивно подвижни сперматозоиди бяха в проби К-, 3, 4 и 6 (съответно $1,27 \pm 0,94$, $0,3 \pm 0,0$, $1,37 \pm 0,89$ и $0,25 \pm 0,05$ процента). Разликите между проба 11 и проби 3 и 6 са статистически достоверни ($p < 0,001$).



Фиг. 1. SDS PAGE на протеиновите фракции, получени след хроматографското разделяне; 1 – маркер за молекулни тегла (от 6,5 до 200 kDa); 2, 3, 4 до 15 – съдържанието на белтъци в съответните хроматографски фракции

Fig. 1. SDS PAGE of protein fractions after chromatography separation; 1 – MW standarts; 2, 3, 4 ...15 – proteins contain in the fractions

Таблица 1. Подвижност на сперматозоиди след температурен шок
Table 1. Motility analysis of ram spermatozoa after cold shock

Проби (n=8) Samples	Статични Static	Непрогресивно подвижни Non-progressive motile	Прогресивно подвижни Progressive motile
К+	42,21±20,83	41,55±8,60	16,24±7,62
К-	60,28±15,63 ^a	26,79±12,38	12,93±4,62
проба 3	66,86±14,27 ^a	28,48±8,46	4,66±1,56 ^a
проба 4	52,68±9,05	35,98±8,73	11,34±8,73
проба 6	50,1±23,81	46,2±29,96	3,7±1,75
проба 8	33,76±20,29	50,52±22,93	15,74±9,67
проба 11	27,22±16,95 ^b	48,14±17,53	24,91±6,39 ^c
проба 15	30,97±11,64 ^b	44,21±16,23	24,82±4,32 ^c

Данните са $x \pm SD$, разликите между а и б $p < 0,05$; а и с $p < 0,001$
 Data are $x \pm SD$, differences between a and b $p < 0.05$; a and c $p < 0.001$

Таблица 2. Подвижност на сперматозоидите след инкубиране при 5°C за 24 часа
Table 2. Motility analysis of ram spermatozoa after incubation at 5°C for 24 hours

Проби (n=8) Samples	Сперматозоиди / Spermatozoa		
	Статични Static	Непрогресивно подвижни Non progressive motile	Прогресивно подвижни Progressive motile
К+	44,86±14,4	51,43±16,31	3,71±1,09
К-	70,25±9,6 ^a	28,48±8,77	1,27±0,94
проба 3	69,9±12,6	29,8±12,54	0,3±0,0 ^a
проба 4	66,8±6,26	31,83±6,87	1,37±0,89
проба 6	63,25±4,15	36,5±4,15	0,25±0,05
проба 8	59,6±10,15	34,3±9,68	6,1±0,64
проба 11	41,25±13,42 ^b	51,1±13,99	7,65±2,29 ^c
проба 15	56,99±6,46	40,48±7,41	2,53±1,39

Разликите между а и б $p < 0,05$; а и с $p < 0,001$
 Differences between a and b $p < 0.05$; a and c $p < 0.001$

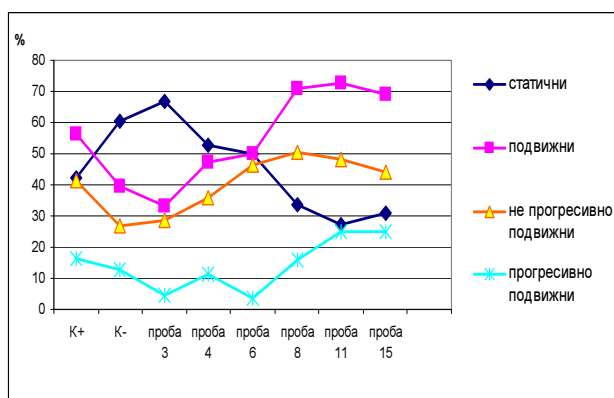
Данните от таблица 1 и 2 са представени графично във фигура 2.

Друг изследван параметър беше скоростта на движението на сперматозоидите. Данните, получени веднага след температурния шок, са представени в таблица 3. Установява се, че процентът сперматозоиди с бърза скорост на движение е най-висок в пробите К+, 11 и 15 (21,27±5,89, 33,23±16,47, 31,9±17,13), а най-нисък – в пробите К-, 3 и 6 (3,13±1,23, 1,9±1,00 и 4,6±0,9).

