



ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО

„Акад. Кирил Братанов“

Цветан Стефанов Цветков

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд

за присъждане на образователна и научна степен „**Доктор**“ по специалност
“Развъждане на селскостопанските животни, биология и биотехника на
размножаването“, шифър 04.02.01

Тема: „Определяне на семинално плазмени протеини, свързани с процеса на
капацитация“

Научен ръководител:

Доц. Деница Даскалова, доктор

Гр. София 2021

Дисертационният труд е написан на 141 страници и включва 34 фигури и 14 таблици. В библиографския списък са цитирани 329 литературни източника.

Научно жури:

Вътрешни членове:

Доц. Теодора Данева, доктор - ИБИР - БАН;

Резервен член:

Доц. Диана Зашева, доктор - ИБИР - БАН

Външни членове:

Проф. д - р Йовка Попова - Земеделски институт, гр. Стара Загора;

Проф. д - р Петя Славова - Земеделски институт, гр. Стара Загора;

Проф. д - р Живко Кръстанов - Земеделски институт, гр. Стара Загора;

Доц. д - р Станимир Йотов, д-р - Тракийски университет

Резервен член:

Доц. д - р Никола Методиев - Институт по животновъдни науки, гр. Костинброд

Защитата на дисертационния труд ще се състои на..... от..... часа.

Материалите по защитата се намират на разположение в библиотеката на ИБИР-БАН, бул. „Цариградско шосе“ 73, София

Забележка: Номерата на фигурите не съответстват на тези в дисертационния труд.

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ:

- СП - семинална плазма
- СПП - семинално плазмени протеини
- ПМ - плазмена мембрана
- ММ - молекулна маса
- АТФ - аденозинтрифосфат
- АР - акрозомна реакция
- ЖРТ - женски репродуктивен тракт
- GPC - Gel Permeation Chromatography
- SDS - PAGE - натриев додецилсулфат полиакриламидна гел - електрофореза
- ПАА - полиакрил амид
- 2D-PAGE - двумерна електрофореза
- ХА - хиперактивация
- ДФ - декапацитиращ/и фактор/и
- SCA - Sperm computer analyzer, спермо-компютърен анализатор
- CASA - Computer assisted semen analysis, компютърно- асистиран спермо анализ
- Ip - изоелектрична точка
- IVF- *in vitro* оплождане
- ХСП - хепарин-свързващите протеини
- ССЖ- селскостопански животни
- ОПН- остеопонтин
- ZnСП- цинк- свързващи протеини
- СОД- супероксид дисмутаза
- КАТ- каталаза
- ГПО- глутатион пероксидаза
- КПАЕ- кучешка простатна аргинин естераза
- ПСА- простат-специфичен антиген
- АФ- алкална фосфатаза
- КФ- кисела фосфатаза
- ЗП- зона пелуцида

- цАМФ- цикличен аденозинмонофосфат
- РАЦ- разтворима аденилил циклаза
- ПКА- протеин киназа А
- ТФ- тирозиново фосфорилиране
- НБК- натриев бикарбонат котранспортер
- АЦ- аденилатциклаза
- ГСА- говежди серумен албумин
- ФРФ- фибробластен растежен фактор
- ИРФ- инсулиноподобен растежен фактор
- ОПН- остеопонтин
- ИПБ- инициращ подвижността белтък
- СПФ- стимулиращ подвижността фактор
- МСП- мотилитет стимулиращ протеин

ВЪВЕДЕНИЕ

Методите за селекция, манипулация и подобряване на оплодителната способност на сперматозоидите е едно от съвременните предизвикателства в репродуктивните биотехнологии при мъжките бозайници. Прилагането на съвременни методи за изкуствено осеменяване (ИО) при домашните и селскостопанските животни (ССЖ), както и в медицинската практика, налага допълнително изучаване на ролята и функцията на семиналната плазма (СП), и по - специално на семинално плазмените протеини (СПП) в нея. Основна цел на животновъдната практика е максималното съхранение на биологичния потенциал на гаметите. За постигането на тази цел се правят опити за подобряване на различните среди за съхранение, криоконсервация, капацицията и др., както и разработването на нови такива, съдържащи субстанции с ефект върху семенната течност. Към този аспект са насочени изследванията върху влиянието и ефекта на някои семинално плазмени фактори върху функционалността на половите клетки, и по специално СПП, които оказват ефект върху капацицията, водят до хиперактивност на сперматозоидите. Други такива белтъчни молекули от СП, оказват декапацитиращ ефект върху върху мъжките гамети. Някои от семинално плазмените протеини са отговорни за функционалността на гаметите и степента на оцеляването им в женския репродуктивен тракт (ЖРТ). Протеини от СП се свързват с повърхността на плазмената мембрана (ПМ) на сперматозоидите по време на еякулация. Тези протеини играят ключова роля в редица процеси, като капацицията, акрозомната реакция и сливането на гаметите по време на оплождането. Други СПП, имат отношение към модулацията на имунния отговор към мъжките гамети при придвижването им през ЖРТ. В семиналната плазма се съдържат и протеини, които имат роля на декапацитиращи фактори (ДФ). В тази насока има много непроучени аспекти, особено що се касае за ролята и влиянието на протеините от СП. Именно това, наложи да се направят опити за установяване на ролята на семинално плазмените протеини върху биологичните параметри на сперматозоидите, водещи до подобряване на хиперактивността и капацицията, както и техният ефект, като декапацитиращи фактори върху сперматозоиди от куче.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е насочена към установяване на ролята на протеини от СП в процеса на капацитация и декапацитация при сперматозоиди от вида *Canis lupus familiaris* (домашно куче). Фокусът на експериментите беше насочен към определяне на СПП, които имат роля в капацитация при *in vitro* условия. В допълнение на тази цел, бяха проведени и експерименти за доказване ефекта на СПП с декапацитиращо действие върху сперматозоидите.

Така поставените цели предполагат решението на следните основни задачи:

Задача 1. Изследване на морфология, тотална концентрация, подвижност и кинетични CASA-параметрите на сперматозоиди от свежи еякулати от вида *Canis lupus familiaris* (домашно куче).

Задача 2. Провеждане на Gel Permeation Chromatography (GPC) на семинална плазма от куче, с цел сепариране на протеини.

2.1. Получаване на семинална плазма.

2.2. Провеждане на хроматографско разделяне на протеините.

2.3. Характеризиране на хроматографски получените протеини след проведената GPC хроматография, чрез SDS-PAGE електрофореза.

Задача 3. Изследване ролята на семинално плазмените протеини върху биологичните параметри на сперматозоиди от куче при условия на *in vitro* индуцирана капацитация.

3.1. Изследване ефекта на семинално плазмените протеини върху мотилитета и скоростта, оказващи влияние върху капацитацията и хиперактивацията на сперматозоиди от куче чрез Sperm Class Analyzer (SCA).

3.2. Изследване ефекта на семинално плазмените протеини върху кинетични CASA параметри, оказващи влияние върху капацитацията и хиперактивацията на сперматозоиди от куче чрез Sperm Class Analyzer (SCA).

3.3. Изследване на декапацитиращия ефект на семинално плазмените протеини върху мотилитета и скоростта на сперматозоиди от куче чрез Sperm Class Analyzer (SCA).

3.4. Изследване на декапацитиращия ефект на семинално плазмените протеини върху кинетичните CASA параметри на сперматозоиди от куче чрез Sperm Class Analyzer (SCA).

Задача 4. 2D - електрофореза (2D-PAGE) на семинално плазмени протеини.

4.1. 2D-PAGE на семинално плазмени протеини с установен ефект върху капацитацията и хупеактивността на сперматозоиди от куче.

4.2. 2D-PAGE на семинално плазмени протеини с установен декапацитиращ ефект върху сперматозоиди от куче.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За изпълнението на задачите по настоящия дисертационен труд беше използвана материалната база и лабораторно оборудване на Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов“ към Българска академия на науките, гр. София. Биологичните материали, необходими за изготвянето на поставените експериментални задачи, бяха предоставени от частни собственици на кучета и получени от ветеринарни лекари от Ветеринарна клиника „Симеоново“- гр. София, както и от „Централна ветеринарна клиника“ – гр. София.

1. Събиране на семенен материал
2. Подготовка на пробите, обработка и първоначална оценка на еякулатите
3. Морфологичен анализ на сперматозоиди
4. Изолиране на семинална плазма
5. Gel Permeation Chromatography (GPC-хроматография) на семинално плазмени протеини
6. Полиакриламидна гел - електрофореза (SDS-PAGE)
7. Спермо - компютърен анализатор (SCA) и компютърно – асистиран спермоанализ (CASA)
8. 2D - електрофореза (2-D PAGE) на семинално плазмени протеини

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Представените резултати в настоящия дисертационен труд условно могат да бъдат разделени на две групи. Първата група обхваща изследвания насочени към охарактеризирането на морфологията, мотилитета, скоростните параметри и кинетичните CASA параметри на свежи еякуланти от вида *Canis lupus familiaris* (домашно куче), както и изолирането на семинална плазма. Втората група включва изследвания с цел охарактеризиране на влиянието, което имат семинално плазмени протеини с ниска и висока ММ по отношение на капацитацията и декапацитацията на сперматозоидите и по- пълното охарактеризиране на високомолекулните и нискомолекулните протеини в СП.

Задача 1. Изследване на морфология, тотална концентрация, подвижност и кинетични CASA-параметрите на сперматозоиди от свежи еякулати от вида *Canis lupus familiaris* (домашно куче).

След получаване, свежите яекулати бяха подложени на CASA-анализ, за определяне на първоначалните CASA параметри на сперматозоидите. На Таблица.1. и Таблица.2. са представени първоначалните данни от анализа на мотилитет, скорост и CASA- кинетични параметри на свежи яекулати.

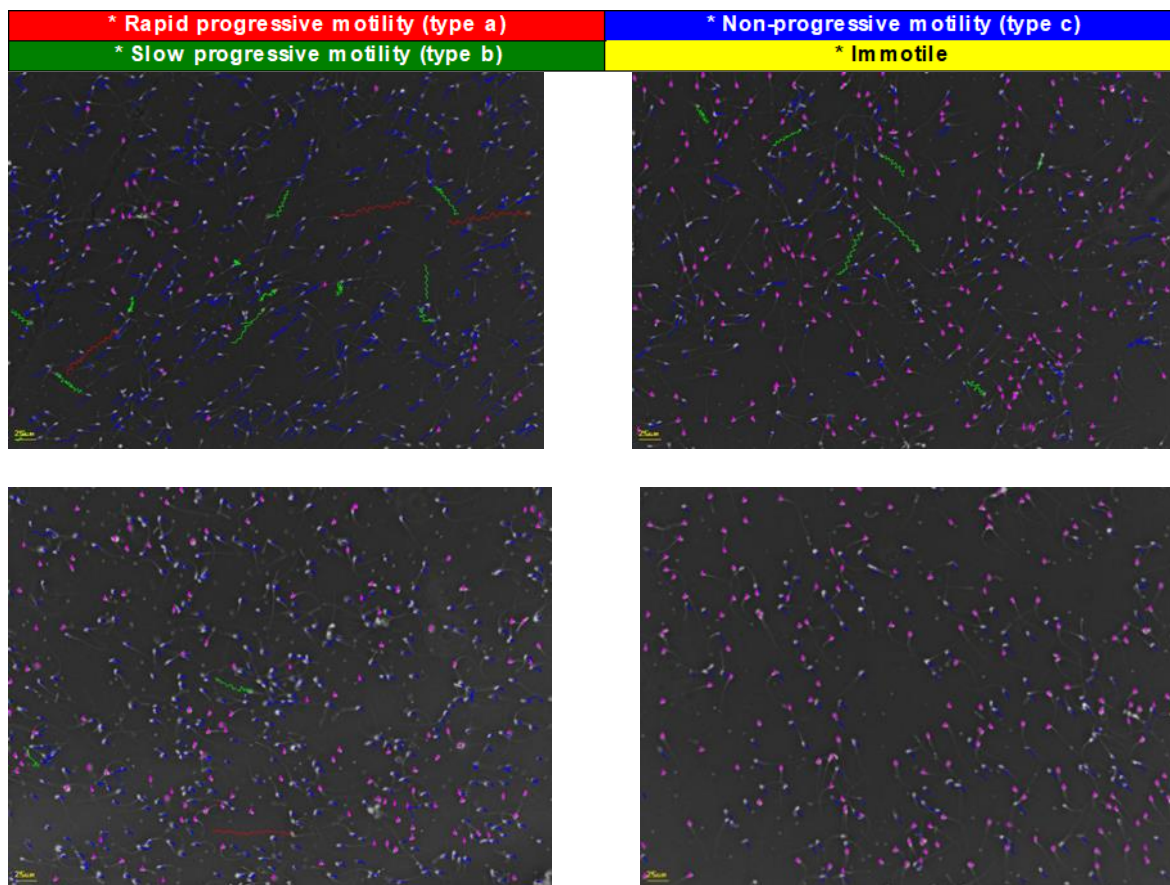
Таблица. 1. Мотилитет и скоростни параметри на свежи еякулати от куче, n=21.

Static %	5.69±1.00
Non progressive %	70.18±2.18
Rapid %	23.13±3.33

Таблица. 2. Кинетични CASA параметри на свежи еякулати от куче, n=21

VCL $\mu\text{m/s}$	70.66±3.5
VSL $\mu\text{m/s}$	33.77±2.11
VAP $\mu\text{m/s}$	43.51±3.18
LIN %	47.13±2.11
STR %	66.69±3.21
WOB %	62.21±3.33
ALH μm	5.26±1.01
BCF Hz	8.18±1.03

За изследванията бяха използвани 21 еякулата от 7 здрави кучета от различни породи, с потвърдена нормозоспермия. Концентрация на сперматозоидите $20\text{-}40 \times 10^6$ кл/мл, рН 6,4-7, подвижност $\leq 70\%$. При проследяване на резултатите, не бяха установени породни различия в показателите от CASA анализа .



Фиг.1. Снимка от CASA анализ на свежи еякулати.

След получаване и първоначален CASA анализ на мотилитет, скорост и кинетични параметри, на всички проби е направен морфологичен анализ на структурните промени в главичката, тялото и опашката на сперматозоидите. Данни от морфологичният анализ на свежи еякулати са представени на Таблица. 3.

Таблица. 3. Морфологичен анализ на свежи сперматозоиди от куче, n=21

	Нормални (%)	Набъбнали акрозоми (%)	Разкъсани акрозоми (%)	Промени в опашка (%)
свежи еякулати	86.01±3.33	7.22±2.67	4.68±1.01	2.09±0.98

Фокусът на морфологичния анализ беше насочен към установяване на настъпили промени, обобщени в следните категории: сперматозоиди с набъбнала, разкъсана/липсваща акрозома и изменения настъпили в опашката на сперматозоидите. Не бяха установени, значителни промени в морфологията на сперматозоидите при различните еякулати.

