



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

Секция „Имуноневроендокринология“

КИРИЛ ЙОРДАНОВ ЛАЗОВ

РОЛЯ НА СЕМЕННАТА ПЛАЗМА И БИОЛОГИЧНИ АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА
С ЦЕЛ РАЗРАБОТВАНЕ НА НОВА ТЕХНОЛОГИЯ ЗА
КРИОКОНСЕРВАЦИЯ НА СПЕРМА ОТ КУЧЕТА

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Научна специалност „Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на размножаването“; Научно направление ш.6.3 „Животновъдство“; Област на висше образование ш.6 „Аграрни науки и ветеринарна медицина“

с научен ръководител: доц. д-р Бойко Георгиев, д-р

София

2024

Дисертационният труд е написан на 128 страници, илюстриран е с 29 фигури и 2 таблици. Библиографията включва 219 литературни източника.

Експерименталните дейности са извършени в Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“, БАН.

Публичната защитата на дисертационния труд ще се състои на от часа в заседателната зала на ИБИР-БАН, бул. „Цариградско шосе“ №73, София, съгласно Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и академични длъжности в ИБИР-БАН, пред научно жури в състав:

Вътрешни членове:

Проф. Пламен Годоров, дбн

Доц. Десислава Абаджиева,

Доц. Теодора Данева (Резервен член)

Външни членове:

Проф. Бойчо Биволарски (Тракийски университет, Стара Загора)

Доц. Станимир Димитров (Тракийски университет, Стара Загора)

Доц. Никола Методиев (ИЖН, Костинброд)

Доц. Екатерина Павлова (ИЕМПАМ, БАН, София) (Резервен член)

Материалите по защитата на дисертационния труд са на разположение в Библиотеката на ИБИР-БАН, гр. София, бул. „Цариградско шосе“ №73, както и на интернет страницата на ИБИР (<http://ibir.bas.bg>).

Забележка: Номерата на фигурите и таблиците не съответстват на номерата в дисертационния труд.



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

Секция „Имуноневроендокринология“

КИРИЛ ЙОРДАНОВ ЛАЗОВ

РОЛЯ НА СЕМЕННАТА ПЛАЗМА И БИОЛОГИЧНИ АКТИВНИ ВЕЩЕСТВА
С ЦЕЛ РАЗРАБОТВАНЕ НА НОВА ТЕХНОЛОГИЯ ЗА
КРИОКОНСЕРВАЦИЯ НА СПЕРМА ОТ КУЧЕТА

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд
за придобиване на образователна и научна степен „Доктор“

Научна специалност ш.04.02.01 „Развъждане на селскостопански животни, биология и биотехника на размножаването“; Научно направление ш.6.3 „Животновъдство“; Област на висше образование ш.6 „Аграрни науки и ветеринарна медицина“

с научен ръководител: доц. д-р Бойко Георгиев, д-р

София

2024

СЪДЪРЖАНИЕ

I.	УВОД.....	6
II.	ЦЕЛ И ЗАДАЧИ.....	7
III.	МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ.....	8
IV.	РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ.....	12
V.	ИЗВОДИ	38
VI.	ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ С НАУЧНО–ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР...	39
VII.	ПУБЛИКАЦИИ НА НАУЧНИ РЕЗУЛТАТИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА	40
VIII.	ДОКЛАДВАНЕ ПРЕД НАУЧНИ ФОРУМИ НА НАУЧНИ РЕЗУЛТАТИ КЪМ ДИСЕРТАЦИЯТА	40

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

ALH - Амплитуда на латерално отклонение на главичката
BCF - Честота на пресичане на линейната траектория
BSA - Говежди серумен албумин
CASA – Компютърно-асистиран спермоанализ
HPLC - Високоэффективна течна хроматография
LDL - Липопротеини с ниска плътност
LIN - Линеарност
VSL - Скорост по правата линия между началната и крайната точка от пътя
WOB – Wobble (трептене)
MW – Молекулно тегло
ИО – изкуствено сомняване
ПМ – Плазмена мембрана
СП – семенна плазма
PBS – Фосфатен буфер
pI – Изоелектрична точка
ROS – Окислителни радикали
SD – Стандартно отклонение
SDS - Натриев додецил сулфат
SDS-PAGE – Еднодименсионална полиакриламидна гел електрофореза
SEM – Стандартна грешка
STR - Праволинейност
VAP - Скорост по осреднена траектория
VCL - Скорост по реално изминатия
АФ – алкална фосфатаза
СК - креатинкиназа
ЛДХ - лактатдеhydroгеназа
ГГТ - гама-глутамилтрансфераза
ПВП - поливилпириolidонът
CRA - криопротективни агенти

I. УВОД

Сред репродуктивните биотехнологии, прилагани при кучета, криоконсервацията на сперма е една от най - важните за запазването и размножаване на генетичния материал - дори след смъртта, улесняване на транспортирането на спермата на дълги разстояния и намаляване на транспортните разходи. Освен това разработените биотехнологии при кучета могат да служат като модел и да бъдат приложими и при други видове от род *Canidi*. Така например в кожухарската промишленост, ангажирана с производството на дрехи от лисича кожа, женските се осеменяват изкуствено (ИО), чрез свежа или замразена сперма, което значително оптимизира икономически процеса на размножаване на животните и се подобряват зоохигиенните условия на тяхното отглеждане.

За успешното осъществяване на изкуственото осеменяване при всички животински видове трябва да са налице следните три предпоставки: първата е, спермалната течност след получаване и разреждане да може да се съхранява без сперматозоидите да губят оплодителната си възможност, втора предпоставка е възможността на женското животно да бъде извършена инсеминация възможно най-близко до мястото на фертилизацията, и третата предпоставка се налага като подход за търсене на най-подходящия момент за изкуствено осеменяване, по възможност без присъствие на мъжко животно. Сравнително рядкото използване на метода на ИО при кучетата показва, че съществуват все още нерешени проблеми, свързани с всяка една от гореизброените предпоставки за неговото прилагане, в резултат на което асистираната репродукция при кучетата значително изостава в сравнение с други видове (Goodrowe et al., 2000; Luvoni et al., 2005). Въпреки че кучешките сперматозоиди се запазват добре при краткотрайно съхранение, те реагират незадоволително при криоконсервиране, което наложи и научноизследвателската разработка в тази посока, през настоящия дисертационен труд.

Хипотетично, голяма част от трудностите, изникващи като фактори, пречатстващи ИО могат да бъдат преодолени в случай, че се разработи надеждна биотехнология за криоконсервация на спермална течност, която да осигурява голям поток от подвижни и функционални сперматозоиди в продължителен период от време в женските полови пътища.

Различни проучвания от последните години са фокусирани над ролята и функцията на СП, като ролеви компонент на еякулата, пренебрегван до момента. Доказано е обаче, че оказва въздействие върху мотилитета, жизнеспособността и биологичните качества на самите сперматозоиди. Една от главните характеристики на спермата при нейното ин витро изследване след замразяване е подвижността. На този показател до скоро се отделяше изключително голямо значение. Известно е, че подвижността, колкото и важна да е като показател, невинаги корелира с функционалната способност на сперматозоидите. Ето защо се наложи разработване на нови технологии на изследване, които да дават по-ясна преценка на качеството на спермата ин витро. Такъв тип технологии са насочени към функционално изследване на определени ензими, които могат да бъдат използвани като прогностични маркери за оценка оплодителния капацитет на мъжките полови гамети. Тези фактори са залегнали в задачите на този дисертационен труд и кореспондират с разработката на нова биотехнология за криоконсервация на сперма. Включени са множество похвати за оценка на качеството на спермалната течност, като ще се хвърля светлина и на ролята на спермалната плазма в оцеляването и оценката на сперматозоидите след процеса на криоконсервация на сперма от кучета, каквато е и крайната цел на настоящата разработка.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационен труд е да се проучи ролята на семенната плазма и възможността за комбинираното прилагане на биологични активни вещества: витамини А, Д3 и Е върху основни параметри на сперматозоиди от куче в процеса на криоконсервация.

Задачи

В изпълнение на горопосочената цел, бяха поставени следните задачи:

- 1. Изясняване ролята на някои семинално плазмени протеини в процеса на криоконсервация;**
- 2. Криоконсервация след отстраняването на спермалната плазма, посредством изпитването на различни режими за центрофугиране и отношението към активността на сперматозоид-специфичните ензими;**
- 3. Криоконсервация, посредством изпитване ефекта на биологично активни субстанции /добавка на А, Д3, Е/, добавяни след процеса на еквилибрация;**
- 4. Криоконсервация, чрез изпитване на методика за двустепенно разреждане на спермалната течност;**
- 5. Криоконсервация, чрез изпитване ефекта на обема и вида на разфасовките при замразяване;**
- 6. Изследване на режима на размразяване и биологична роля върху морфологията и функционалната активност на сперматозоидите;**

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Материали.

За изработването на задачите, свързани с този дисертационен труд, бяха използвани 80 еякулата от мъжки кучета - на възраст 2 до 12 години, от различни породи.

При работата с животните бяха спазени всички законови изисквания за хуманно отношение и защита на животните, както и законовите разпоредби, свързани с безопасните условия на труд.

2. Методи.

2.1. Получаване на спермална течност

Методът за получаване на еякулати бе осъществен, съобразно всичките изисквания за хуманно отношение към животните. При получаване на еякулатите се подхождаше внимателно, без причиняването на какъвто и да е стрес или дискомфорт, които биха могли да навредят на кучетата или да смутят получаването на качествен биологичен материал.

Използван е мануален метод. Спермалната течност е получена като цял, нефракциониран еякулат. В по-голямата част от случаите манипулацията е извършена в присъствието на женско куче във фаза на еструс или бяха използвани тампони, предварително напоени с естрален секрет. С цел хуманно отношение и защита на животното и последващо правилно протичане на половите рефлексии, манипулацията се осъществява с участието на повече от един изследовател.

Впоследствие, транспортирането до лабораториите на ИБИР-БАН се осъществява посредством методи, запазващи стойностите на тази температура, като за целта се използва топла термочанта.

• **Макроскопска оценка на получените еякулати**

Непосредствено след получаване на еякулатите, пробите бяха подлагани на окомерна оценка, за установяване на основните характеристики, необходими за по-нататъшната обработка. Наблюдавани бяха следните параметри за първоначална оценка:

Обем: Определя се сравнително лесно по разграфените единици върху повърхността на чашката посочващи обема.

Цвят: Нормалният цвят на спермалната течност на кучето е бял, със слаби отенъци на кремovo до сиво. Нормалният цвят се променя при наличието на различни примеси. Също може да се причини от наличие на различни патологии, които влошават качеството на еякулатите..

Консистенция: еякулатът трябва да е хомогенна, водниста и бистра консистенция, без наличие на каквито и да е примеси, включително вторични замърсявания..

Чистота: липса на външни замърсители, липса на червени петна, като индикатори за наличие на кръв в еякулата;

pH: оценява се с накапването на капка от еякулата върху индикаторна хартия, като при кучета pH варира в рамките на 6,2 - 6,5;

След осъществяването на макроскопската оценка, годните еякулати се подлагат на разреждане.

• **Разреждане на спермалната течност**

Използват се различни методики за разреждане в зависимост от целта, в съответствие на поставената задачата. За целта се използват различни разреждатели и различно съотношение на разреждане, (Кичева, 2010). При разреждането се спазват следните основни правила:

- Следи се за температурна изравненост между получените еякулати и температурата на разреждателя.
- Бавно и плавно добавяне на разреждателя към получения еякулат.

- Съотношение на разреждане. То трябва да бъде такова, че крайната концентрация на сперматозоидите да отговаря на целите на извършваната задача.

В настоящите изследвания се правят специфични разреждания.

- За провеждане на спермо-компютърен анализатор (SCA) и компютърно-асистиран спермоанализ (CASA), разреждането се извършва посредством сперморазредител и в по-висока степен, като целта е да се получи крайна концентрация от $50-100 \times 10^6$ сперматозоида в милилитър. Това разреждане се прави с цел изпълнение на технологичните изисквания за работата на CASA и коректно отчитане на данните.
- За криоконсервация се извършва разреждане със среда за дълбоко замразяване, като степента на разреждане е такава, че да се постигне крайна концентрация от $100-200 \times 10^6$ сперматозоида в милилитър, което е стандартната концентрация за този вид.
- **Спермо - компютърен анализатор и компютърно - асистиран спермоанализ - SCA и CASA анализът**, предоставя прецизна оценка на еякулати от различни видове като: подвижност, морфология, концентрация, жизнеспособност, ДНК-фрагментация, кинетични параметри.

За изпълнение на така поставените задачи по този дисертационен труд е работено с модул „Motility and Concentration“ на Class Analyzer® CASA System, Spain.

- **Изолиране на спермална плазма**

Изолирането на СП е извършено с оглед нейното последващо проучване, посредством течнохроматографски анализ, SDS-PAGE електрофореза и изследване на активността на ключови ензими, намиращи се в нея, както и експериментално замразяване на еякулати без СП. Използвани са шест различни протокола за отстраняването на семиналната плазма в зависимост от поставените задачи.

- **Изследване на семиналната плазма и семиналноплазмените протеини**

-Спектрофотометрично измерване на общото съдържание на протеин.

-Измерване на общия протеин в семиналната плазма

-Измерване на общия протеин в пробите, сепарирани от HPLC системата.

