



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**

**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО  
„АКАД. К. БРАТАНОВ“**

**Секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите“**

**Десислава Георгиева Градинарска**

**СПЕРМАЛНО ПЛАЗМЕНИ ПРОТЕИНИ – РОЛЯ В  
РЕПРОДУКТИВНИЯ ПРОЦЕС И НИСКОТЕМПЕРАТУРНОТО  
СЪХРАНЕНИЕ НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ КУЧЕТА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

**Научен Ръководител: проф. д-р Мария Георгиева Иванова, дб, дссн**

*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“*

**София  
2019**

Дисертационният труд е написан на 165 страници. Илюстриран е с 47 фигури, 8 таблици и 4 приложения. В библиографския списък са цитирани 245 литературни източника. Експерименталните дейности са проведени в Институт по биология и имунология на размножаването „акад. К. Братанов“ към Българска Академия на Науките.

Дисертационният труд е изработен с финансова подкрепа на: докторантска и бюджетна субсидия на БАН; частично по „Програма за подпомагане на младите учени в БАН“ - проект ДФНП-171; договор с „Галба“ ООД – Централна Ветеринарна Клиника.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на .....2019г. от ..... часа в заседателната зала на Институт по биология и имунология на размножаването „акад. К. Братанов“ към Българска Академия на Науките, 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. д-р Мария Иванова, дссн**

**Доц. д-р Павел Рашев, дб**

**Доц. д-р Диана Зашева, дб (резервен)**

Външни членове:

**Проф. д-р Жеко Байчев, двмн (Лесотехнически университет)**

**Проф. д-р Мая Игнатова, дссн (Селскостопанска Академия)**

**Проф. д-р Наско Василев, двмн (Тракийски университет)**

**Проф. д-р Янислав Илиев, двмн (Лесотехнически университет) (резервен)**

Материалите по защитата са на разположение в Библиотеката на ИБИР-БАН, (София, бул. Цариградско шосе 73), както и на интернет страницата на ИБИР-БАН (<http://ibir.bas.bg>).

*Забележка: Номерацията на фигурите и таблиците в автореферата не съответства на номерацията в дисертационния труд.*



**БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ**

**ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО  
„АКАД. К. БРАТАНОВ“**

**Секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите“**

**Десислава Георгиева Градинарска**

**СПЕРМАЛНО ПЛАЗМЕНИ ПРОТЕИНИ – РОЛЯ В  
РЕПРОДУКТИВНИЯ ПРОЦЕС И НИСКОТЕМПЕРАТУРНОТО  
СЪХРАНЕНИЕ НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ КУЧЕТА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

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

**Научен Ръководител: проф. д-р Мария Георгиева Иванова, дб, дссн**

*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“*

**София  
2019**

## СЪДЪРЖАНИЕ

I.	Увод .....	3
II.	Цел и задачи .....	4
III.	Материали и методи .....	5
IV.	Резултати и обсъждане .....	6
1.	Сравнителна характеристика на сперматозоиди от еякулати, получени фракционно .....	6
2.	Сравнителна характеристика на спермално плазмени протеини от еякулати, получени фракционно .....	18
3.	Характеристика и идентификация чрез 2D-електрофореза на специфични протеини, съдържащи се в сепарирани спермални фракции .....	23
4.	Проучвания върху zona pellucida прикрепящата способност на сперматозоиди, получени чрез фракционно получаване на еякулати от кучета.....	29
5.	Криоконсервация на сперма от кучета чрез иновативен подход и прилагане на методология за високоскоростно замразяване .....	35
6.	Дискусия .....	41
	Изводи и оригинални приноси с научно–приложен характер .....	49
	Публикации и доклади по темата на дисертацията .....	50

## ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

**ALH** - Амплитуда на латерално отклонение на главичката  
**BCF** - Честота на пресичане на линейната траектория  
**CASA** – Компютърно-асистиран спермоанализ  
**COCs** - Кумулус-ооцитни комплекси  
**CPSE** - Кучешка простатно-специфична аргинин естераза  
**F1** – Първа фракция на еякулата  
**F2** – Втора фракция на еякулата  
**F3** – Трета фракция на еякулата  
**HPLC** - Високоэффективна течна хроматография  
**HZA** – Hemizona binding assay  
**HZI** - Hemizona binding index  
**IEF** - Изоелектрично фокусиране  
**LIN** - Линеарност  
**pl** – Изоелектрична точка

**SDS-PAGE** – Еднодименсионална полиакриламидна гел електрофореза  
**STR** - Праволинейност  
**VAP** - Average path velocity (скорост по осреднена траектория)  
**VCL** - Curvilinear velocity (скорост по реално изминатия път)  
**VSL** - Straight line velocity (скорост по правата линия между началната и крайната точка от пътя)  
**WOB** - Трептене  
**ZP** – Zona pellucida  
**ИО** – Изкуствено осеменяване  
**MW** – Молекулно тегло  
**ПМ** – Плазмена мембрана  
**СП** – Спермална плазма  
**СПП** – Спермално плазмени протеини  
**SD** – стандартно отклонение  
**SEM** – стандартна грешка

## I. УВОД

Съвременната селекция на високостойности и ценни индивиди изисква ефективен мениджмънт в организацията на репродуктивния процес при животните, както и оптимизиране на репродуктивните биотехнологии чрез максимално ефикасен анализ и подбор на еякулатите. Нашите познания в областта на мъжката репродуктивна биология, както и по отношение ролята на спермално плазмените протеини (СПП), са ключови при определяне функционалността на сперматозоидите. Ефективното идентифициране на оплодителния потенциал на мъжките полови клетки е актуално от гледна точка на изискването да се даде категоричен отговор на въпроса дали даден еякулат има способност да оплоди яйцеклетката. В тази насока, от изключителна важност е намирането на верен отговор на въпроса кои СПП може да бъдат използвани като маркерни молекули за оплодителен потенциал на гаметите. Биомаркери, базирани на анализ на еякулатите, могат да бъдат използвани не само за оценка на един индивид, но и за оценка на разплодните качества на различни видове.

В последните години са провеждани различни проучвания върху ролята и функцията на СПП като комплексна компонента на течната фаза на еякулата. Доказано е тяхното въздействие върху мотилитета, жизнеспособността и биологичните качества на сперматозоидите, но най-вече върху тяхната способност да оплодят яйцеклетката. Произходът на СПП е от тестисите, епидидимиса, секретите на допълнителните полови жлези, както и от секретите на каналите на мъжката пикочно-полова система. Тези протеини притежават многостранна функция и влияят директно чрез мембранната повърхност на сперматозоидите, като имат способност да предизвикват някои основни модификации в тях. Тези модификации стартират още от съзряването на сперматозоидите и въздействат до оформянето им в компетентна клетка, способна да оплоди яйцеклетката. Основната роля на СПП е, чрез сложни молекулярни и биохимични механизми, да въздействат върху способността на сперматозоидите да придобият оплодителен потенциал. Въпреки проучванията на учените до сега, все още не са напълно разкрити механизмите на трансформациите, които превръщат първоначално неподвижните и неспособни да извършат оплождане сперматозоиди в епидидимиса, в клетки с висок мотилитет след еякулация, способни чрез фузия да проникнат и оплодят ооцита.

Провеждането на съвременни протеомни и транскриптомни анализи на СПП биха дали нови насоки за изясняване механизмите на въздействие на някои специфични протеини върху оплодителния капацитет на сперматозоидите. От друга страна, възможността СПП да бъдат протектори на спермалната плазмена мембрана (ПМ) при *in vitro* съхранение и криоконсервация на гаметите също се нуждае от много изследвания и анализи. Тези въпроси представляват интерес и за настоящия дисертационен труд.

Прилагането на иновативни подходи чрез използването на биомаркерни молекули в оценката на оплодителния потенциал на гаметите ще позволи да се оптимизира и увеличи ефективността на репродуктивния процес и развъждането

на различни животински видове. Настоящата дисертационна работа ще обсъди различни аспекти на репродуктивната биология при кучетата, свързани с ролята на някои протеини от спермалната плазма (СП). Получените чрез съвременни биологични и протеомни изследвания резултати ще спомогнат да се придобие нова информация, обсъждайки по какъв начин специфични СПП повлияват върху мотилитета и оплодителната способност от една страна, а от друга - върху криотолерантността и замразяемостта на сперматозоиди, получени фракционно. Крайна цел на изследванията е разработване на успешна оптимизирана биотехнология за криоконсервация на сперма от кучета.

## **II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

Нашата хипотеза при разработването на дисертационния труд е, че фракционното получаване на еякулати осигурява биологична селекция на различните популации сперматозоиди от еякулата, както и естествена селекция на СПП по специфични характеристики, имащи отношение към биологичните параметри, оплодителната способност и криоустойчивостта на гаметите.

С настоящите изследвания се цели да се постигне оптимизиране на до сега известните биотехнологии за получаване, оценка и замразяване на еякулати от кучета, съобразно оплодителния потенциал на сперматозоидите.

Новото в разработката е, че се прилага оптимизиран технологичен подход за криоконсервация с използване на опаковка на еякулатите в по-големи обеми и модифицирана криопротективна среда при ускорено замразяване, с което се постига успешна криоконсервация. Изследванията са отговор на нарастващите нужди на практиката.

Цел на настоящия дисертационен труд е да се проучи възможността за прилагане на фракционно сепарирани еякулати, с оглед създаване на нова биотехнология за успешна криоконсервация на сперматозоиди от кучета.

За изпълнение на поставената цел си поставихме следните експериментални задачи:

- 1. Сравнителна характеристика на сперматозоиди от еякулати, получени фракционно**
  - 1.1. CASA анализ на мотилитет, кинематични параметри и площ на главичката на сперматозоиди
  - 1.2. Анализ на биологичните параметри на сперматозоидите от еякулати с добро и лошо качество на спермата
- 2. Сравнителна характеристика на спермално плазмени протеини от еякулати, получени фракционно**
  - 2.1. HPLC характеристика на протеини, съдържащи се във F1, F2 и F3
  - 2.2. SDS-PAGE характеристика на протеини, сепарирани чрез фракционно получаване на еякулати
- 3. Характеристика и идентификация чрез 2D-електрофореза на специфични протеини, съдържащи се в сепарирани спермални фракции**

4. **Проучвания върху zona pellucida прикрепящата способност на сперматозоиди, получени чрез фракционно получаване на еякулати от кучета**
  - 4.1. Сравнителен CASA анализ на биологичното и функционално състояние на сепарирани сперматозоиди в условия на *in vitro* индуцирана капацитация
  - 4.2. Получаване и морфологична оценка на яйцеклетки за използване при HZA
  - 4.3. Сравнителен анализ на Zona binding способност на сперматозоиди
5. **Криоконсервация на сперма от кучета чрез иновативен подход и прилагане на методология за високоскоростно замразяване**
  - 5.1. Подготовка, разреждане и криоконсервация на сперматозоиди чрез прилагане на ускорено замразяване
  - 5.2. Размразяване и сравнителен анализ на криотолерантността на сперматозоиди, получени фракционно

### III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

За изпълнение на така поставените задачи по настоящия дисертационен труд бяха използвани материалната база и лабораториите на Институт по биология и имунология на размножаването „Акад. Кирил Братанов” към Българска академия на науките.

Биологичните материали, използвани за експериментите, бяха осигурени от Централна ветеринарна клиника – гр. София, Софийски зоопарк и Факултет по ветеринарна медицина към Лесотехнически университет – гр. София:

1. **Семенна течност:** Общо 114 еякулата (цели и фракционирани) бяха получени от 56 полово зрели и клинично здрави кучета, на възраст от 1.5 до 12 години ( $5.07 \pm 2.44$ ) от 27 различни породи.
2. **Яйчници и яйцеклетки:** 20 яйчника бяха получени при изпълнение на планова овариохистеректомия на 10 полово зрели и клинично здрави женски кучета, от смесена порода, на възраст от 2 до 8 години ( $3.6 \pm 1.96$ ).

При изработването на дисертационния труд бяха използвани следните съвременни експериментални методи и подходи:

1. Фракционно получаване на семенна течност

За целите на настоящия дисертационен труд, семенната течност от кучета беше получавана по метода на мастурбация чрез дигитален масаж в областта на *bulbus glandis*, като цял нефракциониран еякулат или фракционно. както следва:

- F1 – Преспермална фракция (бедна на сперматозоиди);
  - F2 – Богата на сперматозоиди фракция;
  - F3 – Простатен флуид (беден на сперматозоиди).
2. Макроскопска оценка, обработка и разреждане на семенна течност
  3. Компютърно-асистиран спермоанализ (CASA)

4. Биотехнология за криоконсервация на семенна течност
5. *In vitro* капацитация на сперматозоиди
6. Морфологичен анализ на сперматозоиди чрез тристепенно оцветяване
7. Хемизона тест за прикрепяща способност на сперматозоиди към ZP (HZA)
8. Изолиране на спермална плазма
9. Молекулно-ситова високоефективна течна хроматография
10. Спектрофотометрично определяне на протеиново съдържание
11. Характеризиране на СП и СПП чрез полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE)
12. Протеомен анализ на СПП, характерни за отделните фракции на еякулата чрез двуменсионална електрофореза (2D-PAGE)
13. Сребърно оцветяване на полиакриламиден гел
14. Статистически анализи:

Статистическият анализ и графичното представяне на данните са извършени чрез Statistica v.6.0 (StatSoft, Inc). Данните са представени чрез параметрите на дескриптивната статистика: средна стойност  $\pm$  стандартна грешка (SEM); в графичните изображения допълнително е изобразено и стандартното отклонение (SD). Използвани са следните статистически методи: тест за нормалност на разпределението; one-way ANOVA; непараметричен Kruskal-Wallis тест; Student–Newman–Keuls post hoc тест; вътрегрупов корелационен анализ. Разликите между групите бяха считани за достоверни при  $p < 0.05$ . Въведени са две нива на статистическа достоверност: \* -  $p < 0.05$  и \*\* -  $p < 0.001$ .

#### IV. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

##### 1. СРАВНИТЕЛНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА СПЕРМАТОЗОИДИ ОТ ЕЯКУЛАТИ, ПОЛУЧЕНИ ФРАКЦИОННО

###### **1.1. CASA анализ на мотилитет, кинематични параметри и площ на главичката на сперматозоиди**

Следвайки хипотезата, че фракционното получаване на еякулати осигурява немеханична сепарация на отделни популации сперматозоиди и СПП по специфични биологични характеристики, във връзка с изпълнението на подзадачата бяха анализирани основните CASA параметри на свежи сперматозоиди от цели и фракционирани еякулати от кучета. Данните за стойностите на изследваните параметри са изведени на база направен анализ върху общо 307 проби свежа семенна течност, използвани за провеждане на изследванията по настоящия дисертационен труд.

Обемът и концентрацията на сперматозоидите в спермалните проби представляват интерес с оглед тяхната важност в практически и икономически аспект при получаването на дози за използване в биотехнологиите за изкуствено осеменяване (ИО) и криоконсервация на сперма от кучета. В тази насока, информацията по отношение оптималната степен на разреждане на спермата и

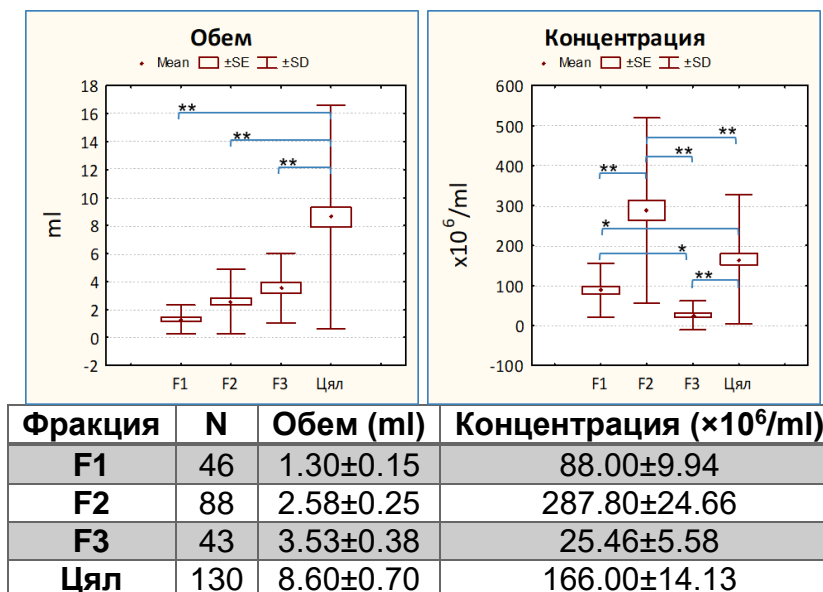


концентрацията на сперматозоидите в една осеменителна доза при този животински вид е противоречива (Silva et al., 2005).

Данните за средните стойности на обема (ml) на F1, F2, F3 и целите еякулати, както и за концентрацията на сперматозоидите ( $\times 10^6/ml$ ) в спермалните проби, са представени на Фигура 1.

По отношение обема на еякулатите естествено беше потвърдено, че целите еякулати демонстрират достоверно най-голям обем ( $8.60\pm 0.70$ ) в сравнение с отделните фракции ( $p < 0.001$ ). Въпреки наблюдаваната тенденция за най-малък обем на F1 и най-голям обем на F3, статистически достоверни различия между отделните фракции не бяха установени.

При анализиране данните за концентрацията на сперматозоидите бяха установени статистически достоверни различия между F1, F2, F3 и целите еякулати. Подобно на изследвания от други автори, беше потвърдена достоверно най-висока концентрация на сперматозоидите във F2 ( $287.80\pm 24.66$ ), в сравнение с останалите групи ( $p < 0.001$ ). Между F1, F3 и целите еякулати също бяха установени статистически значими различия, като най-ниска концентрация на сперматозоидите показва F3 ( $25.46\pm 5.58$ ), в сравнение с F1 ( $88.00\pm 9.94$ ) ( $p < 0.05$ ) и целите еякулати ( $166.00\pm 14.13$ ) ( $p < 0.001$ ). Така получените резултати демонстрират адекватна концентрация на сперматозоидите само във F2 и целите еякулати, с оглед получаване на икономически ефективен брой осеменителни дози от еякулат.

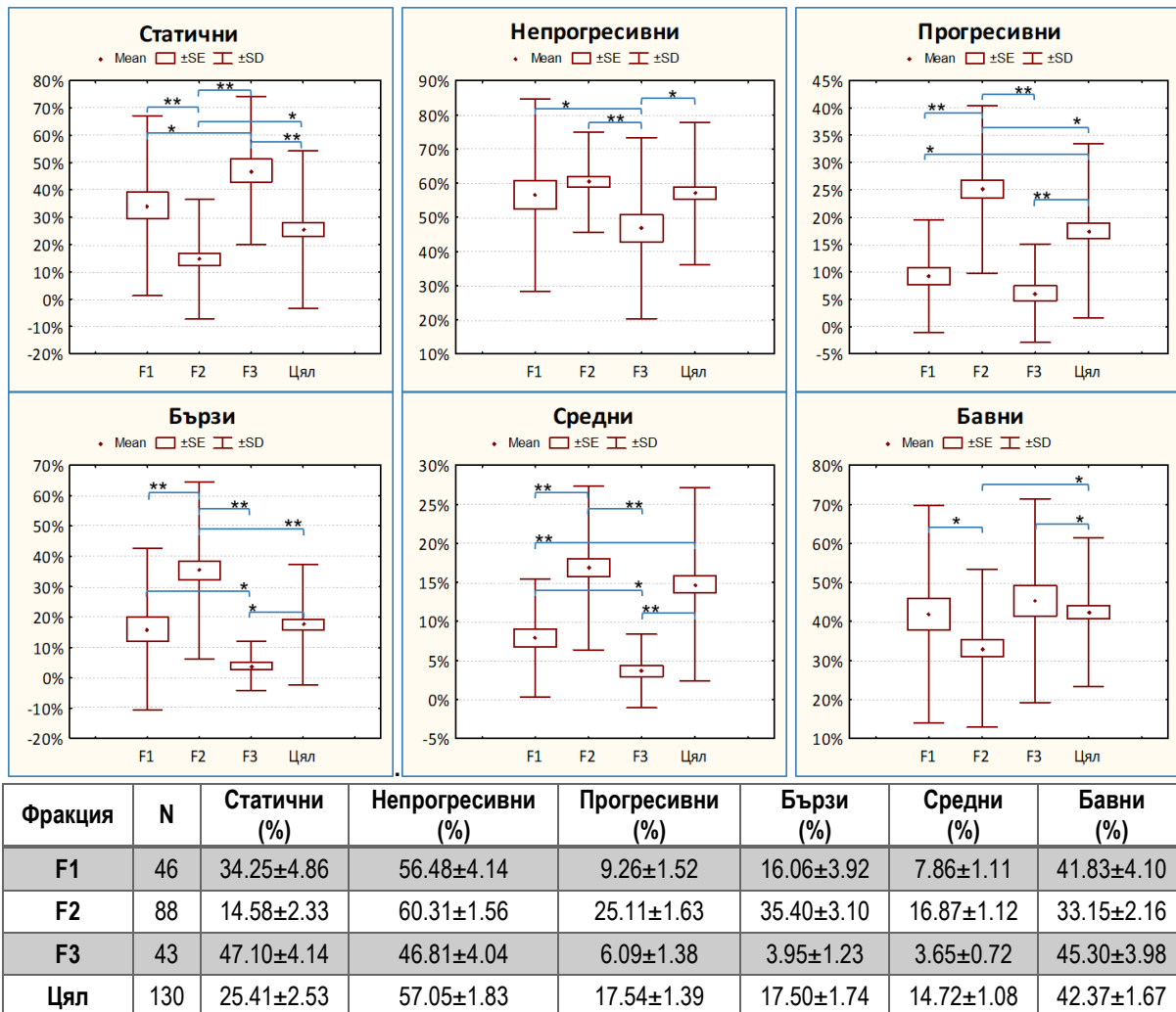


Фигура 1. Сравнителен анализ на получения обем и концентрацията на сперматозоидите в целите еякулати и отделните фракции.

Концентрацията на сперматозоидите сама по себе си е необходим, но не достатъчен показател за качество на спермалните проби. Основните биологични характеристики, прилагани като критерии за оценка на семенната течност в практиката, са подвижността и енергийна обезпеченост на сперматозоидите. За целите на настоящия дисертационен труд беше извършен сравнителен CASA

анализ на мотилитета, прогресията и скоростта на движение на сперматозоидите от целите еякулати и отделните фракции (Фигура 2).