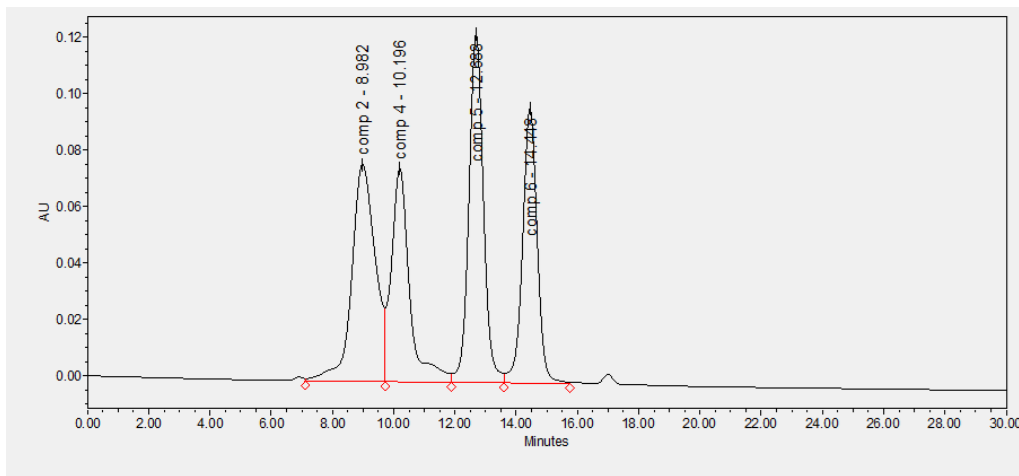
Задача 2. Провеждане на Gel Permeation Chromatography (GPC) на семинална плазма от куче, с цел сепариране на протеини.

2.1. Получаване на семинална плазма.

За провеждането на експериментите по поставената задача бяха получени 21 еякулата от 7 кучета от различна порода. Целта на нашите експерименти беше изолирането на СП от свежи еякулати на кучета с доказана нормозооспермия.

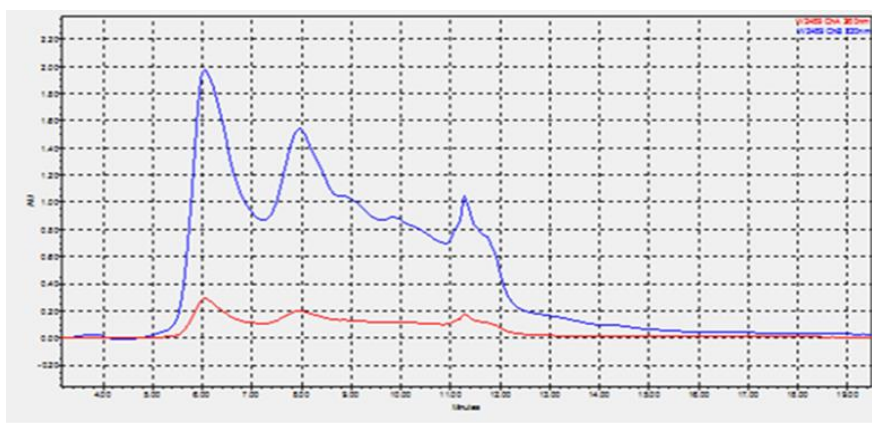
2.2. Провеждане на хроматографско разделяне на протеините.

Използваният от нас метод - Gel Permeation Chromatography (GPC) е също известен като Size Exclusion Chromatography (SEC), който позволява разделянето на протеините на база молекулните им маси. При провеждане на нашите изследвания, за детекцията бяха използвани две дължини на вълната - λ 220nm и λ 280nm. Основание за ползване на двете вълни на разделяне е, че при дължина на вълната λ 280nm интензитетът на поглъщане е много по-малък, което е от полза за някои протеини, в сравнение с дължина на вълната при λ 220nm, при която друга група молекули се визуализират по-добре. Резултатите от еквилибрирането на колоната, преди процедурата за сепариране на СПП от куче са представени на Фиг.2.



Фиг.2. GPC хроматограма на маркер за ММ (Sigma).

Хроматографският анализ беше проведен при скорост на потока от 6 мл/мин. и 1700 psi. Получени бяха 4 добре очертани пика. Съдържанието на всеки пик, като отделна фракция с протеини (Фиг.3.).



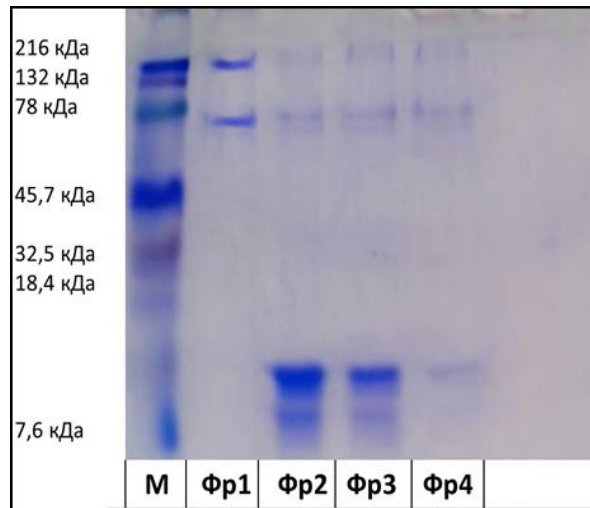
Фиг. 3. Хроматограми на спермална плазма от кучета. Детекцията е проведена при две дължини на вълната - λ 220 nm (синьо) и λ 280 nm (червено).

От анализа на данните се вижда, че първоначално (между 5 до 7 мин) се отделят протеини с висока молекулна маса, над 200кДа, които сформират първи пик или фракция 1 (фр.1). Последващите пикове са сформирани в следните минути:

- Втори пик: от 7.10 до 8.80 мин. - фракция 2 (фр.2)
- Трети пик: от 9.00 до 11.0 мин. - фракция 3 (фр.3)
- Четвърти пик: от 11.10 до 13.00 мин. – фракция4 (фр.4)

2.3. Характеризиране на хроматографски получените протеини след проведената GPC хроматография, чрез SDS-PAGE електрофореза.

Всички хроматографски получени фракции бяха допълнително охарактеризирани помощта на 15% SDS-PAGE електрофореза. За визуализация беше използвано оцветяване Coomassie Brilliant Blue и маркер за молекулно тегло Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standard (BioRad®). След изпълнението на задачата, чрез Gel permeation хроматография са получени 4 фракции, в които се съдържат протеини с ММ вариращи от 4 кДа до над 200 кДа. Беше установено, че ММ на СПП, съдържащи се в четирите получени фракции, варира между 3-4 кДа и над 200 кДа. Съответно, фракция 1 съдържа СПП с висока ММ от 70 кДа до 78 кДа и повече от 200 кДа. Фракция 2 демонстрира протеини с ниска ММ (7,6 кДа и 10-12 кДа) и ниско съдържание на протеини с висока ММ (78 кДа). Фракция 3 също така показва протеини с ниска ММ (7,6 кДа и 12 кДа), а фракция 4 съдържа протеин с най-ниска ММ (3-4 кДа и 6 кДа) (Фиг.4.).



Фиг. 4. 15% SDS-PAGE на СПП фракции (1, 2, 3 и 4) след GPC.

Задача 3. Изследване ролята на семинално плазмените протеини върху биологичните параметри на сперматозоиди от куче при условия на *in vitro* индуцирана капацитация

3.1. Изследване ефекта на семинално плазмените протеини върху мотилитета и скоростта, оказващи влияние върху капацитацията и хиперактивацията на сперматозоиди от куче чрез Sperm Class Analyzer (SCA).

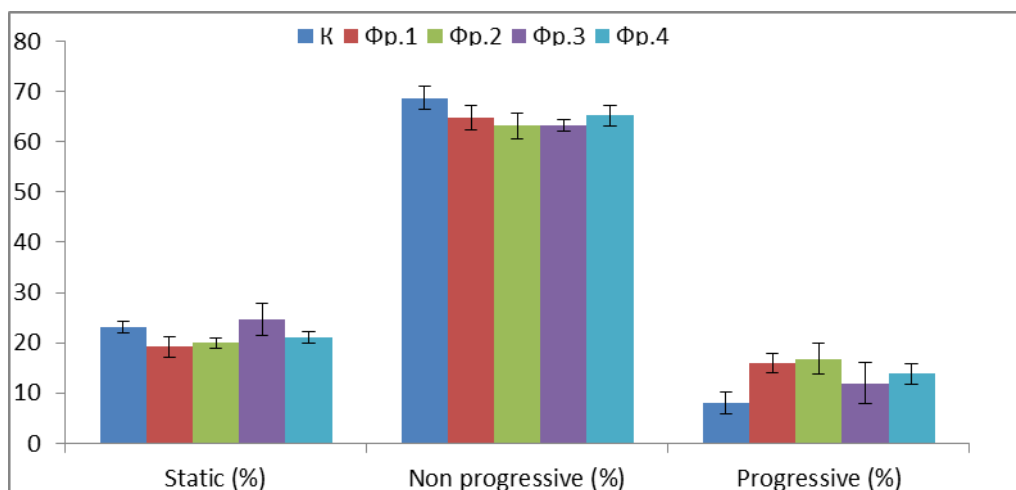
Хиперактивираната подвижност на сперматозоидите е съпътстваща процеса на капацитация, тъй като и двата процеса се проявяват в женския репродуктивен тракт *in vivo* и в капацитираща условия *in vitro*. СП е основен ключов модулатор на подвижността при сперматозоидите (Baas et al. 1983; Graham 1994; Bernardini et al. 2011). Характерният за сперматозоидите модел на движение, известен като хиперактивация, показва висока амплитуда на биене на опашката (Yanagimachi, 1970; Kay and Robertson 1998). Това движение е охарактеризирано след инкубиране на сперматозоиди от различни видове животни в капацитиращи условия (Mortimer and Maxwell 1999; Marquez and Suarez 2007; McPartlin et al. 2008; Suarez 2008; Goodson et al. 2011). Въпреки, че капацитацията и хиперактивацията могат да бъдат съпътстващи процеси те може да не са непременно взаимозависими (Fraser 1977; Suarez et al., 1987; Ramio' et al., 2008; Cola's et al., 2010; Goodson et al., 2011; Garcí'a-A' lvarez et al. 2014). Следователно, оценка на ефектите на СПП върху подвижността на

сперматозоидите по време на *in vitro* индуцирана капацитация при кучета може да допринесе за по-нататъшното разбиране на ефекта на СПП и връзката между хиперактивацията и последващата капацитацията при мъжките гамети. В изпълнение на поставената задача, беше наблюдаван ефекта на сепарирани СПП върху сперматозоиди от куче, с цел да се установи промяна на мотилитет и скорост на сперматозоиди от куче, които могат да послужат като белег за протичащи капацитационни изменения. За целта беше използван Компютърен спермоанализатор (SCA) и Компютърно асистиран семенен анализ (CASA). При изпълнение на експеримента бяха получени 21 еякулата от 7 кучета, с регистрирана нормозооспермия и концентрация ($200-400 \times 10^6$ кл/мл). Като контрола (К) бяха използвани еякулати с цяла СП. При останалите проби СП беше отстранена, и получение аликвоти бяха инкубирани съответно с четирите хроматографски СПП фракции (фракции 1, 2, 3 и 4). Резултатите от проведените експерименти са представени на Таблица.4. и Фиг.5.

Таблица. 4. Мотилитет и скоростни параметри на проби инкубирани с СПП, на 1^{-ви} час, n=21.

	К	Фр.1	Фр.2	Фр.3	Фр.4
Static (%)	23,18±1.09	19.99± 2.14	19.99±1.08	24.66±3.13	20.99±1.15
Non progressive (%)	68.73 ±2.25	64.87 ± 2.45	66.19 ± 2.62	63.35 ±1.12	65.22 ±2.11
Progressive (%)	8.09 ±2.22 ^a	15.14 ±1.81 ^c	13.82± 3.01 ^b	11.99±4.09 ^b	13.79±2.10 ^b

± съществена разлика между а и б р <0,05 и а и с р <0,001; n = 21



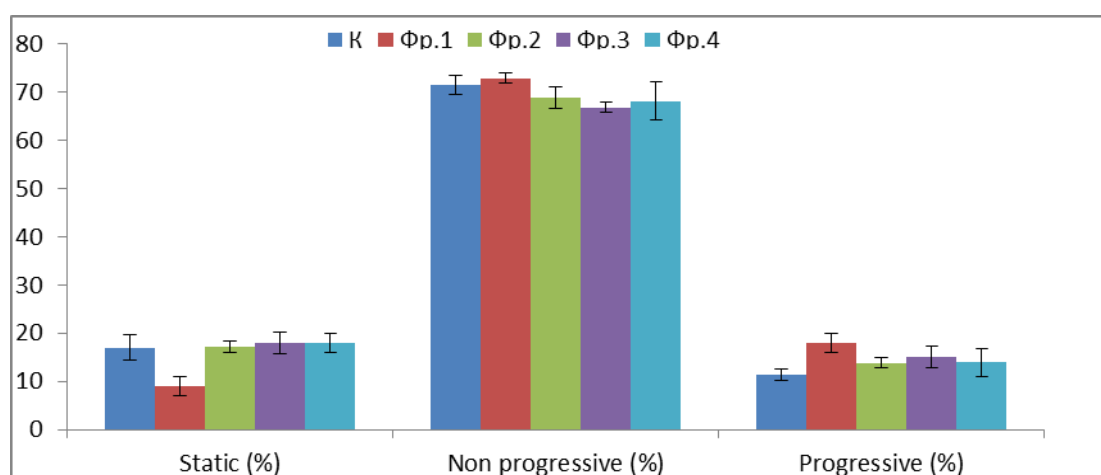
Фиг. 5. Промени в мотилитет и скоростни параметри на проби инкубирани с СПП, на 1^{-ви} час, n=21

При отчитането на резултатите след $1^{-\text{ви}}$ час, К показва наличието на 23.18 ± 1.09 статични сперматозоиди при почти приблизителни резултати за другите проби с Фр. 1 (19.99 ± 2.14) и Фр.2 (19.96 ± 1.08). Пробите инкубирани с СПП съдържащи протеини от фр. 3 и фр. 4 показаха по-висок процент статични сперматозоиди (24.66 ± 3.13 и 20.99 ± 1.15). По отношение на непрогресивността резултатите бяха най-високи при К (68.73 ± 2.25), докато при пробите инкубирани с протеините от фр. 1 и фр.2 съответно (64.87 ± 2.45 и 66.19 ± 2.62). Процентът непрогресивни сперматозоиди при инкубираните с фр. 3 и фр. 4 проби показва следните стойности (63.35 ± 1.12 и 65.22 ± 2.11). Процента на прогресивни сперматозоиди при К беше 8.09 ± 2.22 , след първия час от инкубацията, а при пробите с фр. 1, се установи статистически значимо увеличаване на тези сперматозоиди, в сравнение с останалите проби. След $1^{-\text{ви}}$ час на инкубация най - значими изменения по отношение проследяваните параметри, а именно непрогресивни сперматозоиди бяха отчетени при контролата и при пробите инкубирани със СПП съдържащи се във фр. 1. По отношение на процента прогресивно подвижни гамети най – статистически значимо увеличение бе наблюдавано при пробите инкубирани с протеини от фракция 1. Бе установено статистически значимо намаляване на процента статични сперматозоиди в К (17.03 ± 2.6) и пробите с фр. 1 (10.01 ± 1.88), спрямо първоначалните им показатели и след инкубацията на $2^{-\text{ри}}$ час със СПП. При останалите проби инкубирани с протеини съдържащи се във фр. 2, 3 и 4 също беше наблюдавано понижаване на процента статични сперматозоиди, но не бяха установени статистически значими различия (фр.2- 15.18 ± 1.06 ; фр.3- 17.99 ± 2.18 и фр.4- 17.88 ± 2.01). Процентът на непрогресивни сперматозоиди показва статистически значимо увеличение след $2^{-\text{ри}}$ час на инкубация, като значимо повишаване се наблюдава при пробите инкубирани с фр.1 (72.99 ± 1.06). При К проба и проби с фр. 3 и фр. 4 наблюдавахме незначително повишаване на процента непрогресивни сперматозоиди (К - 71.64 ± 1.99 ; фр.3- 65.89 ± 1.11 и фр.4 67.21 ± 3.88). От анализът на данните, се установи, че процента на прогресивни сперматозоиди на $2^{-\text{ри}}$ час се увеличава в при К проби и тези инкубирани с фр.3. Резултатите от инкубирането на пробите на $2^{-\text{ри}}$ час са представени на Таблица.5. и Фиг. 6.