- **Молекулно - ситова високоефективна течна хроматография (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)**

За изпълнение на задачите по дисертацията, сепарирането на СПП е извършено чрез система Binary HPLC Pump 1525 с UV/vis детектор 2489 (Waters Company®) с едновременно отчитане при две дължини на вълната ($\lambda = 220 \text{ nm}$ и $\lambda = 280 \text{ nm}$). Използвана е **полу-препаративна молекулно-ситова хроматографска колона TSK gel® G3000SW**, 21mm \times 300mm, 10 до 500kDa (Tosoh Bioscience®). Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 12,000-200,000 Da™ (Sigma-Aldrich®) беше използван за определяне на относителното MW на сепарираните протеинови пикове. Опитите са проведени на всички проби при използване на инжекционен обем 500 μl , 30 min време за протичане на пробата и 6 ml/min скорост на потока. В резултат бяха получени хроматограми, отразяващи протеиновия профил на спермалната плазма от кучета с добри характеристики на еякулатите- група 1 (n=15) и незадоволителни характеристики, които не подлежат на криоконсервация - група 2(n=15) .

- **Характеризиране на семинално плазмените протеини чрез полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE)**

За разделяне и идентифициране на белтъчните структури в спермалната плазма е използвана натриевдодецил сулфат полиакриламидна гел-електрофореза (SDS-PAGE) при редуциращи условия.

За изпълнението на поставените цели и задачи на настоящия труд бе извършена SDS-PAGE електрофореза на спермалната плазма на еякулатите с добри, подлежащи на криоконсервация- група 1 и незадоволителни характеристики-група 2. На пробите бе измерено общото съдържание на протеин и впоследствие всички проби бяха разреждени, така че да съдържат еднакво количество белтък. Впоследствие бе добавен Laemmli Sample buffer (Bio-Rad®), в съотношение 1:3 с добавка на 10% β -mercaptoethanol така че, при накапване в стартиращия гел в количество от 20 μ l да се съдържат 25 μ g протеин на джоб. Преди накапване, пробите бяха подложени на топлинна денатурация на 70°C в продължение на 10 минути. Като стандарт бе използван Bio Rad Kaleidoscope Prestained Standards Protein Marker. За изливане на геловите и провеждане на електрофоретичното разделяне беше използвана GeneMate® Dual Cooled Vertical Gel System 16 \times 14cm (BioExpress®) и захранване Apelex® PS608. Електрофоретичното разделяне се провежда при постоянно напрежение 80V, докато пробите са в концентриращия гел, и при 160V след навлизане на пробите в разделящия гел. Визуализацията на протеиновите бандове бе извършена чрез метод на сребърното оцветяване.

- **Биохимичен анализ на спермална плазма от кучета**

В допълнение беше проучена активността на ензимите алкален фосфатаза (АФ), креатинкиназа (СК) и лактатдеhidрогеназата (ЛДХ) в спермалната плазма от еякулати, съставляващи група 1 с добри и група 2 с незадоволителни характеристики. За определяне на активността на ензимите беше използван полуавтоматичен химичен анализатор (Mindray BA-88A). Апаратурата бе еквилибрирана с дестилирана вода (dH₂O). Бяха използвани реактиви (Cerna Diagnostica) за определяне на активността на ензимите, а измерванията на ензимите бяха изразени в U/L

- * Изследване на АФ. Сепарирането на СП бе извършено по гореописаната методология за отделяне на СП - с цел подлагането ѝ на биохимичен анализ.

- * Изследване на СК. Сепарирането на СП бе извършено по гореописаната методология за отделяне на СП - с цел подлагането ѝ на биохимичен анализ.

- * Изследване на ЛДХ. Сепарирането на СП бе извършено по гореописаната методология за отделяне на СП - с цел подлагането ѝ на биохимичен анализ.

- **Криоконсервиране на спермална течност.** За постигането на така поставените цели бяха извършени експериментални замразявания на спермална течност, целящи изясняването на ролята на част от семинално плазмените протеини в процеса на криоконсервация. Криоконсервацията бе осъществена по бавната методология в следните стъпки.

- Първоначална оценка.
- Разреждане
- Еквилибрация
- Замразяване.
- Размразяване
- Оценка след размразяване.

След размразяването бе извършена оценка на еякулатите посредством CASA системата и отделните групи, преминали процес на криоконсервация, бяха сравнени статистически помежду си.

- **Криоконсервация на семинална плазма.**

- Сепариране на семиналната плазма.
- Замразяване.

- Размразяване.
- Оценка след размразяване.
- *Криоконсервация, посредством изпитване ефекта на биологично активни субстанции по време на еквилибрацията и криоконсервацията-АДЗЕ (n=10).*
- *Криоконсервация след отстраняването на спермалната плазма, посредством изпитването на три различни режима за центрофугиране.*
- *Криоконсервация чрез изпитване на методика за двустепенно разреждане на спермалната течност.*
- *Криоконсервация чрез изпитване ефекта на обема и вида на разфасовките при замразяване*
- *Криоконсервация чрез изпитване на различни режими на размразяване.*

Статистически изчисления

Статистическият анализ и графичното представяне на резултатите са извършени чрез Statistica v.6.0 (StatSoft, Inc). Данните са представени посредством параметрите на дескриптивната статистика: средна стойност \pm стандартна грешка (SEM); в графичните изображения допълнително е изобразено и стандартното отклонение (SD). Проведен е тест за нормалност на разпределението. Непараметричен Kruskal-Wallis тест беше използван при сравнение на повече от две групи и неизпълнение на условието за нормалност на разпределението. Разликите между групите бяха считани за достоверни при $p < 0.05$. За откриване на различията в средните стойности между отделните изследвани групи беше използван Student-Newman-Keuls post hoc тест. Непараметричен Mann-Whitney U тест беше използван при сравнение на не повече от две групи.

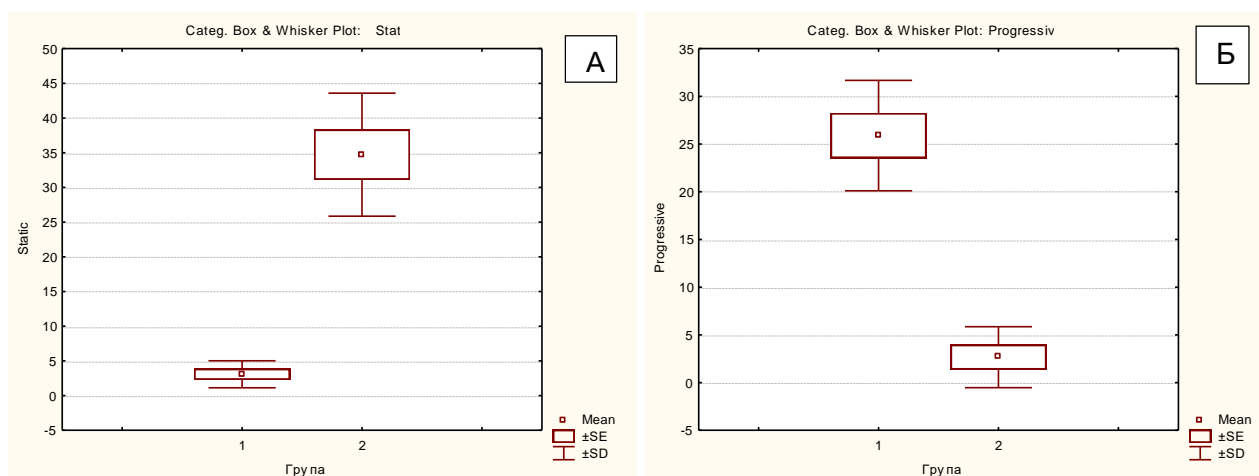
IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Изясняване ролята на някои семинално плазмени протеини в процеса на криоконсервация;

1.1. Селектиране на еякулати със задоволителни и незадоволителни биологични характеристики преди криоконсервация и сепариране на спермална плазма от тях.

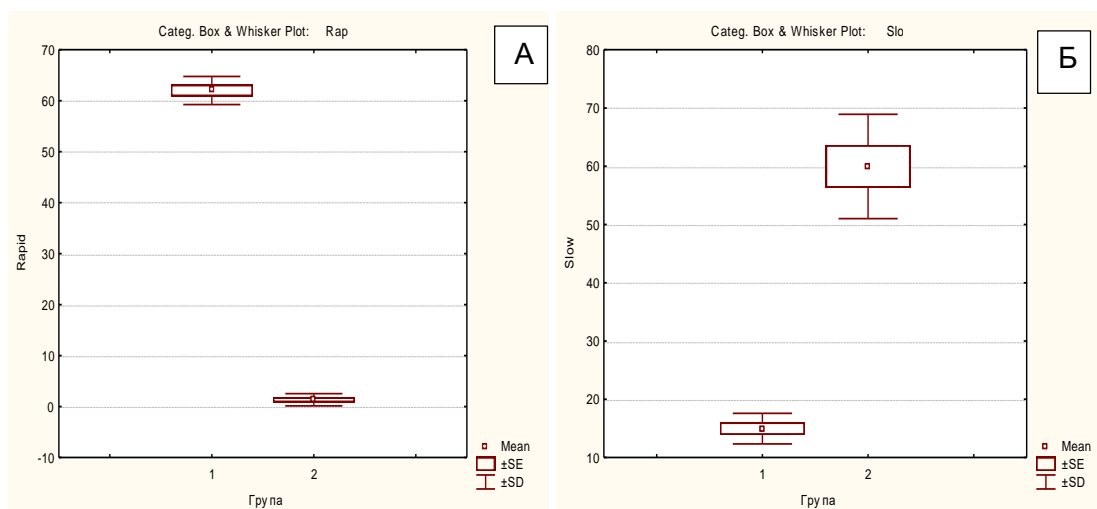
Задачата е фокусирана върху първа стъпка от технологията на криоконсервация. Предварителна оценка и селектиране на еякулати с добри параметри на спермограмата и такива с незадоволителни, които не подлежат на криоконсервиране.

На фигура 1А са показани статистически достоверни разлики в двете изследвани групи. При групата 2 се откриват статистически достоверно по-голям процент статични сперматозоиди $P < 0.05$./ На фигура 3Б са изобразени данните от сравняването на гаметите с прогресивно движение между двете сравнявани групи. След статистическия анализ процентът на прогресивните сперматозоиди показва статистически достоверна разлика $P < 0.05$./ в полза на група 1.



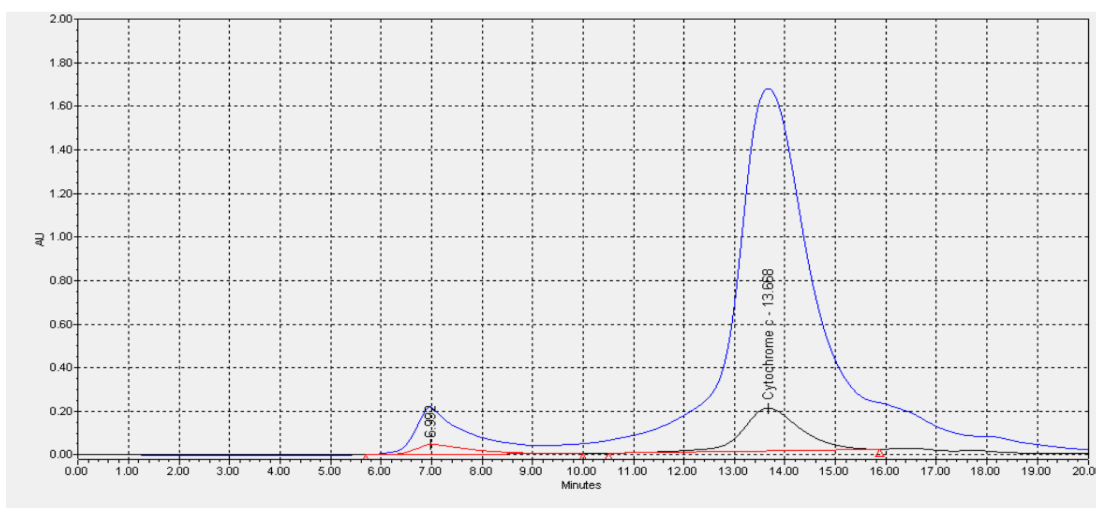
Фигура 1. Анализ на статичните /А/ и прогресивните сперматозоиди /Б/ между групите

На Фигура 2А е изобразен анализа от сравняването на бързите сперматозоиди в двете групи. Установи се статистически достоверна разлика $P < 0.05$./ в полза на група 1. На фигура 4Б е изобразено сравняването на гаметите с бавна скорост между двете групи. Бе открита статистически достоверна разлика в полза на група 1, където процентът на бавно подвижните сперматозоиди бе достоверно по-малък. $P < 0.05$./

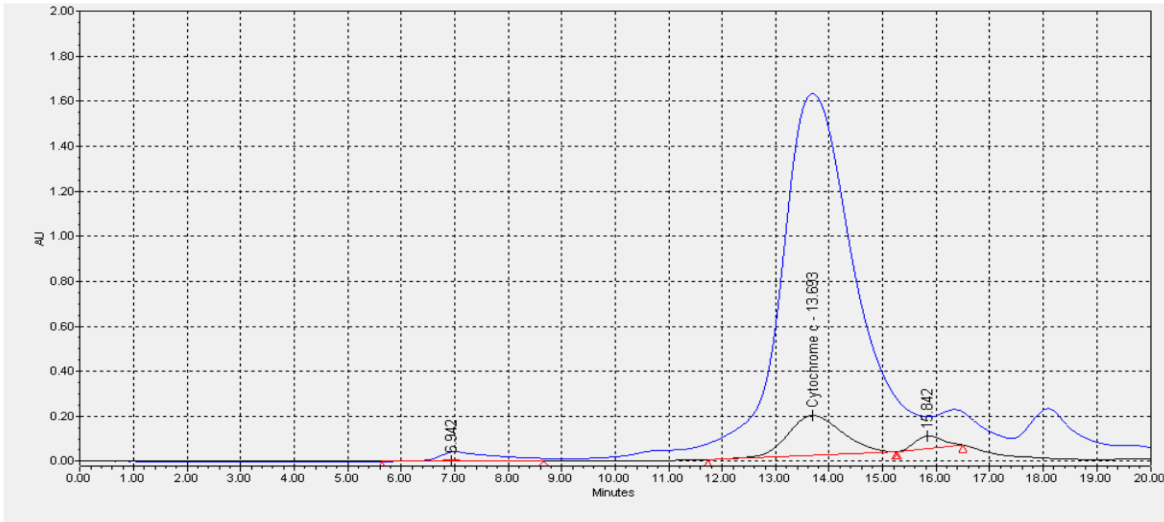


Фигура 2. Анализ на сперматозоидите с бърза /А/ и бавна /Б/ скорост между групите