По отношение общата подвижност, беше установен достоверно най-нисък процент статични сперматозоиди във F2 ( $14.58 \pm 2.33$ ), в сравнение с F1 ( $34.25 \pm 4.86$ ) ( $p < 0.001$ ), F3 ( $47.10 \pm 4.14$ ) ( $p < 0.001$ ) и целите еякулати ( $25.41 \pm 2.53$ ) ( $p < 0.05$ ). F3 показва достоверно най-висок процент статични сперматозоиди, в сравнение с F1 ( $p < 0.05$ ), F2 ( $p < 0.001$ ) и целия еякулат ( $p < 0.001$ ). Между F1 и целия еякулат не беше установена статистически значима разлика.



Фигура 2. Сравнителен анализ на мотилитет, прогресия и скорост на сперматозоидите от целите еякулати и отделните фракции.

В допълнение към оценката на общия и прогресивен мотилитет, незаменимо предимство на провеждането на CASA пред конвенционалния спермален анализ е възможността за оценка скоростта на сперматозоидите и разпределянето им в отделни скоростни популации съобразно стойностите на VCL. Проведеният анализ установи, че процентът бързи сперматозоиди беше достоверно най-висок във F2 ( $35.40 \pm 3.10$ ), в сравнение с останалите групи ( $p < 0.001$ ). Най-нисък процент бързи сперматозоиди показва F3 ( $3.95 \pm 1.23$ ), в сравнение с F2 ( $p < 0.001$ ), F1 ( $16.06 \pm 3.92$ ) ( $p < 0.05$ ) и целия еякулат ( $17.50 \pm 1.74$ )

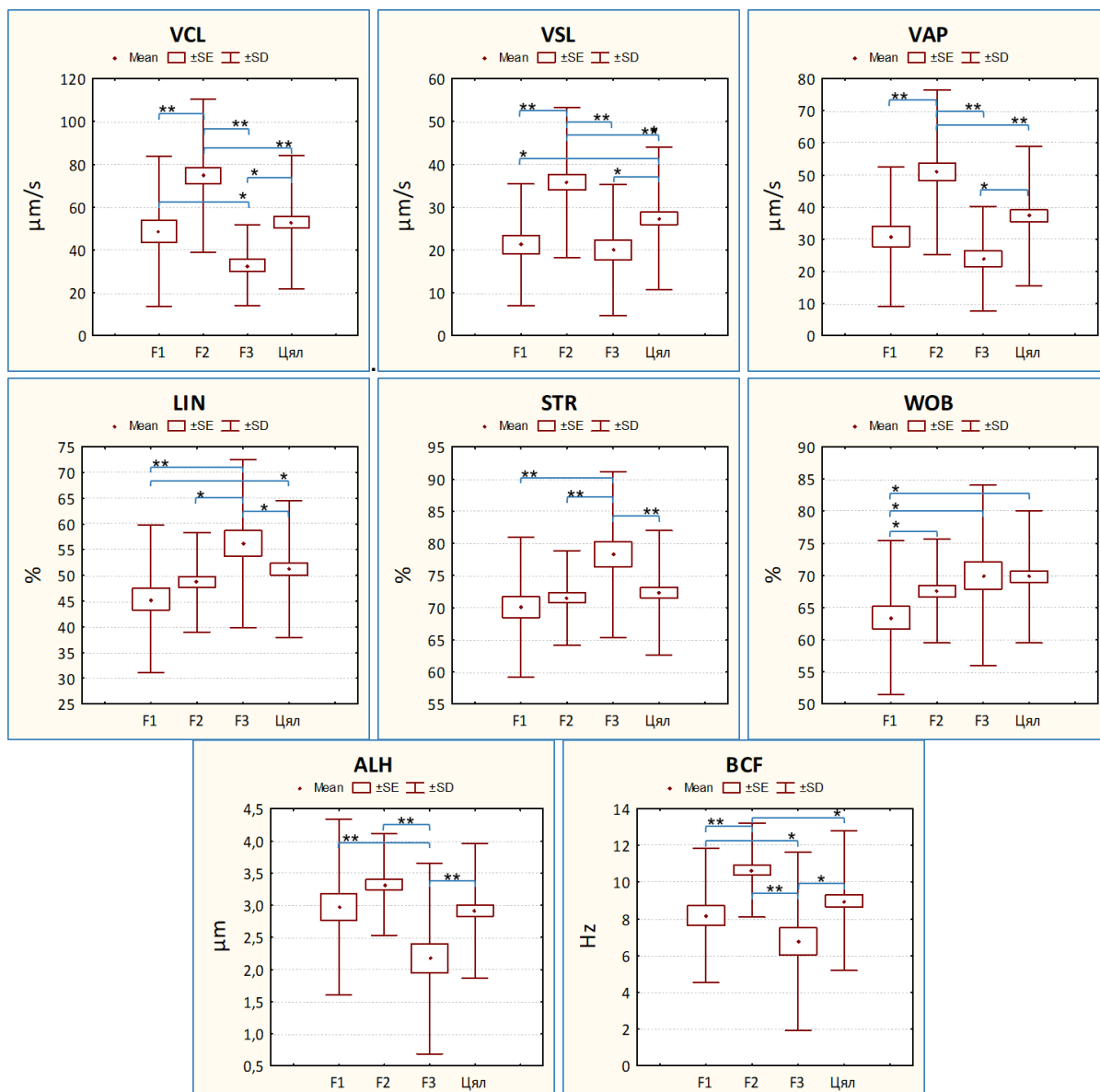
( $p < 0.05$ ). Между F1 и целия еякулат не беше установена статистически достоверна разлика.

В допълнение на това, подобна картина беше установена и по отношение на сперматозоидите със средна скорост на движение. F2 демонстрира достоверно по-висок процент сперматозоиди със средна скорост ( $16.87 \pm 1.12$ ), сравнено с F1 ( $7.86 \pm 1.11$ ) ( $p < 0.001$ ) и F3 ( $3.65 \pm 0.72$ ) ( $p < 0.001$ ). Между F2 и целите еякулати ( $14.72 \pm 1.08$ ) не беше установена достоверна разлика. F3 показва най-ниски стойности на параметъра, в сравнение с F1 ( $p < 0.05$ ), F2 ( $p < 0.001$ ) и целия еякулат ( $p < 0.001$ ). По отношение процента сперматозоиди с бавен мотилитет беше установена достоверно най-ниска стойност на параметъра при F2 ( $33.15 \pm 2.16$ ), сравнено с останалите групи ( $p < 0.05$ ). Между F1, F3 и целите еякулати не беше установена статистически значима разлика в процента бавни сперматозоиди.

Проведеният сравнителен анализ на сперматозоидите от отделните групи беше допълнен от вътрегрупов корелационен анализ на изследваните параметри. И в четирите групи беше установена статистически достоверна ( $p < 0.001$ ) силна положителна корелация между процента прогресивни и бързи сперматозоиди (F1  $r = 0.774$ ; F2  $r = 0.854$ ; F3  $r = 0.893$ ; Цял  $r = 0.731$ ). Намерената корелационна зависимост допълнително потвърждава важността на CASA показателя скорост на движение на сперматозоидите като критерий за оценка качеството на семенната течност.

За конкретизиране и потвърждаване на тези резултати бяха анализирани кинематичните параметри с отношение към жизнеспособността и енергийния капацитет на сперматозоидите от отделните фракции и целите еякулати (Фигура 3). Беше установено, че F2 демонстрира достоверно най-високи стойности на VCL ( $74.77 \pm 3.80$ ), VSL ( $35.83 \pm 1.87$ ) и VAP ( $50.87 \pm 2.73$ ), в сравнение с останалите фракции и целите еякулати ( $p < 0.001$ ). Сперматозоидите от F3 показаха тенденция за най-ниски стойности на параметрите VCL ( $32.82 \pm 2.87$ ), VSL ( $19.99 \pm 2.33$ ) и VAP ( $23.96 \pm 2.49$ ), с различни нива на достоверност.

Тези данни за бавна скорост на движение и нисък енергиен потенциал на сперматозоидите от F3 се допълват и от показанията за достоверно най-високите стойности на LIN ( $56.21 \pm 2.49$ ) и STR ( $78.25 \pm 1.96$ ) на сперматозоидите от F3, в сравнение с F1 ( $p < 0.001$ ), F2 ( $p < 0.001$ ) и целите еякулати ( $p < 0.05$ ). Доказано извънредно ниската концентрация на сперматозоидите също е фактор, имаш отношение към високите стойности на LIN и STR при F3. Слабата активност на сперматозоидите от F3 се демонстрира и посредством достоверно най-ниските стойности на ALH ( $2.17 \pm 0.23$ ), в сравнение с останалите групи ( $p < 0.001$ ). Също така, сперматозоидите от F3 демонстрираха достоверно най-ниски стойности на BCF ( $6.78 \pm 0.74$ ), в сравнение с F1 ( $8.18 \pm 0.54$ ) ( $p < 0.05$ ), F2 ( $10.66 \pm 0.27$ ) ( $p < 0.001$ ) и целия еякулат ( $9.00 \pm 0.33$ ) ( $p < 0.05$ ). По отношение ALH при F1, F2 и целите еякулати, беше установена тенденция за най-високи стойности на показателя при F2, без достоверност на разликите. Най-високи стойности на BCF бяха установени при сперматозоидите от F2, сравнено с F1 ( $p < 0.001$ ), F3 ( $p < 0.001$ ) и целия еякулат ( $p < 0.05$ ).



	N	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH ( $\mu\text{m}$ )	BCF (Hz)
F1	46	48.69 $\pm$ 5.17	21.22 $\pm$ 2.10	30.90 $\pm$ 3.19	45.42 $\pm$ 2.12	70.08 $\pm$ 1.60	63.44 $\pm$ 1.77	2.97 $\pm$ 0.20	8.18 $\pm$ 0.54
F2	88	74.77 $\pm$ 3.80	35.83 $\pm$ 1.87	50.87 $\pm$ 2.73	48.67 $\pm$ 1.03	71.50 $\pm$ 0.78	67.57 $\pm$ 0.86	3.32 $\pm$ 0.08	10.66 $\pm$ 0.27
F3	43	32.82 $\pm$ 2.87	19.99 $\pm$ 2.33	23.96 $\pm$ 2.49	56.21 $\pm$ 2.49	78.25 $\pm$ 1.96	70.02 $\pm$ 2.14	2.17 $\pm$ 0.23	6.78 $\pm$ 0.74
Цял	130	53.03 $\pm$ 2.73	27.39 $\pm$ 1.47	37.25 $\pm$ 1.90	51.24 $\pm$ 1.16	72.32 $\pm$ 0.85	69.80 $\pm$ 0.90	2.91 $\pm$ 0.09	9.00 $\pm$ 0.33

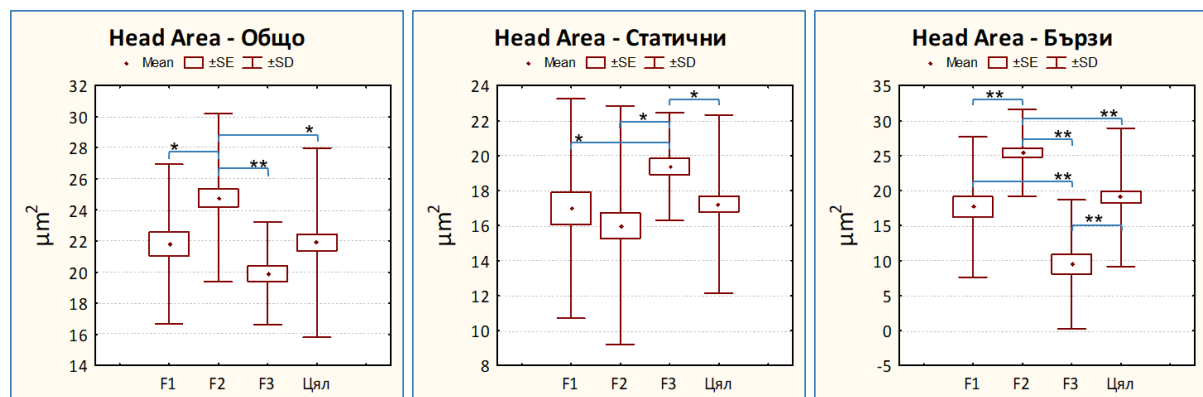
Фигура 3. Кинематични параметри на сперматозоидите от целите еякулати и отделните фракции.

Получените резултати за мотилитета и кинематичните параметри на сперматозоидите демонстрират високата жизненост и енергиен потенциал на сперматозоидите от F2, сравнено не само с F1 и F3, но и със сперматозоидите от целите еякулати. Високите стойности на общ, прогресивен и бърз мотилитет на сперматозоидите, допълнени от високите стойности на показателите VCL, VSL, VAP, ALH и BCF са критерии за добро качество и висок оплодителен потенциал на сперматозоидите. При сперматозоиди от F2 тези данни са в потвърждение на нашата хипотеза, че получаването на еякулатите чрез

фракционно разделяне, позволява сепариране на отделните популации сперматозоиди съобразно техния биологичен потенциал.

От особен интерес за нас, поради липса на такива данни в литературата, бяха резултатите по отношение площта на главичката на сперматозоидите (*head area*;  $\mu\text{m}^2$ ) от отделните фракции и целите еякулати. Параметърът беше заснет и оценен посредством CASA модула „Motility and Concentration“. Нова и интригуваща информация беше получена при сравняване на данните за средните стойности на площта на главичката, общо и диференциално между отделните скоростни групи сперматозоиди (статични, бавни, средни и бързи) (Фигура 4).

Прявят впечатление достоверно най-високите стойности на показателя при сперматозоидите от F2 ( $24.78 \pm 0.58$ ), в сравнение с F1 ( $21.82 \pm 0.76$ ) ( $p < 0.05$ ), F3 ( $19.93 \pm 0.50$ ) ( $p < 0.001$ ) и целия еякулат ( $21.91 \pm 0.53$ ) ( $p < 0.05$ ). Между F1, F3 и целия еякулат не бяха установени статистически значими разлики, въпреки тенденцията за най-малка площ на главичката на сперматозоидите от F3. При диференциален анализ на данните в отделните скоростни популации сперматозоиди може да се отбележи, че установената разлика се базира основно на достоверно по-голямата площ на главичката на бързите сперматозоиди във F2 ( $25.43 \pm 0.66$ ), в сравнение с останалите фракции и целия еякулат ( $p < 0.001$ ) от една страна, в комбинация с доказано най-високия процент бързи сперматозоиди във F2 (Фигура 2) от друга страна.



Фракция	N	Head area- Общо ( $\mu\text{m}^2$ )	Head area- Статични ( $\mu\text{m}^2$ )	Head area- Бавни ( $\mu\text{m}^2$ )	Head area- Средни ( $\mu\text{m}^2$ )	Head area- Бързи ( $\mu\text{m}^2$ )
F1	46	$21.82 \pm 0.76$	$16.97 \pm 0.92$	$20.73 \pm 0.67$	$19.80 \pm 1.30$	$17.65 \pm 1.48$
F2	88	$24.78 \pm 0.58$	$16.01 \pm 0.73$	$22.71 \pm 0.45$	$25.28 \pm 0.59$	$25.43 \pm 0.66$
F3	43	$19.93 \pm 0.50$	$19.37 \pm 0.47$	$19.14 \pm 0.62$	$12.40 \pm 1.33$	$9.47 \pm 1.40$
Цял	130	$21.91 \pm 0.53$	$17.23 \pm 0.45$	$20.85 \pm 0.49$	$20.63 \pm 0.76$	$19.04 \pm 0.87$

Фигура 4. Площ на главичката на сперматозоидите – общо за еякулатите и диференциално в отделните скоростни групи сперматозоиди (статични, бавни, средни и бързи).

В допълнение към тези данни, интересен резултат е установената достоверна ( $p < 0.001$ ) силна положителна корелация между площта на главичката на сперматозоидите и скоростния показател VCL, демонстрирана във

F1 ( $r=0.74$ ), F2 ( $r=0.716$ ) и целите еякулати ( $r=0.822$ ). Резултатът е допълнително доказателство за важността на този параметър и възможността за използването на площта на главичката на сперматозоидите като допълнителен бърз и лесен за анализиране показател за оценка качеството на спермата при кучетата.

Представените данни позволяват да се предположи, че фракционното получаване на семенна течност при кучетата позволява сепариране на сперматозоидите не само по отношение основните параметри на подвижността, но също така и на базата на специфични морфологични характеристики. Нашата хипотеза е, че разликите в площта на главичката на сперматозоидите вероятно се основава на две основни причини. От една страна, предполагаме, че е това е в резултат на нарушения в процеса на сперматогенеза или процесите на зреене на сперматозоидите. Считаме, че тези фактори вероятно са отговорни и за лошите биологични характеристики на сперматозоидите от F1 и F3. От друга страна, предполагаме, че фракционното получаване на сперма позволява сепариране също и на СПП, водещо до различия в биохимичната композиция на СП в отделните фракции. Тези различия биха могли да доведат до промени в структурата и функцията на спермалната ПМ и по този начин да дадат отражение върху размера на главичката, а от там и върху показателя площ на главичката на сперматозоидите.

От анализа на всички горепосочени резултати може да бъде направено следното заключение: Фракционното получаване на семенна течност позволява да бъде постигнато естествено сепариране на различните популации спермални клетки по техни специфични характеристики - мотилитетни и морфологични. Може да се предположи, че популацията сперматозоиди от F1 се състои основно от застаряващи ниско функционални клетки, докато F3 съдържа много малко не напълно зрели сперматозоиди, което вероятно е във връзка със значително по-лошите резултати за мотилитет и активност на гаметите от тези фракции на еякулата.

### **1.2. Анализ на биологични параметри на сперматозоиди от еякулати с добро и лошо качество**

Успешното прилагане на репродуктивните биотехнологии като цяло, и по-специално на криобиотехнологиите за съхранение на семенна течност, зависи в голяма степен от качеството на използвания семенен материал (Таблица 1).

Таблица 1. Критерии за качество на свежа сперма от кучета (Hoffmann, 2003).

Прогресивна подвижност	$\geq 75\%$
Патоморфология	$\leq 20\%$
pH	6.2-7.2
Общ брой сперматозоиди (според породата)	$\geq 0.3-1 \times 10^6$
Обем (на F2)	0.5-2.0

Основният мотилитетен показател, използван за оценяване на семенната течност в практиката, е прогресивната подвижност на сперматозоидите след еякулация. Тук е важно да се подчертае, че този

показател най-често бива оценяван окомерно чрез конвенционалните методи за анализ. Това е причина за често срещана субективна грешка и надценяване настъпателната подвижност на сперматозоидите (Lopate, 2015). Изпъкна необходимостта от оптимизиране качеството на оценката на спермата във ветеринарната практика чрез създаване и актуализиране на стандартизирани протоколи за оценка на всички параметри на спермата и качествен контрол на клиничната лаборатория (Root Kustritz, 2007). Въвеждането в практиката на CASA системи с високи нива на прецизност и надеждност дава възможност за обективна оценка подвижността на сперматозоидите и акуратно отчитане на фини отклонения от стойностите на множество различни параметри (Verstegen et al., 2002).

Във връзка с изпълнението на задачите по настоящия дисертационен труд, базирайки се на проведената първоначална CASA оценка на фракционирани и нефракционирани еякулати, изследваните спермални проби бяха разпределени в две подгрупи: с добро и с лошо качество на спермата. Като добри бяха обозначени пробите с:

- статични сперматозоиди  $\leq 30\%$ ;
- прогресивен мотилитет  $\geq 30\%$ .

Групирането на пробите беше извършено по следния начин. Първоначално, като проби с лошо качество бяха обозначени всички еякулати с повече от 30% статични сперматозоиди. След това, от оставащите проби като лоши бяха обозначени тези с по-малко от 30% прогресивни сперматозоиди. След разпределянето на изследваните проби в съответната качествена група беше установено следното съотношение на добри към лоши проби (Таблица 2):

Таблица 2. Съотношение на добри към лоши проби в рамките на F1, F2, F3 и целите еякулати.

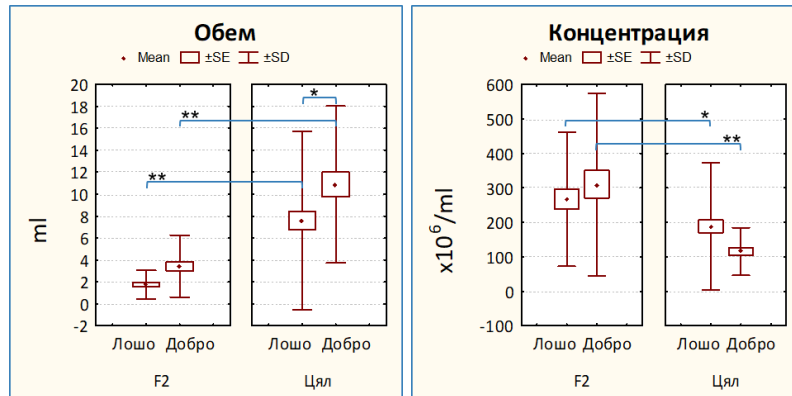
Фракция	N Лоши	N Добри	% Добри
<b>F1</b>	43	3	6.52%
<b>F2</b>	45	43	48.86%
<b>F3</b>	42	1	2.33%
<b>Цял</b>	90	40	30.77%

Установеният нисък процент на проби с добро качество във F1 и F3 беше основание последващия сравнителен анализ на сперматозоидите от двете качества да бъде проведен само с проби от F2 и целите еякулати. Бяха изследвани същите основни и специализирани CASA параметри: обем и концентрация на сперматозоидите; мотилитет, прогресия и скорост на движение; кинематични параметри; площ на главичката.

На Фигура 5 е представен сравнителният анализ на обема на еякулатите (ml) и концентрацията на сперматозоидите ( $\times 10^6/ml$ ) между пробите от F2 и целите еякулати с лошо и добро качество на спермата.

В групата на целите еякулати беше установена статистически значима разлика в обема между добрите ( $10.88 \pm 1.13$ ) и лошите проби ( $7.59 \pm 0.86$ ) ( $p < 0.05$ ).

Във F2 също се наблюдаваше тенденция за по-голям обем при добро качество на еякулатите ( $3.44 \pm 0.43$ ), в сравнение с лошите проби ( $1.76 \pm 0.19$ ) без статистическа достоверност на разликите. В групата на добрите еякулати, F2 демонстрира значително по-малък обем от целите еякулати ( $p < 0.001$ ).



Фракция	Качество	N	Обем (ml)	Концентрация ( $\times 10^6/\text{ml}$ )
F2	Лошо	45	$1.76 \pm 0.19$	$266.90 \pm 28.98$
F2	Добро	43	$3.44 \pm 0.43$	$309.67 \pm 40.43$
Цял	Лошо	90	$7.59 \pm 0.86$	$188.40 \pm 19.41$
Цял	Добро	40	$10.88 \pm 1.13$	$115.58 \pm 10.92$

Фигура 5. Сравнителен анализ на обема и концентрацията на сперматозоидите във F2 и целите еякулати с лошо и добро качество на спермата.