Таблица. 5. Мотилитет и скоростни параметри на проби инкубирани с СПП, на 2^{ри} час, n=21.

	К	Фр.1	Фр.2	Фр.3	Фр.4
Static (%)	17.03±2.60 ^a	10.01± 1.88 ^b	15.18 ± 1.06	17.99± 2.18	17.88 ± 2.01
Non progressive (%)	71.64 ±1.99	72.99 ± 1.06 ^a	63.61 ± 2.18 ^b	65.89 ± 1.11	67.21 ± 3.88
Progressive (%)	11.33±1.11	17.00 ± 2.00 ^a	21.21 ± 1.09 ^b	16.12 ± 2,22	14.90 ± 2.99

± съществена разлика между а и б р <0,05 и а и с р <0,001; n = 21



Фиг. 6. Промени в мотилитет и скоростни параметри на проби инкубирани с СПП, на 2^{ри} час, n=21

3.2. Изследване ефекта на семинално плазмените протеини върху кинетични CASA параметри, оказващи влияние върху капацитацията и хиперактивацията на сперматозоиди от куче чрез Sperm Class Analyzer (SCA).

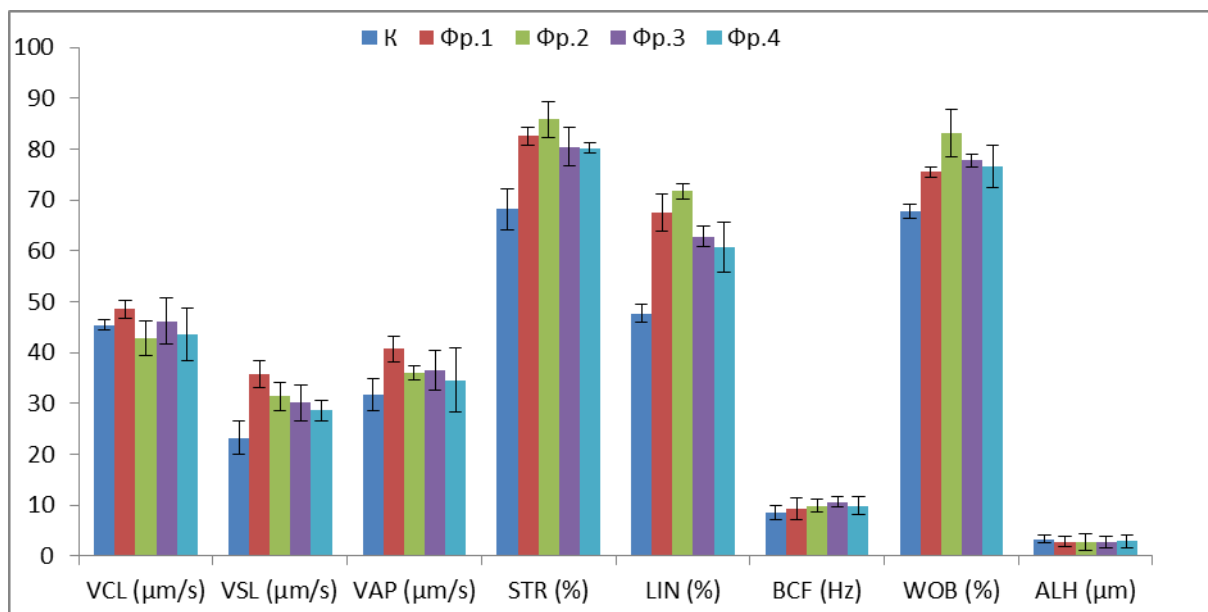
Хиперактивацията (ХА) е модел на движение, наблюдаван при сперматозоидите непосредствено преди оплождането. Тя е критичен момент за успеха на оплождането, защото подобрява способността на мъжките гамети да се прикрепят към стената на яйцепровода, да се придвижат в лумена и да се прикрепят към в зоната пелуцида на ооцита. SCA- методът улеснява детекцията на протичаща ХА. Значително увеличение на някои CASA- кинетични параметри, като VCL, WOB, BCF и ALH и намаляването на LIN и STR обикновено биват разглеждани, като индикация за хиперактивация според скорошни изследвания на редица автори (SchaferSomi and Aurich 2007; Verstegen et al. 2002). За поставената задача в дисертационния труд беше проследен ефектът на СПП от кучешка СП, свързани с промени кинетичните CASA параметри VCL, ALH и LIN (Cancel, 2000). За изпълнението на задачата,

21 еякулата бяха инкубирани с GPC- фракции на 37⁰C, съдържащи протеини с различна ММ, за период от два часа, като измененията в кинетичните параметри бяха отчетени на 1^{-ви} и 2^{-ри} час след инкубирането. След 1^{-ви} час на инкубацията следните изменения в показателите VCL, ALH и LIN в (µm/s), бяха отчетени. Данните от стойностите на кинетичните CASA- параметри са представени на Таблица.6. и Фиг. 7. При К стойностите на VCL бяха 45,35±1.02, а при пробите с Фр.2, 3 и 4 както следва: 42.87±3,34; 46.17±4,57 и 43.53±5,24. Най-съществено увеличение по отношение на параметъра VCL беше наблюдавано в пробара съдържаща протини от Фр.1 (48.5± 1,8). Проследени бяха и промени в стойностите на параметъра за LIN на 1^{-ви} час от инкубацията. Най- ниски стойности по този параметър бяха отчетени при К (47.68±1.79^a), а най- високи стойности бяха отчетени при пробите с Фр.1 и Фр.2 (67.5±3.73; 71.73±1.5), спрямо първоначалните показатели и спрямо другите проби. При пробите с Фр.3 и 4 отчетените стойности бяха съответно: 62.84±1.96 и 60.74±4.97. По отношение на параметъра ALH, най- високи стойности бяха наблюдавани при контролата- 3.29±0.70, докато стойностите му при пробите с Фр. 1, 2, 3 и 4 бяха приблизително еднакви (2.8±1.01; 2.73±1.63; 2.87±1.32). Данните от проведеното инкубиране на пробите на 1^{-ви} час и измененията в кинетичните CASA-параметри са представени на Таблица.6. и Фиг.7.

Таблица.6. Промени в CASA-кинетичните параметрите на сперматозоиди от куче на 1^{-ви} час след инкубация с фракции на СПП, след GPC-хроматография.

	К	Фр.1	Фр.2	Фр.3	Фр.4
VCL (µm/s)	45,35±1.02	48.5± 1,8	42.87±3,34	46.17±4,57	43.53±5,24
VSL (µm/s)	23.26±3,27 ^a	35.68±2,67 ^b	31.41±2,78	30.09±3,42	28.57±1,93
VAP (µm/s)	31.68±3.12	40.72±2,51	36.02±1,39	36.5±3.97	34.6±6.4
STR(%)	68.19±4.13 ^a	82.58±1.7 ^b	85.86±3.55 ^b	80.45±3.8	80.2±1.05
LIN (%)	47.68±1.79 ^a	67.5±3.73 ^c	71.73±1.5 ^c	62.84±1.96 ^c	60.74±4.97
BCF (Hz)	8.54±1.42	9.25±2.11	9.85±1.32	10.56±1.00	9.89±1.69
WOB (%)	67.7±1.41	75.52±1.09	83.14±4.6	77.83±1.26	76.6±4.07
ALH (µm)	3.29±0.70	2.8±1.01	2.73±1.63	2.72±1.06	2.87±1.32

± съществена разлика между а и b p <0,05 и а и с p <0,001; n = 21



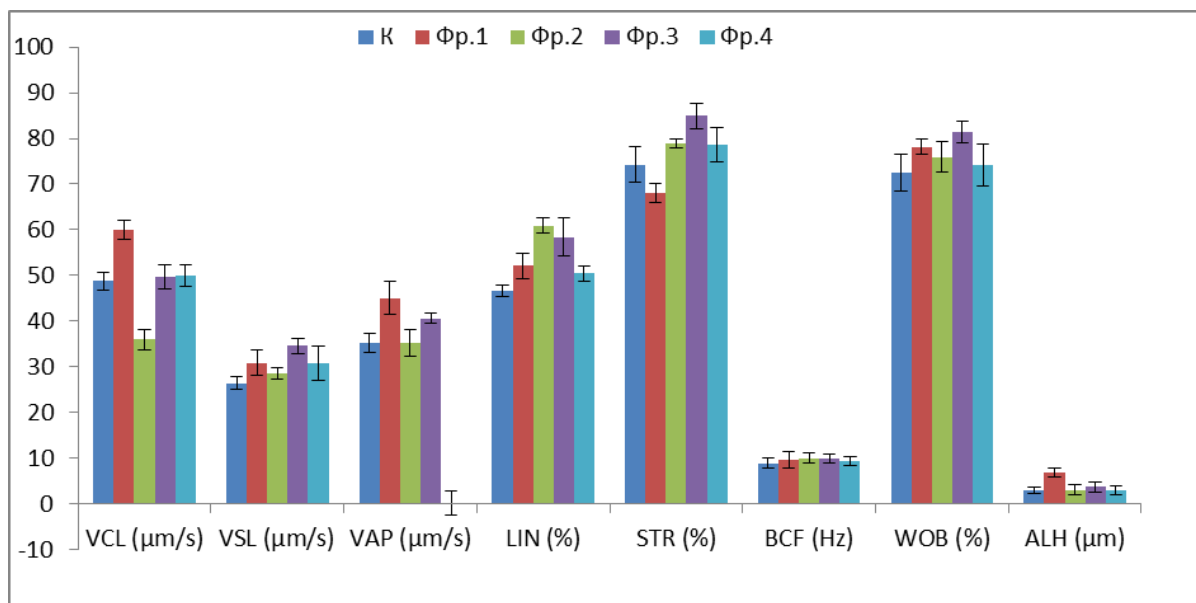
Фиг. 7. Промени в CASA-кинетичните параметрите на сперматозоиди от куче на 1^{ва} час след инкубация със СПП фракции, получени след GPC-хроматография.

Данните от инкубирането на пробите на 2^{ра} час и измененията в кинетичните CASA-параметри са представени на Таблица.7. и Фиг.8.

Таблица.7. Промени в CASA-кинетичните параметрите на сперматозоиди от куче на 2^{ра} час след инкубация със СПП фракции, получени след GPCхроматография.

	К	Фр.1	Фр.2	Фр.3	Фр.4
VCL (µm/s)	48.71±1.88 ^a	60.03± 2.14 ^{c/a}	35.92±2.19 ^c	49.72±2.71	49.95±2.42
VSL (µm/s)	26.38±1.33	30.81±2.77	28.57±1.31	34.56 ±1.67	30.62±3.77
VAP (µm/s)	35.14±2.07 ^a	45.06±3.68 ^b	35.23±3.01	40.58±1.06	39.05±2.64
LIN (%)	46.63±1.26 ^a	52.06±2.71 ^b	60.89±1.61 ^c	58.37±4.18	50.41±1.66
STR (%)	74.24±3.83	68.12±2.06 ^a	78.90±1.11 ^b	84.92±2.84 ^c	78.66±3.84
BCF (Hz)	8.85±1.08	9.65±1.79	9.96±1.14	9.89±1.08	9.32±1.09
WOB (%)	72.52±4.02	78.14±1.69	75.94±3.33	81.44±2.38	74.16±4.64
ALH (µm)	2.97±0.70 ^a	6.82±1.05 ^b	3.03±1.03	3.62±1.21	2.80±1.00

± съществена разлика между а и б р <0,05 и а и с р <0,001; n = 21



Фиг.8. Промени в CASA-кинетичните параметрите на сперматозоиди от куче на 2^{ри} час след инкубация със СПП фракции, получени след GPC-хроматография.