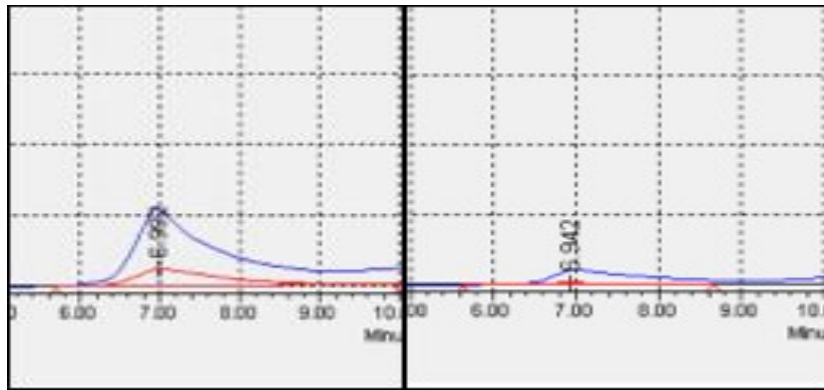
1.2. Сравнителен HPLC анализ на SPPs между двете изследвани групи (от еякулати със задоволителни и незадоволителни характеристики). След като селекцията между двете групи бе осъществена посредством CASA анализ и доказана посредством статистически анализ, се пристъпи към проучване на връзката на семиналнопазмените протеини с качествените характеристики на мъжките гамети. На фиг. 3 е изобразена диаграмата от HPLC анализа на СПП от група 1. На фиг. 4 е показана диаграмата от анализа на група 2. Сравнителният HPLC анализ на СПП между двете групи установява разлики в количеството протеини, съдържащи се в отделените пикове, както и в съдържанието на пиковите. (фиг. 3).



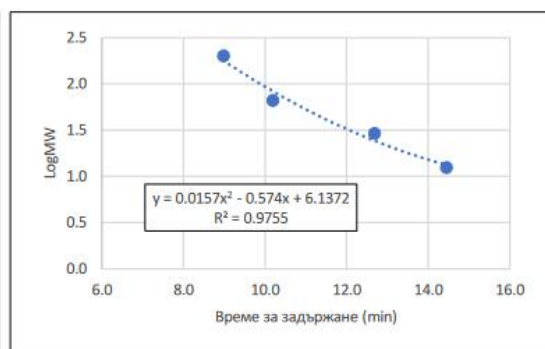
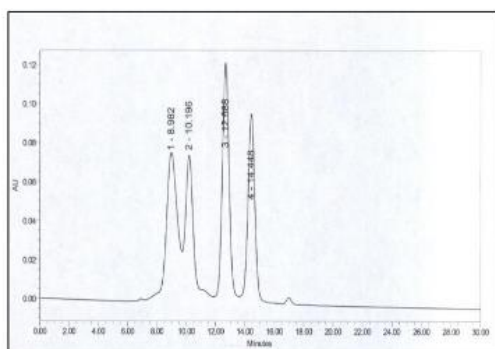
Фигура 3. HPLC анализ на СПП от група 1 при дължина на електромагнитната вълна при $\lambda = 220 \text{ nm}$ син цвят и $\lambda = 280 \text{ nm}$ червен цвят.



Фигура 4. HPLC анализ на СПП от група 2 при дължина на електромагнитната вълна при $\lambda = 220 \text{ nm}$ син цвят и $\lambda = 280 \text{ nm}$ червен цвят.



Фигура 5. Детайлно изобразяване на разликата в пиковите, отразяващи белтъчни фракции с високо молекулно тегло в двете групи.



Фигура 6. Стандартни криви на използвания маркер за MW Prestained Broad при 12% гел. Gel Filtration Markers Kit for Protein Molecular Weights 12.000-200.000 Da™ (Sigma-Aldrich®)

Според хроматограмата на стандартна крива на използвания HPLC стандарт /фиг. 8 /, на 8.982 min – е пикът на β – Amylase from sweet potato с ММ 200kDa, на 10.196 min е пикът на Bovine Serum Albumin, с ММ 66kDa, на 12.688 min е пикът на Carbonic Anhydrase from bovine erythrocytes, с ММ 29kDa и на 14.448 min е пикът на Cytochrome C from horse heart, който е с ММ 12.4kDa.

С настоящите изследвания, в спермалната плазма на куче, бяха идентифицирани общо 4 основни протеинови пика. Профилът на СПП на група 1 (фиг.4) показва изразен пик на 7-та минута, който почти липсва в група 2. (фиг. 3 и фиг. 4) Този пик съдържа протеини с високо молекулно тегло (над 200 кДа). Може да се предположи, че това са група протеини, които принадлежат към групата на свързващите цинк протеини, за които е известно, че имат афинитет към свързване към акрозомната област на сперматозоидите и проявяват защитен ефект върху плазмената мембрана. Също така е възможно, в този пик да има деривати на протеини. Независимо от това, в еякулатите с понижени характеристики, тези протеини почти липсват. За нас, интерес представлява и втория пик, отделен на 14 минута. Ако според протеиновия маркер (фиг.6) на 12.688 min се отделя пикът, съдържащ Carbonic Anhydrase from bovine erythrocytes, с ММ 29kDa, това ни дава основание да предположим, че в този пик се съдържат протеини с молекулна маса около 12.4 кДа и по-ниска. Тези протеини са в значително количество и повече (екстинцията е около 1.68 при еякулатите с добри качествени показатели), в сравнение с ниското съдържание на тези протеини от СП на еякулати от група 2 (екстинцията е 0.22). Тези данни са интересни и могат да послужат като референтен критерий за качество на еякулатите. Очевидно е, че еякулатите с добри биологични характеристики, имат богато съдържание не само като количество на протеини, но и като видове, в сравнение с еякулатите, с влошени характеристики. Това твърдение се потвърждава и от отделения пик на 16-та минута, който почти липсва в СП на еякулати с влошени качествени показатели. Считаме, че в този пик се съдържат нискомолекулни протеини с ММ под 10 кДа. От интерес е функционалната роля на различните групи протеини по отношение на биологичния капацитет при съхранение и криотолерантността на сперматозоидите. Има доказателства, че някои протеини от СП имат положителен ефект върху биологичните качества на сперматозоидите, докато други негативно повлияват подвижността и

преживяемостта на сперматозоидите при кучетата (Neagu et al., 2011; Mogielnicka-Brzozowska et al., 2012).

Извод; В обобщение по конкретната подзадача, считаме че СП на кучета има специфична характеристика на видовете и съдържанието на протеините в еякулати с добра и незадоволителна характеристика на сперматозоидите. При еякулати с добра характеристика е идентифициран протеинов пик с регистрирано наличие на по-високо количество протеини, чиято екстинция достига над 1.80 AU при λ на канала = 220.

На базата на получените различия в хроматограмата и необходимостта от характеризирани на протеините, специфични за еякулати с добри характеристики, бяха проведени допълнителни проучвания за характеризирани на семинално плазмените протеини, което беше изпълнено чрез електрофоретичен анализ, представен в подзадача 3.

1.3. Електрофоретичен профил между двете изследвани групи-със задоволителни и незадоволителни биологични характеристики.

Първоначално бе измерено съдържанието на протеин в четирите пика, които се визуализират при еякулатите от двете изследвани групи. Измерената концентрация спектрофотометрично варира от 0,043 mg / ml до 0,295 mg / ml: Средните стойности за отделните пикове бяха изчислени за всички изолирани СП (табл.1)

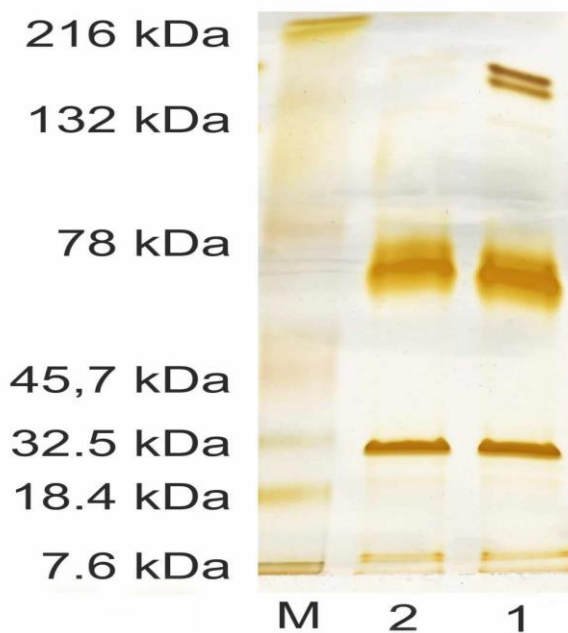
Табл.1. Средни стойности на концентрациите на отделните пикове между двете групи

Еякулати с добри характеристики	Еякулати със занижени характеристики
• Пик 1 - 0,039 mg / ml	• Пик 1 - 0,014 mg / ml
• Пик 2 - 0,278 mg / ml	• Пик 2 - 0,031 mg / ml
• Пик 3 - 0,195 mg / ml	• Пик 3 - 0,005 mg / ml
• Пик 4 - 0,067 mg / ml	• Пик 4 - 0,000 mg / ml

Двете групи бяха подложени на електрофоретично разделяне на 12%-ов гел SDS - PAGE анализ. Интерес представляваха протеините, които се съдържат в СП на еякулатите с добри характеристики. Протеини с молекулно тегло в диапазона от 7,6 kDa до повече от 155 kDa бяха визуализирани на SDS - PAGE на 12% гел (фиг. 7). Това позволи да се осигури добро сепариране на бандовете на високо и нискомолекулните протеини. При изпълнението на сравнителен анализ на протеиновите хроматографски профили на СП, беше демонстрирана относително ниската концентрация на високомолекулните протеини в СП на куче, в сравнение концентрацията на

нискомолекулните протеини (под 70kDa). Тези резултати бяха взети под внимание при изпълнението на SDS-PAGE. Данните от проведените изследвания показват, че електрофорезата потвърждава данните от хроматографския анализ, а именно: в еякулати с добри качествени показатели се съдържат високомолекулни протеини, които липсват или са в малки количества в група 2. Известно е, че някои от високомолекулните протеини в СП се прикрепят по повърхността на плазмената мембрана след еякулацията. Счита се, че по този начин спермалната плазмена мембрана става по устойчива на различни предстоящи събития преди оплождането на яйцеклетката. Има предположения, че някои от тези протеини влияят на енергийната обеспеченост на сперматозоидите, активирайки различни биохимични процеси.

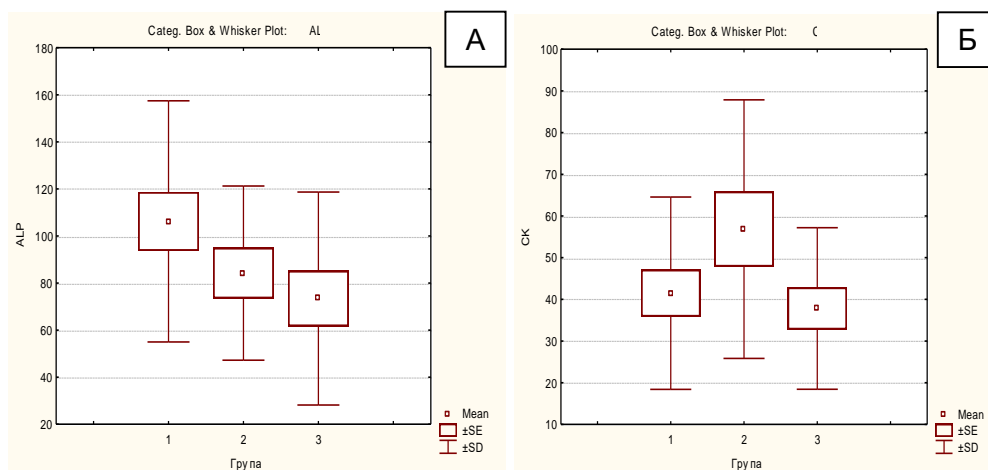
Извод; Получените данни по тази задача потвърждават нашето предположение, че основни различия в биологичните параметри на сперматозоидите е свързано с различното съдържание на протеини в спермалната плазма. Това позволява да направим следното заключение: при кучета с влошени качествени показатели има промени в количеството и качествено съдържание на някои от протеините в спермалната плазма, което повлиява на основни параметри от спермограмата, вероятно свързани с поведението и биологичната функция на сперматозоидите.



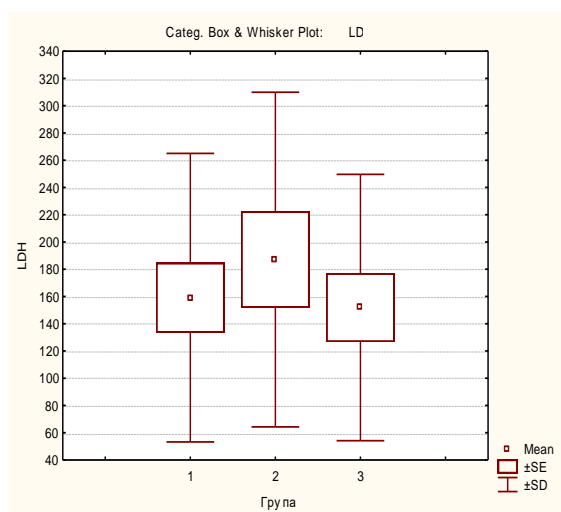
Фигура 7. SDS - PAGE анализ на 12%-ов гел, между двете групи 1-с добри и 2 незадоволителни параметри.