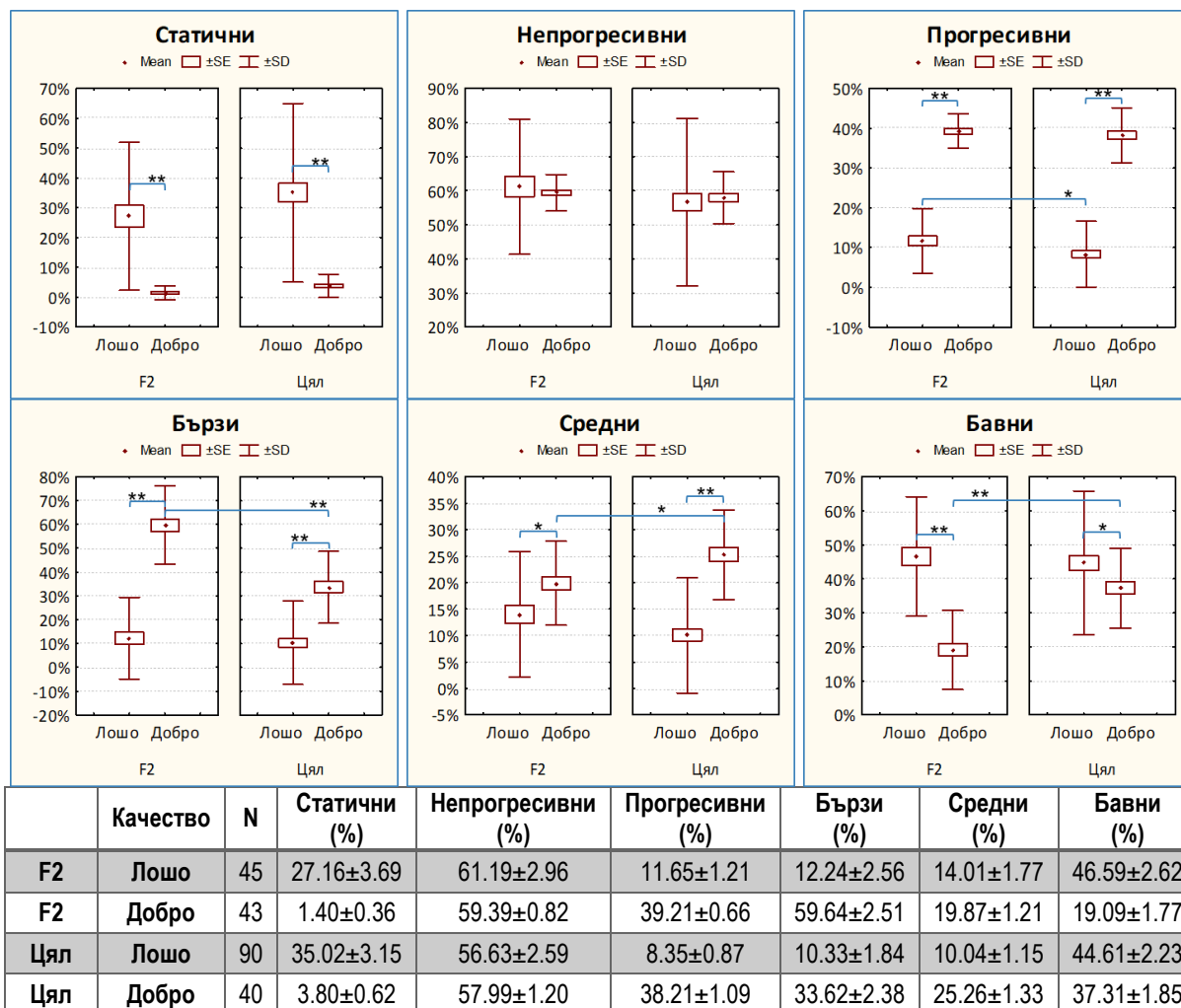
По отношение концентрацията на сперматозоидите, както във F2, така и в целите еякулати не беше установена статистически достоверна разлика между пробите с добро и лошо качество на спермата. В групата на добрите еякулати, F2 демонстрира достоверно по-висока концентрация на сперматозоидите ( $309.67 \pm 40.43$ ), в сравнение с целите еякулати ( $115.58 \pm 10.92$ ) ( $p < 0.001$ ).

Резултатът за липса на достоверна разлика в концентрацията на сперматозоидите между добрите и лошите проби отново подчертава важността и необходимостта на провеждането на по-обширен спермален анализ за оценка качеството на спермата, включващ прогресия, но също и скорост на движение на сперматозоидите. Данните от сравнителния анализ на мотилитета, прогресията и скоростта на сперматозоидите от F2 и целите еякулати с добро и лошо качество на спермата са представени на Фигура 6. Беше доказана статистически достоверна разлика ( $p < 0.001$ ) между добрите и лошите проби от F2 и целите еякулати по отношение процента прогресивни сперматозоиди, основана на използването на показателя като основен критерии за оценяване на еякулатите. Достоверна разлика между пробите с добро и лошо качество беше демонстрирана и по отношение статичните ( $p < 0.001$ ) и бързите сперматозоиди ( $p < 0.001$ ), както при F2, така и при целите еякулати.

Данните за кинематичните параметри на сперматозоидите от F2 и целите еякулати с добро и лошо качество на спермата допълнително прецизират анализа на мотилитета и скоростта на сперматозоидите (Фигура 7). Както F2, така и целите еякулати показаха достоверно по-високи стойности на VCL, VSL и



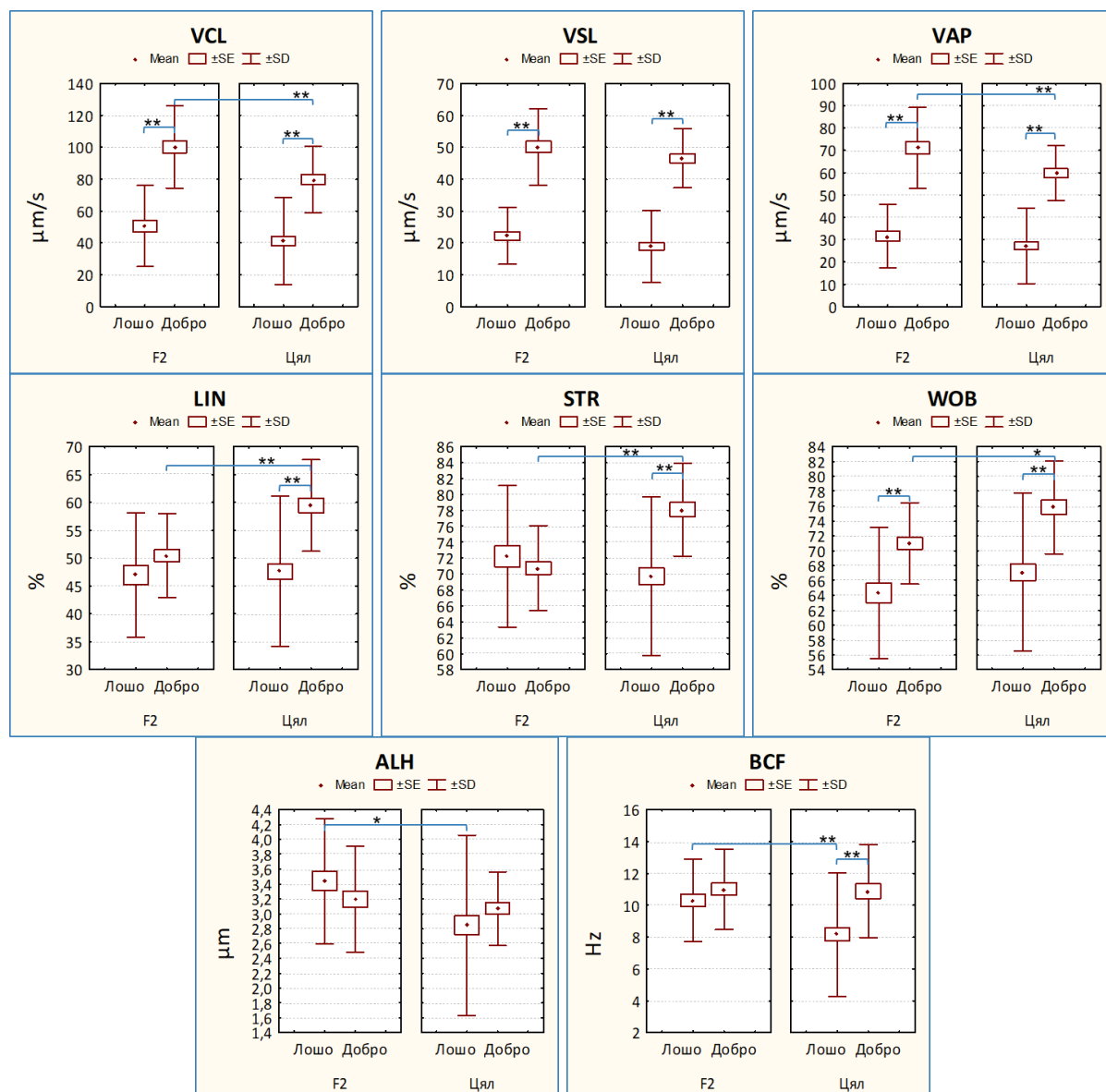
VAP в групата на пробите с добро качество на спермата ( $p < 0.001$ ) спрямо лошите. В групата на добрите еякулати беше установено, че сперматозоидите от F2 имат достоверно по-високи стойности на VCL ( $100.19 \pm 3.93$ ) и VAP ( $71.07 \pm 2.76$ ), в сравнение с целите еякулати ( $79.73 \pm 3.30$  и  $59.82 \pm 1.95$  съответно) ( $p < 0.001$ ). VSL във F2 демонстрира същата тенденция, без достоверност на разликите с целите еякулати.



Фигура 6. Сравнителен анализ на мотилитета, прогресията и скоростта на сперматозоидите от F2 и целите еякулати с добро и лошо качество на спермата.

По отношение на останалите кинематични параметри, F2 демонстрира достоверни различия между пробите с добро и лошо качество на семенната течност само в стойностите на параметъра WOB, които бяха по-високи при добрите проби ( $70.99 \pm 0.83$ ) в сравнение с лошите ( $64.30 \pm 1.31$ ) ( $p < 0.001$ ). Групата на целите еякулати показва достоверно по-високи стойности на LIN ( $59.44 \pm 1.30$ ), STR ( $78.09 \pm 0.92$ ), WOB ( $75.84 \pm 0.99$ ) и BCF ( $10.88 \pm 0.46$ ) при пробите с добро качество на спермата, в сравнение с лошите проби ( $p < 0.001$ ). От друга страна, при сравнителния анализ на пробите с добро качество на семенната течност беше установено, че F2 показва достоверно по-ниски стойности на LIN ( $p < 0.001$ ),

STR ( $p < 0.001$ ), WOB ( $p < 0.05$ ) в сравнение с целите еякулати. Водени от липсата на достоверна разлика в процента сперматозоиди с прогресивен мотилитет между добрите проби от F2 и целите еякулати, бихме могли да изкажем предположението, че обяснението на този резултат се крие във високата чувствителност на CASA метода, успяващ да засече отклонения в линейността и праволинейността на движението вследствие по-висока активност и концентрация на сперматозоидите от F2.

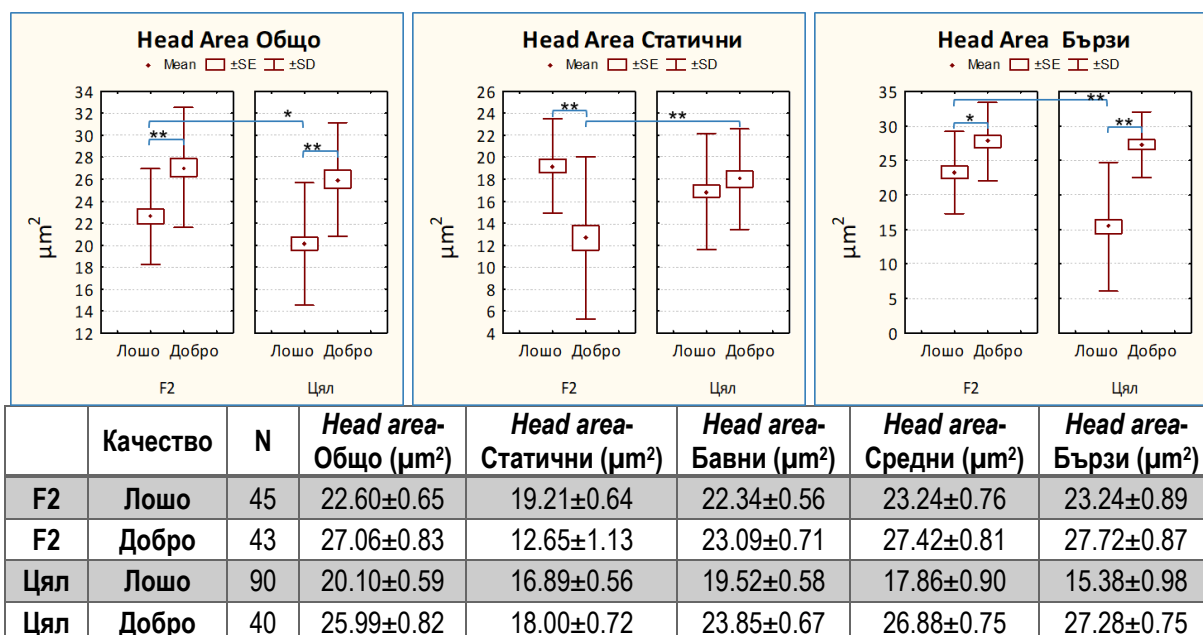


	Качество	N	VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH ( $\mu\text{m}$ )	BCF (Hz)
F2	Лошо	45	50.47 $\pm$ 3.80	22.20 $\pm$ 1.34	31.57 $\pm$ 2.13	46.98 $\pm$ 1.66	72.21 $\pm$ 1.32	64.30 $\pm$ 1.31	3.44 $\pm$ 0.13	10.32 $\pm$ 0.38
F2	Добро	43	100.19 $\pm$ 3.93	50.09 $\pm$ 1.83	71.07 $\pm$ 2.76	50.44 $\pm$ 1.15	70.76 $\pm$ 0.81	70.99 $\pm$ 0.83	3.19 $\pm$ 0.11	11.01 $\pm$ 0.39
Цял	Лошо	90	41.16 $\pm$ 2.89	18.88 $\pm$ 1.20	27.22 $\pm$ 1.78	47.60 $\pm$ 1.42	69.75 $\pm$ 1.05	67.11 $\pm$ 1.12	2.84 $\pm$ 0.13	8.16 $\pm$ 0.41
Цял	Добро	40	79.73 $\pm$ 3.30	46.54 $\pm$ 1.46	59.82 $\pm$ 1.95	59.44 $\pm$ 1.30	78.09 $\pm$ 0.92	75.84 $\pm$ 0.99	3.07 $\pm$ 0.08	10.88 $\pm$ 0.46

Фигура 7. Сравнителен анализ на кинематичните параметри на сперматозоидите от F2 и целите еякулати с добро и лошо качество на спермата.

Получените интересни резултати по отношение площта на главичката на сперматозоидите насочиха нашия интерес към сравнителен анализ на параметъра диференциално между сперматозоидите от F2 и целите еякулати с добро и лошо качество на спермата (Фигура 8).

Подобно на резултатите от предходната подзадача, тук беше установено, че сперматозоидите от еякулати с добро качество на спермата демонстрират достоверно по-голяма площ на главичката при F2 ( $27.06 \pm 0.83$ ) и целите еякулати ( $25.99 \pm 0.82$ ), в сравнение с пробите с лошо качество ( $22.60 \pm 0.65$  и  $20.10 \pm 0.59$  съответно) ( $p < 0.001$ ). Тази тенденция се запазва и диференциално в популациите на бавни, средни и бързи сперматозоиди. Между стойностите за общата площ на главичката при F2 и целите еякулати с добро качество не беше установена статистически достоверна разлика. Впечатление прави достоверно най-ниската площ на главичката в групата на статичните сперматозоиди в добрите проби от F2 ( $12.65 \pm 1.13$ ), сравнено с останалите групи ( $p < 0.001$ ). След направена справка не открихме литературни данни по въпроса и този нов резултат ни заинтригува. Считаме, че в бъдеще са необходими допълнителни изследвания, насочени към диференциален морфометричен анализ на отделните популации сперматозоиди, както и морфологична и функционална оценка на ПМ на сперматозоидите от различните групи.



Фигура 8. Сравнителен анализ на площта на главичката на сперматозоидите от F2 и целите еякулати с добро и лошо качество на спермата.

В заключение по тази подзадача, анализът на резултатите показва, че окачествяването на спермалните проби посредством определените чрез CASA обща и прогресивна подвижност на сперматозоидите позволява селектиране на проби с по-добри показатели не само по отношение на процента бързи сперматозоиди, но и показващи по-добри кинематични показатели и по-високи стойности на площ на главичката на сперматозоидите.

Така извършените окачествяване и анализ на изследваните спермални проби ни позволи да дефинираме критерии за добро качество на спермата при използване на F2 или цял еякулат чрез CASA параметрите: процент статични, прогресивни и бързи сперматозоиди, VCL, VSL VAP и площ на главичката (Таблица 3).

Таблица 3. Критерии за качество на свежата сперма при оценка чрез CASA

Параметър	F2	Цял
Статични (%)	1.40±0.36	3.80±0.62
Прогресивни (%)	39.21±0.66	38.21±1.09
Бързи (%)	59.64±2.51	33.62±2.38
VCL (µm/s)	100.19±3.93	79.73±3.30
VSL (µm/s)	50.09±1.83	46.54±1.46
VAP (µm/s)	71.07±2.76	59.82±1.95
Head area (µm <sup>2</sup> )	27.06±0.83	25.99±0.82

Също така е важно да се подчертае, че след първоначална оценка и селектиране на проби с добри качествени показатели, сперматозоидите от F2 демонстрират по-добри показатели на бърз мотилитет (% бързо подвижни, VCL, VSL, VAP) в сравнение целите еякулати.

На основание на получените резултати, ние насочихме нашите усилия към търсене на други специфични характеристики, свързани с биологичните параметри на сперматозоидите и тяхната оценка при използване в репродуктивните биотехнологии.

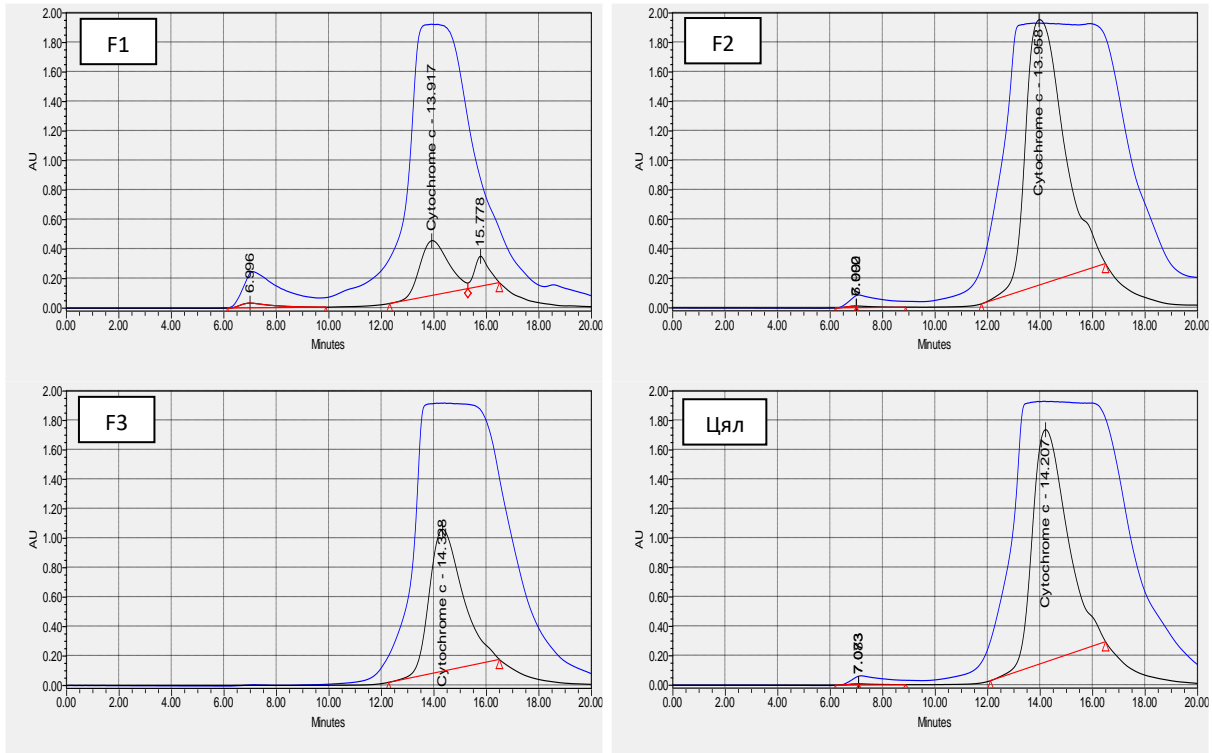
## 2. СРАВНИТЕЛНА ХАРАКТЕРИСТИКА НА СПЕРМАЛНО ПЛАЗМЕНИ ПРОТЕИНИ ОТ ЕЯКУЛАТИ, ПОЛУЧЕНИ ФРАКЦИОННО

### 2.1. HPLC характеристика на протеини, съдържащи се във F1, F2 и F3

Изследванията, проведени чрез CASA, успешно потвърдиха хипотезата, че фракционното получаване на семенна течност при кучетата осигурява немеханично сепариране на различни популации сперматозоиди въз основа на техни основни биологични показатели – концентрация, общ мотилитет, прогресия, скорост, кинематични параметри и площ на главичката. Целта на последващите анализи беше да се установи възможността за постигане на естествено сепариране на СПП посредством фракциониране на еякулатите, както и установяване връзката на специфични СПП с демонстрираните биологични характеристики на различните популации сперматозоиди. За изпълнението на тази цел бяха проведени HPLC анализ в нативно състояние и SDS-PAGE в редуциращи условия на протеините, съдържащи се в СП, изолирана от F1, F2 F3 и цели еякулати.

