

POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

Jednym z głównych problemów z zastosowaniem mrożonego nasienia knura w technice sztucznej inseminacji jest obniżenie przeżywalności plemników poddanych procesowi kriokonserwacji. Możliwość poprawy jakości mrożonego nasienia stwarza modyfikacja biochemiczna składu plazmoemy plemników, co może wpłynąć na lepszą przydatność tych komórek do technologii zamrażania-rozmrażania.

Głównym celem badań będzie wykorzystanie różnych komponentów białkowych plazmy nasienia knura w celu modyfikacji składu biochemicznego plazmoemy plemników na różnych etapach procedury kriokonserwacji nasienia.

Hipoteza badawcza: Komponenty białkowe plazmy nasienia zmieniają skład biochemiczny plazmoemy, co wpływa korzystnie na właściwości biologiczne plemników knura po kriokonserwacji.

W projekcie naukowym wykorzystane zostaną różne warianty modyfikacji struktur błon plemnikowych podczas procesu kriokonserwacji nasienia knura. Z plazmy nasienia zostaną wyizolowane dwie frakcje białek z zastosowaniem techniki sączenia molekularnego (kolumna Sephacryl, Sephacryl S-200 HR). Do prób plemnikowych zostaną dodane uzyskane komponenty białkowe, po czym będą one inkubowane z różnymi frakcjami białkowymi plazmy nasienia przez 1,5 godziny w temperaturze pokojowej, a następnie będzie dodawany rozcieńczalnik BTS (Beltsville Thawing Solution) i próby przechowywane będą w temperaturze 17°C przez 1 godzinę, po czym zostaną poddane procesowi kriokonserwacji stosując zamrażarkę sterowaną komputerowo (Ice Cube 14M), według ustalonego protokołu. Oprócz podstawowych analiz nasienia, plemniki zostaną ocenione z wykorzystaniem metod fluorescencyjnych i biochemicznych na różnych etapach technologii zamrażania-rozmrażania. Ruchliwość plemników zostanie określona przy zastosowaniu komputerowo wspomaganego systemu oceny ruchliwości (CASA). Ponadto zmiany integralności plazmoemy plemników będą oceniane barwnikiem fluorescencyjnym SYBR-14, z dodatkiem jodku propydy, PI, a integralność błon akrosomowych będzie analizowana z wykorzystaniem FITC-PNA. Z kolei funkcjonalność błon mitochondrialnych plemników zostanie określona przy wykorzystaniu barwników JC-1/PI oraz poprzez oznaczenie zawartości ATP metodą bioluminescencyjną. Do identyfikacji zmian apoptotycznych plemników podczas procedury zamrażania-rozmrażania zostanie wykorzystany barwnik fluorescencyjny Yo-Pro-1. Uszkodzenia spowodowane przez peroksydację lipidów błon plazmatycznych plemników będzie analizowane poprzez oznaczenie zawartości malonodialdehydu (MDA), przy wykorzystaniu reakcji z kwasem tiobarbiturowym. Skaningowy mikroskop elektronowy zostanie zastosowany do określenia zmian ultrastrukturalnych i morfologicznych w plemnikach na poszczególnych etapach procedury kriokonserwacji. Badania proteomiczne plazmy nasienia zostaną przeprowadzone z użyciem analiz elektroforetycznych (SDS-PAGE), a następnie próby poddane zostaną analizie densytometrycznej w celu zidentyfikowania składników frakcji białkowych, które mogą być odpowiedzialne za kriotolerancję plemników. Ponadto białkowe frakcje plazmy nasienia i plemników będą analizowane z zastosowaniem elektroforezy dwukierunkowej (2D-PAGE) i spektrometrii mas (MALDI-Tof/Tof) oraz analizy Western-blot. W poszczególnych frakcjach białkowych zostanie również oznaczona aktywność dysmutazy nadadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx), a także całkowita zdolność antyoksydacyjna (TAS).

Poznanie krioprotekcyjnego mechanizmu działania białek plazmy nasienia pozwoli na udoskonalenie technologii kriokonserwacji. Spodziewanym rezultatem podjętych badań będzie pogłębienie wiedzy z zakresu oddziaływania białek plazmy nasienia knura na funkcje plemników podczas technologii zamrażania-rozmrażania nasienia. Przewiduje się, że identyfikacja i scharakteryzowanie komponentów białkowych plazmy nasienia oraz określenie ich wpływu na plazmoemę plemników pozwoli na poprawę technologii zamrażania-rozmrażania tych komórek, a dodatkowo wyjaśni przyczynę różnic międzyosobniczych. Dodatkowo, takie polepszenia procedury zamrażania-rozmrażania nasienia knurów wpłynię na rozpowszechnienie technologii sztucznej inseminacji nasieniem mrożonym na fermach trzody chlewnej. Doskonalenie tego procesu może przyczynić się do powstania w Polsce banku mrożonego nasienia knura. Wyniki projektu zostaną zaprezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych, seminariach oraz zostaną opublikowane w czasopiśmie cytowanych w Journal Citation Reports (JCR).