1.4. Сравняване на ензимната активност в семиналната плазма между еякулати с добри и незадоволителни показатели на спермограмата и въздействието на ултраниските температурни диапазони над функционалната им активност.

На базата на получените резултати от проведените изследвания чрез HPLC и електрофоретичния анализ, проучванията в различията на протеиновия профил в двете групи бяха разширени посредством биохимично изследване на ензимна активност. На изпитване бяха подложени следните ензими - АФ, СК и ЛДХ. Също така с цел изясняване ролята на семиналната плазма в процеса на криоконсервиране на мъжки гамети от вида *Canis lupus familiaris*, бе осъществено биохимично проследяване на ензимната активност на спермалните плазми.



Фигура 8. Данни за анализа на АФ и креатинкиназа между сравняваните групи.



Фигура 9. Данни за анализ на ЛДХ между сравняваните групи.

Резултатите от статуса на АФ в сравняваните групи е показан на фиг.8 А. След статистическата обработка на данните не се откриха достоверни различия в активността на ензима между нито една от сравняваните групи $P > 0.05$, въпреки че неговите нива бяха най-ниски в група 3. Това вероятно се дължи на въздействието на ултраниските температурни режими над белтъчната структура на ензима.

Резултатите от статуса на креатинкиназа са илюстрирани на фигура 8Б. Данните от изследването показаха интересни различия. Беше установена статистически достоверна разлика между групите 1 и 2 $P < 0.05$., докато между група 1 и 3 не бе отчетена статистически достоверна разлика $P > 0.05$. Тези данни идват да покажат, че в спермалната плазма на еякулати от кучета с понижени характеристики на спермограмата има по-високо съдържание на креатинкиназа. Този резултат за кучетата е нов и в достъпната литература не бяха открити данни да е докладван до този момент.

Резултатите от статуса на лактатдеhidрогеназата са изобразени на фигура 9. Между групите подложени на сравняване не бяха открити статистически достоверни различия $P > 0.05$.

След излагане на спермалната плазма на ултраниски температурни диапазони, активността на трите проследявани ензима в сравняваните групи (група 1 и група 3) не показва статистически достоверна разлика, $P > 0.05$. Ензимният статус от своя страна не показва съществена динамика след размразяването.

Тълкуването на получени от нас резултати на този етап представлява информативна конфигурация за разпределението на ензимната активност в сравняваните групи и за техния статус след излагането на ултраниски температури. По литературни данни средната активност на АФ в кучешката спермална плазма е 0.6 IU/cm^3 с много големи вариации от $(0.5 - 257 \text{ IU/cm}^3)$, (Bittmar et al., 2007). Основната част от АФ в спермалната плазма на кучето идва от епидидимиса. Потенциалната значимост на АФ като маркер за качеството на спермата на този етап е в процес на задълбочено проучване, тъй като биохимичното изследване на алкалната фосфатаза в семиналната плазма не бива да се тълкува като самостоятелен подход за оценка на еякулатите. Важно е да се подчертае, че наличието на висока активност на АФ може да се дължи на възпалителни процеси в областта на мъжкия репродуктивен тракт. Има литературни данни, които съобщават за еякулати с много висока активността на АФ при съчетание на лошо качество на спермата и лоша замразяемост в резултат на наличието на възпалителни процеси в мъжката репродуктивна система (Turner and McDonnel, 2003; Estrada et al., 2003). В същото време проучванията, касаещи стабилността на ензима след криоконсервация липсват. В хода на

настоящия експеримент установихме, че ултраниските температурни режими съществено не променят активността на АФ.

Тълкуването на резултатите, свързани с креатинкиназата, където бе установена статистически достоверна разлика между двете сравнявани групи (група 1 с група 2), е интересна с оглед оскъдните данни в достъпната литература, свързани с този ензим. В литературата главно преобладават изследвания извършени с хора. Креатинкиназата е вътреклетъчен ензим, който има роля в енергетиката на сперматозоида. Неговото наличие в спермалната плазма вероятно е резултат от „изтичането” му през деинтегрината плазмена мембрана на мъжките гамети. Според (Yeung CH, et al, 1998) креатинкиназата не се счита за възлов маркер, благодарение на който може да се съди за подвижността на сперматозоидите от човек, тъй като сперматозоидът може да се снабди с енергия благодарение на гликолизата и цикъла на Кребс. Според авторски колектив (Dnnd Gergely et al, 1999), провели изследване сред мъжкото население на Унгария чрез случайно подбрани доброволци, установяват, че съществува обратна корелация между активността на креатинкиназата и концентрацията на сперматозоидите. Друг извод, който правят авторите е, че съществува обратна корелация между завишената активност на ензима и зрелостта на мъжките гамети. Проучване и на други автори (Claus Rolf et al. 1998) предполагат липсата на връзка между фертилния потенциал и активността на креатинкиназата в семиналната плазма и в екстракти от сперматозоиди. От друга страна наличието в спермалната плазма на повишена активност на ензим, който е вътреклетъчен би могло да говори за нарушена пропускливост и функция на клетъчната мембрана или незрялост на сперматозоидите. В заключение може да се каже, че ролята на креатинкиназата като маркер за качество или прогностичен маркер за лечение на безплодие е все още неизяснена и твърде спорна. Необходими са още допълнителни изследвания, за да се установи неговата роля в охарактеризирането на еякулатите.

Тълкуването на данните, свързани с ЛДХ също не може да бъде еднопосочни, поради все още оскъдната информация, която се открива в литературния обзор. Както и при СК, по-голямата част от проучванията са реализирани с хора. Наличието на ЛДХ активност в семиналната плазма е важно и с оглед прогноза при лечението на безплодие при хората. Трима от четирима пациенти, чиято семинална плазма показва ЛДХ активност са отговорили позитивно на лечение с hCG и hMG, докато нито един пациент в чиято семинална плазма не е установена висока ЛДХ активност не е отговорил позитивно на лечението. Тези данни показва клиничната стойност на ЛДХ като потенциален маркер за активността на семенния епител при диагностициране и лечение на мъжко безплодие (Tsujii T et al., 2002). От друга страна и този потенциален маркер не бива да се тълкува

самостоятелно и еднопосочно, тъй като екстрацелуларната поява на ензими, които при нормални условия имат вътреклетъчното локализиране, може да покаже мембранна дисфункция или клетъчна дезинтеграция, т.е. „изтичане” от половите клетки в резултат на нарушена мембранна цялост, които са на ниво сперматоцити или такива достигнали по-висока степен на зрялост (Nassim Virj et al., 1985).

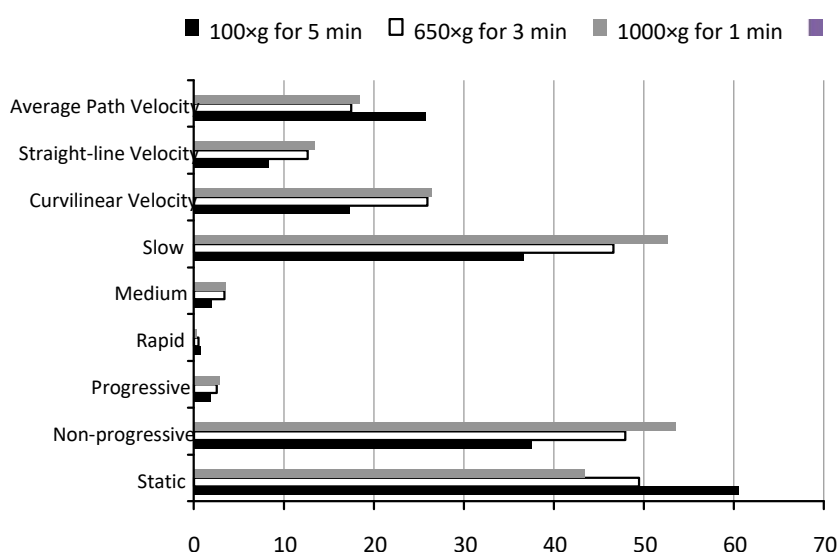
Обобщено, с настоящите анализи за първи път бе установено, че има зависимост между влошените качествени показатели на еякулатите с високото съдържание на ензима креатинкиназа.

2. Криоконсервация след отстраняването на спермалната плазма посредством изпитването на различни режими за центрофугиране;

Съставът и функцията на спермалната плазмата предизвиква интерес и се подлага на задълбочено проучване при много видове. Има данни от редица автори, че ефектите на протеините от СП, в зависимост от тяхната природа и продължителност на действие, могат бъдат както благоприятни, така и увреждащи и са различни при различните видове и индивиди (Tulcan et al., 2004; Aurich, 2008; Strzeżek et al., 2009). При кучета тази течност има главно простатен произход. Това се дължи на факта, че за разлика от други видове простатата е единствената допълнителна полова жлеза, която присъства в репродуктивната система на кучето (Кристенсен, 1979). На този етап ролята на СП в процеса на криоконсервация на мъжките гамети е все още неясен и твърде дискуссионен. Има литературни данни, че простатната течност (спермалната плазма) не е свързана с фертилните характеристики на мъжките гамети (Iguer-Ouada, & Verstegen, 1997). При *in vitro* изследвания на кучешка сперма, съхранявана при стайна температура, добавянето на СП към еякулатите е влошило техните параметри. Отрицателно засегнати са били непрогресивната, прогресивната подвижност и процентът на статични сперматозоиди (England & Allen, 1992).

Въпроси за ролята на кучешки СП засягат и протоколи, свързани с криоконсервация на мъжки гамети. В достъпната литература съществуват много протоколи, въпреки че нито един от тях не е утвърден или стандартизиран. В някои от протоколите отстраняването на семенната плазма е описана като задължителна технологична стъпка, която трябва да бъде изпълнена. Такива препоръки се дават от различни автори (Rota, 1995;) като в протоколите с отстраняване на спермалната плазма като технологичната стъпка се препоръчва да бъде извършена чрез центрофугиране при 600–700 ×g за 4,5 минути. (Rijsselaere, 2002). Но според Koderle (2009), отстраняване на семеналната плазма чрез центрофугиране преди криоконсервация не само нарушава всички параметри на

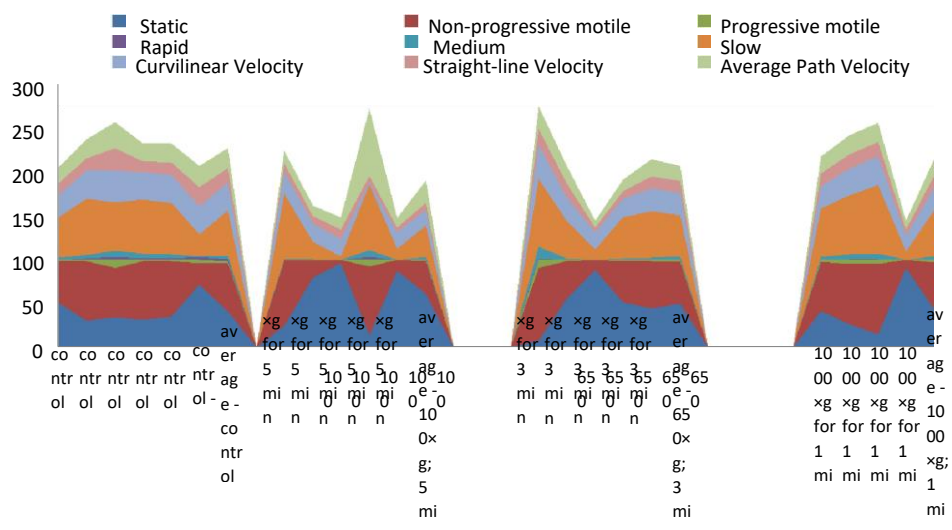
CASA спермограмата, но също така води до денатурация на хроматина в мъжките гамети. Въз основа на гореспоменатите противоречия относно ролята на СП, тествахме ефект на три различни режима на плазмено сепариране и как тази технологична стъпка се отразява върху спермограмата на сперматозоидите. Ефектът от центрофугирането на сперматозоидите бе изпитан веднага след като бе извършен и отново след процеса на замразяване-размразяване.



Фигура 10. Разлики между параметрите на CASA, сравнени с трите режима на центрофугиране, анализирани преди криоконсервация.

На фигура 10 са сравнени параметрите от спермограмата между трите тестови групи преди криоконсервация, непосредствено след осъществяването на стъпката с центрофугирането. От фигурата се вижда, че от тестовите проби тези, които са центрофугирани при 1000xg за 1 минута, имат най-висок процент прогресивно подвижни сперматозоиди, последвани от пробите, центрофугирани при 650xg за 3 минути. Най-ниският процент прогресивно подвижни гамети имат пробите, центрофугирани при 100xg за 5 минути. Същият резултат се наблюдава и при статичните сперматозоиди, най-висок процент са при тестовите проби центрофугирани при 100xg за 5 мин., а нисък при 1000xg за 1 мин. Тази тенденция на влошаване на показателите при намаляване на стойностите на g и увеличаване на времето на експозиция от 1 минута до 5 минути се наблюдава и при останалите показатели от спермограмата- сперматозоиди с бърза, средна и бавна скорост, а също така и при кинетичните параметри VCL, VSL и VAP. На този етап от задачата може да се направи извод, че центрофугирането вече е повлияло над тестовите групи по

различен начин. Още преди да се пристъпи към криоконсервация тестовите групи демонстрират различна степен на влошаване на параметрите.



Фиг. 11 Сравняване между групите -контрола и трите тестови, след като са подложени на криоконсервация.