При К проби, бе установено увеличение по отношение параметра VCL (48.71 ± 1.88) в сравнение с първоначалните показатели и след 2^{ри} час на инкубацията. Същите промени бяха установени и при пробите инкубирани с фр. 2, фр.3 и фр.4 (35.92 ± 2.1 , 49.72 ± 2.71 и 49.95 ± 2.42). Статистически значимо увеличение по отношение на този показател наблюдавахме при пробите инкубирани със СПП съдържащи се във фр. 1, а именно 60.03 ± 2.14 . Относно LIN, бе установено, че пробите инкубирани с фр. 1, фр. 2, фр. 3 и фр.4 показват най - значимо намаляване в стойностите на този показател (52.06 ± 2.71 , 60.89 ± 1.61 , 58.37 ± 4.18 ; 50.41 ± 1.66), за разлика от К проби (46.63 ± 1.26). Важен параметър за установяване на протичаща ХА е ALH, прави впечатление, че стойностите на ALH остават почти непроменен и при пробите инкубирани с фр.4 (2.80 ± 1.00), а при К наблюдаваме намаляване (2.97 ± 0.70). При пробите с фр. 2 и фр. 3 се наблюдава увеличаване (3.03 ± 1.03 и 3.62 ± 1.21). Най-значимо увеличаване в стойностите на ALH регистрирахме при проби инкубирани с протеини съдържащи се във фр.1 (6.82 ± 1.05) на 2^{ри} час от инкубацията. От получените резултати можем да заключим, че повишаване на стойностите на VCL, намаляването на LIN и увеличението на ALH параметрите, потвърждава протичането на ХА, което е наблюдавано и от други автори (Cancel et al., 2000). От направените от нас изследвания с помощта на SCA,

получените резултати сочат, че след двучасова инкубация на сперматозоиди от куче в условия на индуцирана *in vitro* капацитация със СПП, съдържащи високомолекулни протеини от фракция 1, водят до статистически значимо понижаване на LIN параметъра и значително повишаване на VCL. Тези промени са белег на протичаща ХА. Също така бе установено и повишаване стойностите на ALH и понижаване на STR. Тези резултати ни дават основание да предположим, че именно протеините съдържащи се в фракция 1, които имат висока MM, оказват действие върху протичането на хиперактивацията при сперматозоиди от куче. Подобни подходи за детекция на ХА при сперматозоиди от различни животински видове са използвани и от други автори. В допълнение, Neill и Olds-Klarke характеризират хиперактивацията при миши сперматозоиди (Neill and Olds-Klarke, 1987). Други автори, изследвайки сперматозоиди при човек, установяват, че гаметите проявяват бурно флагелатно движение, което е съпроводено с намаляване на прогресивността им, когато биват инкубирани в среди със съдържание на протеини с висока MM (Mortimer et al. 2015). Тези движения на сперматозоидите в резултат от хиперактивацията описват непрогресивни и концентрични кръгови орбити (Suarez et al. 1991; Suarez et al. 1992; Pacey et al. 1995). Оценката на хиперактивацията при човешки сперматозоиди е предложена като крайна точка в прогнозирането и тестването на оплодителната способност на сперматозоидите (Mortimer et al. 1997; Mortimer and Mortimer., 2015). Стандартизирането на методи, като този за определяне на хиперактивацията може да позволи точно и обективно идентифициране на поведението на гаметите в женския репродуктивен тракт и техните фертилни качества.

От получените резултати и от литературни данни, беше потвърдено че високомолекулните протеини от фракция 1, оказват най-значимо влияние върху ХА на сперматозоидите и водят до последваща капацитация. Следователно, пробите съдържащи високомолекулните протеинови фракции повлияват статистически значимо кинетичните и мотилните параметри на еякулата. Според Sparrow и колеги съществена група от протеини в спермалната плазма при хамстери от семейството на гликопротеините с MM над 50 кДа, стимулира кинетичните параметри на мъжките гамети (Sparrow et al., 1992). Hoskins et al., в условия *in vitro*, успяват да доведат до хиперактивирано състояние незрелите сперматозоиди, получени от епидидимис на говедата, чрез инкубация в в

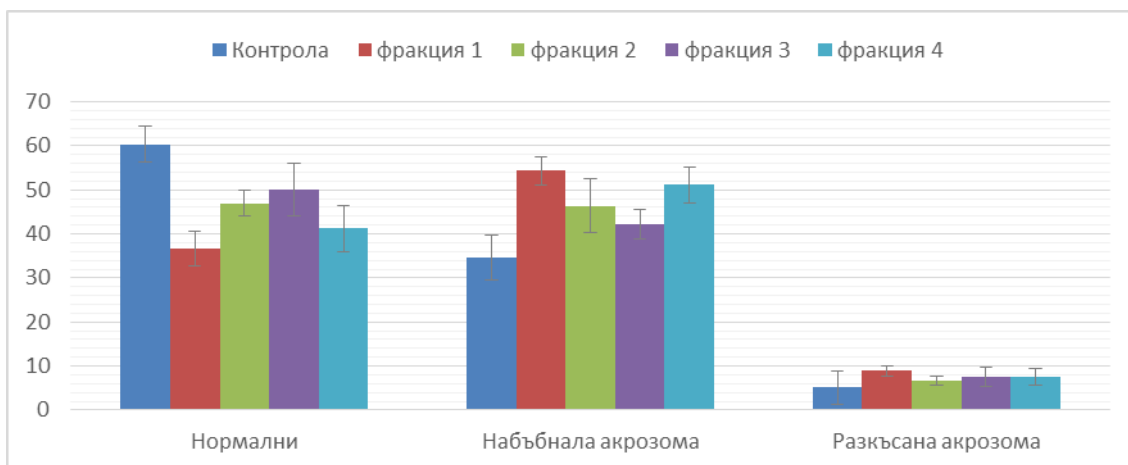
присъствието на високомолекулни комплекси от епидидимална спермална плазма и теофилин (Hoskins et al, 1979). В последствие Jaiswal et al, в опит да охарактеризира СПП от епидидимална плазма и тяхната роля в биохимичната регулация на подвижността на сперматозоидите по отношение на ХА (Das et al., 2010) пречистват и характеризират т.нар. инициращ подвижността белтък (MIP). MIP е термостабилен, димерен протеин с тегло близо 125кДа съставен от две субединици: 70кДа и 54кДа, с изоелектрична точка 4,75 и максимална активност при рН 8 (Jaisaw et al., 2010). Mandal et al., селектират друг високомолекулен протеинин имащ пряко отношение към капацитацията, а именно т.нар стимулиращ подвижността фактор (FMSF), при биволи, като същия показва висока протеинова специфичност и афинитет за стимулиране на кинетиката на епидидималните сперматозоиди при кочове (Mandal et al. 2006). Подобна функция, е открита в козия кръвен серум, като са характеризирани някои от нейните физични, биохимични, физиологични и имунологични свойства. Този протеин е наименуван, като мотилитет стимулиращ протеин (MSP), тъй като стимулира подвижността епидидимални сперматозоиди (Saha et al. 2013). Както FMSF, така и MSP са 66кДа топлоустойчиви мономерни (Arić et al, 2016). FMSF има киселинен характер с рI 3.7. Аспартатът, глутаматът и левцинът са аминокиселините с по - високо представяне във FMSF. По отношение на своя потенциал за насърчаване на подвижността, FMSF не е видово специфичен и бива имунодетектиран при редица животински видове (Khalifa et al., 2014). Други автори посочват, че протеинът PAF-АН, пречистен от СП на нерези и съставен от четири полипептида от 43кДа, 55кДа, 6кДа5 и 100кДа, активира подвижността на инкубирани *in vitro* сперматозоиди, като ги привежда в хиперактивирано състояние и последваща капацитация (Kordan et al., 2009). Също така, съществуват литературни данни, че простатната аргинин естераза в СП на кучета (Canine prostatic arginine esterase (CPSE)), която е протеин принадлежащ към групата на каликреина е зависим от андрогена. Ролята на CPSE в СП от куче не е са напълно изяснена, но проучванията предполагат, че CPSE е отговорен за регулацията на мотилитета на сперматозоидите в маточната шийка (Dube, 1994). В подкрепа на получените от нас резултати, редица други автори посочват връзката между СПП с висока ММ и положителния им ефект върху индуцирането на капацитация *in vitro* (Saha et al. 2013). Като пример, може да се даде нивата на ОПН в СП, който показва

положителна корелация с всички скоростни характеристики на сперматозоидите (Abedin et al. 2020). От приведените до тук литературни данни и получените от нас резултати следва да се заключи, че високомолекулните комплекси (70кДа, 78кДа и повече от 200кДа) в СП водят на иницирането на хиперактивация и капацитация при сперматозоидите. Като допълнение към изследванията за мотилитет, скорост и кинетични CASA параметри на сперматозоидите от всички проби инкубирани с отделните СПП фракции е направена и морфологична характеристика на 2^{-ри} час. В настоящите изследвания е направен морфологичен анализ на структурните промени в главичката на сперматозоидите с цел да се детектира ефлуксът на холестерол от акрозомалната област, като един от белезите за протичане на капацитация (Cancell et al., 2014). Резултатите от морфологичния анализ са представени на Таблица.8. и Фиг.9. Бяха използвани 21 еякулата от 7 кучета, със следните морфологични показатели: Нормални спематозоиди - 86.01 ± 3.33 , с набъбнали акрозоми - 7.22 ± 2.67 , с разкъсани акрозоми - 4.68 ± 1.01 и сперматозоиди с промени в опашка - 2.09 ± 0.98 .

Таблица. 8. Морфологичен анализ на проби инкубирани със СПП фракции, получени след хроматография, на 2^{-ри} час след инкубация на сперматозоиди от куче.

	Нормални	набъбнала акрозома	разкъсана акрозома
Контрола	$60,3 \pm 4,1^a$	$34,6 \pm 5,0^a$	$5,1 \pm 3,9$
фракция 1	$36,7 \pm 3,9^c$	$54,4 \pm 3,2^c$	$8,9 \pm 1,2$
фракция 2	$46,93 \pm 2,9^c$	$46,37 \pm 6,1^b$	$6,7 \pm 0,9$
фракция 3	$50,16 \pm 6,0^c$	$42,24 \pm 3,4^b$	$7,6 \pm 2,2$
фракция 4	$41,2 \pm 5,2^c$	$51,2 \pm 4,1^c$	$7,6 \pm 1,8$

± съществена разлика между а и б р <0,05 и а и с р <0,001; n = 21



Фиг.9. Изменения в морфологията на проби инкубирани със СПП фракции, получени след хроматография, на 2^{ри} час след инкубация на сперматозоиди от куче.

Анализът на морфологичните промени в сперматозоидите показва, че процентът нормални сперматозоиди намалява статистически значимо при всички проби инкубирани със СПП фракции, в сравнение на тези данни при свежа семенна течност. Най-високи проценти на сперматозоиди с набъбна акрозома, бе наблюдавано при проби инкубирани с протеини съдържащи се във фр.1. Литературни данни в подкрепа на получените резултати потвърждават, че изложена на въздействието на протеини от СП, мембраната по апикалната част на главичката на сперматозоидите набъбва при инкубиране на еякулати в условия *in vitro* капацитация (Miller et al., 1990). Други автори потвърждават капацитиращото въздействие на протеини с висока ММ от СП и по-конкретно протеини с тегло 55кДа – 70 кДа, принадлежащи към семейството на спермадхезините (Calvete J et al., 1998). Установен е афинитета за свързване на тези молекули към повърхността на ПМ на сперматозоидите и действието им, като активатори на ефлукса на холестерол и подготовката за акрозомна реакция (Lin and Kan, 1996). В подкрепа на литературните данни, нашите резултати потвърдиха, че най-съществено набъбване на акрозомата се наблюдава в проби, инкубирани с протеини с висока ММ (фракция 1).

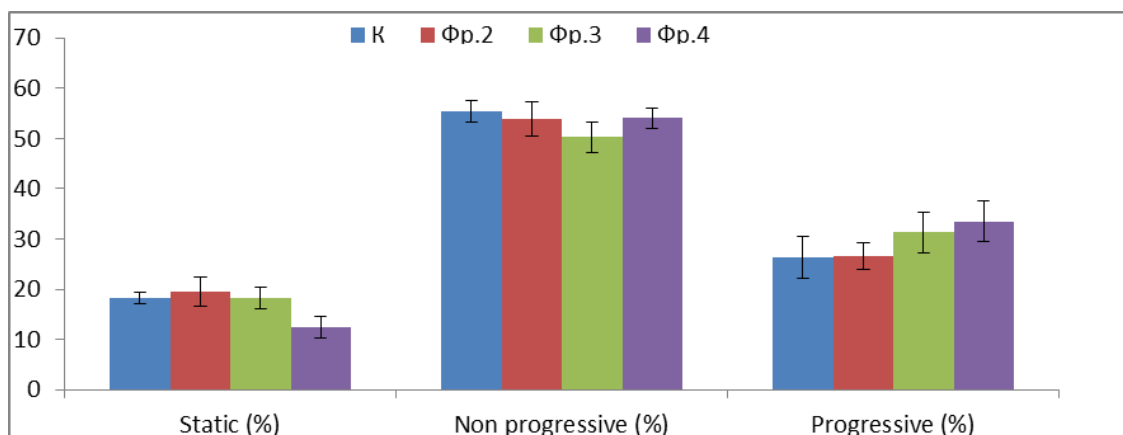
3.3. Изследване на декапацитирация ефект на семинално плазмените протеини върху мотилитета и скоростта на сперматозоиди от куче чрез Sperm Class Analyzer (SCA).

За изпълнение на задачата поставена в дисертационния труд, беше проследен декапацитирация ефект на сепарирани СПП фракции след GPC хроматография. За целите на екперимента бяха получени 10 свежи еякулата от кучета, със следните първоначални показатели: концентрация $200-400 \times 10^6$ кл/мл; статични- 6.13 ± 0.99 ; непрогресивно подвижни- 72.18 ± 3.88 ; прогресивно подвижни- 22.81 ± 2.83 ; VCL - 71.03 ± 4.66 ; VSL- 33.01 ± 3.54 ; VAP – 44.23 ± 2.99 ; LIN- 46.99 ± 3.76 ; STR- 65.34 ± 2.99 ; WOB - 61.88 ± 2.56 ; ALH- 6.01 ± 1.18 ; BCF- 7.66 ± 1.00 и pH 6.8-7. Както бе установено от предишните ни експерименти, високомолекулните протеини от фр. 1, водят до хиперактиваия и капацитационни изменения по отношение на морфологията, кинетичните параметри и мотилитета на сперматозоидите. В тази задача фокусът беше поставен върху декапацитиращ ефект на СПП фракции 2,3 и 4. За да бъде определен декапацитирация ефекта на всяка отделна фракция СПП, настъпилите промени бяха детектирана чрез SCA на 30 мин., 1^{-ви} и 1.5 часа. Резултатите от измененията в подвижността и скоростта на 30 мин. са представени на Таблица.9. и Фиг.10.