При сравнителния анализ на хроматограмите на СП бяха установени различия в хроматографските профили, изразени чрез степента на абсорбция и времето за задържане, отразяващи специфично количествено и качествено разпределение на протеините в отделните фракции и целите еякулати (Фигура

9). Беше демонстрирано, че в СП при кучетата се съдържат протеини и протеинови комплекси с диапазон на относително молекулно тегло (MW) от 7.8kDa до 773.6kDa, сепарирани в 5 хроматографски пика с различно проявление в отделните фракции на еякулата (Таблица 4). Прави впечатление, че СП от F1 е най-бедна в количествено, но най-богата в качествено отношение на протеини. В същото време, СП от F3 е най-бедна в качественото съдържание на протеини. Хроматограмата на СП от F2 показва, че в нея се съдържат протеини с най-голямо количествено и качествено разнообразие.



Фигура 9. HPLC характеристика на протеини, съдържащи се в СП на F1, F2, F3 и цели еякулати при  $\lambda=280$  и  $\lambda=220$ .

Таблица 4. Сравнителен анализ по MW и време за задържане на хроматографски пикове, установени в СП от F1, F2, F3 и цели еякулати.

Пикове	Време за задържане (min)	MW (kDa)	F1	F2	F3	Цял
1	7.0	773.6	+++	++	-	+
2	10.6	65.6	+	-	-	-
3	14.0	15.1	+	+++	++	+++
4	16.0	9.4	++	+++	+	++
5	18.6	7.8	+	-	-	-

СП от F1 демонстрира високо съдържание на протеини с относително MW около 773.6kDa, сепарирани в пик на 7-ма min. Количеството на тези протеини, оценено по скалата за абсорбция, беше най-високо във F1, по-ниско във F2 и целия еякулат и липсващо във F3. Най-важно различие между трите фракции беше установено при сепарирането на пиковете между 10-та и 16-та min (отговарящи на протеини с MW под 65.6kDa). Тази група протеини са най-добре

представени във F2. Слабо проявеният пик на 18-та min, съдържащ протеини с MW около 7.8kDa, беше установен като добре обособен пик само във F1.

## **2.2. SDS-PAGE характеристика на протеини, сепарирани чрез фракционно получаване на еякулати.**

На база на установените различия в количественото и качествено разпределение на протеините в отделните фракции на еякулата и за допълнително характеризирани и идентифицирани на СПП беше проведен SDS-PAGE анализ в редуциращи условия на СПП от F1, F2 и F3. В процеса на работа, като най-удачни за максимално сепарирани и визуализация на протеиновите бандове бяха установени три протокола за провеждане на електрофорезата – 12% гел с натоварване 25µg тотален протеин/дjob, последван от 10% гел със 100µg протеин/дjob за високомолекулни протеини и 15% гел при натоварване 6µg протеин/дjob за нискомолекулни протеини. На Фигури 29, 30 и 31 са представени електрофоретичните профили на СПП от отделните фракции на 4 фракционирани еякулата. Таблица 5 съдържа данните за MW на всички установени протеинови бандове в СП от кучета – общо (mean MW) и съобразно използвания протокол.

Таблица 5. Анализ на протеиновите бандове, визуализирани при трите използвани протокола за провеждане на SDS-PAGE на СП от куче

Банд	15% 6µg (kDa)	12% 25µg (kDa)	10% 100µg (kDa)	mean MW	Банд	15% 6µg (kDa)	12% 25µg (kDa)	10% 100µg (kDa)	mean MW
B 1	-	-	153.4	153.4	B 18	-	-	32.6	32.6
B 2	-	-	134.1	134.1	B 19	-	-	31.4	31.4
B 3	108.9	100.2	102.5	103.9	B 20	-	26.3	28.5	27.4
B 4	86.4	82.7	87.8	85.7	B 21	-	25.3	26.3	25.8
B 5	-	71.0	78.2	74.6	B 22	-	23.0	24.8	23.9
B 6	-	67.9	75.3	71.6	B 23	-	21.8	23.0	22.4
B 7	69.5	63.1	68.3	67.0	B 24	-	20.1	21.6	20.9
B 8	-	-	64.5	64.5	B 25	-	18.9	20.0	19.4
B 9	-	-	59.7	59.7	B 26	-	17.6	19.2	18.4
B 10	-	49.2	55.2	52.2	B 27	-	16.1	18.1	17.1
B 11	-	46.6	52.1	49.4	B 28	-	15.7	15.8	15.7
B 12	-	-	49.1	49.1	B 29	14.6	14.7	14.3	14.5
B 13	-	-	45.5	45.5	B 30	14.2	-	-	14.2
B 14	-	-	42.9	42.9	B 31	13.8	13.9	-	13.8
B 15	-	-	40.5	40.5	B 32	13.6	13.6	-	13.6
B 16	-	32.4	37.4	34.9	B 33	13.5	13.2	-	13.4
B 17	-	29.7	34.6	32.2	B 34	-	12.8	-	12.8

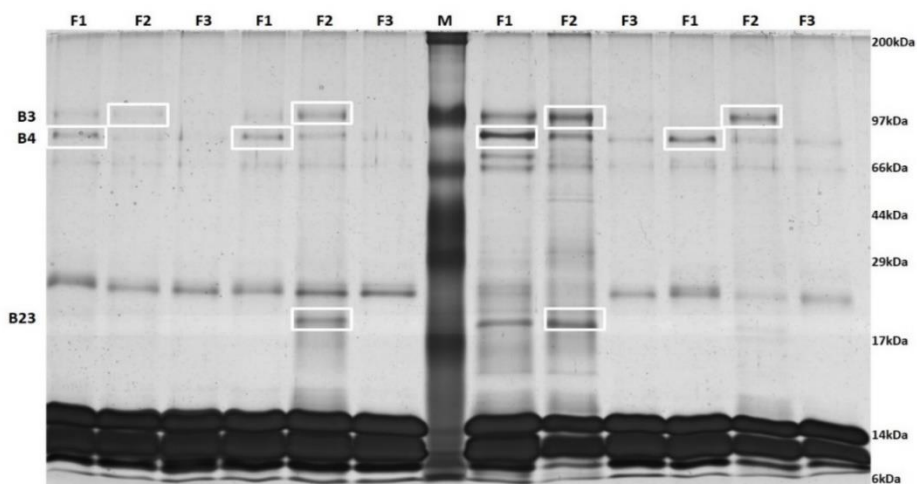
Беше установено, че при дадените експериментални условия електрофоретичният профил на СПП при кучетата демонстрира 34 протеинови банди – 8 на 15%, 23 на 12% и 29 на 10% гел. Относителните MW на проявените

бандове варираха от 153.4kDa до 12.8kDa. Нискомолекулните протеини съставляваха основна част от общия протеин, докато високомолекулните протеини присъстваха в много по-ниски концентрации. Получените резултати се доближават и са в потвърждение на изследвания, проведени от други автори, работещи в областта (Martins, 2005; De Souza et al., 2007).

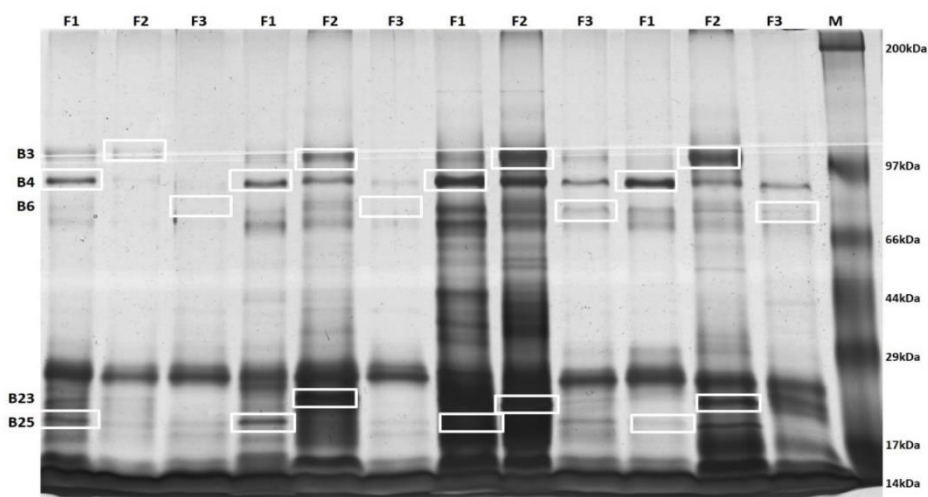
Анализът на получените резултати позволи да се определи относителното количествено разпределение на протеините в СП при кучетата. Беше демонстрирано, че основният протеин, представен в СП в най-висока концентрация, е с MW 14.5kDa (B29), последван от 13.6kDa протеин (B32), визуализирани като добре проявени бандове при натоварване 6µg тотален протеин на джоб (Фигура 12). Съществува предположение, че B29 представлява субединица на кучешката простатно-специфична аргинин естераза (CPSE) (съставена от 15 и 12-14kDa субединици) (Isaacs и Coffey, 1984; Isaacs и Shaper, 1985; De Souza et al., 2007). Този ензим съставлява около 90% от протеините на простатната секреция, повече от 30% от СПП при кучетата и е специфичен маркер за нормалното функциониране на кучешката простата (Dube, 1986; Dube, 1994). Може да се предположи, че B32 вероятно представлява по-малката субединица на CPSE. Освен тези два основни протеина, по-слабо представени, но все пак добре визуализирани при ниското натоварване на джоба, са и протеините с MW 103.9kDa, 85.7kDa, 67.0kDa, 14.2kDa, 13.8kDa и 13.4kDa. Може да се заключи, че тези 8 протеина са едни от основните СПП, представени в най-голямо количество в СП при кучетата (Фигура 12).

От друга страна, следните протеини бяха визуализирани само при 100µg протеин на джоб: 153.4kDa, 134.1kDa, 64.5kDa, 59.7kDa, 49.1kDa, 45.5kDa, 42.9kDa, 40.5kDa, 32.6kDa, 31.4kDa (Фигура 11). Тяхното количество в СП при кучетата е поне 17 пъти по-ниско, в сравнение с горепосочените осем основни протеина (Фигура 12). Останалите протеини с MW 71.0kDa, 67.9kDa, 49.2kDa, 46.6kDa, 32.4kDa, 29.7kDa, 26.3kDa, 25.3kDa, 23.0kDa, 21.8kDa, 20.1kDa, 18.9kDa, 17.6kDa, 16.1kDa, 15.7kDa, 12.8kDa се визуализират добре при 25µg протеин на джоб и имат средно представяне в СП при кучетата.

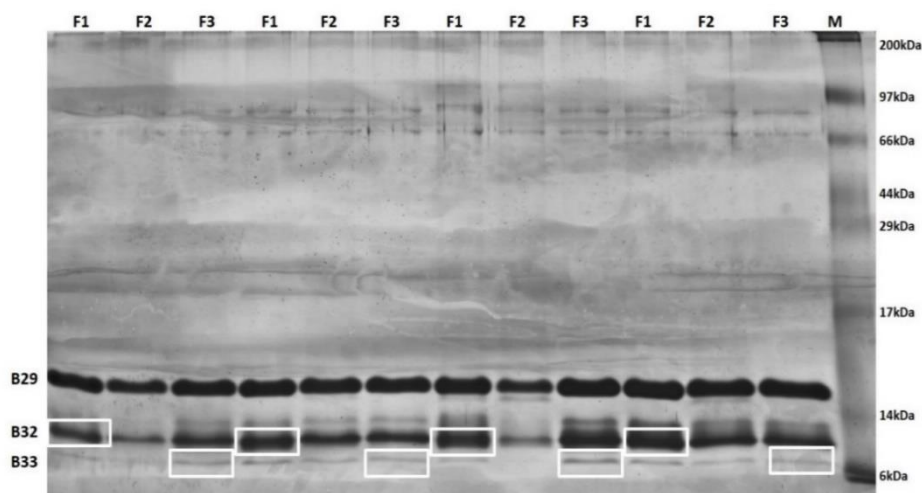
Също така е важно е да се отбележи, че освен разликите в количественото представяне на различните групи протеини в СП, анализът на електрофорезите демонстрира различно присъствие на някои протеини в отделните фракции на еякулата, както и известни индивидуални различия между отделните еякулати. Може да се подчертае преобладаващото присъствие на протеин B3 (103.9kDa) във F2, който се проявява много слабо във F1 и изцяло отсъства във F3 (Фигури 29 и 30). B23 също беше установен като протеин, характерен основно за F2 (Фигури 29 и 30). Протеини B4 и B25 бяха установени като характерни за F1, докато в останалите фракции се визуализират по-слабо или изцяло отсъстват (Фигури 29 и 30). Протеин B32 беше добре представен във всички фракции, но се забелязваше малко по-силно представяне във F1 (Фигура 12). По отношение на F3 направи впечатление много по-слабото визуализиране или липсата на протеин B6, а от друга страна – малко по-силното представяне на B33, в сравнение с F1 и F2 (Фигури 30 и 31).



Фигура 10. Электрофоретичен профил на СПП от 4 фракционирани еякулата на 12% гел при натоварване 25 $\mu$ g тотален протеин на джоб.



Фигура 11. Электрофоретичен профил на СПП от 4 фракционирани еякулата на 10% гел при натоварване 100 $\mu$ g тотален протеин на джоб.



Фигура 12. Электрофоретичен профил на СПП от 4 фракционирани еякулата на 15% гел при натоварване 6 $\mu$ g тотален протеин на джоб.



За нас основен интерес представлява функционалната роля на различните групи СПП по отношение биологичния капацитет при *in vitro* съхранение и криотолерантността на сперматозоидите. Има доказателства, че някои протеини от СП имат положителен ефект върху биологичните качества на сперматозоидите, докато други СПП негативно повлияват подвижността и преживяемостта на сперматозоидите при кучетата (De Souza et al., 2007; Neagu et al., 2011; Mogielnicka-Brzozowska et al., 2012) и други животински видове (Brandon et al., 1999; Barrios et al., 2005; Muiño-Blanco et al., 2008; Rodríguez-Martínez et al., 2011). Установяването на специфични количествени и качествени различия в разпределението на СПП в отделните фракции на еякулата при кучетата ни насочи към провеждането на допълнителни протеомни анализи чрез 2D-електрофореза.

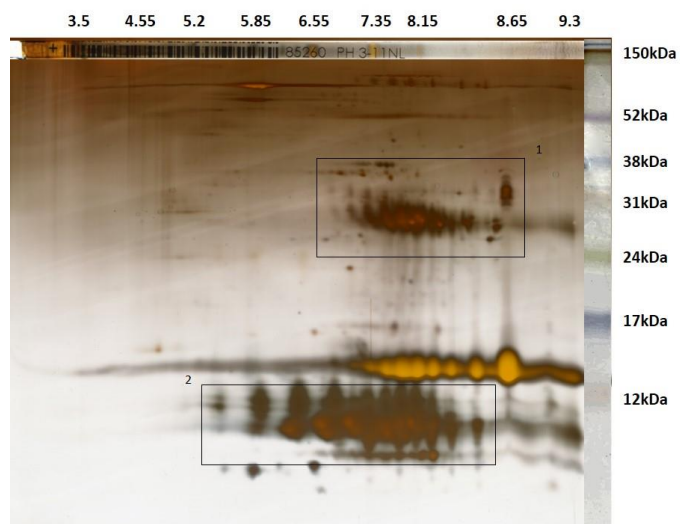
### **3. ХАРАКТЕРИСТИКА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЧРЕЗ 2D-ЕЛЕКТРОФОРЕЗА НА СПЕЦИФИЧНИ ПРОТЕИНИ, СЪДЪРЖАЩИ СЕ В СЕПАРИРАНИ СПЕРМАЛНИ ФРАКЦИИ**

Резултатите, получени от HPLC и SDS-PAGE анализите на СПП по задача 2, недвусмислено показаха наличието на разлики между отделните фракции на еякулата по отношение съдържанието на протеини в СП, както в количествено, така и в качествено отношение. Установяването на тези различия беше основание за провеждането на по-задълбочен протеомен анализ чрез двуменсионална електрофореза на СП от отделните фракции на еякулата.

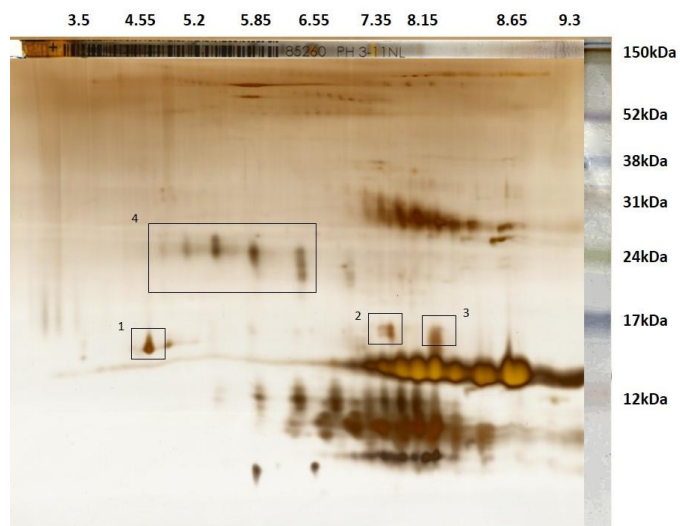
За първата стъпка от 2D-анализа- изоелектричното фокусиране (IEF), бяха използвани стрипове с широк диапазон за кисели и основни протеини и нанесени 100µg протеин/чашка. За извършване на сепарирането на фокусираните протеини по MW беше проведена вертикална SDS-PAGE на 15 % разделящ гел. Електрофоретичните профили по MW и изоелектрична точка (pI) на протеините от F1, F2 и F3 са представени на Фигури 33, 34 и 35.

След проведена визуализация на протеиновите петна чрез сребърно оцветяване, получените електрофоретични гелове ясно демонстрират наличие на различия и специфика при F1, F2 и F3. Протеомният профил на СПП, съдържащи се в отделните фракции на еякулата при кучетата, е представен на Таблица 6.

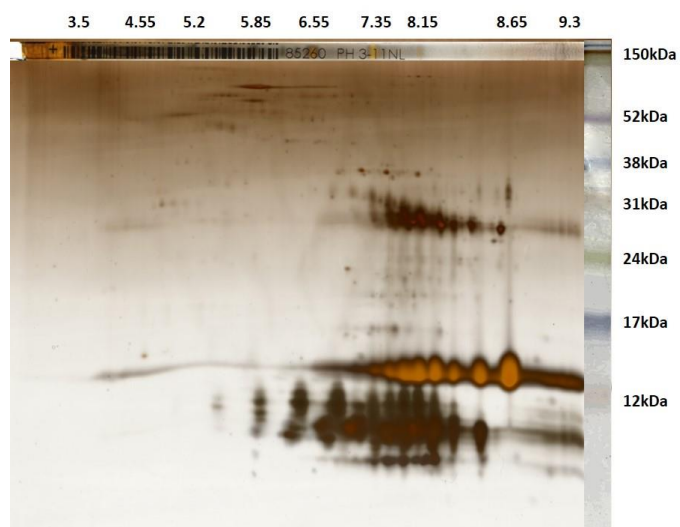
Провеждането на 2D-електрофореза на СП от отделните фракции на еякулата позволи да бъде получена богата информация. От направената литературна справка се оказа, че до момента тази информация е нова и няма данни за публикуван подробен протеомен профил по MW и pI на протеините, съдържащи се в СП при кучетата. Този факт наложи да се направи обстоен анализ на получените резултати при дадените експериментални условия. Бяха установени 453 индивидуални протеинови петна общо за трите фракции на СП. Относителното MW на проявените петна варираше от 135.3kDa до 2.0kDa; pI бяха при pH от 3.40 до 9.55 (Таблица 6).



Фигура 13. 2D-PAGE профил на СПП от F1 (X – pI; Y – MW).



Фигура 14. 2D-PAGE профил на СПП от F2 (X – pI; Y – MW).



Фигура 15. 2D-PAGE профил на СПП от F3 (X – pI; Y – MW).

Таблица 6. Протеомен 2D-профил на СПП в отделните фракции на еякулата.