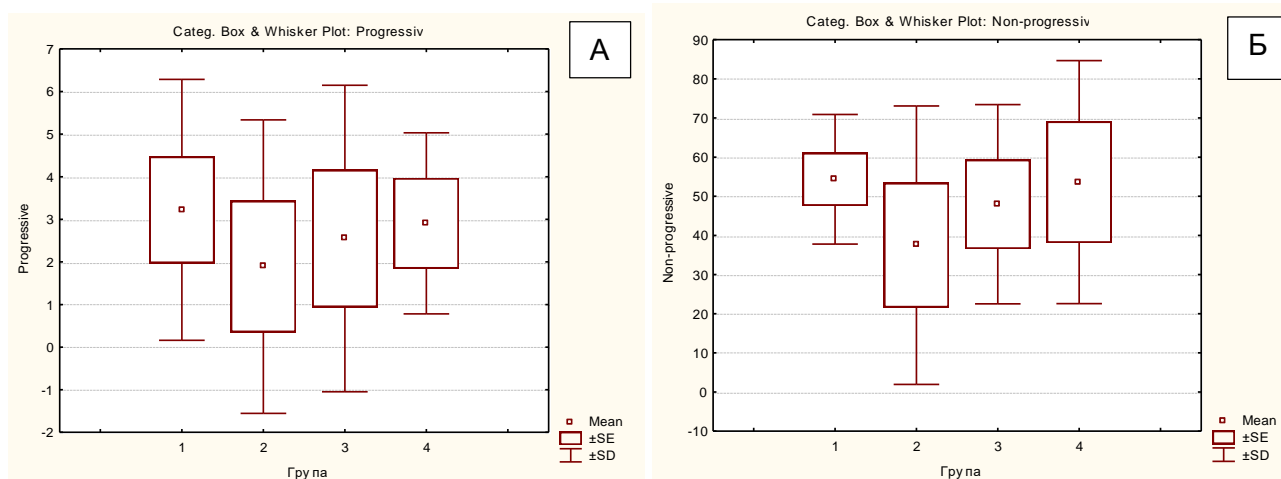
След процеса на замразяване и размразяване, контролата демонстрира по-добри резултати във всички параметри от спермограмата - фиг. 11. За сперматозоидите с непрогресивна подвижност контролата има значително по-добри параметри от тестовите групи. Сред тестовите групи най-високият процент на непрогресивни подвижни сперматозоиди се наблюдава в режим на центрофугиране $650 \times g$ за три минути и най-ниският в групите, центрофугирани при $1000 \times g$ на минута. За статичните тенденцията се поддържа, като най-ниският процент е контролата, а най-високият при $1000 \times g$ за една минута. От фигурата е видно, че в резултат на нискотемпературните ефекти скоростта на бързите сперматозоиди и сперматозоидите със средна скорост е намаляла рязко, без значителна разлика в нито една от пробите. При бавно движещите се сперматозоиди процентът е най-висок в контролите, последвани от тестовите групи $650 \times g$ за три минути и $1000 \times g$ за една минута. От представените резултати може да се заключи, че отстраняването на сперматозоидната плазма не е подобрило CASA параметрите на мъжките гамети по време на криоконсервацията. Подобни резултати са получени и от Jennie Risopatrón (2012). Проучванията, проведени преди излагането на гаметите на ултраниска температура, показват влошаване на параметрите веднага след центрофугиране. Тези смущения вероятно са от общ характер и се дължат на следните въздействия. При по-продължителна обработка на сперматозоидите, свързана с

центрофугиране, анализирани на сперматозоидите и ресуспендиране на седиментни утайки с цел разреждане за криоконсервация, има вероятност да се предизвика температурен шок, метаболитни нарушения и повишен оксидативен стрес. По време на обработката на еякулатите имаше и термични въздействия, увеличаващи риска от температурен шок, тъй като температурата в центрофугата практически никога не може да бъде изравнена с температурата на криопротектора и останалите инструменти, използвани при обработката на спермата. Освен това, има информация, че някои спермално плазмени протеини (14, 24, 70 и 82 kDa), (Cheema et al., 2011) и с по-високо молекулно тегло, (около 150 kDa), които ние детектрихме в хода на задача 1, сравнявайки плазми от еякулати с добри и лоши показатели, имат положителна корелация с характеристиките на спермата.

Обобщено, извършването на технологичната стъпка свързана с отстраняване на СП посредством центрофугиране не доведе до подобряването на CASA параметрите.

3. Криоконсервация посредством изпитване ефекта на биологично активни субстанции /добавка на А, ДЗ, Е/ добавени към разреждателя за криоконсервация;

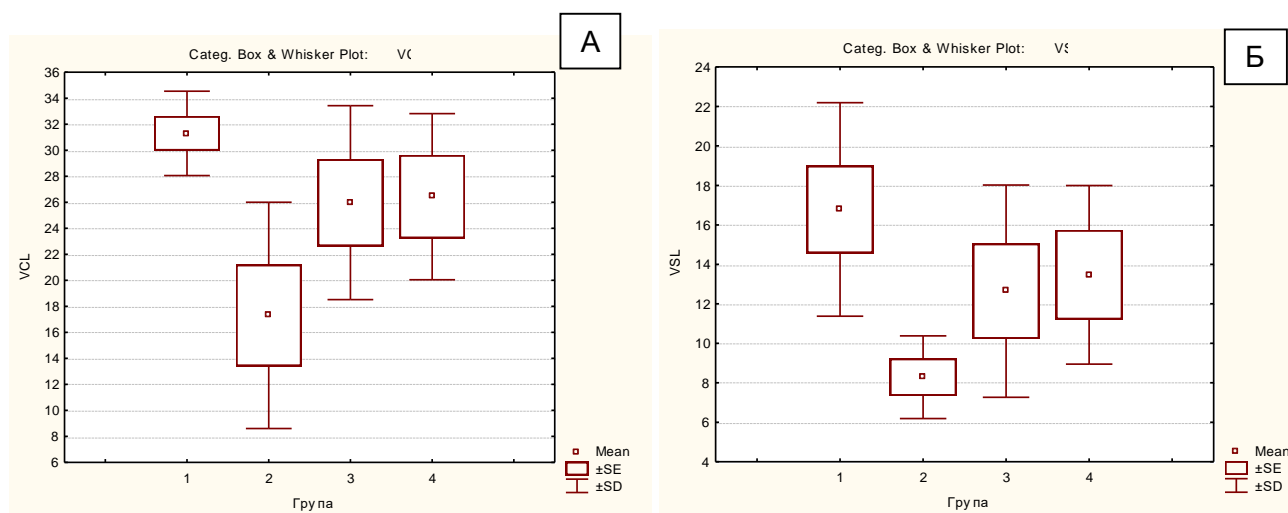
Изследванията на ролята на биологично активни вещества във връзка с предпазването на гаметите от оксидативен стрес и подобряването на подвижността им след замразяване представлява интерес за много учени, особено при вида куче, където има още редица неизяснени моменти (Vieira et al., 2018) Оксидативният стрес (ОС) се характеризира с дисбаланс между повишени нива на генериране реактивни кислородни форми (ROS) и/или нарушена ендегенна антиоксидантна защита. В този контекст съставът на спермалната плазма (СП) играе ключова роля в защитата на сперматозоидите срещу ОС (Samanta et al., 2018).



Фигура 12. Сравнителен анализ на прогресивни А и непрогресивни сперматозоиди Б между сравняваните групи.

При статистическото сравняване на прогресивни / фиг. 12 А/ и непрогресивни /фиг. 12 Б/ сперматозоиди в групите помежду им не бе отчетена статистически достоверна разлика между нито една от тях / $P > 0.05$ /.

Интересен бе резултатът със статистически достоверна разлика / $P < 0.05$ / между групите 1 и 2, представени на фиг. 13А по показател VCL и нарастващата тенденция в група 1, 3 и 4, спрямо показател VSL. Всъщност се оказва, че сперматозоиди, криоконсервирани с добавянето на витамин Е - 1 mg/ml среда, холекалциферол – 2000 UI/ml среда и витамин А – 1500 UI/ml среда, подобрява стойностите на тези скоростни параметри в сравнение с криоконсервирани по стандартна технология - без добавяне на допълнителни биологично активни вещества. Това бе важен индикатор и показва, че присъствието на споменатите добавки към средата има протектираща роля върху сперматозоидите, като съхраняват техния мотилитет.



Фигура 13. Сравняване на параметрите VCL и VSL между отселните групи.

Доказано от различни изследвания е, че антиоксидантните молекули могат да намаляват въздействието на ОС и по този начин да подобряват качеството на сперматозоидите след размразяване. Получените резултати се интерпретират и с факта, че оксидативният стрес е един от водещите фактори, увреждащи мъжките гамети в хода на криоконсервацията. Добавянето на антиоксидантни молекули, като витамин Е, могат да намаляват въздействието на ОС и по този начин да съхранят характеристиките на сперматозидите до по-голяма степен. По време на технологичните стъпки, свързани с

криоконсервацията, продукцията на реактивни окислителни радикали се повишава. Когато ROS присъстват във физиологични концентрации, те медиат множество ключови за сперматозоидите функции, като капацитация, хиперактивация, акрозомна реакция, правилното прикрепване на сперматозида към яйцеклетката и други. Но когато скоростта им на генериране надвишава капацитета на ендогенните антиоксидантни системи, ROS се натрупват в по-голяма концентрация и водят до възникването на оксидативен стрес и съответно влошаване на характеристиките на замразените-размразени гаметите. Въздействието на витамин Д би могло да се обясни хипотетично с факта, че в човешките сперматозоиди е открит рецептор за холекалциферон – VDR. Активирането на рецепторната молекула води до увеличаване на вътреклетъчните калциеви катиони (Ca^{2+}), като в резултат се подобряват скоростните параметри на сперматозоидите. Въздействието на витамин А също е неясно, но ние предполагаме, че природата му на мастноразтворим витамин би могла да стабилизира клетъчната мембрана на гаметите. В заключение може да се каже, че подобряването на характеристиките на спермограмите в опитните групи се дължи на един от гореописаните фактори или на комбинация от тях.

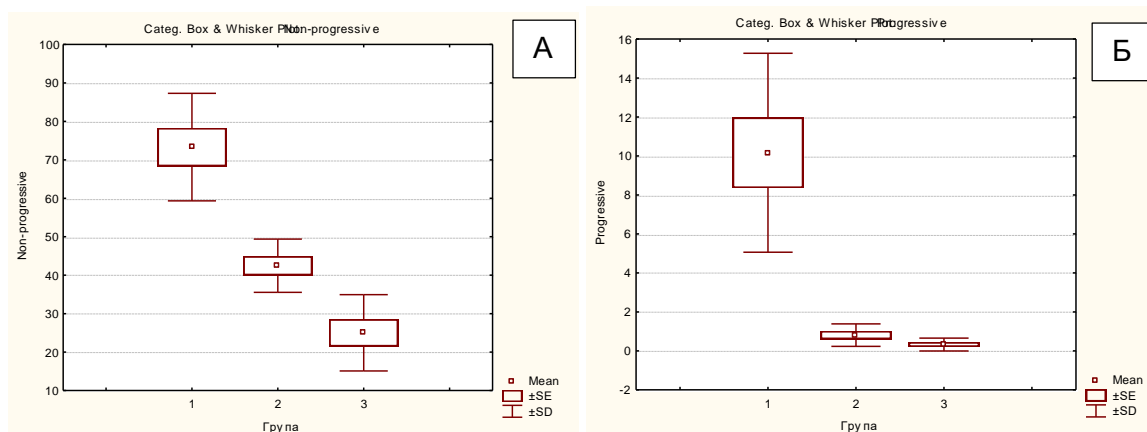
Извод: Добавянето на Е - 1 mg/ml среда, холекалциферол – 2000 UI/ml среда и витамин А – 1500 UI/ml среда достоверно подобри параметъра VCL на тестовата група в сравнение с контролата, замразена без добавката на БАВ.

4. Криоконсервация, чрез изпитване на методика за двустепенно разреждане на спермалната течност;

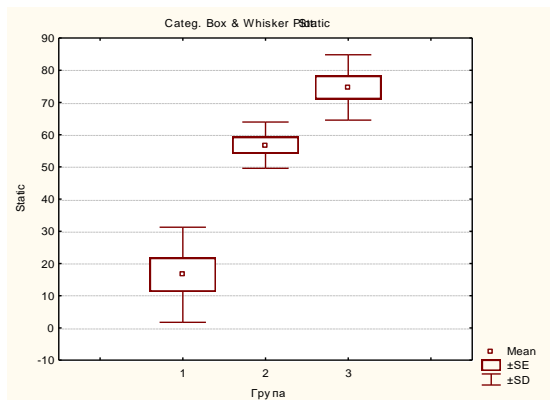
След като методиката с отстраняването на спермалната плазма бе изпитана с отрицателен ефект и след проучвания на ролята на БАВ, които подобряват кинетичния показател VCL, нашите по - нататъшни проучвания бяха насочени към оптимизиране на технологията за криоконсервация, като се проучи друг важен фактор, а именно как влияе начинът на разреждане на семенната течност от гледна точка снижаване на токсичния ефект на глицерина при по-кратък контакт със сперматозоидите. Методът е подробно описан в материали и методи на дисертацията. Глицеринът е незаменим криопротектор, който оказва защитно действие от вредните въздействия, които настъпват по време на криоконсервирането. В процеса на криоконсервация образуването на вътреклетъчен лед настъпва след като започне първо да се образува екстрацелуларен. Извънклетъчното образуване на ледени кристали е причина за значително увеличение на концентрацията на разтворени вещества в течната фаза извън клетката, която все още не е замръзнала, което създава нефизиологично висок градиент и води до изтичане на вода през клетъчната мембрана и в резултат настъпваща тежка дехидратация на гаметите. От своя страна

вътреклетъчните кристалчета лед, които се образуват на по-късен етап от извънклетъчните, водят до механични криогенни увреждания на клетката. Известно е, че глицеринът е основен интрацелуларен протектор, който предпазва клетките от температурен шок, снижавайки криоскопската точка в процеса на криоконсервация и намалявайки размерите на вътреклетъчните ледени кристали по време на снижаване на температурите (Galarza et al., 2021; Shin et al., 2008). Наред с незаменимите си полезни качества относно криозащитата на гаметите е известно, че глицеринът е и токсичен. Ето защо ние си поставихме за цел да добавим разреждателя на два етапа, като бяха извършени две разреждания. Целта бе да се намали времето на контакт между глицерина и сперматозоидите по време на тричасовия процес на еквилибрация.