Таблица.9. Мотилитет и скоростни параметри на 30 мин, след инкубиране с протеини от Фр.2,3,4; n=10

	К	Фр.2	Фр.3	Фр.4
Static (%)	18.30 ± 2.60^a	19.50 ± 1.06	18.30 ± 2.18	12.40 ± 2.01
Non progressive (%)	55.40 ± 1.99	53.90 ± 2.18^b	50.30 ± 1.11	54.10 ± 3.88
Progressive (%)	26.30 ± 1.11	26.60 ± 1.09^b	31.40 ± 2.22	33.50 ± 2.99

\pm съществена разлика между а и б р <0,05 и а и с р <0,001; n = 21



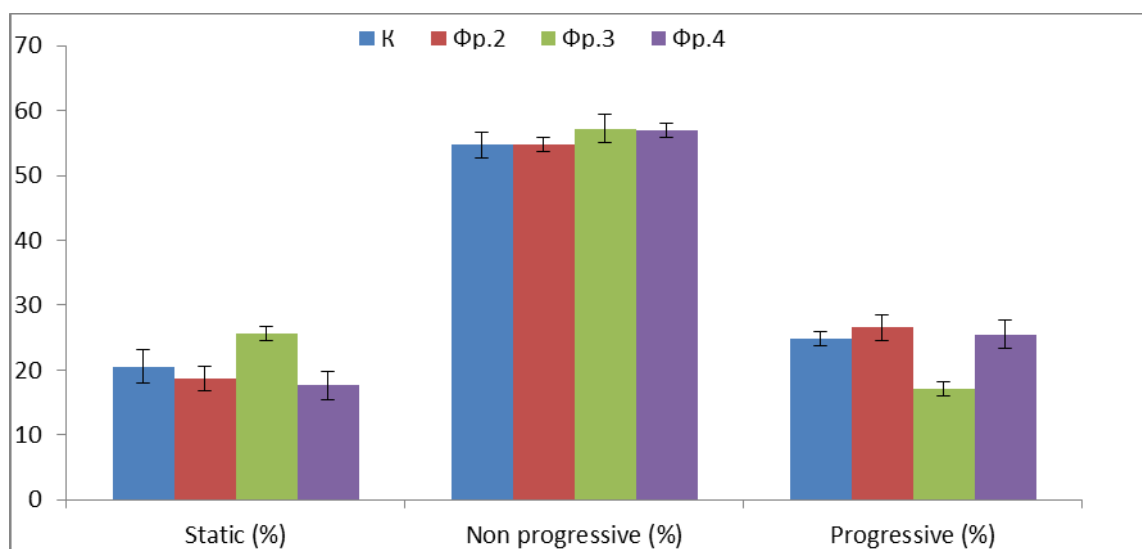
Фиг.10. Промени в мотилитет и скоростни параметри на 30 мин., след инкубиране с протеини от Фр.2,3,4; n=10

Процентът статични сперматозоиди след 30 мин. в К проба бяха отчетени следните стойности (18.30 ± 1.1), докато при пробите инкубирани със протеини от фр. 2 и фр.3 бяха съответно (19.5 ± 2.87 и 18.30 ± 2.08). Най-нисък процент статични сперматозоиди бяха наблюдавани в пробите инкубирани с гр. 4 (12.4 ± 2.1). По отношение на процента непрогресивни клетки, статистически значима разлика между К (55.40 ± 2.19) и пробите с Фр. 2, 3 и 4 (53.90 ± 3.45 ; 50.30 ± 3.02 ; 54.1 ± 1.99) не бяха установени. Най - съществено повишаване по показателя за прогресивност на 30 мин бяха отчетени при проби инкубирани с фр. 3 и фр.4 (31.40 ± 3.99 и 33.50 ± 4.01), докато при К и пробата с фр. 2 резултатите бяха единични (26.30 ± 4.22 и 26.60 ± 2.67). За да проследим измененията в мотилитета и скоростните параметри на сперматозоидите по отношение на времето, отчетохме деакацитационните изменения проследихме 1^{-ви} час от инкубирането. Резултатите са представени на Таблица.10. и Фиг.11.

Таблица. 10. Мотилитет и скоростни параметри на 1^{-ви} час, след инкубиране с протеини от Фр.2,3,4; n=10

	К	Фр.2	Фр.3	Фр.4
Static (%)	20.50 ± 2.60	18.60 ± 1.88	25.60 ± 1.06	17.60 ± 2.18
Non progressive (%)	54.70 ± 1.99	54.80 ± 1.06	57.20 ± 2.18	56.90 ± 1.11
Progressive (%)	24.80 ± 1.11	26.60 ± 2.00	17.20 ± 1.09	25.50 ± 2.22

± съществена разлика между а и b p <0,05 и а и с p <0,001; n = 21



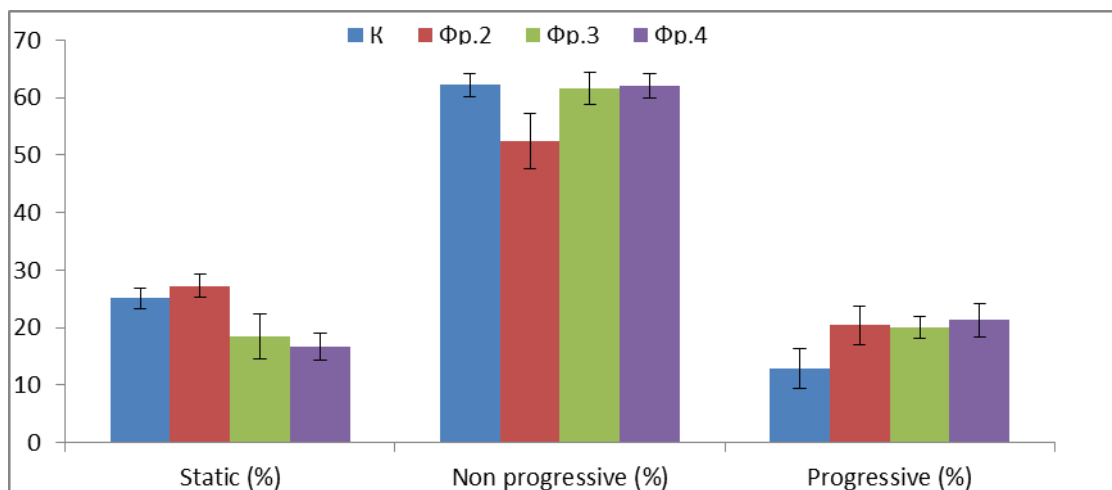
Фиг.11. Промени в мотилитет и скоростни параметри на 1^{-ви} час., след инкубиране с протеини от Фр.2,3,4; n=10.

След 1^{ви} час на инкубация пробите, съдържащи СПП от фр. 2 и фр.3, показаха изменения по отношение на процента статични сперматозоиди спрямо К (20.50±2.60), като за фр.2 се наблюдава понижаване (18.60± 1.88), а във фр. 3-повишаване на статичността (25.60± 1.06). Най-съществено понижаване в процента статични сперматозоиди беше наблюдавано при фр.4 (17.60± 2.18). Наблюдавахме слабо увеличение на процента непрогресивни сперматозоиди при проби с фр.3 (57.20± 2.18) и фр.4 (56.90± 1.11) спрямо К (54.70±1.99). Изменение в непрогресивността във фр. 2 не беше отчетена (54.80± 1.06). Слабо повишаване в процента прогресивни сперматозоиди беше наблюдавана при проби инкубирани с фр.2 (26.60± 2.00) и фр.4 (25.50± 2.22) спрямо К (24.80±1.11), като понижение в прогресивността демонстрираха само пробите инкубирани с фр. 3 (17.20± 1.09). Понижаването на някои определени CASA параметри в тези проби (процента статични сперматозоиди, в комбинация с повишаването на процента непрогресивни) са сигурен белег за настъпване на декапацитация. След 1.5 часа на инкубация, бе установено, че в К проби се повишава процентът на статични сперматозоиди(25.1±1.78), както и в пробите сионкубирани с СПП от фр. 1 (27.2± 1.99). Намаляване на процента на статичните клетки беше установено и в проби с фр. 4, но най- значимо, то бе в пробите с фр. 3. По параметъра - непрогресивни гамети, установихме увеличаване в К проби (62.2±2.08), в проби с фр. 3 (61.6± 2.77) и в проби с фр. 4 (62.0± 2.09). Намаляване на процента на непрогресивност бе установено в проби инкубирани със СПП от фр.2 (52.4± 4.85). Процентът на прогресивни сперматозоиди показва понижение след 1,5-час на инкубация, в К проби (12.9±3.44), в пробите с фр.2 (20.4±3.33) и във фр. 4 (21.3±2.91). Занчимо повишаване на процента прогресивни сперматозоиди бе регистрирано в проби инкубирани с фр.3 (20.0±1.93). Статистически значимо намаляване на процента бързоподвижни сперматозоиди бе установено в пробите съдържащи СПП от фр. 2 (10.2± 2.44). Резултатите от инкубирането на 1,5 час са представени на Таблица.11. и Фиг.12.

Таблица. 11. . Мотилитет и скоростни параметри на 1,5 час, след инкубиране с протеини от Фр.2,3,4; n=10

	К	Фр.2	Фр.3	Фр.4
Static (%)	25.1±1.78	27.2± 1.99 ^a	18.4± 3.98 ^b	16.7± 2.34 ^b
Non progressive (%)	62.2±2.08 ^a	52.4± 4.85 ^b	61.6± 2.77	62.0± 2.09
Progressive (%)	12.7±3.44 ^a	20.4± 3.33 ^b	20.0± 1.93	21.3± 2.91

± съществена разлика между а и б р <0,05 и а и с р <0,001; n = 21



Фиг.12. Промени в мотилитет и скоростни параметри на 1,5 час., след инкубиране с протеини от Фр.2,3,4; n=10

Получените от нас резултати съвпадат с данни от литературни източници, установяващи декапацитирация ефект на нискомолекулни протеини, които покриват ПМ на сперматозоидите и имат за цел да възпрепятстват преждевременната капацитация (Bailey, 2010). Декапацитиращи фактори в СП са протеините от BSP- семейството (BSP - A1/-A2 и BSP - A3), които имат ММ 14- 2 кДа и рI 3,8-65 (Naus and Manjunath, 2000). Тези протеини оказват декапацитирацията си ефект, като се свързват с холиновите остатъци по повърхността на ПМ на сперматозоида и след еякулация биват отделени от хепарина или компоненти от ЖРТ (Therien et al. 1998). При свързването си с ПМ, протеините проявяват и афинитет към богати на холестерол участъци, като по този начин възпрепятстват свързването на албумин и глюкозамингликани с холестерола и неговия преждевременен ефлукс (Gwathmey et al. 2006). Конкретен пример за такъв нискомолекулен протеин е PDC-109 с ММ от 35кДа и рI 4,7, който предпазва сперматозоидите от навлизането им хиперактивирано

състояние до контакта им с епитела на яйцепровода при кравите (Tannert et al. 2006).

3.4. Изследване на декапацитация ефект на семинално плазмените протеини върху кинетичните CASA параметри на сперматозоиди от куче чрез Sperm Class Analyzer (SCA).

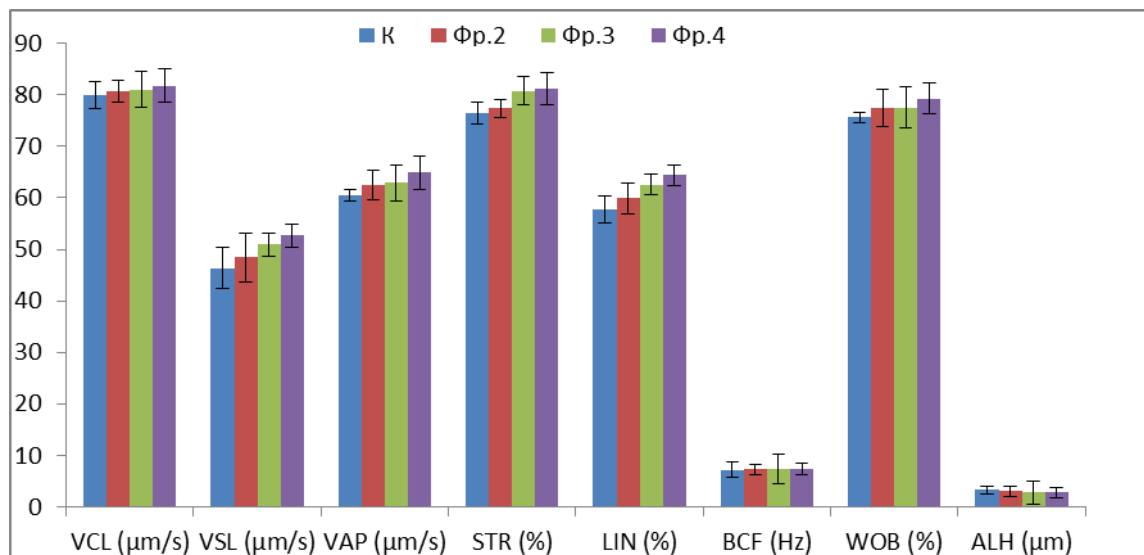
След проследяване на влиянието на различни фракции от СПП върху мотилитета и скоростните параметри на сперматозоидите, насочихме вниманието си върху ефекта им върху кинетичните CASA-параметри. Фокусът на изследването бе насочен към изменения в параметрите: VCL, LIN и ALH. За целите на експеримента бяха използвани 10 еякулата от кучета, със следните първоначални кинетични параметри: VCL -71.03 ± 4.66 ; VSL -33.01 ± 3.54 ; VAP -44.23 ± 2.99 ; LIN -46.99 ± 3.76 ; STR -65.34 ± 2.99 ; WOB -61.88 ± 2.56 ; ALH -6.01 ± 1.18 ; BCF -7.66 ± 1.00 и pH 6.8-7. За проследяване на декапацитация ефект на СПП върху сперматозоидите, СП беше отстранена и получените ликвоти, бяха инкубирани с 300 μ l модифицирана капацитираща среда за кучета (Mahi and Yanagimachi, 1978), за да бъдат инициирани капацитационни изменения. Като контрола (К) беше използван еякулат с цяла СП, към който бяха добавена капацитираща среда. Пробите бяха инкубирани на 37⁰C за 1 час. След установяване на настъпила капацитация, към вече капацитиралите сперматозоиди бяха добавени по 300 μ l от СПП фракции (фр. 2, фр. 3 и фракция 4). За да бъде определен декапацитация ефекта на всяка отделна фракция СПП, настъпилите промени бяха детектирана чрез SCA на 30 мин., 1^{-ви} и 1.5 часа. На Таблица.12. и Фиг.13. са показани данните от CASA кинетичните параметри на 30 мин от инкубирането със СПП от различните фракции. Прави впечатление, че К проба и сперматозоидите инкубирани с фр.2, фр. 3 и фр. 4 показаха почти единични резултати по отношение на VCL. В К проба, стойности бяха (80.0 ± 2.55) , във фр.2 (80.7 ± 2.03) , във фр. 3 $(81.3.48)$ и във фр. 4 (81.8 ± 3.33) . Параметърът за LIN при К (57.8 ± 2.63) ; фр.2 (59.9 ± 2.98) ; фр.3 (62.6 ± 1.98) и фр.4 (64.4 ± 1.96) , не претърпява статистически значими промени във всичките проби, спрямо първоначалните показатели. Анализът на резултатите при отчитането на параметър ALH не показаха съществени различия

визследваните проби: К (3.3 ± 0.70); фр. 2 (3.1 ± 1.01); фр. 3 (2.8 ± 2.24) и фр. 4 (2.8 ± 0.98).