MW	pI	Фракции						
135.3	6.95	F2	89.5	4.02	F3	62.7	7.21	F1, F2
130.9	7.03	F2	88.5	3.84	F2	62.5	6.76	F3
127.7	7.14	F2	88.0	8.37	F1	62.4	7.03	F1, F2
123.9	7.23	F2	88.0	8.06	F1, F2, F3	61.5	5.94	F2
120.4	5.24	F3	87.7	7.56	F2	60.1	6.11	F1, F2, F3
119.6	4.69	F2	86.7	5.18	F1, F2, F3	60.1	8.94	F2
119.6	5.35	F3	86.3	5.09	F1, F2, F3	59.5	5.45	F1, F2, F3
119.1	4.62	F2	86.3	5.29	F1, F2, F3	59.5	6.25	F2, F3
118.5	5.13	F3	86.2	8.37	F2	58.9	5.97	F1, F2, F3
116.7	4.77	F2	85.9	5.40	F1, F2, F3	58.9	5.54	F1, F3
116.5	4.83	F2	84.7	7.78	F1	57.2	5.15	F3
111.3	6.10	F2	84.7	7.99	F1	56.9	6.11	F2
108.2	6.23	F2	84.4	5.50	F2	56.6	4.98	F2, F3
104.2	6.35	F2	84.3	5.98	F1, F2, F3	56.4	4.90	F2, F3
102.1	7.72	F3	83.5	7.83	F1, F2	56.2	5.07	F2, F3
101.9	6.46	F2	83.2	7.60	F2	56.1	6.78	F2
101.2	7.34	F1, F2	83.0	7.55	F2	56.1	7.05	F2
101.2	8.83	F2	82.7	8.06	F1, F2	56.0	6.66	F1, F2
101.2	9.22	F2	82.7	8.52	F1, F3	55.9	6.92	F2
100.8	6.59	F2	81.5	8.61	F1	55.8	4.76	F1, F3
100.8	8.24	F2	81.5	8.37	F1, F2	55.5	6.55	F2
100.8	8.28	F2	80.8	3.72	F1, F3	55.4	6.28	F2
100.8	8.44	F2	80.2	9.45	F1, F3	54.5	8.14	F1
100.6	8.77	F2	79.3	6.15	F3	54.5	8.38	F1
100.4	8.19	F2	76.6	4.91	F3	54.0	6.60	F3
100.2	7.77	F1, F2, F3	75.7	7.56	F1	53.4	4.33	F3
100.0	4.06	F1	74.4	5.40	F3	53.2	4.42	F3
100.0	8.53	F2	74.1	5.66	F1, F2, F3	52.7	6.72	F2, F3
99.8	7.50	F1	74.1	5.76	F1, F2, F3	52.6	6.85	F3
99.8	8.02	F1, F2, F3	74.1	6.51	F2	52.1	9.46	F1
99.6	7.62	F1, F2	74.0	5.48	F2, F3	49.3	5.54	F1, F3
99.6	8.68	F2	73.7	6.97	F1, F3	47.7	5.74	F1, F3
99.2	7.89	F1, F2, F3	73.5	5.56	F1, F2, F3	47.7	5.87	F3
99.2	8.13	F1, F2, F3	73.3	6.66	F2, F3	47.3	5.30	F3
99.2	8.95	F2	73.2	6.58	F3	46.6	5.21	F3
99.0	6.68	F2	72.8	6.79	F1, F2, F3	45.7	5.71	F3
98.6	6.80	F2	72.8	7.18	F1, F3	45.3	7.94	F1
97.4	5.16	F3	71.9	6.92	F2	44.7	5.43	F1
96.8	5.31	F3	69.5	7.06	F1, F2	44.7	6.01	F3
96.8	5.43	F3	69.2	5.96	F1, F2, F3	44.3	5.34	F1
96.2	4.17	F3	68.7	5.39	F3	43.2	6.13	F3
95.7	9.45	F1, F3	68.2	5.27	F3	42.8	6.41	F3
94.5	4.83	F2	68.1	7.17	F1, F2	42.4	6.78	F3
93.1	7.24	F1, F2	66.1	7.30	F2	42.2	7.65	F1
92.2	4.97	F2, F3	66.0	7.37	F3	41.6	7.20	F3
90.4	7.76	F1	65.6	7.18	F3	40.2	8.36	F1
90.0	7.62	F1, F3	64.7	7.03	F3	40.0	7.97	F1
89.9	4.20	F2	63.8	6.09	F3	38.6	6.41	F3
89.7	7.44	F1, F2	63.6	5.84	F3	36.0	8.87	F2
89.7	7.83	F1, F3	63.6	5.95	F3	35.9	8.80	F2
89.5	7.98	F1	63.4	6.63	F3	35.8	5.10	F3
			62.9	6.50	F3	35.4	4.97	F3

35.1	7.49	F1, F2
35.1	7.39	F1, F2
35.1	7.64	F1
35.0	7.25	F1, F2
35.0	7.32	F1, F2
35.0	7.52	F3
34.9	7.57	F1, F3
34.8	8.87	F2
34.2	8.05	F3
33.9	7.29	F1, F2, F3
33.7	7.49	F2, F3
33.6	7.74	F1, F3
33.5	8.75	F1
33.4	7.57	F1, F3
33.3	5.76	F1, F3
33.2	6.83	F1
33.2	6.95	F1
33.0	7.18	F1
33.0	7.04	F1, F3
33.0	7.91	F1, F2, F3
32.8	7.31	F1, F2, F3
32.7	4.08	F3
32.2	7.62	F1, F3
31.9	8.81	F1, F3
31.6	5.89	F3
31.2	5.66	F3
31.0	5.46	F1
30.7	8.82	F1, F2, F3
30.6	8.08	F2
30.3	8.09	F3
30.0	6.94	F1, F3
30.0	7.98	F1
29.9	7.16	F1, F2, F3
29.9	4.76	F2
29.7	8.53	F1, F2, F3
29.6	8.34	F1
29.5	7.37	F1, F2, F3
29.4	5.40	F1
29.2	8.81	F1, F2, F3
28.8	7.50	F1, F2, F3
28.6	7.58	F1, F2, F3
28.6	5.08	F1
28.5	4.76	F1, F2, F3
28.5	4.90	F1, F2, F3
28.2	7.73	F1, F2, F3
28.1	4.66	F3
27.9	8.83	F1, F3
27.8	7.37	F1, F2, F3
27.8	7.92	F1, F2, F3
27.7	7.17	F1, F2, F3
27.5	5.59	F3
27.5	7.50	F1, F2, F3
27.5	6.97	F1, F3

27.4	7.58	F1, F2, F3
27.3	5.89	F3
27.3	7.73	F1, F2, F3
27.2	5.91	F1
27.2	8.04	F1
27.1	7.92	F1, F2, F3
27.1	8.30	F3
27.0	8.12	F2
27.0	8.37	F3
27.0	6.18	F3
27.0	8.45	F3
27.0	8.46	F1
27.0	8.51	F3
26.9	8.22	F3
26.7	5.31	F3
26.7	5.45	F3
26.7	5.63	F3
26.7	8.71	F1
26.6	7.41	F1, F2, F3
26.6	7.85	F1, F2, F3
26.5	7.95	F1, F2, F3
26.5	7.59	F1, F2, F3
26.5	7.77	F1, F2, F3
26.4	8.62	F1
26.4	8.66	F3
26.4	8.36	F3
26.3	4.52	F3
26.3	8.15	F1, F2, F3
26.3	8.29	F1, F2, F3
26.2	8.47	F1, F2, F3
26.2	8.86	F1, F2, F3
26.2	4.27	F3
26.1	8.98	F1, F2
26.1	8.06	F1
26.1	4.08	F3
26.0	8.65	F2
26.0	9.20	F3
26.0	8.75	F1, F2, F3
26.0	9.37	F3
26.0	8.67	F3
26.0	9.28	F3
25.9	9.47	F1, F2, F3
25.7	7.04	F1
25.5	7.29	F1
25.4	7.14	F1
25.3	6.04	F2
25.3	6.98	F1
25.3	8.05	F2
25.2	8.37	F1, F2, F3
25.2	6.87	F1
25.1	6.47	F1
25.1	5.48	F2
25.1	8.66	F1, F2, F3

25.1	8.76	F1, F2, F3
24.9	7.33	F1
24.4	4.81	F2
24.3	5.11	F2
24.3	7.26	F1
24.2	5.49	F2
24.2	6.59	F2
24.1	5.99	F1, F2
24.0	5.00	F1
23.9	8.51	F1, F3
23.9	7.81	F3
23.9	8.72	F1, F3
23.9	7.94	F1, F3
23.8	7.80	F1
23.8	8.13	F3
23.8	8.34	F3
23.6	6.58	F2
23.3	7.15	F1, F2, F3
22.9	7.16	F2
22.8	8.04	F3
22.7	7.75	F1, F2, F3
22.6	6.61	F2
22.5	7.18	F2
22.5	7.21	F3
22.5	7.84	F1
21.7	7.39	F3
21.7	7.54	F3
21.7	7.85	F3
21.7	7.97	F3
21.6	8.28	F3
21.6	8.53	F3
21.4	8.85	F3
21.0	7.62	F1, F3
20.9	7.85	F3
19.1	7.40	F1, F3
19.1	7.64	F1, F2, F3
19.1	7.25	F3
19.0	7.52	F1, F2, F3
19.0	7.80	F3
18.8	8.12	F1, F2, F3
18.7	6.74	F1
18.7	7.10	F2, F3
18.6	7.39	F3
18.5	5.98	F2
18.4	7.63	F1, F2, F3
18.4	7.22	F3
17.7	8.09	F2
17.4	7.32	F1, F2
17.4	4.86	F2
17.3	7.15	F1
17.1	4.73	F1
17.0	4.36	F2
16.8	4.57	F2, F3

16.3	7.27	F1, F2, F3
16.0	3.70	F2
15.3	6.99	F1, F2, F3
15.3	7.20	F1, F2, F3
15.2	6.75	F1
15.2	5.96	F1, F3
15.2	6.75	F2, F3
15.1	7.41	F1, F2, F3
14.8	7.58	F1, F2, F3
14.6	7.75	F1, F2, F3
14.6	7.92	F1, F2, F3
14.6	8.09	F1, F2, F3
14.5	8.29	F1, F2, F3
14.4	3.94	F1, F2, F3
14.4	8.54	F1, F2, F3
14.4	8.85	F1, F2, F3
14.3	3.68	F1
14.2	4.24	F3
13.9	3.40	F2
13.6	9.48	F1, F2, F3
13.5	6.56	F1, F2, F3
13.3	7.00	F1, F2, F3
12.4	6.08	F1, F2, F3
12.3	6.59	F1, F2, F3
12.1	8.42	F1, F2, F3
12.1	7.01	F1, F2, F3
12.0	7.39	F1, F2, F3
12.0	7.57	F1, F2, F3
12.0	7.91	F1, F2, F3
11.9	7.75	F1, F2, F3
11.8	8.09	F1, F2, F3
11.3	5.53	F1, F2, F3
11.0	6.09	F1, F2, F3
10.9	6.57	F1, F2, F3
10.8	7.01	F1, F2, F3
10.8	7.93	F1, F2, F3
10.8	9.28	F1, F2, F3
10.7	8.49	F1
10.7	7.41	F1, F2, F3
10.7	7.59	F1, F2, F3
10.6	8.09	F1, F2, F3
10.5	8.27	F1, F2, F3
10.5	7.23	F1, F2, F3
10.5	7.73	F1, F2, F3
10.0	5.53	F1, F3
9.8	8.52	F1
9.6	7.03	F1, F2, F3

9.6	8.10	F1, F2, F3
9.6	6.58	F1, F2, F3
9.5	6.07	F1, F2, F3
9.5	7.41	F1, F2, F3
9.5	7.58	F1, F2, F3
9.4	7.75	F1, F2, F3
9.4	7.92	F1, F2, F3
9.3	9.23	F1, F3
9.2	9.39	F1, F3
9.1	8.52	F1
9.1	6.91	F1, F2, F3
9.1	7.25	F1, F2, F3
9.1	9.53	F1, F3
8.8	8.29	F1, F2, F3
8.7	6.06	F1, F3
8.2	6.48	F1, F2, F3
8.2	7.16	F1, F2, F3
8.1	6.79	F1, F2, F3
8.0	8.69	F1
8.0	8.37	F1
7.8	7.51	F1, F2, F3
7.8	7.91	F1, F2, F3
7.7	8.09	F1, F2, F3
7.7	8.66	F1, F2
7.6	7.74	F1, F2, F3
7.6	8.28	F1, F2, F3
7.5	8.55	F1, F2, F3
7.5	8.73	F3
7.4	5.54	F1
7.3	8.99	F1, F2, F3
7.3	6.01	F1, F3
7.2	6.42	F1, F2, F3
6.8	9.40	F1, F3
6.7	7.27	F1, F2, F3
6.7	9.28	F1, F2, F3
6.6	8.70	F3
6.6	7.78	F1, F2, F3
6.6	8.56	F1, F2, F3
6.6	6.54	F1, F2, F3
6.6	7.58	F1, F2, F3
6.5	8.09	F1, F2, F3
6.5	8.66	F2
6.5	6.92	F1, F2, F3
6.4	8.30	F1, F2, F3
6.4	9.54	F1, F2, F3
6.3	7.42	F1, F2, F3
5.9	8.45	F2

5.7	8.65	F2
5.6	7.04	F1
5.6	8.06	F2
5.6	7.90	F1
5.6	8.06	F1
5.6	8.08	F3
5.5	7.74	F2
5.4	7.38	F1
5.4	8.30	F1, F3
5.4	8.31	F2
5.4	7.44	F3
5.4	8.56	F3
5.3	7.77	F3
4.9	6.01	F3
4.7	6.58	F1
4.7	8.53	F1
4.7	8.20	F1
4.7	8.93	F1, F2, F3
4.7	8.35	F1
4.6	7.00	F1, F2, F3
4.6	7.22	F1, F2, F3
4.6	6.84	F1, F3
4.5	7.58	F1, F2, F3
4.5	7.88	F1, F2, F3
4.5	7.41	F1, F2, F3
4.5	7.75	F1, F2, F3
4.5	8.09	F1, F2, F3
4.5	8.28	F2, F3
4.5	7.98	F1, F2, F3
4.4	9.27	F1, F2, F3
4.3	8.58	F2, F3
3.7	6.31	F1
3.7	9.42	F1, F3
3.7	6.75	F1, F2, F3
3.6	8.53	F1
3.4	7.92	F1, F2
3.4	9.27	F1, F3
3.4	6.00	F1, F2, F3
3.4	9.55	F1, F2, F3
3.3	7.72	F1
3.3	8.05	F3
3.3	8.26	F1
3.3	8.57	F3
2.3	9.31	F1
2.0	6.83	F1

С прецизността на методиката за провеждане на 2D-PAGE, така получените резултати потвърдиха отново нашите данни от предварително проведения SDS-PAGE анализ. Доказа се, че нискомолекулните протеини (под 14.5kDa) в СП при кучетата съставляват основна част от общия протеин, докато

високомолекулните протеини присъстват в значително по-ниски концентрации и тези данни важат за всяка една от трите фракции на еякулата.

Също така, проведенният 2D-PAGE анализ в настоящите изследвания позволи да се допълнят нашите знания с нова и непубликувана до сега информация. Беше доказано, че СП при кучетата съдържа основно алкални протеини, придвижващи се при IEF към алкалния край на стрипа (-) и имащи *pI* при *pH* над 5.85. Получените данни са с важно научно-приложно значение и могат да намерят място при провеждане на бъдещи протеомни анализи на СПП при кучетата, с оглед подбор на подходящи стрипове и подобряване на протокола за провеждане на IEF и двумерна електрофореза.

След направен обстоен анализ, още беше установено, че най-добре представената група протеини в СП при кучетата са тези с *MW* 14.5kDa. Тези протеини се визуализират като минимум 10 протеинови петна с *pI* при *pH* между 6.75 и 9.48. От направена справка с други автори (Mogielnicka-Brzozowska et al., 2015), може да се предположи, че в тази група влизат някои цинк-свързващи протеини (9.3–19.0kDa и *pI* при *pH* 6.1–10.0) и по-конкретно цинк-свързващи полипептиди с *MW* от 11.7 до 15.4kDa и *pI* при *pH* 6.8–8.7. Тази група протеини са идентифицирани чрез маспектрометрия и е доказано, че тук се съдържа CPSE - главният протеолитичен ензим в кучешката СП, който е специфичен маркер за нормалното функциониране на простатната жлеза.

За нас от основен интерес беше установяването на протеини, специфични за отделните спермални фракции, и техните различия в количествено и качествено отношение в СП. Анализът на данните позволи да се идентифицират общо 453 протеинови петна. От тях, 70 протеина бяха визуализирани само във F1, други 74 - само във F2, а 95 протеина бяха проявени само във F3.

Също така, бяха установени различия в количественото проявление (интензитета) на много от протеиновите петна, общи за отделните фракции. Такива различия бяха установени например в групата на протеините с *MW* между 38kDa и 24kDa и *pI* при *pH* между 6.55 и 8.65 (Фигура 13 [1]). Интензитетът на проявяване и броят индивидуални протеинови петна беше видимо най-голям при F1, по-слабо проявен при F3 и най-слаб при F2. Подобна тенденция беше установена и в групата на протеините с *MW* под 12kDa и *pI* между 5.2 и 8.65 (Фигура 13 [2]). Друг явен пример за различното количествено представяне на индивидуални протеини между отделните фракции са протеините 16.8kDa с *pI* 4.57, 18.8kDa с *pI* 8.12 и 19.1kDa с *pI* 7.64, представени много по-добре във F2, в сравнение с F1 и F3, където бяха слабо визуализирани (Фигура 14 [1], [2] и [3]).

Нашето внимание беше насочено към изследване на група протеини, която е специфична и много добре представена в СП от F2 на еякулата при кучетата и не се установява във F1 и F3 (Фигура 14 [4]). Резултатите от анализа показаха, че тя се състои от следните добре визуализирани 8 протеина:

- 24.4kDa с *pI* 4.81;
- 24.3kDa с *pI* 5.11;
- 25.1kDa с *pI* 5.48;
- 24.2kDa с *pI* 5.49;
- 24.1kDa с *pI* 5.99;
- 22.6kDa с *pI* 6.61;
- 23.6kDa с *pI* 6.58;
- 24.2kDa с *pI* 6.59.

Беше направен опит за първоначална идентификация на тези осем протеина при кучета чрез разширено търсене по MW и pI в Proteome-pI: Proteome Isoelectric Point Database (<http://isoelectricpointdb.org>) (Kozlowski, 2016). При зададени следните параметри на разширено търсене: MW 22-26kDa и pI при pH 4-7, беше установено, че търсената група протеини в базата данни обхваща общо 687 протеина. От тях 573 бяха обозначени като “нехарактеризирани протеини”. Останалите 114 бяха идентифицирани като специфични протеини. При разглеждане на данните за тези 114 протеина, не бяха установени такива, които да имат отношение към СП. Тези резултати ни позволяват да твърдим, че намерените от нас осем протеина, специфични за F2, вероятно попадат в групата на неизследвани до момента “нехарактеризирани протеини”. Тези данни дават основание за провеждане на бъдещи изследвания чрез масспектрометрия за точно характеризирани и идентифицирани на новооткритите от нас протеини.

Като заключение по тази задача, може да се обобщи, че протеините съдържащи се в СП от трите фракции на еякулата показват различия в количествено и качествено отношение. Съществуват специфични протеини, които са характерни за всяка отделна фракция. Наличието на осем специфични за F2 протеини представлява интерес по отношение тяхното идентифициране и оценка на ролята им в репродуктивния процес при кучетата. Може да се изкаже предположение, че тази група протеини най-вероятно оказват благоприятен ефект по отношение биологичните характеристики на сперматозоидите, които са доказани с изследванията по Задачи 1 и 2 на настоящата дисертация.

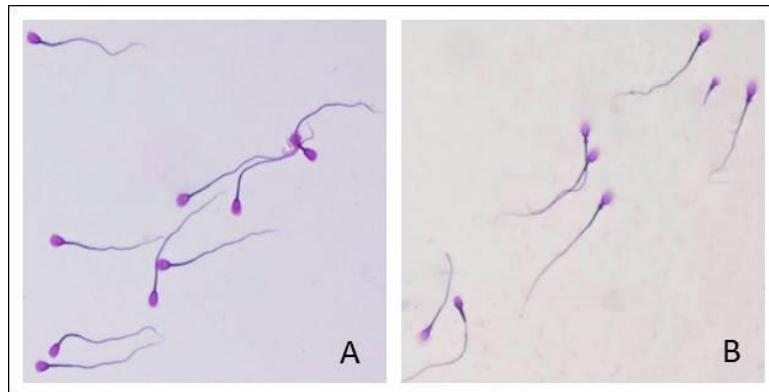
Като продължение на досегашните изследвания, усилията ни бяха насочени към проучвания върху оплодителния потенциал на сперматозоидите от F2.

#### **4. ПРОУЧВАНИЯ ВЪРХУ ZONA RELUCIDA ПРИКРЕПЯЩАТА СПОСОБНОСТ НА СПЕРМАТОЗОИДИ, ПОЛУЧЕНИ ЧРЕЗ ФРАКЦИОННО ПОЛУЧАВАНЕ НА ЕЯКУЛАТИ ОТ КУЧЕТА**

##### ***4.1. Сравнителен CASA анализ на биологичното и функционално състояние на сепарирани сперматозоиди в условия на *in vitro* индуцирана капацитация***

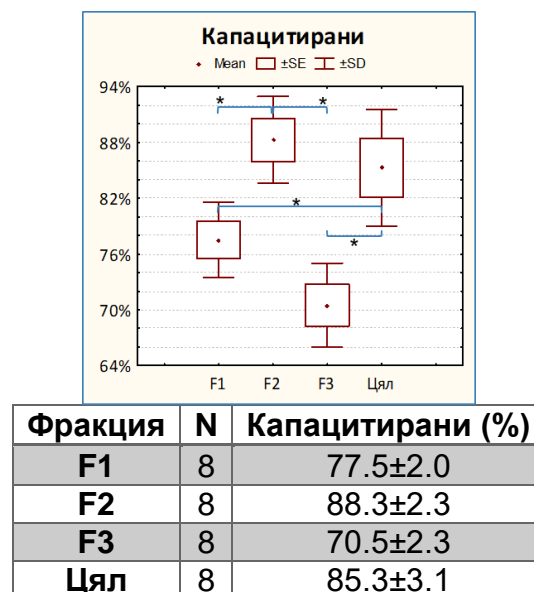
За целите на задачата, капацитация на сперматозоидите в *in vitro* условия беше индуцирана с оглед последващо провеждане на сравнителен анализ на прикрепящата способност към ZP на сперматозоидите от отделните фракции (тест) и целите сборни еякулати (контрола). Присъствието на капацитиращи фактори (албумин, калциеви и хидрогенкарбонатни йони) в средата за капацитация, използвана за настоящите експерименти, индуцира промени в структурата на ПМ на сперматозоидите. Тези промени се изразяват в увеличаване на неопределеността на фосфолипидните молекули, довеждащо до нарушаване на липидната асиметрия. Това е феномен, който от физиологична гледна точка е необходим за повишаване афинитета на клетките с интактни акрозоми към свързване със ZP. Капацитационният статус на сперматозоидите

беше определен чрез оценка морфологичното състояние на сперматозоидите и настъпилите изменения, визуализирани като набъбване на акрозомата (Фигура 16).



Фигура 16. Състояние на акрозомата при сперматозоиди преди (А) и след (В) индуцирана капацитация (40x) (тристепенно оцветяване, Nikolov et al., 1991).

Морфологичният анализ на сперматозоидите преди и след индуцирана капацитация демонстрира, че повечето сперматозоиди капацитират успешно, но бяха наблюдавани специфични особености в отделните групи. F2 демонстрира достоверно най-висок процент сперматозоиди с набъбнали акрозоми ( $88.3 \pm 2.3$ ) в сравнение с F1 ( $77.5 \pm 2.0$ ) и F3 ( $70.5 \pm 2.3$ ) ( $p < 0.05$ ). Между F2 и целия еякулат ( $85.3 \pm 3.1$ ) не бяха установени достоверни разлики (Фигура 17).

