

БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО
“АКАД. К. БРАТАНОВ”

**ПРОГРАМА ЗА РАЗВИТИЕ
НА СЕКЦИЯ “ЕМБРИОБИОТЕХНОЛОГИИ ПРИ
ЖИВОТНИТЕ”**

за периода 2022-2026 год.

**От доц. д-р Росен Стефанов
За участие в конкурс за длъжността Ръководител секция
« Ембриобиотехнологии при животните »**

НАИМЕНОВАНИЕ НА СЕКЦИЯТА

СЕКЦИЯ "ЕМБРИОБИОТЕХНОЛОГИИ ПРИ ЖИВОТНИТЕ"

НАУЧНО НАПРАВЛЕНИЕ

Основната проблематика на Секция "Ембриобиотехнологии при животните" е съсредоточена върху фундаментални и приложни биологични изследвания и микроманипулационни техники, насочени към проследяване физиологични, биохимични процеси с акцент върху репродуктивния статус и качеството на гаметите. Редица изследователи доказват, че стойностите на тези главни направления са водещи за понататъшно успешно реализиране на самите ембриобиотехнологии при животните.

Експерименталните разработки в секцията се свеждат до прилагането на нови научно-обосновани подходи с репродуктивна значимост, свързани с неблагоприятното въздействие на фактори от външната среда, ефект на редица биологично активни вещества, както и разработването на нови технологични схеми за повишаване на репродуктивния потенциал при сс животни и риби.

Основните теми за научни изследвания в звеното се отнасят до:

- Изучаване на репродуктивните проблеми на селскостопанските животни и риби при естествено протичаща репродукция, синхронизирано с разработването на методи и подходи за достигане на максимално използване на естествените им репродуктивни възможности;
- Разработване, усъвършенстване и приложение на технологични подходи за дълготрайно съхранение на мъжки и женски гамети от различни животински видове: от риби до бозайници;
- Гаметогенеза и качество на гаметите, оплождане, преимплантационно развитие на ембриони и ембриотрансфер;

- Влияние на оксидативния стрес върху виталитета на сперматозоиди при ин витро съхранение; антиоксидантна защита в условия на инициращи апоптоза свободни радикали (ROS) при сперматозоидите;
- Изследвания върху маркерни протеини и ензими в семенна течност и връзка с фертилитета на разплодни животни;
- Изясняване морфологичните особености на ооцити и ембриони от различни видове животни на клетъчно и субклетъчно ниво;
- Проследяване и охарактеризиране на видови различия в динамиката на предимплантационното развитие на ембрионите, с цел решаване инфертилитетни проблеми и запазване на ценни за генофонда видове.
- Разработване на методи за култивиране на кумулусни комплекси, свежи ембриони, тъкан - ин витро и ин виво и за дългосрочното им съхраняване, чрез замразяване;
- Санитарни аспекти на репродуктивните биотехнологии.

ПО-ВАЖНИ НАУЧНИ ПОСТИЖЕНИЯ

Изследвана е ролята на определени протеини и ензими, имащи отношение към фертилитета на разплодници. Изследвани бяха активността на LDH и GGT в еякулати с нормални и патологични сперматологични параметри, изследвани чрез CASA, както и зависимостта на тези показатели с получените приплоди. Установена беше положителна корелация между броя на установените морфологични дефекти, активността на LDH и фертилитета на изследваните рзплодници. Намаляването на процента на морфологично дефектните сперматозоиди с около 10 процента има като резултат покачване на фертилитета с около 1 процент. Установено беше, че е възможно използването за

изкуствено осеменяване на проби семенна течност до 5-6 ден след получаване и разреждане, без това да има съществено влияние върху фертилитета и активността на изследваните ензими. Освен това положителна корелация беше установена и между показателите сперматозоидна подвижност, установена чрез CASA и фертилитета.