Таблица.12. Промени в CASA-кинетичните параметри на 30 минута, след инкубиране със СПП протеини от фр. 2, фр. 3 и фр. 4; n=10

	К	Фр.2	Фр.3	Фр.4
VCL ($\mu\text{m/s}$)	80.0 ± 2.55	80.7 ± 2.03	81.3.48	81.8 ± 3.33
VSL ($\mu\text{m/s}$)	$46.3\pm 3,99$	48.4 ± 4.66	50.9 ± 2.22	$52.7\pm 2,21$
VAP ($\mu\text{m/s}$)	60.5 ± 1.23	62.5 ± 2.91	62.9 ± 3.56	64.9 ± 3.33
STR (%)	76.5 ± 2.18	77.4 ± 1.7	80.8 ± 2.72	81.2 ± 3.22
LIN (%)	57.8 ± 2.63	59.9 ± 2.98	62.6 ± 1.98	64.4 ± 1.96
BCF (Hz)	7.2 ± 1.42	7.3 ± 1.01	7.4 ± 2.88	7.4 ± 1.18
WOB (%)	75.6 ± 1.11	77.4 ± 3.56	77.5 ± 4.01	79.3 ± 2.99
ALH (μm)	3.3 ± 0.70	3.1 ± 1.01	2.8 ± 2.24	2.8 ± 0.98

\pm съществена разлика между а и б р <0,05 и а и с р <0,001; n = 21



Фиг.13. Промени в CASA-кинетичните параметри на 30 минута, след инкубиране със СПП протеини от фр. 2, фр. 3 и фр. 4; n=10

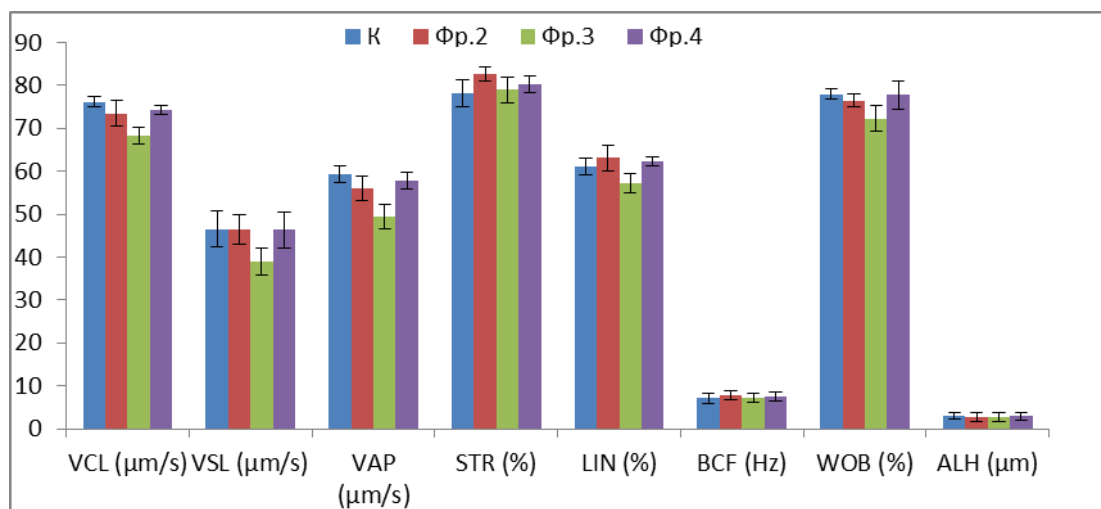
След отчитането на CASA показателите на 30 мин пробите бяха повторно инкубирани и измененията в параметрите бяха отчетени на 1^{ви} час. Данните от измененията на CASA кинетичните параметри са представени на Таблица.13. и Фиг.14. След 1^{ви} час на инкубация, прави впечатление намаляване в стойностите на VCL, в равнение с предишните показатели, като в К проби се установи значително понижение (76.2 ± 1.23), при проби инкубирани със СПП от фр. 2 - 73.5 ± 2.89 , при проби с фр. 3 - 68.3 ± 1.88), а при проби с фр.4 - 74.2 ± 1.03 . Тенденцията за намаляване в стойностите на показателите се запази и при LIN, параметъра, като при К проби беше отчетено (61.0 ± 2.0), при фр. 2 (63.1 ± 3.01),

при фр. 3 (57.1 ± 2.22) и фр. 4 (62.3 ± 1.11). В ALH не се установе статистически значими омрни, спрямо първоначалните показатели, и тези от 30 мин. На инкубацията със СПП фракции: К (3.1 ± 0.70), фр.2 (2.7 ± 0.99), фр. 3 (2.7 ± 1.08) и фр. 4 (2.9 ± 1.00).

Таблица.13. Промени в CASA-кинетични параметри на 1^{-ви} час, след инкубиране с протеини от фр.2, фр. 3 и фр. 4; n=10

	К	Фр.2	Фр.3	Фр.4
VCL ($\mu\text{m/s}$)	76.2 ± 1.23	73.5 ± 2.89	68.3 ± 1.88	74.2 ± 1.03
VSL ($\mu\text{m/s}$)	46.5 ± 4.13	46.4 ± 3.36	39.0 ± 3.17	46.3 ± 4.08
VAP ($\mu\text{m/s}$)	59.4 ± 1.99	56.1 ± 2.87	49.4 ± 2.93	57.7 ± 1.98
STR (%)	78.2 ± 3.12	82.6 ± 1.74	79.0 ± 3.01	80.2 ± 2.02
LIN (%)	61.0 ± 2.0	63.1 ± 3.01	57.1 ± 2.22	62.3 ± 1.11
BCF (Hz)	7.1 ± 1.18	7.9 ± 1.07	7.2 ± 1.01	7.4 ± 1.03
WOB (%)	78.0 ± 1.11	76.44 ± 1.44	72.3 ± 3.01	77.8 ± 3.33
ALH (μm)	3.1 ± 0.70	2.7 ± 0.99	2.7 ± 1.08	2.9 ± 1.00

\pm съществена разлика между а и б р <0,05 и а и с р <0,001; n = 21



Фиг.14. Промени в CASA-кинетичните параметрите на сперматозоиди от куче на 1^{-ви} час след инкубация със СПП фракции, получени след GPC-хроматография

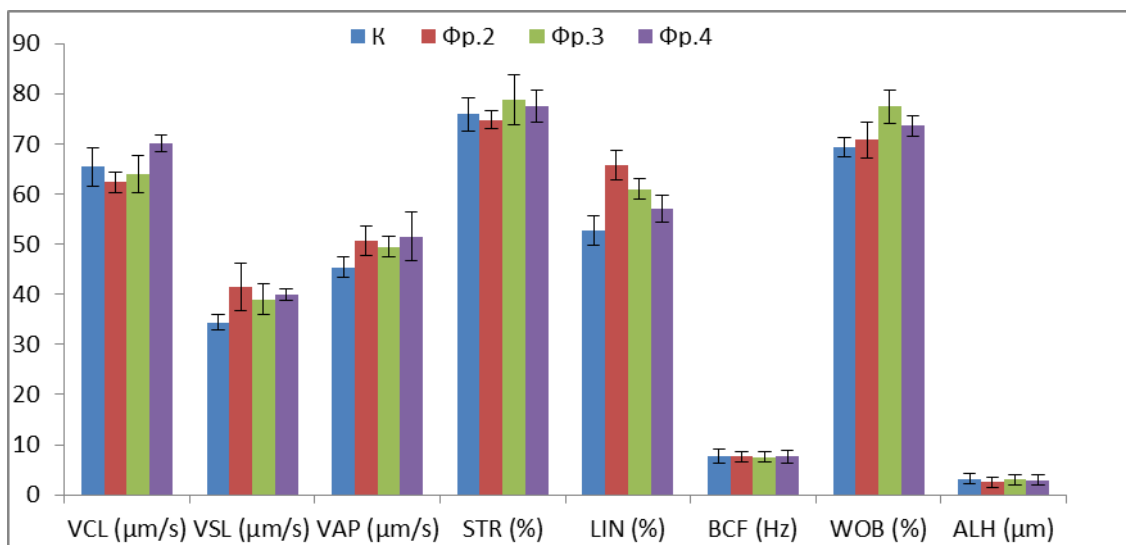
От анализът на резултатите, може да се каже, че след 1^{-ви} час на инкубация със СПП, се забелязва намаляване и в четирите проби на основните показатели за хиперактивация (VCL, AHL), което говори за настъпването на декапацитационни изменения по отношение на кинетиката на сперматозоидите. След отчитането на измененията на 1^{-ви} час, пробите бяха инкубирани отново за последващи 30мин и подложени на CASA анализ. Резултатите от

проведения CASA анализ върху кинетичните параметри на 1,5 час от инкубацията е представен на Таблица.14 и Фиг. 15.

Таблица.14. Промени в CASA-кинетични параметри на 1,5 час, след инкубиране с протеини от Фр,2,3,4;n=10

	К	Фр.2	Фр.3	Фр.4
VCL ($\mu\text{m/s}$)	65.4 \pm 3.87	62.4 \pm 2.03	63.9 \pm 3.76	70.0 \pm 1.67
VSL ($\mu\text{m/s}$)	34.4 \pm 1.62 ^a	41.5 \pm 4.66 ^b	39.0 \pm 3.12	39.9 \pm 1.11
VAP ($\mu\text{m/s}$)	45.4 \pm 1.95	50.7 \pm 2.91	49.5 \pm 2.09	51.5 \pm 4.89
STR (%)	75.9 \pm 3.33	74.8 \pm 1.7	78.8 \pm 4.99	77.5 \pm 3.08
LIN (%)	52.7 \pm 2.89 ^a	69.8 \pm 2.98 ^b	61.0 \pm 2.08	57.0 \pm 2.66
BCF (Hz)	7.7 \pm 1.33	7.7 \pm 1.01	7.5 \pm 1.04	7.6 \pm 1.18
WOB (%)	69.4 \pm 1.96	70.8 \pm 3.56	77.4 \pm 3.33	73.6 \pm 2.04
ALH (μm)	3.2 \pm 1.01	2.6 \pm 1.01	3.0 \pm 1.03	2.9 \pm 1.03

\pm съществена разлика между а и б р <0,05 и а и с р <0,001; n = 21



Фиг.16. Промени в CASA-кинетичните параметрите на сперматозоиди от куче на 1.5 час след инкубация със СПП фракции, получени след GPC-хроматография.

След инкубирането тенденцията за намаляване на стойностите на VCL се запази, като най-значимо намаляване в показателите показаха пробите инкубирани с фр.2 (62.4 \pm 2.03) и К проби (65.4 \pm 3.87). Намаляването на стойностите бе наблюдавано, но без статистически значими разлики в пробите инкубирани с фр. 3 (63.9 \pm 3.76) и фр. 4 (70.0 \pm 1.67). При LIN наблюдавахме намаляване на стойностите във всички проби, но в потвърждение на теорията ни, че ниско молекулните протеини оказват декапацитиращ ефект върху сперматозоидите, стойностите бяха статистически значимо повишени в проби

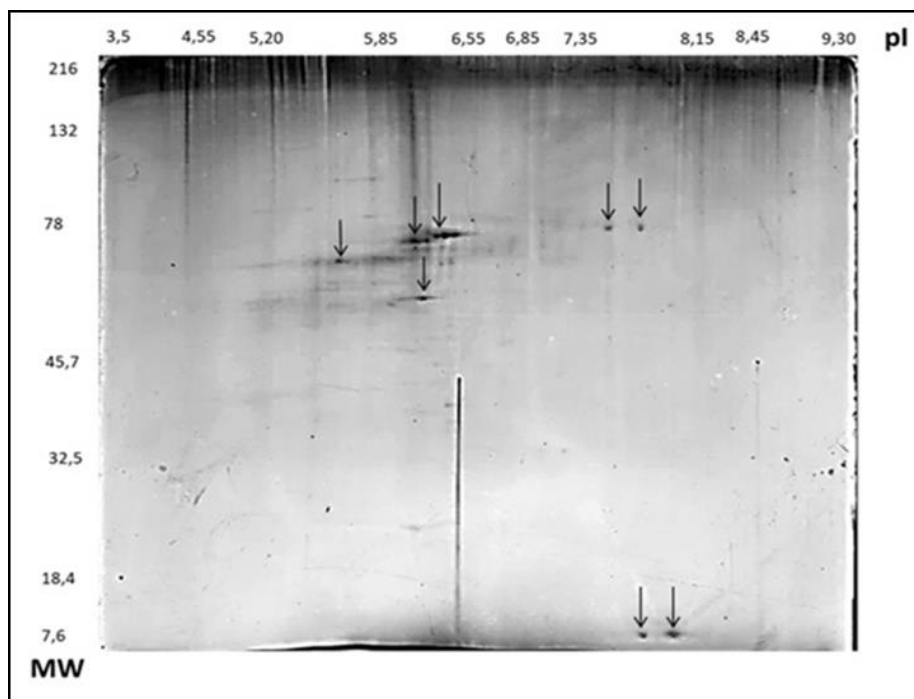
нкубирани със СПП от фр. 2 (69.8 ± 2.98). Това ни дава основание да смятаме, че мъжките гамети придобиват праволинеен модел на движение, преминавайки в декапацитирано състояние. Не бе наблюдавано статистически значимо изменение в стойностите на AHL: К - 3.2 ± 1.01 , фр.2 - 2.6 ± 1.01 ; фр.3 - 3.0 ± 1.03 и гр. 4 2.9 ± 1.03 . Получените данни от заложения в дисертационния труд експеримент ни дават основание да смятаме, че фракционираният СПП с ниска ММ, вероятно оказват декапацитиращ ефект върху сперматозоидите от куче в условия *in vitro* индуцирана капацитация. Намалването на стойностите на VCL в комбинация увеличаването на LIN са достоверен белег за протичаща декапацитация в тях. Получените данни дават основание да смятаме, че нискомолекулните комплекси от СП могат бъдат считани за декапацитиращ фактор спрямо мъжките гамети в условия *in vitro*. Проучванията на редица автори отбелязват ефекта на нискомолекулните протеини от СП, като декапацитиращи фактори. Това бе потвърдено и от нашите изследвания със СПП. В допълнение, наскоро бе установено, че протеинът rCRISP1, вероятно има биологични функции при свързването със яйцеклетката (способността се медира от S2 региона) и има декапацитиращ ефект, като може би да влияе на от йонните канали, отговорни за капацитацията. CRISP1 за това, че е първият идентифициран член на семейството на силно консервирани протеини - Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) с ММ от около 20кДа-30 кДа (Cohen, 2008). Установено е, че СПП с ниска ММ корелират с ниска плодовитост при сперматозоидите на бикове. Факторите на декапацитация в СП са описани за няколко вида и включват и човешки фактор за антифертилитност 1 (AF1), стабилизиращ фактор на заешки акрозоми (ASF) и плазмин на семенни бикове (SPLN). В допълнение, De Lamirade и съавтори съобщават за наличието на СПП, които инхибират движението на сперматозоидите, наречен по-късно "sperm-plasma motility inhibitor" (De Lamirade and Gagnon, 1984). Burkman и колектив наблюдава, че някои определени CASA параметри, съответно: линейност, VCL и ALH могат да се използват за откриване на функционалното състояние на сперматозоидите (Burkman, 1991). Идентифицирани са два СП фактора, контролиращи транспорта на Ca^{2+} в сперматозоидите, калтрин при бик (Rufo et al., 1984) и калсемин при овен и човек, за които е показано, че действат като ДФ. Протеини от СП с ММ 23 кДа, идентифициран като фосфатидилета-ноламин-свързващ протеин 1 (PEBP1) е разположен върху

акрозомната, след-акрозомния регион и флагела на мишки и човешки сперматозоиди, инхибира иницирането на капацита на сперматозоидите. Също така, има данни за СПП с ММ 10кДа имащ декапацитиращ върху сперматозоидите на бозайници (Araki et al, 2016). В нашето проучване установихме, че нискомолекулните СПП с ММ 15кДа-52кДа), вероятно оказват декапацитиращ ефект на сперматозоиди от куче, повлиявайки мотилитета, скоростните и кинетичните им параметри.