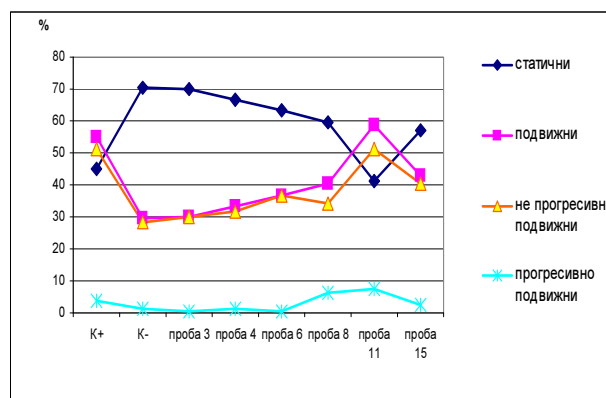
Локализация на семиналноплазмените протеини по повърхността на половите клетки

Имуноцитохимичният анализ показва, че някои СП „полепват“ по повърхността на половите клетки. Този резултат е в съгласие с резултатите, получени от други автори (Barrios et al., 2005). Снимките, получени чрез

конфокален микроскоп, показват, че някои СП протеини се локализируют в областта на главичката в апикалния регион. При някои от сперматозоидите се наблюдава оцветяване в тялото и опашката на сперматозоида. Открива се добро оцветяване на шийката на зрелите мъжки полови клетки. Също така се установява и флуоресценция на ПМ, покриваща апикалния регион. В много от клетките има оцветяване само в тялото и в опашката, като в някои случаи постакрозомният район не е оцветен. Тези резултати доказват, че е възможно някои СП да взаимодействат и да „полепват“ по ПМ на сперматозоидите, като по този начин оказват влиянието си върху сперматозоидите. Не може да се твърди, че СП с по-висока молекулна маса, както и тези с ниска ММ, имат специфична локализация по повърхността на сперматозоидите, и в двата случая се срещат



A/A)



Б/В)

Фиг. 2. А) Подвижност на сперматозоидите след температурен шок; Б) подвижност на сперматозоидите след инкубиране при 5°C за 24 часа. Представени са и данните за общо подвижните, сбор от непрогресивно подвижните и прогресивно подвижните сперматозоиди

Fig. 2. A) Motility of ram spermatozoa after cold shock; B) Motility of ram spermatozoa after incubation at 5°C for 24 h. The total motility of ram sperm cells, sum of non progressive motile and progressive motile is shown on the figure

Таблица 3. Скорост на движение на сперматозоидите след температурния шок
Table 3. Velocity of sperm cells after cold shock

Проби Samples	Сперматозоиди / Spermatozoa	
	Бързи Rapid	Средно подвижни Medium
K+	21.27±5.89	9.23±4.2
K-	3.13±1.23 ^a	5.68±3.92
проба 3	1.9±1.00 ^a	5.23±2.60
проба 4	9.48±7.60	5.72±2.79
проба 6	4.6±0.9	2.02±0.48
проба 8	8.34±4.84 ^b	15±8.54
проба 11	33.23±16.47 ^c	11.83±4.47
проба 15	31.9±17.13 ^c	12.98±3.18

Разликите между а и b p<0,05; а и с p<0,001
Differences between a and b p<0.05; a and c p<0.001

сперматозоиди, оцветени в главичката, тялото и опашката. Прави впечатление обаче, че постакрозомният сегмент остава почти винаги по-слабо реагиращ.

ДИСКУСИЯ

Няколко проучвания доказват, че специфични компоненти от СПл се адсорбират по повърхността на сперматозоидите (Desnoyers et al., 1992; Metz et al., 1990). Предполага се, че тези компоненти притежават важна функция в процеса капацитация и в транспорта на сперматозоидите (Cross et al., 1996). В допълнение може да се посочи, че адсорбиращите се фактори от СПл са важни както за капацитацията, така и за поддържане на жизнеността на сперматозоидите (Russell et al., 1985). Някои от протеините функционират, като стабилизират мембраната до определен период.

Резултатите от биохимичните проучвания на сперматозоиди след температурен шок показват, че се наблюдават морфологични нарушения, особено в акрозомата и плазмената мембрана, както и отделянето на протеини и липиди от клетките (Mann et al., 1964). Тези ултраструктурни, биохимични и функционални промени най-често засягат мотилитета и ПМ на сперматозоидите. Движението е характерно за сперматозоидите на бозайниците и това са единствените подвижни клетки при тези животни и при човека. Мотилитетът е един от основните параметри, който показва качеството на еякулата. След криоконсервация и охлаждане се наблюдава драстично редуциране на броя на прогресивно подвижните сперматозоиди. Въпреки напредъка в криобиологията процентът на нормално функциониращите клетки след



размразяване остава значително по-малък, особено при сперматозоиди от коч. Доказано е, че ниските температури увреждат ПМ на сперматозоидите, като причиняват значителни морфологични изменения, което повлиява пермеабилитета на мембраната. Съществуват данни, които показват, че ПМ заедно с митохондриите и аксонемата са изключително важни клетъчни структури за мотилитета и живота на сперматозоидите (Barrios, B. et al., 2000).