Изследвана е връзката между нивата на пероксидация на липидите и промените в биологичните свойства на сперматозоиди от мускусни патоци, след 24 - часово съхранение. Установи се, че след съхранение на еякулатите за 24 часа се повишават нивата на MDA, като едновременно се наблюдава намаляване подвижността на сперматозоидите. Тази тенденция е по-силно изразена при сперматозоидите с прогресивно, в сравнение с тези с непрогресивно движение.

Проучен е ефекта от наличието на жълто тяло в яйчници на свине върху качеството на ооцити след тяхната витрификация. Може да се заключи, че количеството и качеството на популацията ооцити при свине се променя в съответствие с наличието или отсъствието на жълто тяло. Този извод може да се използва за да се подобри ефективността при *in vitro* програми за производство на ембриони.

Установено е, че активността на ЛДХ и АФ от водноразтворим и тритонов екстракт, както и ГГТ от тритонов екстракт са индикатори за качеството на криоконсервирана семенна течност. ГГТ присъства в две различни изоформи, базирайки се на негативната корелация с мотилитета на изоформата във водноразтворимия екстракт. Положителна корелация е установена между активността на СОД и мотилитета, както и негативна между КАТ и мотилитет. Установено е, че каталазата е по-лабилен ензим в сравнение с SOD, което води до намаляване на активността ѝ при ултраниски температури и частично да доведе до повишаване нивата на H_2O_2 .

Беше проследено в динамика съдържанието на свободни оксирадикали и беше проучено въздействието им върху формирането на липидните прекиси в семенната течност от бивол. Установи се и как прекисните процеси влияят върху биологичните качества на сперматозоидите в условия на *in vitro* съхранение. Изводът до който достигнахме е, че продължителното съхранение на семенна течност води до повишаване на динамиката с която се размножават свободните радикали. Това води до засилване на липидно прекисните процеси засягащи спермалните клетки, като най-уязвими са клетъчните мембрани и

клетъчните ядра и като краен резултат се наблюдават редица функционални и морфологични увреждания при сперматозоидите.

Установено е влиянието на породата върху потенциала за замразяване и размразяване на сперма от кочове, като са намерени достоверни породни разлики върху мотилитета, скоростните параметри на сперматозоидите и виталитета на сперматозоидите както преди замразяване, така и след размразяване на еякулатите. Установиха се достоверни породни разлики след криоконсервация по отношение морфологията на сперматозоидите. Автохтонната българска порода (Софийска) и породата за месо – Ил дьо Франс, се отличават с по-добра криотолерантност на сперматозоидите от изследваните породи за мляко – СПБМ и Лакон. Потвърждаваме връзката между активността на LDH-C4 и подвижността на сперматозоидите. Потвърдена е връзката между активността на ензима γ GT и антиоксидативната защита на сперматозоидите. Достоверни породни разлики са установени и при изследване активността на ензимите LDH и γ GT преди замразяване на еякулатите, които се запазиха и след размразяване. Криоконсервацията предизвиква понижена активност на ензимите от антиоксидантната защита SOD и CAT. Установена е право пропорционална зависимост между броя на подвижните сперматозоиди и активността на двата ензима. Установи се обратна пропорционална зависимост между степента на липидна пероксидация и подвижността на сперматозоидите.

НАУЧНИ ТЕМИ РАЗРАБОТВАНИ В МОМЕНТА ОТ СЪТРУДНИЦИТЕ НА СЕКЦИЯТА

Тема: Влиянието на Fe-йони върху про/антиоксидантния статус и морфо-функционалните параметри при сперматозоиди от вида *Ovis Aries*

Манипулирането на спермата при *in vitro* съхранение води до свръхгенериране на свободни радикали (ROS – reactive oxygen species) и индуциране на оксидативен стрес (OS). Йоните на преходните метали (главно желязо или мед) катализират образуването на \bullet OH чрез реакция на Fenton от супероксидни анионни радикали (\bullet O₂⁻) и H₂O₂, които естествено възникват в резултат на клетъчния метаболизъм. Имайки предвид, че почти всяка смес, използвана в лабораторната практика, съдържа замърсяване с метални йони, което дори в много ниски концентрации може да генерира \bullet OH. Липсата на фундаментални данни за тези процеси е основното ограничение за формиране на

комплексен подход за устойчиво управление и решаване на проблемите, свързани със съхранението на семенна течност от кочове и влиянието на желязни и медни йони върху морфофункционалните характеристики на сперматозоидите.