Задача 4. 2D - електрофореза (2D-PAGE) на семинално плазмени протеини.

4.1. 2D-PAGE на семинално плазмени протеини с установен ефект върху капацитацията и хупеактивността на сперматозоиди от куче.

С настоящото изследване си поставихме за цел допълнителното охарактеризиране на протеините от фракция 1, която показва наличие на протеини с доказан ефект върху хиперактивацията и капацитацията на сперматозоидите от кучета в условия *in vitro* индуцирана капацитация. Проведена беше двумерна електрофореза, което позволи да се диференцират и охарактеризират високомолекулни протеинови комплекси, съдържащи се във фракция 1, разделени по ММ и по тяхната изоелектрична точка (pI). Опитът е проведен на 15% ПАА гел с маркер за ММ Kaleidoscope™ Prestained SDS-PAGE Standard (BIO-RAD) и pI- Broad range pI marker (pH 3-10) (GE Healthcare®). В резултат от разделянето на протеиновите молекули, съдържащи се във фракция 1, бяха регистрирани протеинови петна с висока ММ от 68 кДа и pI 5.65; 75 кДа и pI 6.8; 76 кДа и pI 6.91; 77 кДа и pI 7.58; 78 кДа и pI 7.77 .Бяха регистрирани и две протеинови петна с много ниска и еднаква молекулна маса, но с различна изоелектрична точка: 6кДа pI и 7.87 и 6кДа и pI 7.95. От изпълнението на задачата, се установи, че получената след GPC хроматография фракция 1, с установен доказан ефект върху процесите на хиперактивация и капацитация на сперматозоидите, съдържа високомолекулни протеинови комплекса с ММ в границите от 68кДа - 78кДа. Резултатите от анализа са представени на Фиг. 17.



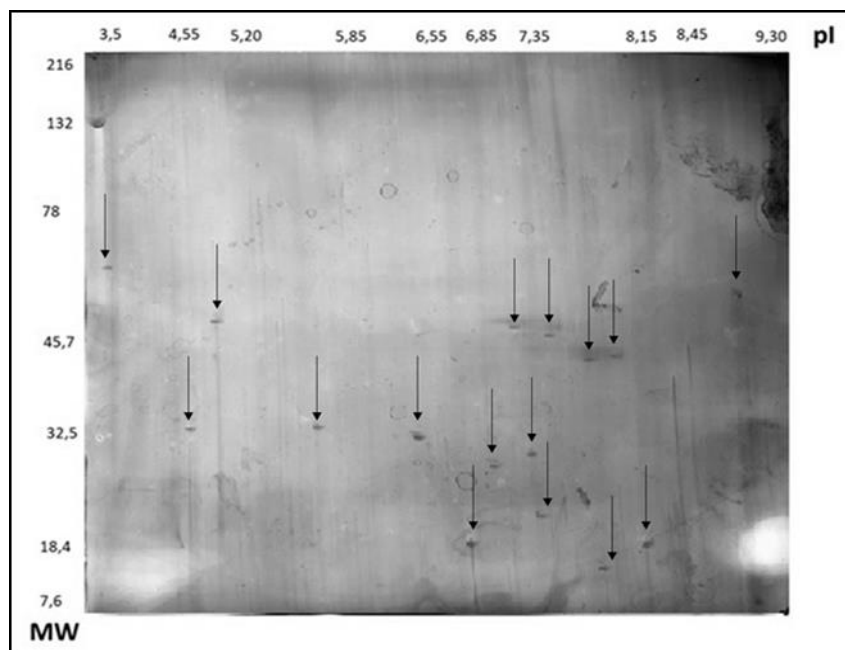
Фиг.17. 2-D PAGE на Фракция 1 на 15% ПАА гел, представяща протеинови петна с доказан ефект върху хиперактивацията на сперматозоиди от куче

В резултат от разделянето на протеиновите молекули, съдържащи се във фракция 1, бяха регистрирани протеинови петна с висока ММ от 68 кДа и pI 5.65; 75 кДа и pI 6.8; 76 кДа и pI 6.91; 77 кДа и pI 7.58; 78 кДа и pI 7.77. Бяха регистрирани и две протеинови петна с много ниска и еднаква молекулна маса, но с различна изоелектрична точка: 6кДа pI и 7.87 и 6кДа и pI 7.95. От изпълнението на задачата, се установи, че получената след GPC хроматография фракция 1, с установен доказан ефект върху процесите на хиперактивация и капцитация на сперматозоидите, съдържа високомолекулни протеинови комплекса с ММ в границите от 68кДа - 78кДа. В допълнение на получените от нас резултати, има доста литературни данни за ефекта на високомолекулни протеини върху капцитацията и хиперактивацията. Пример за такъв протеин е ОПН с ММ 55 кДа и pI 4.5 (Souza et al. 2009). Наличието му в СП на различни разплодници се окачествява, като положително и е свързано с високи нива на заплодяемост. При жребци е идентифициран протеинът SP-1, с ММ от 72кДа и pI 5.6, който оказва ефект върху сперматозоидите, подобен на ОПН, като данни за влиянието му върху кинетиката и мотилитета не е добре проучена (Brandon et al. 1999). Литературните данни показват наличие на протеини с ММ 55кДа и pI 4.5, имащи отношение към високата плодовитост при

бикове (Killian et al., 1993). Друго семейство СПП са ХСП, които също са свързани с оплодителния потенциал на сперматозоидите. Пет протеина с ММ от 18кДа, 31кДа, 33кДа, 48кДа и 55 кДа са идентифицирани като членове на ХСП, наричани антигени, свързани с плодовитостта и са били използвани като биохимични маркери за прогнозиране на плодовитост при биковете (McCauley et al., 1999). Тези протеини са широко разпространени в СП при различни видове бозайници, като почти всички представители на ХСП семейството имат афинитет за свързване към ПМ на сперматозоидите (Bellin et al., 1998). Изследвания на БСП-А1 и БСП-А2 показват техния идентичен аминокиселинен състав и свързващ капацитет към хепарина, като играят важна роля за плодовитостта на биволските бици (Gwathmey et al., 2003). От направените изследвания на СПП с различна ММ и от литературни данни, може да заключи, че протеините от СП на куче, които са с висока ММ (68кДа - 78кДа), повлияват съществено протичането на капацитационни промени в сперматозоидите, като имат ефект върху основни параметри за мотилитет, скорост и кинетичност.

4.2. 2D-PAGE на семинално плазмени протеини с установен декапацитиращ ефект върху сперматозоиди от куче.

В изпълнение на поставената задача по дисертационния труд, беше проведена 2D-PAGE на фракция 2, която показва най-голям ефект по отношение на декапацитиращите изменения при сперматозоидите в условия *in vitro* индуцирана капацитация. Проведеният анализ беше извършен на 15 % ПАА гел, което позволи да бъдат охарактеризирани протеините съдържащи се във фракция 2, по молекулна маса и изоелектрична точка. Опитът беше проведен с използването на маркер за ММ Kaleidoscope™ Prestained SDS-PAGE Standard (BIO-RAD) и pI- Broad range pI marker (pH 3-10) (GE Healthcare®). Резултатите от 2D –PAGE анализа са представени на Фиг.32.



Фиг.18. 2-D PAGE на Фракция 2 на 15% ПАА гел, представяща протеинови петна с доказан ефект върху декапацитацията на сперматозоиди от куче

След разделянето на протеините, съдържащи се във фракция 2, бяха регистрирани 16 протеинови петна с ММ от 9 до 52 кДа и изоелектрична точка от 3 до 9,2, съответно: 9,2 кДа и I_p 6,62; 15 кДа и I_p 7,53; 18 кДа и I_p 7,9; 21кДа и I_p 7,4; 29 кДа и I_p 7,1; 30 кДа и I_p 7,3; 33кДа и I_p 4,5; 33 кДа и I_p 6,32; 34 кДа и I_p 5,5; 42 кДа и I_p 7,8; 43кДа и I_p 7,9; 46 кДа и I_p 7,4; 47 кДа и I_p 7,1; 50 кДа и I_p 4,6; 51кДа и I_p 9,2; 52 кДа и I_p 3).

Декапацитиращите фактори са белтъчни молекули, присъстващи в семиналната плазма, които покриват и стабилизират мембраната на сперматозоидите, като по този начин възпрепятстват преждевременната капацитация (Bedford and Chang, 1962). При някои видове, ДФ присъстват в СП и се връзват със сперматозоидите само при еякулация, но при други, присъстват върху клетките преди еякулацията. Отстраняването на ДФ от повърхността на клетката по време на инкубация създава условия за възникването на капацитацията. Ранните проучвания на декапацитацията и декапацитиращите фактори установяват, че СПП играят ключова роля в регулацията на процеса. Oliphant и колектив доказват, че протеините и гликопротеините оказват най-съществен ефект върху декапацитацията при различни видове бозайници (Oliphant et al.1985). Най-ранно проучените декапацитиращи фактори на СП са „акрозом-стабилизиращият фактор“ (АСФ),

изолиран от СП при зайци (Eng and Oliphant, 1978) и „антифертилитетен фактор“ (АФ) при хора (Reddy et al, 1979). И двата фактора представляват гликопротеини съставени от различни субединици (Audhya et al, 1987; Wilson and Oliphant, 1987). АСФ възпрепятства оплождането чрез инхибиране на акрозомната реакция (Eng and Oliphant, 1978), докато последващи проучвания показват, че АСФ от човешката с СП действа по различен механизъм, който е все още не е известен (Reddy et al, 1982). Сред едни от най- добре охарактеризирани ДФ е говеждия семинално плазмен протеин, който се свързва с холиновите фосфолипиди по сперматозоидната мембрана и впоследствие бива отстранен от хепарин или други компоненти от репродуктивния тракт, извличайки холестерол и фосфолипиди (Therien et al. 1998). Един от аналозите на този протеин, а именно PDC-109 е отговорен за свързването на сперматозоидите от бик с епитела на овидукта при кравите (Gwathmey et al. 2006). Това предполага, че PDC-109 от СП позволява преминаването на мъжките гамети през ЖРТ, действайки като декапацитиращ фактор забавящ протичането на преждевременна капацитация (Boilard et al. 2002). Друг такъв ДФ, открит в епидидимални сперматозоиди от мишка представлява протеин с молекулна маса около 40кДа (Fraser et al. 1998). Свързването на този ДФ към мембраната на сперматозоида, води до стимулиране на калмодулин-чувствителната Ca_2^+ АТФ-аза, което води до поддържането на ниски нива на Ca_2^+ . Имунолокализационни проучвания доказват, че Ca_2^+ АТФ-аза се намира предимно в пост-акрозомалния регион на главата на сперматозоидите (Fraser and Adeoya-Osiguwa, 1996). По време на капацитацията обаче ДФ се отделя от повърхността на мембраната и се инактивира, като по този начин ефектът му върху Ca_2^+ -помпа намалява, позволявайки на вътреклетъчния Ca_2^+ да се повиши и така стимулира намаляването на декапацитацията ефект върху клетката. Според други проучвания, редица ДФ представляват протеини от СП с молекулна маса 20- 30 кДа (Rakha et al. 2000). При идентифицирането на фактори, влияещи на декапацитацията, Gibbons et al. успяват да селектират фракции от СПП с ниска и висока молекулна маса, за да бъде определен ефекта на различните фракции върху декапацитацията на сперматозоиди от мишки. При инкубиране на мишите сперматозоиди с ниско- и високомолекулни фракции СПП и последваща имунолокализация те установяват, че протеини с маса 20кДа - 30кДа имат

силен афинитет на свързване с акрозомалната, постакрозомалната част и опашката на мъжките гамети. Въпросните протеини принадлежат към т. нар. фосфатидилетаноламин - свързващи протеини 1. (Gibbons et al. 2005). Малка група спермадезини в СПП проявяват ефект и върху декапацитацията. Те представляват гликопротеини с маса 12кДа до 16кДа, чиято биологична активност зависи от степента им на гликозилиране, както и от способността им да свързват хепарин. В СП са представени основно протеините AQN-1, AQN-3 и AWN, групирани като хепарин-свързващи протеини, тъй като те се прикрепят в различна степен към плазмената мембрана на сперматозоидите, от тестисите до еякулата. Една от основните им функции е свързана със стабилизация на ПМ на сперматозоидите преди еякулация (Kwok et al. 2010). Друг ДФ с ефект върху клетъчния метаболизъм на сперматозоидите е протеинът SPINK3 (серинов протеазен инхибитор Kazal тип 3), (Ou et al., 2012). SPINK3 е с ММ 6кДа, с добре характеризирана функция, като инхибитор на трипсиноподобни серинови протеази (Ohmuraya et al., 2012; Assis et al., 2013). Въпреки това, сред различните функции приписвани на този протеин, е установено, че намалява вътреклетъчното повишаване на Ca^{2+} (Coronel et al., 1992; Zalazar et al., 2012). Не е известен молекулярният механизъм, лежащ в основата на този ефект. SPINK3 се секретира главно от семенни мехурчета в семенната течност, където се прикрепя към повърхността на сперматозоидите (Chen et al., 1998), преди да навлезе в ЖРТ (Ou et al., 2012). При експериментални модели с миши сперматозоиди, клетките биват инкубирани *in vitro* с фракции от селектиран SPINK3 и след това са подложени на капацитиращи условия, но такива не се проявяват. Въздействието на SPINK3 спрямо сперматозоидите се дължи на блокирането на мембранната хиперполяризация, а от там и приема на Ca_2^+ , зависещо от CatSper- каналите, поддържайки клетките в стабилно декапацитирано състояние (Zalazar et al. 2012). От резултатите получени от нашите експерименти следва да се заключи, че присъствието на нискомолекулни протеини от СП (9кДа-52 кДа), съдържащи се във фр.2, оказва декапацитиращия ефект върху сперматозоиди от куче, повлиявайки мотилитета и кинетичните им параметри. Биологичните ефекти на СПП върху функцията и поведението на на сперматозоидите са сложни и не са напълно изяснени. В СП се съдържат разнообразни фактори, които повлияват както виталитета, така и енергийния потенциал на сперматозоидите (Rodriguez-Martinez et al. 2011).