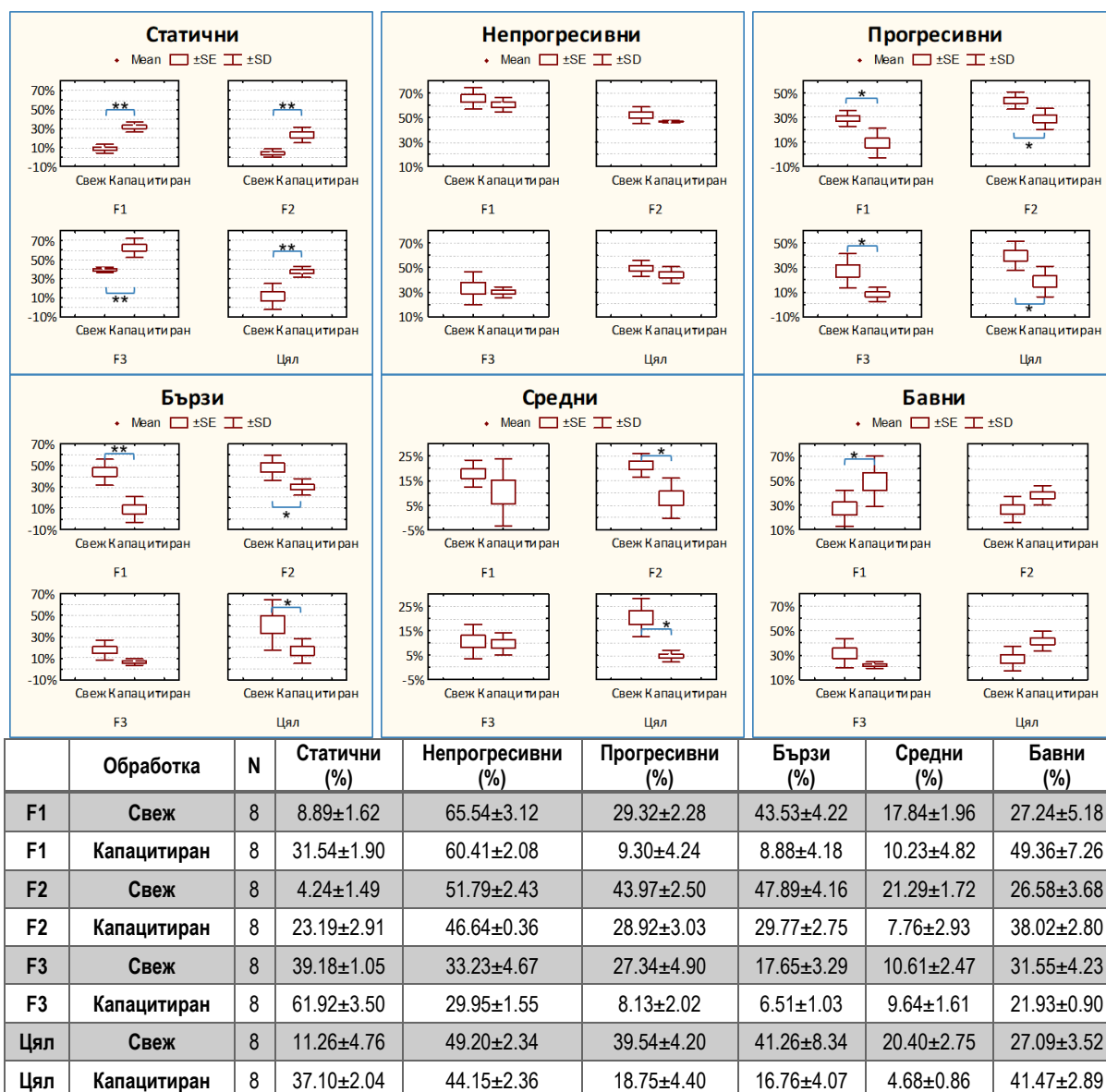


Фигура 17. Сравнителен анализ на способността за капацитация на сперматозоидите от отделните фракции и целия еякулат.

Беше извършен сравнителен анализ на резултатите от CASA по отношение на мотилитета и скоростта на движение на сперматозоидите преди и след инкубация в условия за *in vitro* индуциране на капацитация. Беше установено, че след капацитацията настъпват специфични промени в мотилитета и скоростните параметри в популациите сперматозоиди от



отделните фракции и целите еякулати. Въпреки, че беше регистрирано статистически достоверно увеличаване на процента статични сперматозоиди при всички изследвани групи ( $p < 0.001$ ) и достоверно намаляване на процента сперматозоиди с прогресивен мотилитет ( $p < 0.05$ ) (Фигура 18), относно скоростта на движение се установиха следни особености, а именно: при сперматозоидите от F1 беше наблюдавано най-изразено понижаване на бързата подвижност ( $p < 0.001$ ), докато при F2, F3 и целия еякулат този показател е с незначителни изменения.



Фигура 18. Сравнителен анализ на мотилитет, прогресия и скорост на фракционно получени сперматозоиди от кучета преди и след инкубация за *in vitro* индуциране на капацитация.

За нас важни бяха резултатите относно поведението на сперматозоидите от F2, където след инкубацията в средата за капацитация беше установена в най-малка степен загуба на общата подвижност с достоверно най-нисък процент

статични сперматозоиди ( $23.19 \pm 2.91$ ) ( $p < 0.05$ ), при липса на достоверна разлика на данните преди капацитацията на F2 спрямо F1 и целия еякулат (Фигура 18).

Установено беше, че след капацитацията F2 запазва тенденцията за най-висок процент сперматозоиди с прогресивен мотилитет ( $28.92 \pm 3.03$ ), сравнено с F1 и F3 ( $p < 0.05$ ) и целия еякулат (без достоверност на разликата). Като допълнение на тези данни се явяват разликите, установени по отношение на бързата подвижност на сперматозоидите, където F2 демонстрира в най-висока степен запазване на енергийния потенциал на сперматозоидите след капацитацията ( $29.77 \pm 2.75$ ) в сравнение с F1, F3 и сборния еякулат ( $p < 0.05$ ) при близки по стойност данни и липса на достоверна разлика преди капацитацията на F2 спрямо F1 и целия еякулат.

Резултатите от CASA и морфологичния анализ на сперматозоидите от отделните фракции и сборния еякулат демонстрираха, че с настоящите експерименти беше постигната успешна *in vitro* индуцирана капацитация на сперматозоидите от изследваните проби. Може да се твърди, че сперматозоидите, съдържащи се в отделните фракции на еякулата показват различия в основните параметри на мотилитета. Най-същественото в проявата на специфично поведение на сперматозоидите от трите фракции в условия на *in vitro* индуцирана капацитация, беше запазването в достоверно най-висока степен на стойностите на мотилитета и скоростта при сперматозоидите от F2, в сравнение с тези от F1, F3 и целия еякулат.

#### **4.2. Получаване и морфологична оценка на яйцеклетки за използване при HZA.**

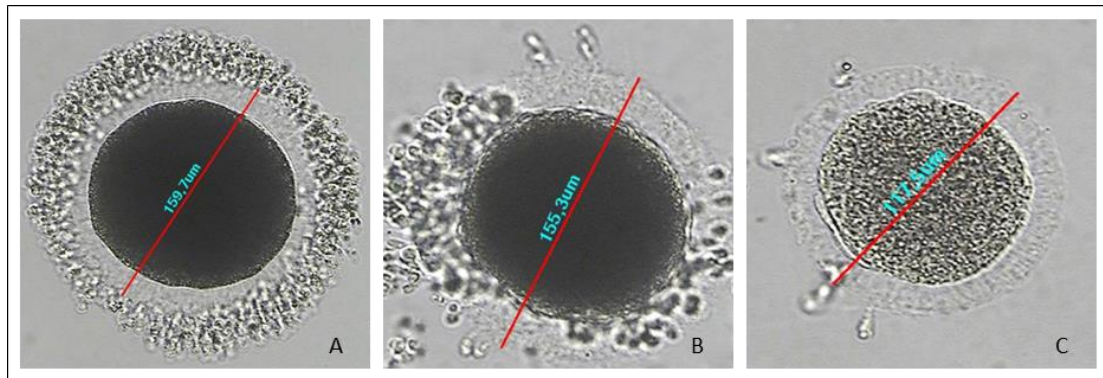
В изпълнение на задача 4.2 по настоящия дисертационен труд бяха обработени 20 яйчника от 10 полово зрели и клинично здрави женски кучета, от смесена порода, на възраст 2-8 години. Кумулус-ооцитни комплекси (COCs) бяха изолирани чрез пункция и слайсинг на замразено-размразени кучешки яйчници, като от един яйчник бяха получени от 10 до 40 яйцеклетки, в зависимост от индивида и състоянието на яйчниците. За провеждането на HZA бяха използвани само добре съхранени яйцеклетки, оценени и селектирани на следния морфологичен принцип:

- оценка на целостта на слоя кумулусни клетки;
- оценка на формата и размера на яйцеклетката;
- оценка състоянието на ооплазмата.

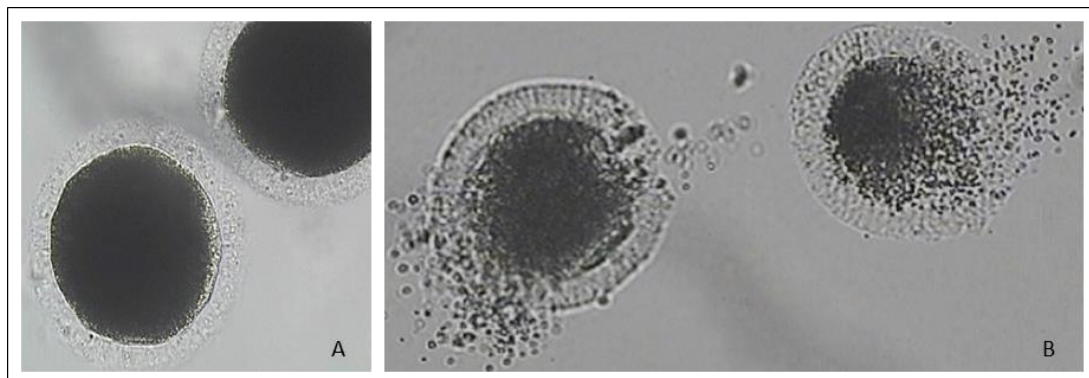
Събраните COCs бяха окачествени в следните три класа (Hewitt и England, 1998), представени на Фигура 19:

- Клас 1 – съхранена форма на ооцита, тъмна хомогенна ооплазма, напълно обградени от поне един плътен слой кумулусни клетки;
- Клас 2 – светла ооплазма, не напълно оградени от кумулусни клетки;
- Клас 3 – бледа ооплазма, често променена форма и малък размер на ооцита, без кумулусни клетки.

За настоящите експерименти бяха използвани само Клас 1 COCs, поради добре съхранена структурна и морфологична цялост на ZP, съгласно морфологичните характеристики.



Фигура 19. Оценка на COCs – Клас 1 (А); Клас 2 (В) и Клас 3 (С).



Фигура 20. Ооцити след вортекс с отстранени кумулусни клетки (А); Хомоложни хемизони след разрязване на ооцит (В).

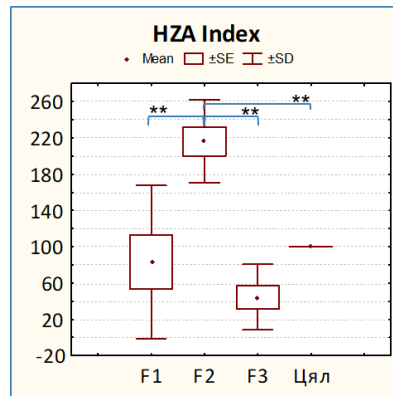
На Фигура 20 [А] са представени яйцеклетки след събаряне на кумулусните клетки чрез вортекс. Манипулацията е трудоемка, но и води до частична загуба на яйцеклетки. В резултат от общо получени 350 яйцеклетки, за нашите експерименти успешно бяха събрани и селектирани по морфологични характеристики 115 яйцеклетки. Една част бяха използвани на момента за последващи манипулации. Друга част бяха замразявани в пайети (по 5 ооцита в пайета, всеки в индивидуална капка среда за замразяване) и съхранявани за последваща употреба при  $-150^{\circ}\text{C}$  в биофризер.

За изпълнение на задачата, в последващите стъпки от експеримента беше приложено разрязване на две на така изолираните и обработени яйцеклетки (Фигура 20 [В]).

#### **4.3. Сравнителен анализ на Zona binding способност на сперматозоиди**

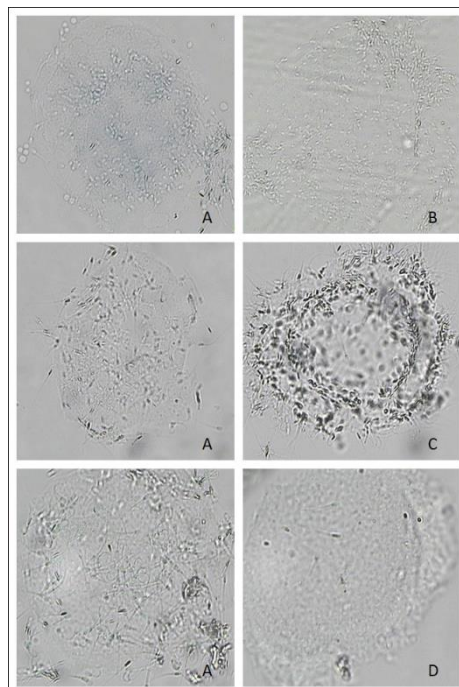
Данните от сравнителния анализ на резултатите от HZA (представени чрез хемизона индекс HZI) са демонстрирани на Фигура 21. Проведеният HZA беше извършен с цял сборен еякулат като контролна проба и трите фракции (F1, F2, F3) като тестови проби (Фигура 22).

Анализът на резултатите от HZA демонстрира различия в прикрепящата способност към ZP на сперматозоидите от контролните и опитни проби. При сравняване на данните беше установено, че сперматозоидите от F2 демонстрират достоверно най-висок HZI ( $216.11 \pm 16.17$ ,  $p < 0.001$ ), в сравнение със сперматозоидите от F1 ( $83.21 \pm 29.88$ ) и F3 ( $44.6 \pm 12.79$ ), както и тези от контролния еякулат (100.0) (Фигура 21).



Фракция	N	HZI
F1	8	83.21±29.88
F2	8	216.11±16.17
F3	8	44.6±12.79
Цял (Контрола)	8	100.0

Фигура 21. HZI на фракционно получени кучешки сперматозоиди.



Фигура 22. HZA на фракционно получени кучешки сперматозоиди: Сборен еякулат - Контрола (A); F1 (B); F2 (C); F3 (D).

В заключение, установените различия в прикрепящата способност към ZP на сперматозоидите в отделните фракции и целия еякулат демонстрират, че

получаването на сперма чрез мануално фракционно разделяне, позволява естествено сепариране на сперматозоиди, както и на СПП по техни съществени биологични качества, като съществен белег е оплодителния потенциал на гаметите. Известно е, че в еякулата могат да се диференцират различни популации сперматозоиди, съобразно тяхната зрялост, морфологична цялост и съхранен енергиен капацитет. Комплексният анализ на резултатите от CASA за мотилитет на сперматозоидите, доказването на специфични СПП, способността за капацитация и за прикрепяне на сперматозоидите към ZP, всички тези специфични индикатори за оплодителен потенциал на сперматозоидите взети заедно позволяват да се направи обобщаващ извод. При F2 беше доказан значително по-голям брой сперматозоиди със съхранен потенциал да оплодят яйцеклетката, в сравнение с тези данни за F1, F3 и целия еякулат.

Получените резултати от изследванията по Задачи 1, 2, 3 и 4 ни позволиха да разработим технологичен подход за криоконсервация на сперма от кучета чрез прилагане на ускорено замразяване.

## **5. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ НА СПЕРМА ОТ КУЧЕТА ЧРЕЗ ИНОВАТИВЕН ПОДХОД И ПРИЛАГАНЕ НА МЕТОДОЛОГИЯ ЗА ВИСОКОСКОРОСТНО ЗАМРАЗЯВАНЕ**

### ***5.1. Подготовка, разреждане и криоконсервация на сперматозоиди чрез прилагане на ускорено замразяване***

Криоконсервацията на сперма от кучета представлява интерес за практиката от гледна точка на видовите специфики на гаметите и все още не добре решените въпроси, касаещи средите за замразяване, обема и опаковката, степента на разреждане, температурните режими на замразяване и размразяване, които са основни елементи на цялостната биотехнология за дълготрайно съхранение на спермата.

В настоящите изследвания насочихме своите усилия за подобряване на постигнатото до тук и оптимизиране на криобиотехнологията за замразяване на сперма от кучета. До момента наш колектив е работил в тази насока и на база на постигнатото се основава и разработката по настоящия дисертационен труд (Иванова, 2010).

Въз основа на резултатите от предходните изследвания, експериментите и анализите по настоящата задача бяха проведени със сперматозоиди от F2 (тест) и цели еякулати (контрола) с доказано добро качество на свежата сперма.

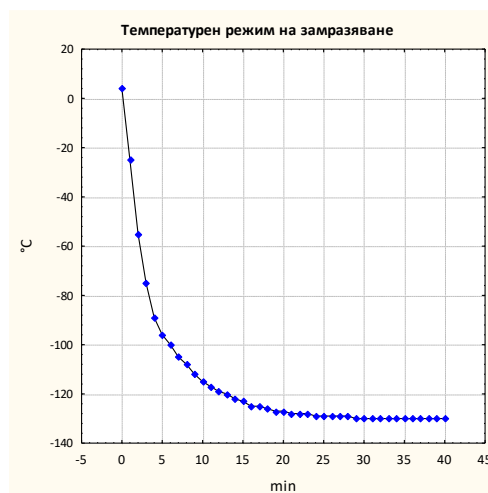
Същността на разработения от нас нов оптимизиран подход при замразяването на сперма от кучета се състои в:

- немеханично елиминирание на биологично непълноценни клетки и на СПП от F1 и F2;
- прилагане на модифицирана криопротективна среда KGT;
- използване на опаковка за замразяване в по-голям обем (500µl);
- прилагане на ускорено замразяване без допълнително използване на парите на течен азот или CO<sub>2</sub>.

Данните за постигнатото немеханично сепариране на сперматозоиди и СПП чрез мануално фракционно получаване на еякулатите са представени в резултатите от изследванията по задачи 1, 2, 3 и 4.

В настоящите изследвания се приложи нов подход за криоконсервация, чрез замразяване на спермата в хоризонтално разположени криофиолки и обем от 500 $\mu$ l. Разреждането на спермата с модифицирана криопротективна среда KGT се извършва в съотношение от 1:2 до 1:4 за постигане на крайна концентрация на сперматозоидите 200-300 $\times 10^6$ /ml (т. е. 100-200 $\times 10^6$  подвижни сперматозоида в доза от 500 $\mu$ l). Като нова среда за замразяване беше предложена среда KGT (модифицирана среда по Rota et al., 1995). Замразяването се извърши чрез оптимизиран и ускорен подход без допълнително използване на парите на течен азот или CO<sub>2</sub> при използване на криофризер с температура -150°C.

Температурната схема (скорост на замразяване) при използвания от нас метод за криоконсервация на семенна течност от кучета е представен на Фигура 23 и Таблица 7.



Фигура 23. Термограма на скоростта на понижаване на температура при приложеното ускорено замразяване.

Понижаването на температурата на спермалните проби в криофиолките стартира от +4°C (температурата на пробите след еквилибрация) и достига до -130°C за период от 29min. Средната скорост на понижаване на температурата за целия период беше 4.6°C/min. Скоростта на замразяване беше най-висока в началото на процеса и постепенно понижаваше своите стойности с напредване на замразяването на пробите (Таблица 7).

В рамките на първите две минути от поставянето на пробите в биофризер на -150°C скоростта на понижаване на температурата отчете максимални стойности от 29.5°C/min., като за около 3.3 min беше достигната температурата от -80°C. Бързото достигане до тази температура е от особена важност, тъй като при нея приключва критичния етап на кристализация на свободната извънклетъчна и вътреклетъчна вода и се достига до пълна анабиоза на спермалните клетки.

Таблица 7. Данни за измерената скорост на понижаване на температурата при използвания подход за ускорено замразяване.

min	°C	°C/min
0	4	-
1	-25	29
2	-55	30
3	-75	20
4	-89	14
5	-96	7
6	-100	4
7	-105	5
8	-108	3
9	-112	4
10	-115	3
11	-117	2
12	-119	2
13	-120	1
14	-122	2
15	-123	1
16	-125	2
17	-125	0.5
18	-126	0.5
19	-127	1
20	-127	0.5
21	-128	0.5
22	-128	0.33
23	-128	0.33
24	-129	0.33
25	-129	0.2
26	-129	0.2
27	-129	0.2
28	-129	0.2
29	-130	0.2
30	-130	0
31	-130	0
32	-130	0
33	-130	0
34	-130	0
35	-130	0
36	-130	0
37	-130	0
38	-130	0
39	-130	0
40	-130	0

Снижаването на температурата до  $-130^{\circ}\text{C}$  градуса беше по-плавно и забавено. Първоначално температурата от  $-100^{\circ}\text{C}$  беше достигната на 6-та min от поставянето на пробите на  $-150^{\circ}\text{C}$ , със средна скорост на понижаване на температурата  $8.4^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . На 13-та min беше постигната температура от  $-120^{\circ}\text{C}$ . Средната скорост на понижаване на температурата през този 7-минутен период беше  $2.9^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Температурата от  $-130^{\circ}\text{C}$  беше достигната за още 16min със средна скорост  $0.6^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

За нашите цели особено важно беше постигането на високоскоростно понижаване на температурата в началните минути на замразяването, с оглед избягването на основните увреждащи клетките фактори в процеса на криоконсервация - образуването на хиперосмотични разтвори, възникването на рязък осмотичен градиент и дехидратация на клетките. Известно е, че на базата на основни физико-химични закони при снижаването на температурата и вследствие свойството на водата да замръзва в чист вид се наблюдава хиперконцентриране на разтворите. Това оказва пагубно въздействие върху мембранните структури на сперматозоидите. Вследствие тяхното действие се наблюдава разтваряне на мембранните липиди, липопротеини и денатурация на мембранните протеини. Също така, вследствие възникването на осмотичен градиент се предизвиква поток на свободна вода в посока извън клетката и нейната последваща дехидратация. Освен това, някои от основоположниците на криоконсервацията на клетки считат, че при загубата на свързаната вода се нарушават структурата и функциите на макромолекулите със силно негативен ефект върху метаболитните процеси в клетките след размразяване (Осташко, 1978). С настоящите изследвания и приложения нов подход на замразяване се цели снижаване на деструктивното действие на осмотичния шок върху гаметите, с постигането на възможно най-бързо постигане на температура  $-80^{\circ}\text{C}$ . Всеизвестно е, че колкото по-бавно се развиват тези процеси, толкова по-продължително е времето за действие на увреждащите фактори и нарушенията в клетъчните структури и функции

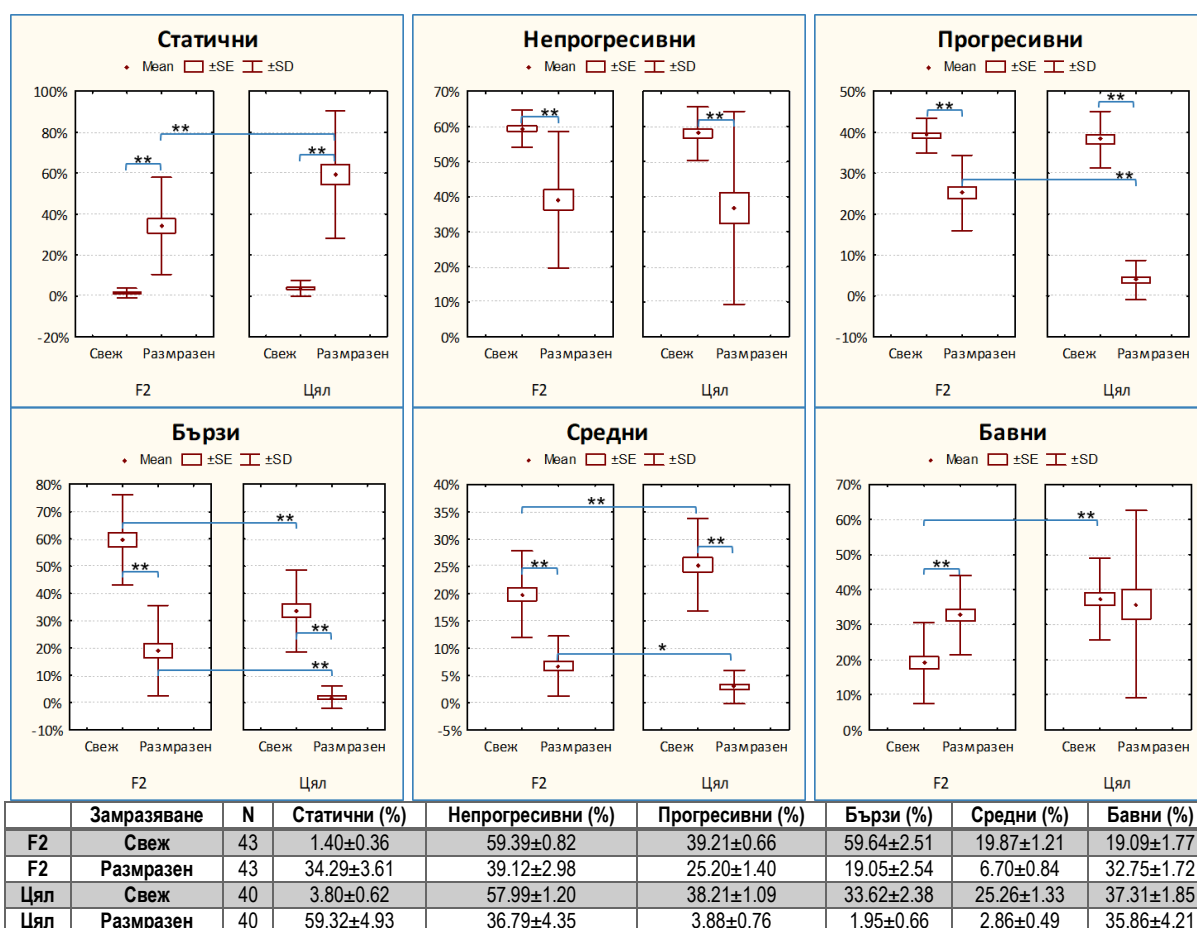
са по-значителни. Посредством приложеното ускорено замразяване беше осигурен бърз преход на клетките от частична към пълна анабиоза и максимално



кратко време за действие на основните увреждащи фактори при криоконсервация – образуване на хиперосмотични разтвори, осмотичен градиент и дехидратация на клетките.