Предимствата на едностъпковите и двустъпковите техники за разреждане на спермата все още са дискуссионни (Arif et al., 2020). Методът на едноетапно разреждане е по-практичен, тъй като разреждателят се добавя еднократно при стайна температура. Двустепенният метод за разреждане включва още една допълнителна стъпка, съгласно García-Alvarez et al., (2010).

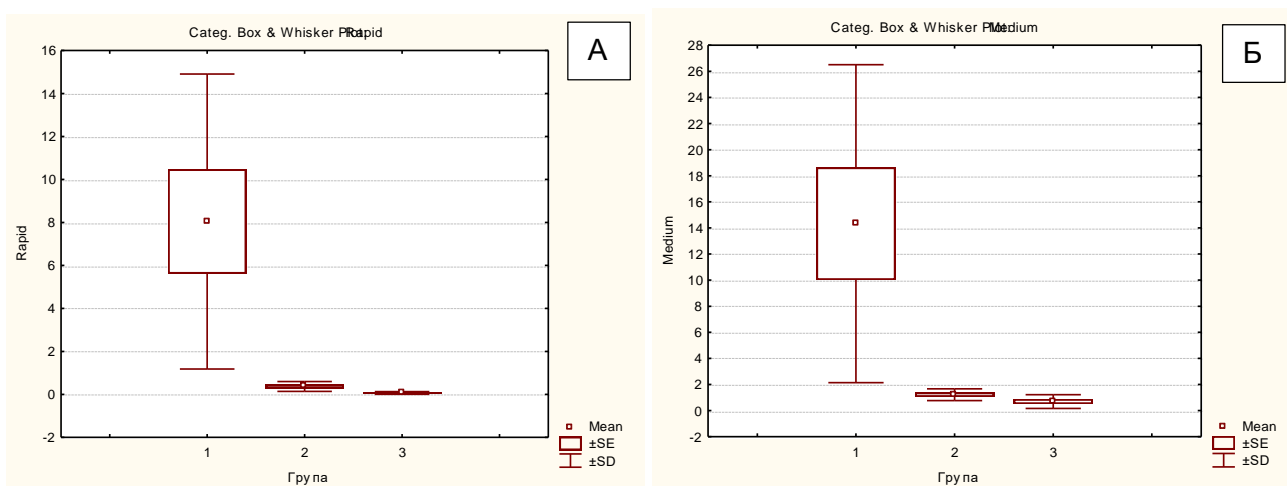


Фигура 14. Сравнителни данни от анализ на непрогресивни /А/ и прогресивни /Б/ сперматозоиди



Фигура 15. Сравнителни данни от анализ на статични сперматозоиди.

Сравнителните анализи за показателите непрогресивни /фиг.14 А/ и прогресивни /фиг. 14 Б/ сперматозоиди, са с достоверно $P < 0.05$ по-висок процент в група 2, спрямо група 3. Също така достоверна разлика в полза на група две спрямо група 3 се наблюдава и при статичните сперматозоиди /фиг.15/. Този резултат идва да покаже, че двустепенното разреждане преди замразяване оказва положително въздействие върху гаметите след криоконсервация. Изводът се потвърждава и от Реѝа and Forsberg (2000), които съобщават, че двустепенното разреждане е условие за по-доброто съхранение на гаметите, подложени на криоконсервация.



Фигура 16. Сравнителни данни от анализ на сперматозоиди с бърза /А/ и средна /Б/ скорост.

На фигура 16 е показано сравнението между сперматозоидите с бърза и средна скорост между сравняваните групи. Значително по-висок и статистически достоверен е броят на бързите сперматозоиди /фиг.18А/ в групата 2 спрямо група 3/ $P < 0.05$ /. Данните по тези показатели имат важно значение, защото са свързани с енергийния потенциал на гаметите. По отношение на показателя сперматозоиди със средна скорост на движение /фиг.18 Б/ между групите 2 и 3 не бе отчетена статистически достоверна разлика.

В подкрепа с получените данни по тази задача, се присъединяват и други автори, които сочат техниката на двустепенното разреждане като значителен фактор за подобряване качеството на спермата на африканското диво куче след размразяване (Van den Berghe et al., 2018). Двустепенното разреждане на спермата с добавянето на глицерин на втора фаза, т.е. непосредствено преди замразяването, намалява токсичния му ефект в значителна степен.

Проблематиката, свързана със самия токсичен ефект на глицерина бе разгледана подробно в литературния обзор. Данните сами по себе си подсказват, че малкото време от стъпката, свързана с доразреждане с разредител II до преместването на пробите в биофризера или течен азот за дълбоко съхранение /не повече от 20 мин./ се оказва достатъчно за проникването на криопротектора в сперматозоидите и осигуряване на криопротективен ефект. В резултат на получените статистически достоверни резултати препоръчваме технологията с двустепенно разреждане на спермалната течност и добавка на глицерин, да се извършва непосредствено преди излагането на пробите на ултраниските температурни диапазони.

Извод;. Може да се каже, че група 2 замразена по метода на двустепенното разреждане превъзхожда по показателите-прогресивни, непрогресивни и бързо движещи се гамети контролата, но не са намерени достоверни разлики в кинематичните параметри VCL, VSL и VAP.

5. Криоконсервация, чрез изпитване ефекта на обема и вида на разфасовките при замразяване.

Изследванията на технологията за криосъхранение на сперма на кучета включва и анализи върху степента на разреждане, базирана на концентрация на сперматозоидите в 1 мл. По този начин лесно може да се изчисли броят на сперматозоидите, който е нужен и позволява приготвянето на дози сперма за изкуствено осеменяване. Освен това, стандартизирана концентрация би позволила на изследователите да определят точната пропорция на разреждане между спермата и разредителя, основана на изходната концентрация на

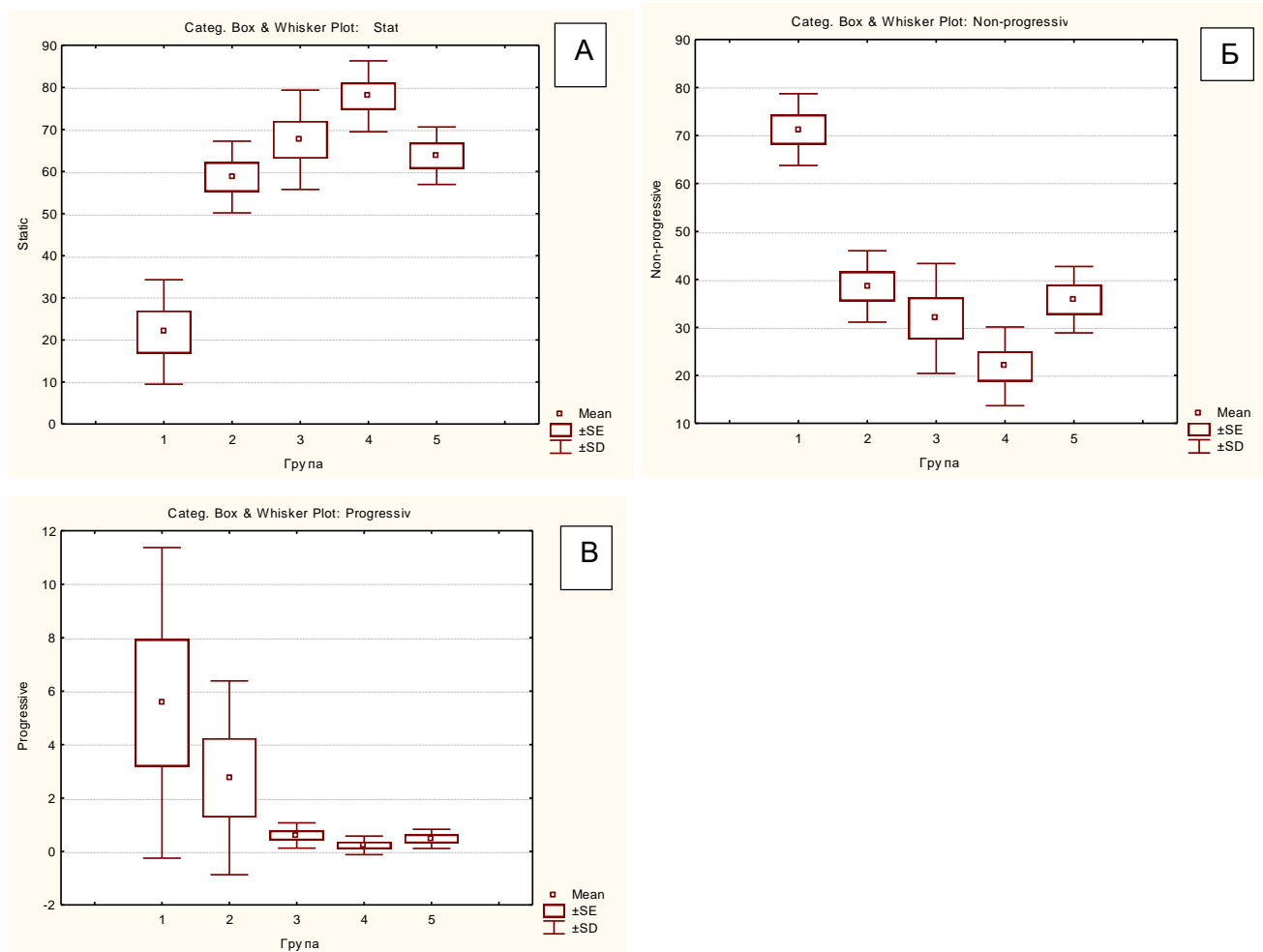
сперматозоидите в 1 мл. Стандартизираната концентрация при криоконсервирана сперма от куче е $100\text{--}200 \times 10^6$ (Silva et al., 2005; Pesch и Hoffmann, 2007; Farstad, 2009).

Благодарение на стандартизираната концентрация лесно се изчислява степента на разреждане с криозащитната среда. Изчислението се прави по формулата $V_1C_1 = V_2C_2$, където V_1 е началният обем на получения еякулат, C_1 е концентрацията на сперматозоидите в него, V_2 е обемът, който трябва да получим след разреждането с криопротективната среда и C_2 е стандартната концентрация. Освен концентрацията на сперматозоидите, други изследователи обръщат внимание на обема и вида на разфасовката. Спермата от кучета основно се замразява, като се използват паетната технология, гранулната или криофиолки. За целта се използват паети с обем от 0.25 и 0.5 мл., гранули с обем от 0.5мл (по Нагазе-Нива) или криофиолки с обем от 0.5мл (R Strzeżek et al 2015). Тези по-малки обеми се криоконсервират с добри параметри, поради по-малката си маса и бързо отделяне на топлина и следователно по-бързо достигат до квантовите температурни режими, минимализирайки криогенните увреждания. От друга страна те не са съвсем удобни, тъй като е необходимо да се размразят по-голям брой замразени дози, за да се извърши изкуственото осеменяване. В случай, че са замразени количества в обем от 0.5 мл. ще са необходими около 4 дози, а в паети от 0.25 мл около 8. Може да се заключи, че криоконсервирането на сперма от куче не е така икономически изгодно, както при другите видове, при които от един еякулат се получават голям брой дози. При кучето от един еякулат се получават една до най-много три осеменителни дози. (Dominik Lechner et al., 2021).

На фигура 17 са показани сравненията между петте групи, касаещи статичните, непрогресивните и прогресивно движещите се сперматозоиди. След статистическия анализ резултатите показаха, че има специфични различия на данните между отделните групи. При статистическата обработка на статичните сперматозоиди (фиг. 19А) между групите 2 и 3 не бе отчетена статистически достоверна разлика $/P > 0,05/$, докато между групите 2, (с обем от 3мл) и 4 (с обем от 6 мл.) бе отчетена статистически достоверна разлика $/P < 0.05/$ в полза на група 2. Между групите 2 и 5 не бе отчетена статистически достоверна разлика $/P > 0.05/$. Също така, между групите 3 и 4: и 3 и 5 не бе отчетена статистически достоверна разлика $/P > 0.05/$. От резултатите може да се направи извод, че високият обем, използван като разфасовка за замразяване от 6 мл. повлиява негативно и при тази група се регистрират най-висок процент статични сперматозоиди.