Целта е да се установи връзка между Fe-йони, про/антиоксидантния статус и морфо-функционалните параметри при сперматозоиди.

Задачи за изпълнение:

1. Установяване съдържанието на Fe-йони в семенна плазма чрез оптико-емисионни спектрофотометрични методи
2. Изследване въздействието на Fe-йони върху про/антиоксидантния статус чрез определяне промените нивото на липидната пероксидация в семенна плазма
3. Изследване въздействието на Fe-йони върху основните морфофункционални параметри на сперматозоидите

Тема: Понижаване на оксидативните увреждания на спермата от Мускусни патоци чрез добавяне на антиоксиданти.

Целта е да се изследва податливостта на сперматозоидите от Мускусни патоци към оксидативни увреждания и разработване на стратегии за намаляване на оксидативния стрес чрез добавяне на антиоксиданти към сперморазредители.

Задачи за изпълнение:

1. Установяване ефекта на различни прооксидантни фактори: H_2O_2 и комбинация от желязни катиони и H_2O_2 (Фентонова система) върху качеството и морфофункционалните показатели (концентрация, подвижност, морфология, виталитет) и оксидативния статус (нива на липидна пероксидация и глутатион) на сперматозоиди от Мускусни патоци.
2. Установяване ефекта на различни концентрации на антиоксиданти (витамин С, витамин Е и специфичният за желязо хелатор - Десферал) поотделно и в комбинация върху морфофункционалните параметри и оксидативния статус на сперматозоиди от Мускусни патоци.
3. Установяване ефекта на добавката на антиоксидант или комбинацията от антиоксиданти в сперморазредители предназначени за сперма от Мускусни патоци върху оплодеността на яйцата и люпимостта

НАУЧНИ ТЕМИ КОИТО ПРЕДСТОИ ДА БЪДАТ РАЗРАБОТЕНИ ВЪВ ЗВЕНОТО:

- Усъвършенстване на основните ембриологични методики чрез използване животински яйчници, като модел за окачествяване и съхранение на женски гамети
- Изследване ефекта от наличието на жълто тяло в яйчници върху качеството на ооцити
- Проучване токсично действие на свободни радикали върху сперматозоиди от селскостопански животни, с цел повишаване на протекцията, във връзка с прилагането на различни режими на съхранение;
- Проучването на възможността за запазване и подобряване на качеството на сперматозоидите, използвани при изкуствено осеменяване, чрез прилагане на метални хелатори;

СЪТРУДНИЧЕСТВО

В рамките на съвместно изпълнявани проекти изследователите от секцията са в сътрудничество с:

- Аграрен университет – Пловдив, катедра Животновъдни науки, по изпълнение на проект Понижаване на оксидативните увреждания на спермата от Мускусни патоци чрез добавяне на антиоксиданти
- Институт по животновъдни науки –гр. Костинброд, по изпълнение на проект Ж 126 „Анализ и оценка на влиянието на различни фактори върху параметрите на селекционните и репродуктивни признаци за оптимизация и управление на производството в овцевъдството”

НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛНА ДЕЙНОСТ

Образователна дейност в звеното се изразява в два лекционни курса:

- Ин витро техники в репродуктивната биология –Нов Български Университет-лектор доц. Росен Стефанов
- Криосъхранение и трансфер на гамети-Пловдивски университет -лектор доц. Росен Стефанов

В секция „Ембриобиотехнологии при животните” през последните две години са защитени следните дисертационни и дипломни проекти:

- Дисертационен проект на тема: **Изследване влиянието на породните особености при овце върху криотолерантността на сперматозоидите** – защитен 2020 година
Докторант Мадлена Андреева
Ръководител Росен Стефанов