### 5.2. Размразяване и сравнителен анализ на криотолерантността на сперматозоиди, получени фракционно.

Данните от проведения сравнителен CASA анализ на мотилитета, прогресията и скоростта на движение на сперматозоидите от F2 и целите еякулати преди и след замразяване са представени на Фигура 24. По отношение общия мотилитет на сперматозоидите след размразяване беше установен достоверно по-нисък процент статични сперматозоидите след размразяване при F2 ( $34.29 \pm 3.61$ ;  $p < 0.001$ ), в сравнение с целите еякулати ( $59.32 \pm 4.93$ ). Важно е да се отбележи липсата на достоверна разлика при статичните сперматозоиди в използваните проби с добро качество на спермата от F2 ( $1.40 \pm 0.36$ ) и цели еякулати ( $3.80 \pm 0.62$ ) преди провеждането на криоконсервация. Не беше установена достоверна разлика в процента непрогресивни сперматозоиди между двете групи преди и след криоконсервация.

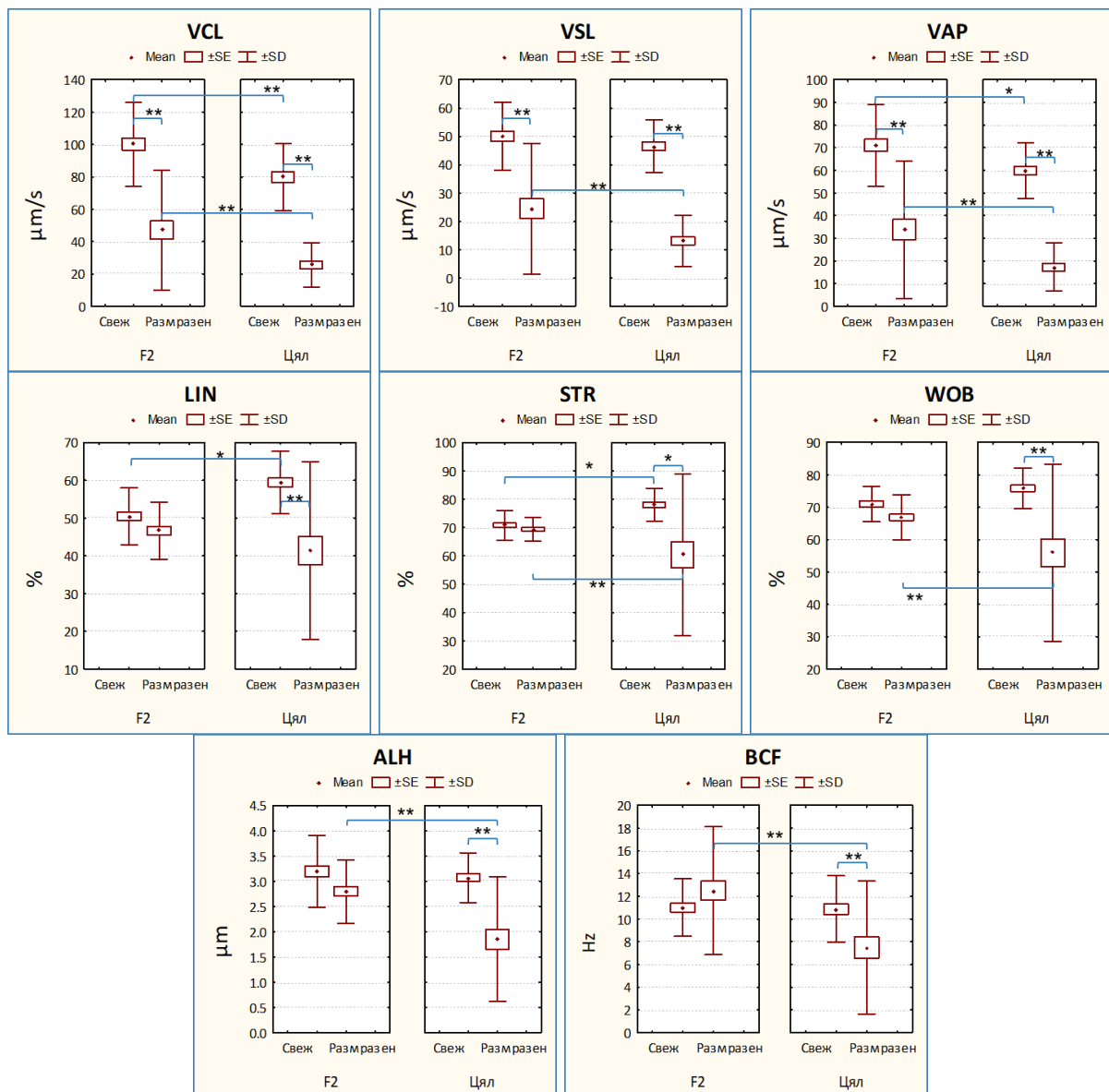


Фигура 24. Сравнителен анализ на мотилитета, прогресията и скоростта на сперматозоидите от F2 и целите еякулати преди и след криоконсервация.

По отношение прогресивния мотилитет, F2 демонстрира достоверно по-висок процент сперматозоиди с прогресивно движение ( $25.20 \pm 1.40$ ;  $p < 0.001$ )



след размразяване, в сравнение с целия еякулат ( $3.88 \pm 0.76$ ) при липса на достоверна разлика между двете групи преди криоконсервация. Тези данни позволяват да се направи заключение, че макар използваните проби преди криоконсервация да имат близки и с недостоверност на разликите качествени характеристики, след размразяване се установяват съществени различия.



	Качество	N	VCL (µm/s)	VSL (µm/s)	VAP (µm/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (µm)	BCF (Hz)
F2	Свеж	43	100.19±3.93	50.09±1.83	71.072.76±	50.44±1.15	70.76±0.81	70.99±0.83	3.19±0.11	11.01±0.39
F2	Размразен	43	47.10±5.67	24.48±3.52	33.88±4.62	46.64±1.15	69.37±0.62	66.89±1.07	2.80±0.10	12.49±0.86
Цял	Свеж	40	79.73±3.30	46.54±1.46	59.82±1.95	59.44±1.30	78.09±0.92	75.84±0.99	3.07±0.08	10.88±0.46
Цял	Размразен	40	25.51±2.16	13.11±1.43	17.38±1.69	41.32±3.72	60.37±4.50	55.93±4.33	1.85±0.19	7.49±0.92

Фигура 25. Сравнителен анализ на кинематичните параметри на сперматозоидите от F2 и целите еякулати преди и след криоконсервация.

Анализът на данните за скоростта на движение на клетките показва, че след криоконсервация и размразяване се запазва тенденцията за по-добро представяне на сперматозоидите от F2, установена и преди замразяване. Процентът сперматозоиди с бърза скорост на движение, като важен показател,

свързан с енергийния потенциал на гаметите, беше достоверно по-висок във F2 ( $19.05 \pm 2.54$ ,  $p < 0.001$ ), сравнено с целите еякулати ( $1.95 \pm 0.66$ ) (Фигура 24).

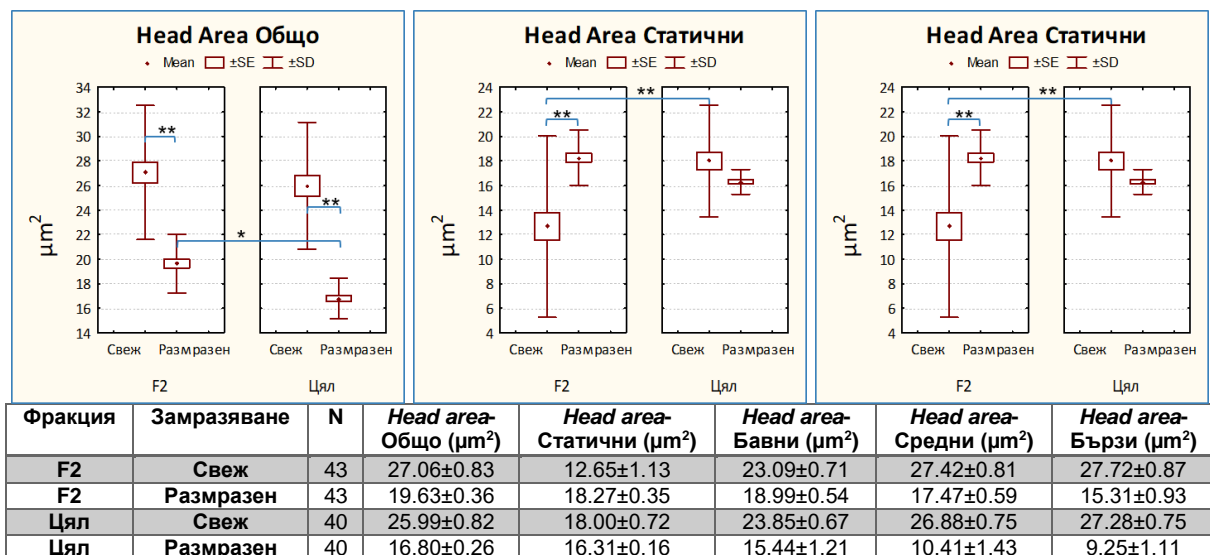
Данните за кинематичните параметри на сперматозоидите след размразяване демонстрираха по-добро запазване на активността и праволинейността на движение на сперматозоидите от F2, в сравнение с целите еякулати (Фигура 25). След размразяване беше демонстрирано достоверно понижаване на стойностите на VCL, VSL и VAP на сперматозоидите от F2 и целите еякулати, спрямо стойностите на посочените параметрите преди процеса на криоконсервация ( $p < 0.001$ ).

Тези резултати са естествено последствие на деструктивното действие на ниските температури по време на замразяване. В същото време, беше установено, че сперматозоидите от F2 показват достоверно по-високи стойности на VCL и VAP, в сравнение с целите еякулати както преди, така и след криоконсервация ( $p < 0.001$ ). По отношение праволинейната скорост, VSL демонстрира достоверно по-високи стойности след размразяване при F2 ( $24.48 \pm 3.52$ ), в сравнение с целите еякулати ( $13.11 \pm 1.43$ ) ( $p < 0.001$ ) при липса на достоверност на разликите преди провеждането на криоконсервация.

В допълнение към тези данни, като потвърждение за по-добре запазената праволинейност и прогресивност на движение на сперматозоидите от F2 са липсата на достоверна разлика в стойностите на LIN, STR и WOB преди и след размразяване. Докато в същото време, беше установено достоверно понижаване стойностите на параметрите след размразяване при целите еякулати ( $p < 0.001$ ). По-доброто запазване на активността на сперматозоидите от F2 след криоконсервация беше демонстрирано също и чрез липсата на достоверна разлика в стойностите на ALH и BCF преди и след размразяване. F2 показва достоверно по-високи стойности след размразяване на ALH ( $2.80 \pm 0.10$ ) и BCF ( $12.49 \pm 0.86$ ), в сравнение с целите еякулати ( $1.85 \pm 0.19$  и  $7.49 \pm 0.92$  съответно) ( $p < 0.001$ ) (Фигура 25).

Както и при анализа на данните при свежите еякулати, интересни се оказаха резултатите за промените в заснетата площ на главичката на сперматозоидите вследствие процеса на криоконсервация на спермата (Фигура 26). Беше установено достоверно ( $p < 0.001$ ) понижаване на стойностите на площта на главичката след размразяване при F2 ( $19.63 \pm 0.36$ ) и целите еякулати ( $16.80 \pm 0.26$ ), сравнено с данните за параметъра при свежите спермални проби ( $27.06 \pm 0.83$  при F2 и  $25.99 \pm 0.82$  при целите еякулати). Преди криоконсервация не бяха установени достоверни разлики в стойностите на площ на главичката между F2 и целите еякулати, докато след размразяване F2 отново показва достоверно по-високи стойности в сравнение с целите еякулати ( $p < 0.05$ ).

Особено очевидни бяха тези данни по отношение на заснетата площ на главичката на бързите сперматозоиди, като бяха установени същите зависимости - достоверно ( $p < 0.001$ ) понижаване на стойностите на параметъра след размразяване при F2 ( $15.31 \pm 0.93$ ) и целите еякулати ( $9.25 \pm 1.11$ ), както и достоверно по-високи стойности след размразяване при сперматозоидите от F2 в сравнение с целите еякулати ( $p < 0.001$ ).



Фигура 26. Площ на главичката на сперматозоидите от F2 и целите еякулати преди и след криоконсервация - общо за еякулатите и диференциално в отделните групи сперматозоиди (статични, бавни, средни и бързи).

В групата на статичните сперматозоиди бяха установени интригуващи данни, указващи нуждата от провеждане на допълнителни изследвания. Не бяха установени достоверни различия в стойностите на параметъра при сперматозоидите от целите еякулати преди и след размразяване, както и при сравняване на F2 и целите еякулати след размразяване. При все това, достоверно по-високи стойности след размразяване бяха демонстрирани при сперматозоидите от F2 ( $12.65 \pm 1.13$ ), в сравнение с първоначалните стойности за площ на главичката при свежите проби ( $18.27 \pm 0.35$ ) ( $p < 0.001$ ).

В заключение, на база на резултатите, получени при изпълнение на задачата, може да се твърди, че с настоящите изследвания по дисертационния труд е разработена успешна нова технология за криоконсервация на сперматозоиди от кучета в криофиолки с обем 500µl и прилагане на ускорено замразяване. Методологията обхваща прецизен анализ на еякулатите преди замразяване, което е гарант за успеваемост след размразяване. Доказано е, че сперматозоидите от F2 демонстрират по-добра криотолерантност и по-висок оплодителен потенциал, което позволява методологията да бъде препоръчана за нуждите на практиката и използвана в биотехнологията за ИО със замразена сперма.

## 6. ДИСКУСИЯ

Оптимизирането на технологиите за *in vitro* съхранение и криоконсервация при ултраниски температури има водеща роля за запазване жизнеспособността и функционалността на гаметите при селекция на ценни и редки видове. Наред с технологичните режими, съществуват и фактори от биологично естество, оказващи съществено въздействие върху оплодителната способност на сперматозоидите. Един от тези фактори са протеините от СП. Еякулатите

представяват изключително богата, нехомогенна течна структура, в която се съдържа разнообразен набор от различни популации сперматозоиди и СПП. В последните години интерес за все повече учени представляват функцията и механизмите на действие на СПП, както и тяхната връзка с биологичните качества и оплодителен потенциал на сперматозоидите в *in vitro* условия и при нискотемпературно съхранение. Това важи и по отношение вида *Canis lupus familiaris* и в тази насока са проведените изследвания по настоящия дисертационен труд.

В изследванията на много автори се обособява становището, че качеството на еякулатите определя оплодителната способност на сперматозоидите и стои в основата на репродукцията при животните. В практиката на селекция и развъждане на животните се използват стандартни конвенционални методи за качествен анализ на спермата, които дават обща информация при първичната оценка на семенната течност. При все това, в последните години се налага все по-силно мнението, че провеждането на по-обстойно изследване и прецизното определяне на оплодителния потенциал на сперматозоидите са от изключителна важност. Общоприетите методи за анализ на спермата не винаги могат да предоставят цялостно определяне на функционалния капацитет на сперматозоидите и често не позволяват да се получат достоверни данни за обяснение на нарастващия инфертилитет при мъжките индивиди. В някои случаи се наблюдава успешно заплождане въпреки отклоненията в спермограмата на донорите, докато в други оплождане не се осъществява. В повечето репродуктивни центрове и ветеринарни клиники, прилагащи ИО, основен тест за оценка качеството на спермата е определяне процента на подвижни клетки и тяхната жизнеспособност. Понякога има субективност в резултатите, тъй като тези методи са индиректни подходи за определяне метаболитната активност и функционалност на сперматозоидите. Това обуславя вариабилност в резултатите, която е повлияна от грешки в клетъчния анализ (Graham et al., 1980).

Въвеждането на компютърните системи за спермоанализ дава възможност за получаване на по-обективна и цялостна оценка на спермалните параметри (Davis и Siemers, 1995). Чрез тях се добива специфична информация за подвижността и вида на движение на сперматозоидите, което позволява поточно прогнозиране на техния оплодителен потенциал (Budworth et al., 1988; Zhang et al., 1998). Наличието на такава техника в ИБИР-БАН позволи разработването на настоящия дисертационен труд. За целта беше направена обективна и цялостна оценка на общо 114 еякулата от 56 кучета, като бяха проведени и обработени общо 525 отделни CASA анализа.

По първа задача на дисертацията, получените чрез CASA резултати за мотилитет, кинематични параметри и площ на главичката на сперматозоиди от фракционно получени еякулати, както и направен анализ на биологичните параметри на сперматозоидите от еякулати с добро и лошо качество на спермата, позволиха да се достигне до следните заключения: фракционното получаване на семенна течност, използвано като метод на работа в настоящата

дисертация, дава възможност за естествено сепариране на популациите спермални клетки по техни специфични характеристики; окачествяването на спермалните проби на базата на общата подвижност и прогресията на сперматозоидите позволява подбор на проби с по-добри показатели по отношение скоростта на движение, кинематичните параметри и площта на главичката; сперматозоидите от F2 демонстрират по-добри показатели на бърз мотилитет (% бързо подвижни, VCL, VSL, VAP), в сравнение със сперматозоидите от другите две фракции и целите еякулати. Статистическият анализ и доказаните достоверни разлики и корелационни зависимости на обобщените данни ни насочиха към анализиране и на други фактори, важни за цялостната оценка на оплодителния потенциал на гаметите. Един от тези фактори са СПП.

Има разностранни изследвания за физиологичната роля на СП в условия *in vivo*: тя е основна среда, която активира и увеличава подвижността на сперматозоидите; буферна среда, осигуряваща оптимални осмотични условия; източник на енергийни ресурси; предотвратява преждевременното активиране на сперматозоидите по време на физиологичен транспорт чрез стабилизиране на ПМ и активиране на инхибитори на капацитацията (Desnoyers и Manjunath, 1992; Villemure et al., 2003; Leahy и Gadella, 2011); осигурява защита на сперматозоидите от фагоцитоза в условия на възпалителен процес в репродуктивния тракт (Alghamdi et al., 2004); фактори на СП, като протеини, цитокини, полови хормони и простагландини, съпътстват миграцията на сперматозоидите в женския репродуктивен тракт и притежават потенциални биологични възможности за протекция на сперматозоидите от различни патогени, както в мъжката, така и в женската репродуктивна система (Maegawa et al., 2002); СП участва в регулирането на транспорта на сперматозоидите в женския репродуктивен тракт и тяхната последваща елиминация (Troedsson et al., 2005); някои СПП са в помощ на сперматозоидите при взаимодействие с яйцеклетка (Töpfer-Petersen et al., 2008; Leahy и Gadella, 2011); други протеини от СП играят имуномодулираща роля, която е от полза за оцеляването на сперматозоидите в женската полова система; СП участва в активацията на експресия на ембриотрофични цитокини и подпомага подготовката на майчините родилни пътища за развитието на ембриона, по-специално чрез имунните промени, необходими нормалното развитие на бременността (Robertson, 2005); СП като цяло оказва влияние върху процеса оплождането (Rozeboom et al., 2000).

Ролята на СП и специфичните СПП за репродуктивния процес и оплождането при кучетата все още не е напълно изяснен. Често наличните в литературата данни по въпроса при този животински вид са противоречиви. Някои изследвания посочват, че протеините от простатния флуид имат негативен ефект по отношение мотилитета и морфологията на сперматозоидите при *in vitro* съхранение (England и Allen, 1992; Rota et al., 1995; Sirivaidyapong et al., 2001a; Yamashiro et al., 2009). В същото време, други автори доказват, че присъствието на СП в еякулата допринася за по-високата осмотична

резистентност на сперматозоидите (Strzeżek и Fraser, 2009). *In vitro* експерименти са демонстрирали положителен ефект върху заплодяемостта при добавяне на хомоложен простатен флуид към замразено-размразени сперматозоиди преди инсеминация (Nöthling и Volkman, 1993; Hori et al., 2005; Nöthling et al., 2005, Nöthling et al., 2007). Други изследвания демонстрират, че добавянето му след размразяване довежда до намаляване на хиперактивния мотилитет, но не се отразява върху преживяемостта и акрозомния статус на сперматозоидите (Rota et al., 2007). Тези противоречиви данни, показват необходимостта от провеждането на допълнителни изследвания.