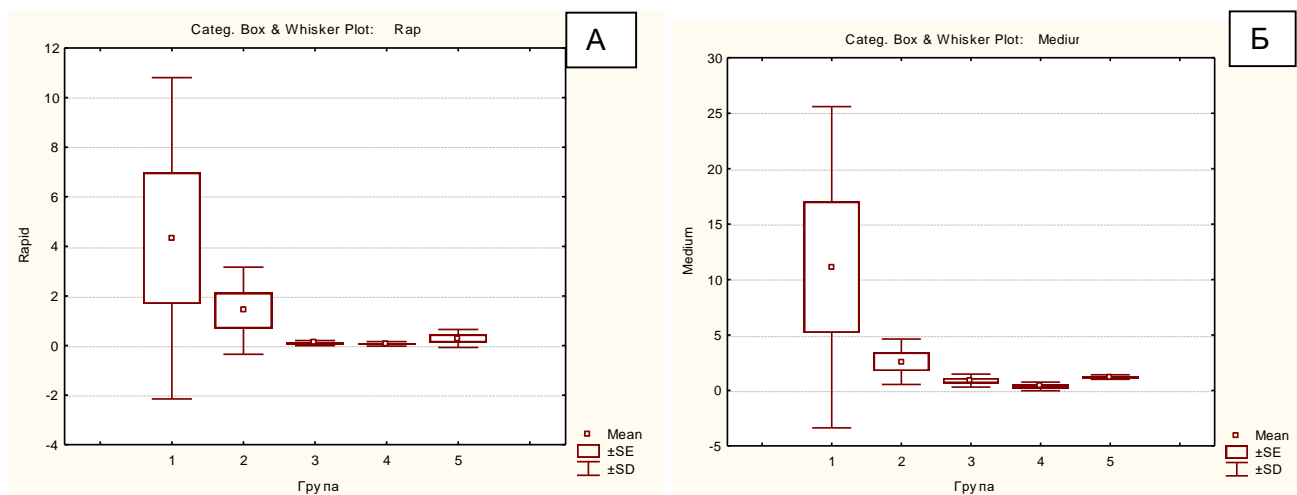
Данните за следващия показател-непрогресивна подвижност са дадени на фиг. 19Б. Между група 2 (3мл) и група 3 (4мл); и между група 2 (3мл) и група 5 (контрола) не бе отчетена статистически достоверна разлика $P > 0.05$. Докато между групите 2 (3мл) и 4 (6мл); и 4 (6мл) и 5 (контрола) бе отчетена статистически достоверна разлика $/P < 0.05/$, където в група 4

показателите са с най -ниска стойност. В същото време, между групите 3 (4мл) и 4 (6мл); и 3 (4мл) и 5 (контрола) не бе отчетена статистически достоверна разлика $P > 0.05$. Отново сперматозоидите от група 4, замразяване в обем от 6 мл, показаха най -ниски стойности и на този показател.



Фигура 17. Сравнителен анализ на статичните /А/, непрогресивни /Б/ и прогресивни /В/ сперматозоиди

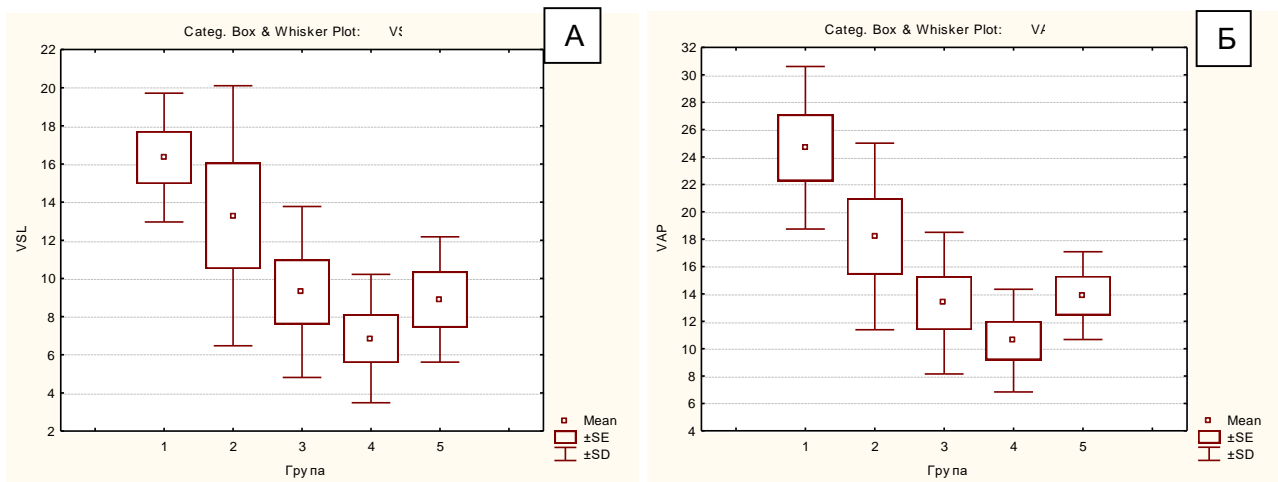
Данните от показател прогресивни сперматозоиди, показани на фиг. 17В, представляват най-засилен интерес за целите на настоящето изследване. Между групите 2 (3мл) и 3 (4мл); и между групите 2 (3мл) и 5 (контрола) не бе отчетена статистически достоверна разлика $P > 0.05$. Докато между групите 2 (3мл) и 4 (6мл)] и 4 (6мл) и 5 (контрола) бе отчетена статистически достоверна разлика $P < 0.05$, където в група 4 сравнителните данни за прогресивни сперматозоидиданните са с най -ниска стойност. В същото време, между групите 3 (4мл) и 4 (6мл); и 3 (4мл) и 5 (контрола) не бе отчетена статистически достоверна разлика $P > 0.05$. Отново сперматозоидите от група 4, замразяване в обем от 6 мл, показаха най- ниски стойности на този показател.



Фигура 18. Сравняване на сперматозоиди с бързо и средно движение в отделните групи

Данните за бързо подвижните сперматозоиди са дадени на фиг.18А. При сравняването им между пробите, замразявани в различни обеми се доказва, че между групите 2 и 3; група 2 и 4; група 2 и 5 бе отчетена статистически достоверна разлика $P < 0.05$ в полза на втора група. Докато между групите 3 и 4; 3 и 5; 4 и 5 не бе отчетена статистически достоверна разлика $P > 0.05$. Резултатите от анализа показват, че замразяването в обем от 3 мл. позволява достоверно по-добре да се съхранят сперматозоидите с бързо движение в сравнение с контролната група. По отношение на сперматозоидите със средна скорост (фиг.18 Б) бе отчетена статистически достоверна разлика между групите 2 (3мл) и 3 (4мл); 2 (3мл) и 4 (6мл); и 2 и 5. Като група 2 демонстрира отново най-добро запазване и на сперматозоидите със средна скорост след процеса на замразяване.

Получените данни от кинетичните параметри VSL и VAP, показани на фигура фиг. 21 сочат, че между тестовите групи не бе открита статистически достоверна разлика. Този показател е засегнат единствено от процеса на замразяване като група 1 и групите 2, 3, 4 и 5 имат отчетена достоверна разлика / $P < 0.05$ / и за двата скоростни показателя в полза на група 1.



Фигура 19. Сравнителен анализ на кинетичен параметър VSL и VAP в отделните групи.

В заключение на проведените изследвания по задача 5 може да се каже, че сравнителният CASA анализ върху биологичните параметри на свежи и криоконсервирани в различни обеми еякулати от кучета отчита специфични различия, с достоверност на разликите между отделните групи. Криоконсервацията снижава достоверно процента на прогресивно подвижните и бързо подвижни сперматозоиди и повишава процента на статичните сперматозоиди. При криоконсервация в обем от 3 мл. се постига достоверно по-добра протекция на сперматозоидите, чрез запазване на основните биологични и кинематични параметри, в сравнение с останалите изследвани обеми (4мл, 6 мл, и 0.6мл.).

Проблематиката, свързана със замразяването на спермална течност от куче в големи обеми идва от по-голямото количество топлина (Q), която трябва да се отдаде от системата. Тъй като по-големият обем биологична течност притежава по-голяма маса и следователно количеството ѝ топлина, което трябва да се отдаде е по-голямо. Следователно по-голямото количество топлина би следвало да се отдели за по-дълго време. По-дългото време на отделянето на количеството топлина би удължило процеса на криоконсервация и достигането на квантовите температурни режими. Но така гаметите биха преминали по-бавно през опасните зони на кристализация и рекристализация и криогенните увреждания ще са в много по-значителна степен. Имайки предвид тези теоритични познания, единственият начин количеството топлина да се отдаде за по-кратко време и да се достигне по-бързо до квантовите температурни диапазони, е да се увеличи площта, през която се осъществява топлообмена. Именно такъв ефект бе постигнат в тази експериментална част от дисертацията, а именно чрез промяната на разфасовката. Голямата епруветка от 15 мл, в която се поставя пробата от 3 мл, поставена

в хоризонтално положение, води до значително увеличаване на площта. Това е така, тъй като сместа от спермална течност плюс криопротективна среда е флуид, който няма собствена форма, а заема формата на съда, в който се поставя и доказахме, че се охлажда по- бързо отколкото контролата.

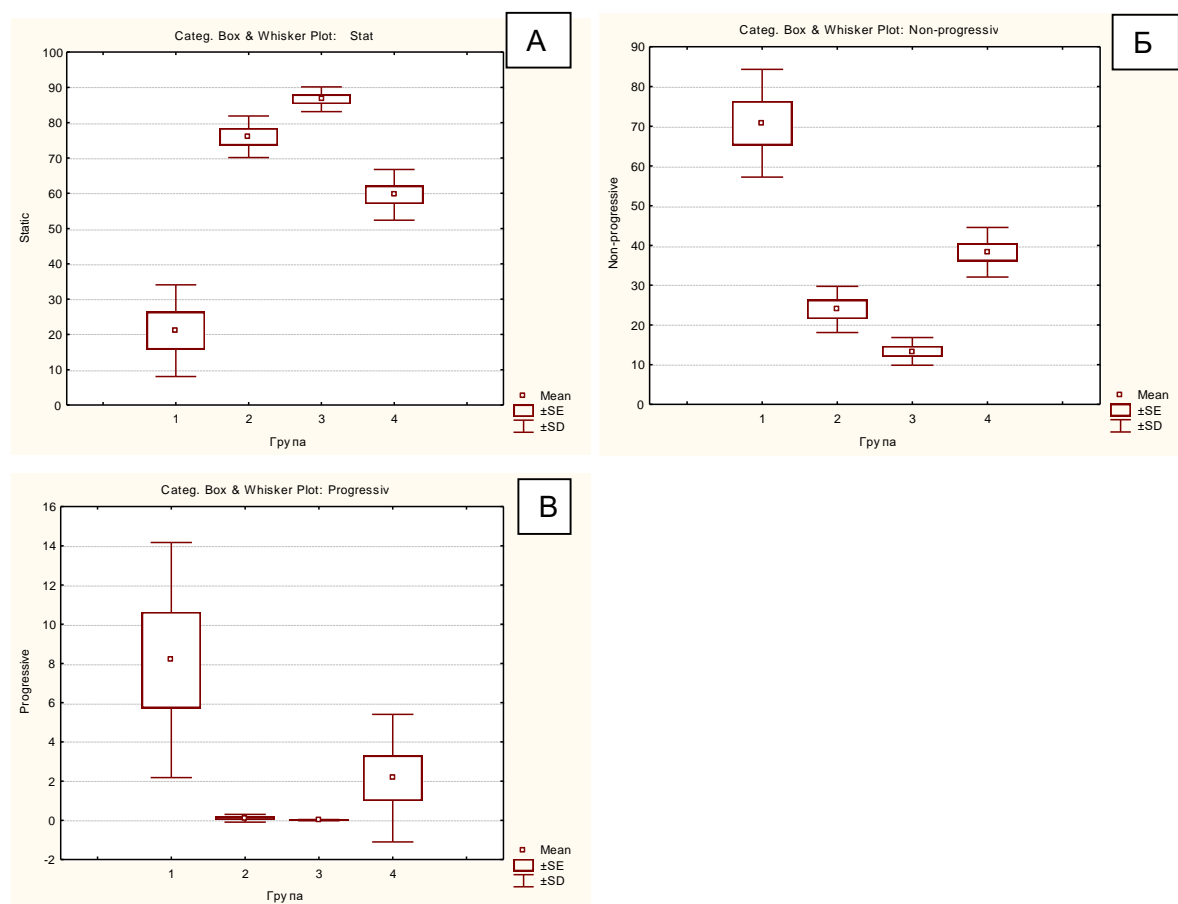
ОЖбобщено, замразяването на спермална течност от куче в по-голеви обеми от 3 мл е възможно като замразените дози в този обем превъзхождат контролите, замразени в обем от 0.6мл, по отношение на показателите свързани с бързо движещите се сперматозоиди и сперматозоидите със средна скорост на движение.

6. Изследване на режима на размразяване и биологична роля върху морфологията и функционалната активност на сперматозоидите.

Един от важните фактори, заемащ основно място в цялостната технология за криоконсервация на сперматозоиди от кучета е подбора на правилен температурен режим на размразяване, съобразно разреждателите, степента на разреждане и обема, и технологията на замразяване. Оптимизирането на процесите на замразяване и размразяване на спермата на кучетата ще позволят да се постигне добър оплодителен потенциал на сперматозоидите след ИО, както и получаването на максимален брой инсеминационни дози от един еякулат. Има изследвания на автори върху ефекта на замразяване в паети-френски сламки (0,25- и 0,5-мл.), две скорости на замразяване (паети, поставени на 3,5 и 8 см над течния азот) и две скорости на размразяване (във вода при 37 и 70 градуса), (Nöthling and Shuttleworth, 2005). Авторите доказват, че нито скоростта на замразяване, нито скоростта на размразяване не повлияват на подвижността на петата минута след размразяването ($P > 0,05$), но процентът на прогресивно подвижни сперматозоиди, 60 минути след размразяването, е бил по -висок за гаметите, размразена при 70 °C в сравнение с 37°C ($P < 0.06$, $n = 64$). Друго важно заключение е, че скоростта на замразяване зависи и взаимодейства със скоростта на размразяване ($P < 0,05$).