Предполага се, че някои семенни компоненти биха могли да предпазят интегритета на мембраната на сперматозоидите след температурен шок, а оттам – и тяхната жизнеспособност. Нашите резултати показват, че фракциите, които съдържат СП с ниска ММ, предпазват в достоверно по-висока степен мотилитета на сперматозоидите. Тези данни са в съгласие с получените резултати от Barrios и колеги, които показват, че някои нискомолекулни протеини от СП може да имат протективен ефект върху сперматозоидите при температурен шок. Също така се установи, че прогресивната подвижност на сперматозоидите се запазва при пробите, инкубирани с нискомолекулни СП (фиг. 2). Данните показват, че във фракциите, съдържащи вискомолекулни СП, вероятно се намират фактори, които дестабилизира ПМ и повлияват негативно върху мотилитета на сперматозоидите. Получените резултати след имуноцитохимията доказват, че във фракциите с нискомолекулни СП присъстват фактори, които може да се прикрепят към ПМ и по този начин да действат протектиращо. Това взаимодействие вероятно повлиява ПМ като стабилизиращ фактор при ниски температури. Тези резултати допълват наши предишни проучвания, при които с двойно прилагане на флуорохромите CFDA/PI се установи, че интегритетът на ПМ (жизнеността на сперматозоидите) се запазва по-добре при сперматозоиди, инкубирани с нискомолекулни СП (Kukov et al., 2009). Ако по време на температурния шок се увреди или се дестабилизира ПМ, то вероятността тези сперматозоиди да се движат прогресивно и да оплодят яйцеклетката значително намалява. Предполагаме, че нискомолекулните семенни протеини имат протектиращ ефект върху сперматозоидите, съхранявани при ниски температури, като предпазват ПМ на мъжките полови клетки. При инкубиране на сперматозоиди с нискомолекулни СП се запазва статистически достоверно по-висок брой сперматозоиди с прогресивно движение, съпроводено с достоверно по-висок процент клетки, имащи висока скорост на движение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение може да се отбележи, че в селектирани чрез хроматография семиналноплазмени протеини от коч се съдържат нискомолекулни фактори, които протектират половите клетки при съхраняването им *in vitro* при ниски температури. Проучването на тези семиналноплазмени фактори и използването им в протективните среди биха били полезни в практиката при изкуственото осеменяване на овце.

ЛИТЕРАТУРА

- Audhya, T., J. Reddy and L.J. Zaneveld, 1987. Purification and partial chemical characterization of a glycoprotein with antifertility activity from human seminal plasma. – *Biol Reprod* 36, 511-521.
- Barrios, B., M. Fernandez-Juan, T. Muino-Blanco, J. A. Cebrian-Perez, 2005. Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. – *Journal of Andrology*, 26, 4.
- Barrios, B., R. Perez-Pe, M. Gallego, A. Tato, J. Osada, T. Muino-Blanco J. A. Cebrian-Perez, 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. – *Biology of Reproduction*, 1, 63, 5, 1531-1537.
- Bhargava, P. M., 1986. Seminal plasmin, an antimicrobial and transcription inhibitory protein from bovine seminal plasma, might be nature's own antifertility agent. – *Ann Nat Acad Med Sci India*, 21, 53-86.
- Brandon, C. I., G. L. Heusner, A. B. Caudle and R. A. Fayer-Hosken, 1999. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. – *Theriogenology*, 52, 863-873.
- Cross, N. L., 1993. Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm. – *Mol Reprod Dev*, 35, 316-323.
- Cross, N. L., 1996. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor. – *Biol Reprod*, 54:138-145.
- Desnoyers, L., Manjunath P., 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. – *J Biol Chem*, 267, 10149-10155.
- Fraser, G. S., D. M. Bucci and C. L. Brooks, 1996. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in half-millilitre straws. – *Theriogenology*, 46: 1103-1115.
- Hafez, E. S. E., 1993. *Reproduction in farm animals*, 6th edition.

- Killian, G. J., Chapman D. A., Rogowski L. A., 1993. Fertility-associated proteins in holstein bull seminal plasma. – *Biol Reprod*, 49:1202–1207.
- Kukov, A., D. Daskalova, M. Ivanova-Kicheva, R. Stefanov, A. Neicheva, 2009. Immunocytochemical localization of separated seminal plasma proteins on the ram's sperm plasma membrane during in vitro preservation at 4°C. – *Journal Biotechnology in Animal Husbandry*, 25 (5-6), 925-934.
- Manjunath, P. and I. Therien, 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. – *J Reprod Immunol*, 53, 109-119.
- Manjunath, Puttaswamy, Nauc Veronica, Bergeron Annick, Münard Martin, 2002. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. – *Biol Reprod*, 67 (4):1250-8 12297543.
- Mann, T., 1964. *The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract*. London: Methuen & Co Ltd.
- Metz, KW, Berger T, Clegg ED, 1990. Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. – *Theriogenology*, 34,691-700.
- Mortarino, M., G. Tedeschi, A. Negri, F. Cecilian, L. Gottardi and G. Maffeo et al., 1998. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma proteins. – *Electrophoresis*, 19, 797-801.
- Russell, LD, Montag B, Hunt W, Peterson RN, 1985. Properties of boar sperm plasma membranes (PM): proteins released by washing and differential solubility in salts, detergents, and sensitivity to surface radiolabelling. – *Gamete Res*, 11, 237-252.
- Strzezek, J., F. Saiz-Cidoncha, P. Wysocki, A. Tyszkiewicz and M. Jastrzebski, 2002. Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. – *Anim Sci.*, 20, 255-266.

Рецензент – доц. д-р Атанас Бочуков
E-mail: a_bochukov@abv.bg