Някои от тези фактори могат да действат позитивно на мъжките гамети, като индуцират капацитацията или протектират гаметите при ниски температури. Това обяснява богатата и доста разнородна информация на редица автори в тази насока. От получените от нас резултати се застъпва тезата, че в СП се съдържат фактори, като специфични протеини, благоприятстващи процеса на капацитация. Нашите резултати се установяват, че СПП с висока ММ, каквито са протеините от фракция 1 с ММ 68 кДа и рI 5.65; 75 кДа и рI 6.8; 76 кДа и рI 6.91; 77 кДа и рI 7.58; 78 кДа и рI 7.77, значително повлияват мотилитета и скоростта на сперматозоидите от кучета, водейки до хиперактивност и последваща капацитация на гаметите. Като допълнение, с подобен ефект бяха установени и протеини от семейството на FK506-binding protein (FKBP65), с ММ 75kDa и Ip 6.8 и 76 кДа и Ip 6.3, които са идеифицирани като Heat Shock Proteins. Протеини с ММ 78кДа се описват в литература, като лактоферин или принадлежащи към семейството на Iron Binding Proteins, имащи подобни ефекти върху сперматозоидите. От друга страна, относно механизма на действие на СПП, съществуват редица изследвания предполагащи, че някои от протеините могат да се адсорбират по клетъчната повърхност на сперматозоидите и така да протектират гаметите. Има и други становища, в които се твърди, че в СП се съдържат протеини, които имат декапацитиращ ефект, стабилизирайки я след еякулацията на сперматозоидите (Rota et al. 2007). Предполага се, че тази стабилизация на ПМ се постига, като тези СПП замаскират някои повърхностно мембранни рецептори и спират първичния ефлукс на холестерола (Tennert et al, 2001). От проведената от нас 2D-PAGE на фракция 2, се установи, че протеини с ниска ММ от 9кДа - 52 кДа в СП от куче, имат декапацитиращо действие. Подобен ефект е установен при протеин с ММ 15 кДа идентифициран, като Lipocalin-type Prostaglandin-D Synthase, Zn-binding proteins, някои Heparin binding proteins, GSP15 - Goat Seminal Plasma Protein с ММ от 18 кДа (ZnСП), Canine prostatic arginine esterase (CPSE) с ММ 30 кДа, с доказан декапацитиращ ефект върху сперматозоидите. В скорошни изследвания на Mogielnicka-Brzozowska се установява, че протеините pPchBPs и PchBPs се срещат в СП на куче, и са идентифицирани като свързващи цинк протеини, които проявяват защитен ефект върху плазмената мембрана, проявявайки преференциално свързване към мембраната на сперматозоидната акрозома и така предпазват от настъпването на ранна

капацитация. ZnСП участват също и в разпознаването на сперматозоида с яйцеклетката по време на оплодителния процес (Mogielnicka-Brzozowska, 2014). Цинкът е кофактор за повече от 80 металоензима участващи в ДНК репликацията и синтезата на белтъци. Тези два тъпя са главните компоненти за правилното произвеждане и развитие на половите клетки именно за това ролята на цинка е много важна за репродукцията (Hadwan et al. 2013). В допълнение, протеинът CPSE, идентифициран в кучешка СП, е мултифункционален протеин, поради своите свързващи цинк свойства и има молекулно тегло 29 кДа, като се смята, че оказва декапацитиращ ефект. Има данни, че по време на еякулацията определена част от протеините се свързват към плазмената мембрана на сперматозоидите, блокирайки прогестероновите рецептори локализирани в акрозомния регион (Sirivaidyarong et al. 2001). Така наречените „coating” протеини и гликопротеини с простатен произход постепенно се изместват от спермалната мембранна повърхност по време на капацитация и по този начин позволяват на други протеини да се свържат към вече свободните рецептори, за да могат да инициират акрозомната реакция (Rota et al. 2007). Друга група от СПП се смята, че участват в капацитацията и модуляцията на акрозомната реакция и принадлежи към хепарин-свързващите протеини (ХСП) (Miller et al. 1990). ХСП се свързват към повърхността на сперматозоидите след еякулация и засягат фертилността в следствие на тяхната модулираща роля по време на акрозомната реакция (Manjunath et al. 1993). Най-изученият ХСП при различни видове животни е остеопонтинът, който е установен във високи концентрация в СП от кучета (Souza et al. 2006). Souza и колеги, използвайки високоафинитетна хроматография с последваща SDS-PAGE съобщават за визуализирането на 19 протеинови банда от кучешка СП. От тези 19 банда, протеините с ММ 61,5 кДа се стича, че участват в акрозомната реакция при кучешките сперматозоиди (Souza et al. 2006). Сперматозоидите претърпяват две основни промени в подготовката си за оплождане: капацитация и хиперактивация. Капацитацията представлява съвкупност от биохимични процеси в крайната фаза на матурация на сперматозоидите, които ги подготвят за пентерция на яйцеклетката. Процесът включва промени в ПМ, като пространствено преразпределение на определени белтъци и ефлукс на холестерол, което подготвя сперматозоида за акрозомна реакция и последващо оплождане (Fraser, 2005). Хиперактивацията,

от друга страна, е промяна в движенията на опашката на сперматозоида. Това може да осигури силата, необходима на сперматозоида за преминаването през ЗП на яйцеклетката, за да се осъществи оплождането. Макар и да се смята, че ХА е част от процеса на капацитация има известни доказателства, че тя се контролира от механизми, различни от тези отговорни за акрозомната реакция (Marquez et al. 2007). Хормонални сигнали, които индуцират овулацията или сигнали от овулиращия фоликул могат да стимулират епитела на яйцепровода да секретира фактори, които отключват капацитацията и хиперактивацията на сперматозоидите в ЖРТ при условия *in vivo*. Това води до тяхното освобождаване в ампулата по времето, когато се осъществява овулацията (Suarez et al. 2008). От приведените дотук данни бива установено, че СПП взаимодействат със сперматозоидите в СП на кучета и могат да повлияят на различни аспекти от функциите на гаметите в процеса на оплождане. От представените резултати и данни се показва, че СПП са способни да упражняват разнообразен ефект върху функцията на сперматозоидите и изследванията в тази насока трябва да продължат. Резултатите от проведените изследвания по настоящия дисертационен труд, върху механизмите на протичане на процеса капацитация при вида *Canis lupus familiaris* установи, че в СП се съдържат СПП, които играят ключова роля в процесите на капацитация и хиперактивация. За да се осъществи едно успешно оплождане на яйцеклетката, сперматозоидите претърпяват серия от биохимични и структурно- функционални промени, които да гарантират техния оплодителен потенциал и съществена част от тях зависят от състава на протеинови молекули в СП. Също така, бяха установени и протеини, съдържащи се в СП, които оказва декапацитиращ ефект върху сперматозоидите. Ето защо изучаването на молекулните механизми, сигналните пътища и отговорните биомолекули за тези промени са от изключително важно значение. По-доброто разбиране на ролята на СПП може да обясни много от проблемите на репродукцията и мъжкия инфертилитет. От представените резултати и данни, се показва, че СПП са способни да упражняват разнообразен ефект върху функцията на сперматозоидите, като изследванията в тази насока трябва да продължат.

ИЗВОДИ

- Чрез GPC хроматографски анализ и 2D-PAGE електрофореза се установи, че в СП на куче се съдържат високо молекулни протеини (фракция 1), с ММ от 68 кДа и рI 5.65; 75 кДа и рI 6.8; 76 кДа и рI 6.91; 77 кДа и рI 7.58; 78 кДа и рI 7.77, оказващи ефект върху мотилитета, скоростта и кинетичните CASA-параметри на сперматозоиди от куче.
- Инкубирането на сперматозоиди от куче с високо молекулни СПП (фракция 1), водят до хиперактивност на половите клетки, като повишават тяхната VCL и непрогресивност.
- Морфологичните изследвания установиха, че високо молекулните протеините от фракция 1, индуцират капацитация и водят до нарастване на процента на сперматозоиди с набъбнала акрозома в сравнение с другите изследвани проби.
- Чрез GPC анализ и 2D-PAGE електрофореза се доказа, че съдържащите се СПП във фракция 2 са с ниска ММ (между 9кДа и 54кДа), оказвайки декапацитиращ ефект върху сперматозоиди от куче и водейки до намаляване на основните скоростни и кинетични CASA-параметри (VCL, ALH, WOB и BCF).

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ЗА ВНЕДРЯВАНЕ В ПРАКТИКАТА

Практическото приложение на хроматографски сепарирани протеини, с доказан ефект върху капацитацията и хиперактивността на сперматозоидите би намерило широко приложение в репродуктивните биотехнологии за подобряване на средите за съхранение след криоконсервация и капацитация. Фундаменталните проучвания в сферата на протеомиката на семиналната плазма, биха предоставили съществена информация за механизма на протичане на капацитационните и декапацитационните изменения в мъжките гамети, които са предпоставка за успеваемостта на оплождането. Протеиновите молекули от СП биха могли да послужат, като маркер за оплодителната способност, което би предоставило съществено предимство при селекцията на мъжки разплодници при селско стопанските животни. Асоциативните способности на белтъчните молекули по отношение на ПМ на сперматозоидите, предполага протективната роля, която те играят в среди с неблагоприятно влияние спрямо мъжките гамети. От тази гледна точка, определени СПП, биха могли да послужат за подобряване на средите за нискотемпературно съхранение. Измененията, които високомолекулните белтъчни комплекси в СП оказват върху мъжките полови клетки, могат да бъдат използвани за подобряване на редица среди за съхранение, както и на среди след размразяване на сперматозоиди. Цялостната роля на СПП по отношение на акрозомна реакция, капацитацията, декапацитацията, цялостния енергиен метаболизъм и други важни показатели на сперматозоидите, все още не е напълно изяснена, което налага още по-задълбочени изследвания в сферата на протеомиката на семиналноплазмените протеини.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ТЕМАТА ПО ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

- **Tsvetan Tsvetkov**, Maria Ivanova, Denica Daskalova-Yanakieva. Functional analysis of seminal plasma proteins on motility, velocity and other kinetic parameters. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, 72, 72(1), pp. 92-99, „Prof. Marin Drinov“ Academic Publishing House, 2019, ISSN 1310-1331, 92-99. JCR-IF (Web of Science):0.251
- **Tsvetkov, Ts.**, Daskalova, D.. Analysis of seminal plasma proteins related to sperm hyperactivation. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences, „Prof. Marin Drinov“ Academic Publishing House, е приета за печат в списание "Доклади на БАН"- 2019, ISSN 1310-1331 (ПРОТОКОЛ № 1/29.01.19), JCR-IF (Web of Science):0.251
- 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:1314-6246, 19-24

НАУЧНИ ФОРУМИ (КОНФЕРЕНЦИИ/ КОНГРЕСИ)

- Семинално плазмени протеини, повлияващи in vitro- индуцираната хиперактивация при сперматозоидите- **Цветан Цветков**; Деница Даскалова; XXX Юбилейна международна научна online конференция на Съюз на учените - Стара Загора 04- 05. 06.2020
- Промени в кинетичния профил на сперматозоиди инкубирани с високо- и нискомолекулни семинално плазмени протеини- **Цветан Цветков**; Деница Даскалова- Юбилейна научна сесия „Дни на науката“, 31 октомври – 1 ноември 2019, Пловдив;
- Morphological and kinetic changes in spermatozoa during in vitro induced decapacitation with seminal plasma proteins- **Tsvetan Tsvetkov** ; Denica Daskalova - Младежка научна конференция "Климентови дни" - 8 ноември 2019, София
- Seminal plasma proteins affecting capacitation and decapacitation of spermatozoa- **Tsvetan Tsvetkov** ; Denica Daskalova- „Ветеринарната медицина в полза на хората – Втора международна научна конференция“ 18-19 октомври 2019 г.
- Семинално плазмени протеини, влияещи на процеса на декапацитация в условия in vitro- **Цветан Цветков**; Деница Даскалова; „Втори интердисциплинарен докторантски форум“- 31 август 2019г.

- High molecular weight proteins in canine seminal plasma and their influence on hyperactivation and capacitation of - **Tsvetan Tsvetkov**; Denica Daskalova- International Symposium on Animal Science (ISAS)- 2019; Belgrade
- Вискомолекулни протеинови молекули в семиналната плазма на вида *Canis lupus familiaris*, свързани с процеса на капацитация- **Цветан Цветков**; Деница Даскалова- Ежегодна научна сесия „Дни на науката“, 2 и 3 ноември 2018 г, Пловдив
- Canine seminal plasma proteins influencing hyperactivation and kinetic parameters - **Tsvetan Tsvetkov**; Denica Daskalova- Международна научна конференция „Климентови дни“ 8 и 9 ноември, 2018, София
- High molecular weight proteins in canine seminal plasma and their influence on hyperactivation and capacitation of spermatozoa- **Tsvetan Tsvetkov** ; Denica Daskalova- 15th International Symposium for Immunology of Reproduction (15th ISIR), June 15-17, 2018, Varna
- Characterization of seminal plasma proteins involved in regulation of sperm hyperactivation- **Tsvetan Tsvetkov** ; Denica Daskalova- VII Национална конференция с международно участие „Морфологични дни“, 8-10 юни 2018г.
- Молекулярни механизми на капацитация при сперматозоиди- **Цветан Цветков**; Деница Даскалова- Втори докторантски симпозиум “Молекулярна биология-нови хоризонти”, 6 – 7 април, 2017г