- Дипломен проект на тема: **Влияние на натриеви и калиеви катиони върху някои параметри на сперма от еякулати от бик**– защитен 2020 година

Дипломант Филипа Димитрова - НБУ

Ръководител Росен Стефанов

- Дипломен проект на тема: **Влияние на оксидативния стрес върху мотилитета и морфологичния статус на сперматозоиди от мускусни патоци**- защитен 2020 година

Дипломант Елица Кънева - ХТМУ

Ръководител Росен Стефанов

- Дипломен проект на тема: **Влияние на средите за съхранение на семенна течност върху спермалните показатели при разплодници от вида *Cairina moschata*** - защитен 2021 година

Дипломант Христина Благова - СУ

Ръководител Росен Стефанов

- Дипломен проект на тема: **Изследване криотолерантността на сперматозоиди от вида *Ovis aries***. - защитен 2021 година

Дипломант Петя Евтимова - ХТМУ

Ръководител Мадлена Андреева

В момента в секцията се разработва дисертационен проект на тема: Влиянието на Фейони върху про/антиоксидантния статус и морфо-функционалните параметри при сперматозоиди от вида *Ovis Aries* от задочен докторант Петя Евтимова с ръководител доц. Росен Стефанов.

Доц. Стефанов беше консултант и да защитен през 2021 г. от Стефан Манчев дисертационен проект на тема: **“Възможности за регулиране на репродуктивния процес при породите североизточна българска тънкорунна и синтетична българска млечна популация овце“**

ПЛАН ЗА РАЗПРОСТРАНЕНИЕ НА НАУЧНО-ОБРАЗОВАТЕЛНАТА ДЕЙНОСТ

Целта на нашата дейност е и разпространението на получените в звеното резултати сред нашите колеги в България и чужбина, както и от хората пряко заинтересовани от нашата дейност – фермери, ветеринарни лекари, зооинженери. Разпространението на тези резултати ще се реализира чрез:

✓ Научни форуми – конгреси, конференции и научни семинар

Участието в подобни мероприятия освен , че подпомага разпространението на резултатите получени при изследванията в секцията, а също така създава условия за обмяна на опит с учени от други изследователски звена.

✓ Публикации

Засилване публикационната активност на звеното в международни списания и в списания с ранк, с цел разпространение на постигнатите резултати и разпознаваемост на международно ниво на учените на ИБИР. Публикуването на научни обзорни трудове и публицистични статии не се изключва, но поднесени до подходяща аудитория, която би могла да привлече „клиенти“ за услугите на института.

✓ **Организиране на работни срещи с фермери, ветеринарни лекари, зооинженери**

Колективът ще положи усилия за активно разпространение на резултатите от своята изследователска работа, които да достигнат до широката публика, като прицелните групи са учени, научните центрове в България и в чужбина, обществени организации като цяло, неправителствени организации, като фермери, лекари, ветеринарни лекари, лица с репродуктивни проблеми, а също и разпространение на знания да достигнат до студенти по биология, по хуманна и ветеринарна медицина.

КАДРОВИ СЪСТАВ

В Секция „Ембриобиотехнологии при животните” работят един доцент, един асистент и един специалист-биолог. Зачислен е един докторант на задочна докторантура. Тенденцията е да се увеличи научния персонал чрез привличане млади специалисти, а също така и прирастване на изследователи от секцията в по горни степени.

ОБОБЩЕНИЕ

Предложеният на вниманието на членовете на Научния съвет проект за развитието на научното звено е с потенциал за бъдещото развитие на секция «Ембриобиотехнологии при животните» и ще ѝ отреди подобаващо място в Института по Биология и Имунология на размножаването «Акад. К. Братанов». Считаю, че реализирането на този проект ще стане възможно в резултат на тясното сътрудничество както с колегите от секцията, така и с административното ръководство и благодарение на колегиалните взаимоотношения с другите ръководители на научни звена в Института.