От казаното до тук се стига до заключението, че освен провеждането на клетъчен анализ, от особена важност е изследването и на други фактори, които оказват въздействие върху мъжкия фертилитет, каквито са някои от протеините на СП.

Търсейки яснота върху ролята на СПП, ние насочихме своите усилия към изследвания чрез HPLC и SDS-PAGE на протеини, сепарирани чрез фракционно получаване на еякулати. Чрез хроматографски анализ в нативни условия беше доказано, че F1 е най-бедна в количествено, но най-богата в качествено отношение на протеини. В същото време, F3 е най-бедна в качествено отношение на протеини. Хроматограмата на F2 показва, че в нея се съдържат протеини с най-голямо количествено присъствие и разнообразие. При анализ на протеините в отделните фракции, СП от F1 демонстрира високо съдържание на протеини с високо относително MW (около 773.6kDa), сепарирани в пик на 7-ма min. Количеството на тези протеини, оценено по скалата за абсорбция, беше най-високо във F1, по-ниско във F2 и целия еякулат и липсващо във F3.

При направената литературна справка в търсене на отговор кои може да са тези протеини се достигна до предположението, че в тази група протеини вероятно влизат някои високомолекулни спермадхезини. Известно е, че те участват при сформирването на резервоар на сперматозоидите в овидукта и играят важна роля при междугаметното взаимодействие (Caballero et al., 2006; Manásková и Jonáková, 2008; Töpfer-Petersen et al., 2008). Друг протеин с високо MW представен в СП, е имобилинът (400kDa), за който е доказано, че инхибира подвижността на сперматозоидите чрез създаване на силно вискозитетна и еластична среда (Usselman и Cone, 1983; Das et al., 2010). Нашите резултати от CASA демонстрираха, че сперматозоидите от F1 показват тенденция за най-ниски стойности на LIN, STR и WOB. Дали преобладаването на високомолекулни протеини във F1 се отразява върху мотилитета и кинематичните параметри на сперматозоидите е въпрос, който все още няма убедителен отговор. С резултатите от настоящите изследвания може да се даде насока в търсенето на отговор на въпроса. Относително лошите CASA характеристики на сперматозоидите са в подкрепа на предположението, че във F1 на еякулата се съдържат основно остарели и слабо функционални клетки, но също така има и присъствие на високомолекулни протеини, оказващи негативен ефект върху сперматозоидите.

Най-съществени разлики между трите фракции бяха установени при сепарирането на хроматографските пикове между 10-та и 16-та min (MW около и под 65.6kDa). Тази група протеини е най-добре представени във F2. В търсене на отговор кои протеини попадат в тази група и от направената литературна справка се установи, че някои автори доказват значителни корелации между два СПП (67kDa и 58.6kDa) и качествените характеристики на сперматозоидите и тези протеини са предложени като маркери за фертилитет (De Souza et al., 2007). Имайки предвид, че в настоящите CASA изследвания сперматозоидите от F2 показват достоверно най-добри показатели за мотилитет, кинематични параметри и площ на главичката, може да се предположи, че това се дължи на присъствието на такива маркерни протеини. Предполага се, че тези протеини са от групата на BSP. При *in vitro* изследвания е доказано, че BSP имат протективен ефект върху мотилитета на сперматозоидите посредством междумолекулни взаимодействия с ПМ, като така се възпрепятства движението на фосфолипидите в бислоя, което стабилизира мембраната (Gwathmey et al., 2006). Има данни за присъствие и на друга група протеини като спермадхезините, които също представляват интерес за учените. Счита се, че някои от тях имат способността да се свързват с фосфолипиди от външната повърхност на ПМ на сперматозоидите при еякулация, което определя тяхната акрозомно стабилизираща роля. Също така, тази група протеини имат и още една важна функция - AQN-1, AQN-3 и AWN показват афинитет на свързване с ZP (Kraus et al., 2005). Интересна е функцията на Андроген-свързващия протеин с MW 70-90kDa, който участва в: матурацията на сперматозоидите; активирането на мотилитета; въздейства на способността на сперматозоидите за оплождане и др. (Munell et al., 2002).

Характеризирането на протеините в редуциращи условия чрез SDS-PAGE показва различия в количественото представяне на различните групи протеини в СП на отделните фракции. Визуализирано беше различно присъствие на някои протеини в отделните фракции на еякулата, както и известни индивидуални различия между отделните еякулати. Така например, протеин с MW 103.9kDa показва присъствие основно във F2, като в същото време се проявява много слабо във F1 и изцяло отсъства във F3. Подобни специфики бяха установени и за други протеини, описани в резултатите по Задача 2.

Получените данни от HPLC и SDS-PAGE анализите на СПП недвусмислено показаха наличието на разлики между отделните фракции на еякулата по отношение съдържанието на протеини в СП в количествено и в качествено отношение. За нас представляваше особен интерес да задълбочим тези изследвания като докажем и характеризираме специфични за отделните фракции протеини, които биха могли да се предложат като маркерни молекули. За целта се насочихме към провеждане на сравнителен протеомен анализ чрез 2D-PAGE на СП от отделните фракции на еякулата.

От направена литературна справка се установи, че до момента има единични или оскъдни данни за проведени изследвания на СП от кучета чрез 2D-PAGE протеомен анализ. Това дава основание да твърдим, че представените от

нас резултати и подробен протеомен профил на СПП при кучетата да са нови и оригинални. Резултатите по Задача 3 дадоха богата информация. Беше направен анализ на 453 индивидуални протеинови петна общо за трите фракции на СП, от които 70 протеинови петна бяха визуализирани само във F1, други 74-само във F2, а 95 протеина бяха проявени само във F3. Относителните MW на проявените петна варираше от 135.3kDa до 2.0kDa, а установеният диапазон на pI беше при pH от 3.40 до 9.55.

Доказа се, че нискомолекулните протеини с MW под 14.5kDa съставляват основна част от общия протеин в СП при кучетата, докато високомолекулните протеини присъстват в значително по-ниски концентрации и тези данни важат за всяка една от трите фракции на еякулата. От направена справка с изследвания на други автори може да се предположи, че освен добре представената в СП при кучетата CPSE (15kDa и 12-14kDa), тук вероятно влизат и протеини от групата на калмодулина, имащи отношение към капацитацията на сперматозоидите. Счита се, че калмодулин-свързващите протеини с MW 15 kDa и 16kDa участват в замаскиране на някои компоненти от повърхността на ПМ, което повишава пропускливостта и инфлукса на йони (Ignotz и Suarez, 2005; Schlingman et al., 2007).

Друго важно доказателство по настоящите изследвания е, че СП при кучетата съдържа основно алкални протеини, придвижващи се при IEF към алкалния край на стрипа (-) и имащи pI при pH над 5.85. Получените данни са с важно научно-приложно значение и могат да намерят място при провеждане на бъдещи протеомни анализи на СПП при кучетата, с оглед подбор на подходящи стрипове и подобряване на протокола за провеждане на IEF и 2D-PAGE.

Доказаните чрез SDS-PAGE СПП с MW 14.5kDa (по Задача 2) бяха визуализирани чрез 2D-PAGE като минимум 10 протеинови петна с pI при pH между 6.75 и 9.48 (по Задача 3). Може да се предположи, че в тази група влизат някои цинк-свързващи полипептиди с MW от 11.7 до 15.4kDa и pI при pH 6.8–8.7, включващи и CPSE (специфичен маркер за простатната функция при кучетата) (Mogielnicka-Brzozowska et al., 2015).

Нов и недокументиран до сега е резултатът за установяването и диференцирането на група протеини, специфична само за СП от F2. В тази група влизат следните 8 добре визуализирани протеина: 24.4kDa с pI 4.81; 24.3kDa с pI 5.11; 25.1kDa с pI 5.48; 24.2kDa с pI 5.49; 24.1kDa с pI 5.99; 22.6kDa с pI 6.61; 23.6kDa с pI 6.58; 24.2kDa с pI 6.59. Тези протеини са много добре представени във СП от F2 и не се установяват във F1 и F3. Направената литературна справка дава основание да се предположи, че тук са представени различни протеини от групата на хепарин-свързващи протеини (HBP), калмодулин-свързващи протеини, убиквитин и др. HBP играят стабилизираща роля за ПМ по време на капацитация; оказват влияние върху устойчивостта на сперматозоидите на осмотичен лизис; свързват се с глюкозаминогликани и така медирират капацитацията и оплодителната способност на сперматозоидите; добавянето на HBP в спермата води до съхраняване в по-висока степен на прогресивния и бърз мотилитет и кинематичните параметри, в сравнение с нетретирани проби



(Töpfer-Petersen et al., 2008). Калмодулин-свързващите протеини участват в стимулирането на различни калций-зависими ензимни активности чрез специфично свързване и по този начин модулират мотилитета на сперматозоидите (Ignotz и Suarez, 2005; Schlingman et al., 2007).

Слабо проявеният протеинов пик на 18-та min, установен след HPLC по Задача 2, с относително MW около 7.8kDa, е добре обособен само във F1. Може да се предположи, че в този пик има присъствие на нискомолекулният полипептид убиквитин (8kDa), за който се счита, че е маркерен протеин за клетъчна деградация (Sutovsky, 2003). Тези данни могат да дадат обяснение за получените по-слабите резултати от CASA анализа за биологичен потенциал на сперматозоидите от F1.

Резултатите по Задачи 2 и 3 позволиха да се допълнят нашите знания за ролята на протеините от СП при кучетата и за наличието на специфични маркерни протеини, свързани с биологичните качества на сперматозоидите. Нашата хипотеза е, че някои СПП могат да индуцират или супресират определени ензимни или биохимични модификации в сперматозоидите, които са свързани с енергийното обезпечаване на клетките. Тези модификации стартират от самото начало на сперматогенезата, по време на съзряването на сперматозоидите и действат до оформянето им в компетентна клетка, способна да оплоди яйцеклетката. Също така може да се предположи, че основната роля на протеините от СП се обуславя от организацията и протичането на сложни междумолекулни взаимодействия и механизми, водещи до вътреклетъчни структурни промени, които от своя страна въздействат върху способността на сперматозоидите да придобият оплодителен потенциал. Въпреки проучванията на учените до сега, все още не са напълно изяснени процесите при трансформацията, превръщаща неподвижните и неспособни сами да извършат оплождане сперматозоиди в епидидимиса, в клетки с висок мотилитет след еякулация, способни чрез фузия да проникнат в ооцита.

Като продължение на нашите изследвания, считаме, че не бива да се омаловажава и ролята на някои механизми и процеси (капацитация, акрозомна реакция и прикрепване на сперматозоидите към повърхността на яйцеклетката), оказващи влияние върху оплодителната способност на гаметите. Тези механизми във висока степен зависят от функционалността и интегритета на спермалната ПМ. Поради това има разработени редица техники за специфично определяне на функционалността на ПМ, като определяне на мембрания интегритет чрез използване на различни флуорохроми (De Leeuw et al., 1991; Valcárcel et al., 1994), хипоосмотичен тест (Correa и Zavos, 1994), определяне на митохондриалната активност (Garner et al., 1997; Windsor, 1997; Thomas et al., 1998; Nagy et al., 2003), определяне състоянието на акрозомата с използване на флуоресцентни лектини (Cross и Meizel, 1989) или антитела (Fenichel et al., 1989), и на ZP-free hamster ovum test (Yanagimachi, 1984).

В настоящите изследвания сме приложили два метода за морфо-функционална оценка на спермалните клетки – тристепенен метод за оцветяване и оценка състоянието на акрозомата и функционален тест за

прикрепяща способност на сперматозоидите към хомоложна ZP. Данните за практическото приложение на тези методи при кучетата са оскъдни и все още има необходимост от допълване на знанията.

Резултатите, получени по Задача 4 на настоящия дисертационен труд, показваха различия в прикрепящата способност към ZP на сперматозоидите от отделните фракции и целия еякулат. При F2 беше доказан значително по-голям брой сперматозоиди, които са в състояние да капацитират и имат съхранен биологичен потенциал да оплодят яйцеклетката, в сравнение с тези данни за целия еякулат или сперматозоидите от F1 и F3. Резултатите от изследванията по тази задача имат практическо значение и позволяват да се направи заключението, че мануалното получаване на сперма чрез разделяне на еякулата на фракции е ценен метод, осигуряващ естествено сепариране на различните популации сперматозоиди от еякулата по техни съществени биологични качества, но и позволяващ да се постигне биологична селекция на протеините от СП. На базата на CASA анализ върху мотилитет, кинематични параметри и площ на главичката на фракционно сепарирани сперматозоиди, както и чрез морфологичен анализ на спермалната ПМ и протеомни анализи на протеините в СП бяха получени обстойни и обективни резултати, свързани със специфични характеристики за функционалност на гаметите, доказани и чрез анализ на прикрепящата способност на сперматозоидите към ZP. С настоящите изследвания беше доказано, че F2 на еякулата притежава достоверно най-добри данни по отношение мотилитет, прогресия, скорост и площ на главичката на сперматозоидите, а също и притежава специфичен протеинов профил и висок HZI, които са гарант за добър оплодителен потенциал на гаметите.

Въз основа на резултатите, получени по Задачи 1-4 от дисертационния труд, както и на база на постигнати резултати от предхождащи изследвания на работен колектив от секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология на гаметите”, насочихме своите усилия да подобрим постигнатото до тук и да оптимизираме криобиотехнологията за замразяване на сперма от кучета. Бяха използвани сперматозоиди от F2 (тест) и цели еякулати (контрола). Целта на изследването беше разработване на нов оптимизиран подход и прилагане на методология за високоскоростно замразяване на сперма от кучета. Основанието за тези разработки е голямата практическа необходимост от оптимизирана биотехнология за нискотемпературно съхранение на сперма от кучета. Разработеният нов подход за замразяване на сперма от кучета включва: използване на метод за немеханично елиминиране на биологично непълноценни клетки и на СПП с негативен ефект върху сперматозоидите; използване на опаковка за замразяване в по-голям обем (500µl); използване на модифицирана среда за криоконсервация KGT; прилагане на високоскоростно замразяване. Получените резултати са основани на прецизността в оценката и подбора на еякулатите преди замразяване, базирана на CASA, протеомика на СПП (HPLC, SDS-PAGE и 2D-PAGE) и функционален HZA за прикрепяща способност на сперматозоидите, което позволи цялостно изпълнение на поставените цели по дисертационния труд.

**В заключение:** Някои от представените резултати по дисертационния труд са потвърждение или продължение на изследвания на други учени, работещи в областта на репродуктивната биология при кучетата. По-голямата част от нашите изследвания са нови и уникални и обогатяват научните знания в сферата на размножаването и развъждането на животните. Такива са данните касаещи морфологичната характеристика площ на главичката на сперматозоидите от куче, характеристиката и идентификацията на специфични протеини, съдържащи се в сепарирани спермални фракции, получените данни от 2D-PAGE на СПП, които са специфични и се съдържат в различните фракции на еякулата. Като завършек на дисертационния труд е предложена за нуждите на практиката нова оптимизирана биотехнология за криоконсервация на сперматозоиди от кучета, чрез прилагане на ускорено замразяване в обем 500 $\mu$ l и използване на модифицирана криопротективна среда.

## ИЗВОДИ

1. Фракционното получаване на семенна течност при кучетата позволява да бъде постигнато естествено сепариране на различни популации сперматозоиди и СПП по специфични характеристики, свързани с мотилитета, морфологията и функционалността на гаметите.
2. Високите стойности на общ, прогресивен и бърз мотилитет, допълнени от VCL, VSL, VAP и заснета площ на главичката са критерии за еякулати с добро качество и висок оплодителен потенциал на сперматозоидите.
3. Сперматозоидите от F2 демонстрират по-добри показатели за общ мотилитет, прогресия, скорост, кинематични параметри (VCL, VSL, VAP), както и капацитационна способност, оплодителен потенциал (HZI) и криотолерантност, в сравнение с останалите фракции и целите еякулати.
4. Получени са специфични хроматографски и електрофоретични профили на СП, демонстриращи различното количествено и качествено разпределение на СПП в трите фракции на еякулата при кучетата.
5. Нискомолекулните протеини (под 14.5kDa) в СП съставляват основна част от общия протеин, докато високомолекулните протеини присъстват в значително по-ниски концентрации при всяка една от трите фракции на еякулата при кучетата.
6. За първи път чрез 2D-PAGE е изведен подробен протеомен профил и са характеризирани специфични СПП, съдържащи се в сепарирани спермални фракции. Анализирани са 453 индивидуални протеинови петна с относителни MW от 135.3kDa до 2.0kDa и pI при pH от 3.40 до 9.55, като 70 протеина са визуализирани само във F1, 74 - само във F2 и 95 протеина - само във F3.

## **ОРИГИНАЛНИ ПРИНОСИ С НАУЧНО – ПРИЛОЖЕН ХАРАКТЕР**

1. За първи път е установена достоверна ( $p < 0.001$ ) силна положителна корелация между заснетата площ на главичката на сперматозоидите и скоростния показател VCL, демонстрирана във F1 ( $r=0.74$ ), F2 ( $r=0.716$ ) и целите еякулати ( $r=0.822$ ). Заснетата площ на главичката на сперматозоидите може да бъде използвана като допълнителен бърз и лесен за анализиране показател за оценка качеството на спермата при кучетата.
2. Направеният за първи път подробен протеомен профил на СПП от сепарирани спермални фракции и доказателството, че СП при кучетата съдържа основно алкални протеини, придвижващи се при IEF към алкалния край на стрипа (-) и имащи pI при рН над 5.85, са нови научно-приложни знания, които могат да намерят място при провеждане на бъдещи протеомни анализи на СПП при кучетата, с оглед подбор на подходящи стрипове и подобряване на протокола за провеждане на IEF и 2D-PAGE.
3. За първи път е доказана група протеини, специфична за СП от F2 на еякулата при кучетата, включваща следните добре визуализирани 8 протеина: 24.4kDa с pI 4.81; 24.3kDa с pI 5.11; 25.1kDa с pI 5.48; 24.2kDa с pI 5.49; 24.1kDa с pI 5.99; 22.6kDa с pI 6.61; 23.6kDa с pI 6.58; 24.2kDa с pI 6.59. Тези протеини са кандидати за бъдещи изследвания с оглед характеризирането и идентифицирането им чрез масспектрометрия и предлагането им за маркерни молекули за фертилитет.
4. За нуждите на ветеринарната практика на ИО със замразена сперма от кучета е разработена успешна и иновативна биотехнология за криоконсервация на сперма чрез прилагане на ускорено замразяване на фракционно получени сперматозоиди в криофиолки с обем 500 $\mu$ l, при използване на модифицирана криопротективна среда.

## **ПУБЛИКАЦИИ НА НАУЧНИ РЕЗУЛТАТИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИЯТА**

1. Gradinarska D, Ivanova M. An innovative approach to cryopreservation of canine semen. Proceedings of the International Scientific Conference "Veterinary Medicine in Service of People" 2017; 1-6.
2. Gradinarska D, Ivanova M, Chervenkov M, Mladenova V, Daskalova D, Bucak MN. Evaluation of the fertilization potential of fractionally collected canine spermatozoa by homologous hemizona binding assay. *Turkiye Klinikleri J Reprod Artif Insemin-Special Topics* 2017; 3(2):114-20.
3. Gradinarska D, Hristova M, Daskalova D, Valeva Y, Lazov K, Ivanova M. Cryopreservation of dog semen in cryovials using a cryoprotective medium with

antioxidants. Сборник доклади от международна научна конференция „20 Година Факултет По Ветеринарна Медицина“: Традиции и съвременност във ветеринарната медицина 2016; 81-9.

4. Ivanova M, Gradinarska D, Daskalova D. Reproductive biotechnology in animal husbandry—current status and future prospects. *Biotechnol Anim Husbandry* 2015;31(4):467-80.

Цитирана в: Mogielnicka-Brzozowska M, Słowińska M, Fraser L, Wysocki P, Strzeżek R, Wasilewska K, Kordan W. Identification and characterization of non-phosphorylcholine-binding and phosphorylcholine-binding proteins of canine seminal plasma. *Ann Anim Sci* 2017; 17(3):771–86.

5. Gradinarska D, Ivanova M, Daskalova D, Lazov K, Chervenkov M. Comparative analysis of the capacitation ability of fractionally obtained canine spermatozoa. *Journal of Mountain Agriculture on the Balkans* 2015; 18(3):412-25.

#### **ДОКЛАДВАНЕ ПРЕД НАУЧНИ ФОРУМИ НА РЕЗУЛТАТИ ПО ДИСЕРТАЦИЯТА**

1. Gradinarska D, Ivanova M, Genov M, Tsvetkov T. Comparative analysis of fresh, capacitated and frozen-thawed canine spermatozoa, obtained through fractional semen collection. 21st EVSSAR Congress, 22-23 June 2018, Venice, Italy. *Reproduction and Pediatrics in Dogs, Cats and Small Companion Animals*, p.191.

2. Gradinarska D, Ivanova M, Tsvetkov T, Daskalova D. Cryotolerance of fractionally collected canine spermatozoa. 21st Annual ESDAR Conference, 24–26 August 2017, Bern, Switzerland. *Reproduction in Domestic Animals, Proceedings of the 21st Annual ESDAR Conference*, 52 (S3), p. 61-62. IF 1.4.

3. Градинарска Д, Иванова М. Нова биотехнология за криоконсервация на сперматозоиди при вида *Canis lupus familiaris*. Интердисциплинарен докторантски форум, 6-7 април 2016, ЦО към БАН, София. Сборник с материали, p.19.

4. Gradinarska D, Ivanova M, Lazov K. Zona-binding capacity of canine spermatozoa obtained through fractional sperm collection. 19th Annual ESDAR Conference 2015, 16-19 септември 2015, Варна. *Reproduction in domestic animals* 2015, 50(3), pp. 1-86, 55. IF 1.515.

5. Gradinarska D, Ivanova M, Daskalova D, Hristova M, Valeva Y, Lazov K. Differences in seminal plasma proteins between dogs with good and poor quality of the sperm. 14th International Symposium for Immunology of Reproduction. "Progress in Reproductive Immunology", 22-24 май 2015, Варна. *American Journal of Reproductive Immunology* 2015, 73(1):39-40. IF 2.438.