Прави впечатление, че технологията на размразяване се отразява във висока степен на биологичните параметри на сперматозоидите. Очевидна е разликата между група 1 и групите 2, 3 и 4, като е отчетена достоверна разлика / $P < 0.05$ / в полза на група 1 във всички таблици и за всички изследвани показатели. - параметри преди замразяването. За нас интересни са сравнителните данни между трите изследвани режима на размразяване. Данните от проведения сравнителен CASA анализ на статични, непрогресивни и прогресивни сперматозоиди по групи са представени на Фигура 20. По отношение на статичните сперматозоиди (фиг.20 А), след размразяване, бе установено достоверно отклонение между сравняваните групи. Между група 4 и 3, група 4 и 2 бе отчетена

статистически достоверна разлика $P < 0.05$. Между групите 3 и 4 не бе отчетена статистически достоверна разлика. $P > 0,05$.

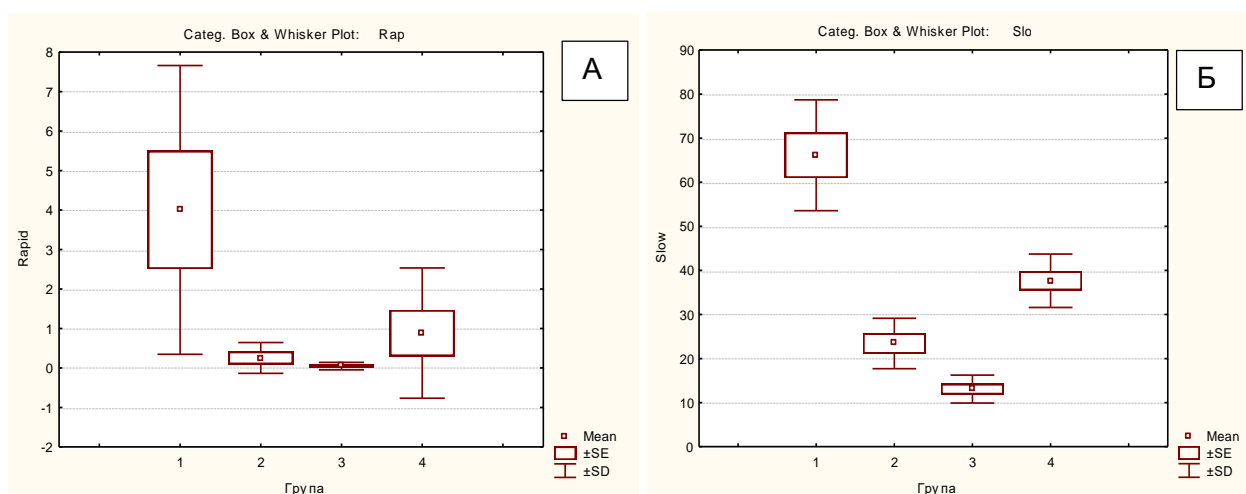


Фигура 20. Сравнителен анализ на статични, непрогресивни и прогресивни сперматозоиди

По отношение на непрогресивните сперматозоиди, резултатите от които са изобразени на фигура 20 Б, се установи статистически достоверна разлика между групите 4 сравнена с 3, група 4 сравнена с 2. $P < 0.05$. Между групите 2 и 3 не бе отчетена статистически достоверна разлика $P > 0,05$. За показателя прогресивно движещи се сперматозоиди /фиг.22В/ бе отчетена статистически достоверна разлика $P < 0.05$ между групите 4 сравнена с 3, група 4 сравнена с 2. Като между групите 2 и 3 отново не бе отчетена статистически достоверна разлика. $P > 0,05$. На този етап може да се направи заключение, че пробите размразени при температурен режим от $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ имат статистически достоверно по-малък процент статични гамети и по-голям процент сперматозоиди с прогресивно и непрогресивно движение.

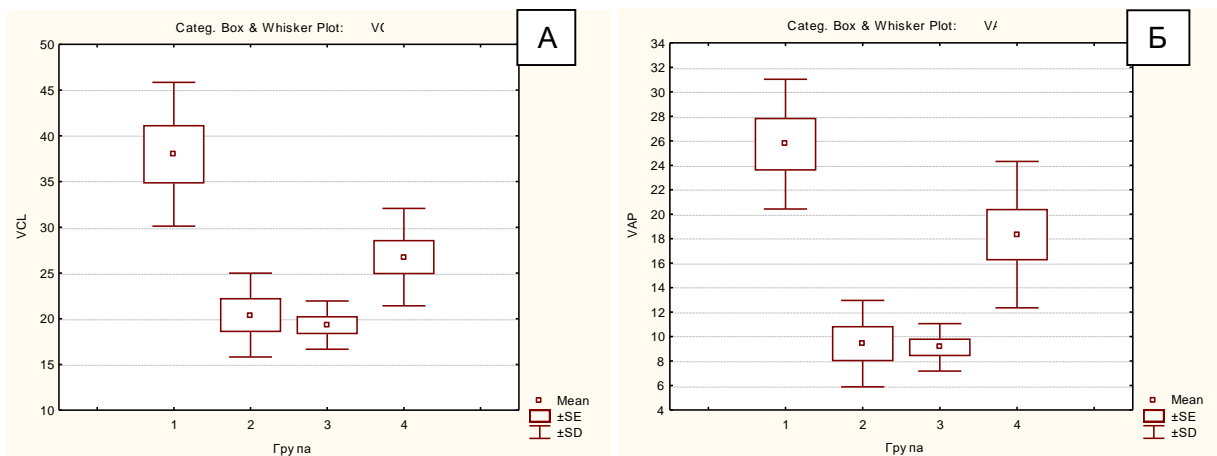
Един от важните фактори, определящи биологичния потенциал на сперматозоидите е скоростта на движение на сперматозоидите. Известно е, че процесът на замразяване –

размразяване въздейства на начина на движение на сперматозоидите, отчитайки достоверна разлика в полза на група 1 при сравнението ѝ с групите 2, 3 и 4 / $P < 0.05$ /, отразено на фиг. 20. При сперматозоидите с бързи движения сравнителният анализ, изобразен на фиг. 21А, бе отчетена статистически достоверна разлика между групите 4 и 3, така и между жгрупите 4 и 2 / $P < 0,05$ /. Между групите 2 и 3 не бе отчетена статистически достоверна разлика / $P > 0,05$ /. При изследваните режими достоверно най-висок процент бавно подвижни (фиг. 20 Б) сперматозоиди се демонстрира при група 4. Като се откриват достоверни статистически различия с група 3 и група 2 / $P < 0,05$ /. Този резултат на по-висок процент бавни сперматозоиди в група 4 се обяснява с предположението, че групата на бавно подвижни сперматозоиди има популации клетки, които са живи, със съхранен енергиен потенциал и вероятно са в състояние на температурна анабиоза и биха могли да се възстановят в подходящи условия след размразяване. Статистически достоверни разлики между групи 2 и 3 не бяха открити / $P > 0,05$ />.



Фигура 21. Сравняване на скоростта на движение на сперматозоидите – бързоподвижни /А/ и бавноподвижни /Б/

Данните от кинетичните параметри са показани на фигура 22. VCL и VAP са в най-висока степен съхранен в група 1 в сравнение с всички останали групи / $P < 0,05$ /. При сравняване на данните между 3-те технологични режима не бе отчетена статистически достоверна разлика между тях. Различните температурни режими на размразяване не повлияха достоверно параметрите VCL и VAP / $P > 0,05$ />.



Фиг. 24 Сравняване на кинетичен параметър VAP и VCL в отделните групи

В заключение от получените данни по настоящата задача и от направените CASA анализи ясно се очертава, че при сравняване на трите опитни протокола, оптималният режим за размразяване на замразени в криофиолки сперматозоиди е 65°C , който резултат е в съгласие с други автори, работещи с кучешка сперма (Nöthling and Shuttleworth, 2005; Bencharif and Dordas-Perpinya, 2020; Ligocka et al., 2023).

Търсенето на методи за подобряване на криоконсервацията на кучешки сперматозоиди доведе до алтернативни подходи към подобряване на качеството на гаметите след замразяване-размразяване като етапи от биотехнологията криоконсервация.

Обобщено, размразяването на замразени гамети от куче при температурен режим от 65°C достоверно запазва в по-висока степен процента на прогресивно, непрогресивно подвижните сперматозоиди и понихава процента на статичните. Също така статистически достоверно е по-голям броят на бързо движещите се гамети.

V. ИЗВОДИ

1. В резултат на сравнителен HPLC анализ на семиналноплазмени белтъци при еякулатите с добри спермални параметри и такива с влошени се установи наличието на 4 основни пика. Основното различие в профилите е наличието на белтъчни молекули с по-висока молекулна маса в спермалната плазма на еякулатите със задоволителни характеристики. В резултат на електрофоретично изследване на електрофореза тези белтъци бяха визуализирани и се установиха високомолекулни белтъци с маса над 65 kDa. При еякулати с лошо качество се наблюдава ниска интензивност на визуализация на първия пик, т.е. намалява активността на високомолекулните протеини с тегло между 65 kDa и 216 kDa.
2. Криоконсервацията не оказва негативно влияние върху активността на трите ензима /АФ, креатинкиназа и ЛДХ / в семенната плазма.
3. Установи се, че е по-подходящо криоконсервацията на сперма от куче да се извършва без сепариране на спермалната плазма.
4. Добавянето на витамин Е - 1 mg/ml среда, холекалциферол – 2000 UI/ml среда и витамин А – 1500 UI/ml среда запазва биологичните характеристики на семенната течност от куче след криоконсервация.
5. Замразяване с технология за двустепенно разреждане в известна степен води до подобряване на CASA параметрите. Установи се, че добавянето на глицерин преди криоконсервацията /не повече от 20 минути/ е достатъчно време за изравняване на разреждателя.
6. Замразяването на големи обеми от 3 мл е възможно без да се предизвиква настъпване на криогенни увреждания над мъжките гамети.
7. Най-подходящ режим за размразяване на сперма от куче, замразена в обем от 0.6мл в криофиолки от 2 мл е температура от 65°C до изчезване на твърдата фаза и увеличаване на температурата на водната баня на 40°C за 3 до 5 минути.

VI. ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ С НАУЧНО–ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР

Приноси с научен характер:

1. Установена беше статистически повишен процент подвижност след двуетапна техника на разреждане. Удължителите с тази техника на разреждане могат да поддържат подвижност над 30%. Поради това се препоръчва на практиката да се използват техники за разреждане в две стъпки за производството на замразени семенни дози от кучета.
2. За първи път при кучето се съобщава за резултат, по отношение на взаимовръзката на качество на гаметите към съдържание на ензима креатинкиназа.

Практически приноси:

1. В протоколите за криоконсервация, свързана със сепарирането на спермалната плазма, няма положителен ефект и ако се извършва, то тя трябва да бъде с режим на центрофугиране от 1000g за една минути.
2. Добавянето на БАВ като комбинацията от витамин Е - 1 mg/ml среда, холекалциферол – 2000 UI/ml среда и витамин А – 1500 UI/ml среда оказва положителен ефект при криоконсервирането.
3. Двустепенното разреждане има позитивен ефект и препоръчваме включването му в протоколите за криоконсервация на спермална течност от куче.
4. Най-подходящ режим за размразяване на спермална течност се установи в обем от 0.6мл при температурен режим от 65°C до изчезване на твърдата фаза и постепенно увеличаване на температурата на водната баня на 40°C за 3 до 5 мин.

VII. ПУБЛИКАЦИИ НА НАУЧНИ РЕЗУЛТАТИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Lazov, K.**, Georgiev, B., Taushanova, P., Gradinarska, D., Ivanova, M.. Comparative analysis of cryopreservation of male gametes with and without seminal plasma from *Canis Lupus Familiaris*. Bulgarian Journal of veterinary medicine, 22, 1, 2019, ISSN:1311-1477, 129-134, /Q3/
2. **Lazov, K.**, Gradinarska, D., Daskalova, D.. Effect of the combined application of vitamins A, D3 and E on the motility of canine spermatozoa during the process of cryopreservation. Proceedings of VIIIth Workshop on Experimental Models and Methods in Biomedical Research, Institute of Experimental Morphology, Pathology and Anthropology with Museum (IEMPAM), 2018, ISSN:1314-9091, 15-20.
3. Daskalova, D., Tsvetkov, T., **Lazov, K.**, Gradinarska, D., Hristova, M., Ivanova, M.. Canine seminal plasma - functions and interaction with capacitation. Journal of BioScience and Biotechnology, SE/Online, Plovdiv university press "Paisii Hilendarski", 2017, ISSN:1314-6238 (Print), 1314-6246 (Online), 19-24.

VIII. ДОКЛАДВАНЕ ПРЕД НАУЧНИ ФОРУМИ НА НАУЧНИ РЕЗУЛТАТИ КЪМ ДИСЕРТАЦИЯТА

1. **Kiril Lazov**, Tsvetan Tsvetkov, Denica Daskalova, Boyko Georgiev, 2017. Постер "Effect of vit. E, A, D3 extender and different volume of vials for cryopreservation on quality of canine spermatozoa". World Biodiscovery Congress, София, /17-19.07.2017 г./.
2. **Кирил Лазов**, Деница Даскалова, 2017. Доклад „Молекулярни промени в сперматозоидите по време на криоконсервация“. Втори докторантски симпозиум "Молекулярна биология-нови хоризонти, ИМБ-БАН, София, /06-07. 04.2017 г./.
3. **Kiril Lazov**, Taushanova P., Georgiev B., Stefanov R., 2018. Постер „Effect of trivitaminol on the motility of canine spermatozoa after cryopreservation“. 15 Internatiponal symposium for immunology of reproduction, Варна, /15-17.06.2018 г./.
4. **Kiril Lazov.**, Georgiev, B., Taushanova, P., Gradinarska, D., Ivanova, M., 2019 Постер „Comparative analysis of cryopreservation of male gametes with and without seminal plasma from *Canis lupus familiaris*“, ВТОРА МЕЖДУНАРОДНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ „ВЕТЕРИНАРНАТА МЕДИЦИНА В ПОЛЗА НА ХОРАТА“, Тр. У-тет, Ст. Загора /18-19.10.2019/.

