



Европейски съюз



ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013  
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”  
BG051PO001-3.3.06 -0059

Проект”Фундаментално и приложно обучение на докторанти, постдокторанти, специализанти и млади учени е интердисциплинарни биологични направления и иновационни биотехнологии” (BG051PO001-3.3.06-0059)

**д-р Петър Димитров**  
**Асистент и задочен докторант**  
**в секция „Репродуктивни биотехнологии и криобиология**  
**на гаметите”**

Институт по биология и имунология на размножаването  
„акад.К.Братанов”  
Българска Академия на Науките



Европейски съюз



Европейски социален фонд

ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013  
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”  
BG051PO001-3.3.06 -0059

Темата на дисертацията ми е: *In vitro* характеристика на сперма от кучета във връзка с методите на замразяване и размразяване.

Научен ръководител: проф. д-р Мария Георгиева Иванова, дсн



# Защо тази разработка е важна?

Запазването на оплодителния потенциал на сперматозоиди от кучета след прилагане на метода на нискотемпературно съхранение е приоритетна цел, с оглед практическо използване на генетичен материал от ценни или редки индивиди и породи. До настоящия етап проблемите, които не са решени са свързани с:

- оптимизиране на технологиите от получаване на еякулатите;
- цялостната оценка на биологичните параметри на сперматозоидите;
- състава на протективните среди;
- методите за замразяване и размразяване;
- индивидуалните характеристики на еякулатите, свързани с криотолерантността на гаметите;
- ролята на женското животно при използване на методите за ИО;

Допълнителни проучвания в тези аспекти ще допринесат за оптимизиране и подобряване на резултатите от практическо прилагане на методите за дълготрайно съхранение на сперма от кучета.

Все още са оскъдни данните, касаещи състава на спермалната плазма и ролята на спермално плазмените протеини, като основни биологични фактори при *In vitro* съхранение. В тази насока, с настоящата анотация на научните ми изследваия, се предлага да се направи опит да се решат основни биологични и биотехнологични въпроси, касаещи съхранението на гамети от вида *canis* и разработване на цялостна технология с практическо приложение.

За решаването на тази цел се предвижда провеждане на анализи, свързани с характеристика на спермално плазмени протеини и тяхната корелация със сперматологичните параметри при кучета. Особено внимание ще се обърне на остеопонтините и хепарин байндинг протеините от *cauda epididymis* и от тестиси, във връзка с тяхната потенциална роля в процеса оплождането.

Разработването на прогностичен тест за криотолерантност на сперматозоиди от кучета, чрез комбиниран спермокомпютърен анализ и анализ на вътрешния митохондриален мембранен потенциал при гамети с различия в криотолерантността, също би намерило практическо приложение.

Важно е да се отбележи, че експериментите за оптимизиране на методите за дълготрайно съхранение на сперма от различни породи кучета – в пайети, фиолки или туби, при използване на степенно разреждане на спермата, за които няма достатъчно проучвания, ще позволи създаването на нова биотехнология за криоконсервация и размразяване на сперма от различни породи кучета.

# До настоящия етап има проведени изследвания на екипа, с който работя върху ефекта на ниските температури на биологичните мембрани и адаптационните способности на сперматозоиди от кучета при *in vitro* съхранение и криоконсервация

Анализите са правени чрез морфологичен анализ и анализ чрез флуоресцентно боязан Анексин V с Cy3.18 и флуорохрома 6CFDA.

Чрез този тест се получава информация за различни популации клетки в даден еякулат, при които има промени във фосфолипидната организация на ПМ. Тестът позволява едновременно да се диференцират популации клетки, които са живи с функционална активност или живи ,но нефункционални и умрели.

Нарушенията на ПМ настъпват на различни нива в нейната организация, което се отразява на биологичната функция на клетката. Това е основен фактор, който играе определяща роля при практическата оценка на дадена репродуктивна биотехнология за *in vitro* съхранение, дали е добра или се нуждае от допълнителни анализи и бъдещо усъвършенстване.

От проведените изследвания върху морфологията на сперматозоидите е установено, че при криоконсервация най-силно се засяга акрозомата на сперматозоидите.

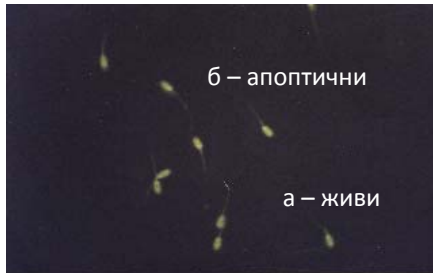


Фигура 1. Морфологични изследвания и регистриране на увреждания на сперматозоиди от кучета, свързани с процеса криоконсервация: а- нормални сперматозоиди, б, в – сперматозоиди с промени в акрозомата –(увеличение - 200х).

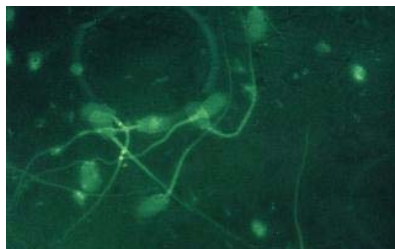
а- нормални сперматозоиди

б, в – сперматозоиди с промени в акрозомата

# Определянето на поведението на плазмено мембрания ФС чрез Annexin V/ 6CFDA тест при свежи и криоконсервирани сперматозоиди (Фигура 2, 3).



Фигура 2. Изследвания с Annexin V/ 6CFDA тест на поведението на ФС от ПМ на сперматозоиди от кучета: а – живи и б – апоптични – увеличение 200х.



Фигура 3. Локализация на екстернализиран ФС при сперматозоиди от куче след криоконсервация. Наблюденията са направени върху едно и също поле с двата филтъра за зелена и червена флуоресценция (увеличение – 400х)

АнексинV има афинитет да се свързва към негативно заредени ФЛ, както е ФС в присъствие на  $Ca^{2+}$  йони. Това качество на Анексин V позволява диференцирането на сперматозоиди с различни изменения на ПМ. Известно е, че ФС е интрацелуларен фосфолипид и при нарушена функция на ПМ се екстернализира на външната повърхност в различни региони на ПМ.

При инкубирането на сперматозоидите с двете бои едновременно се разграничават на едно и също поле с двата филтъра за червена и зелена флуоресценция, следните популации клетки:

- А. Живи сперматозоиди – светят само зелено и са реагирани само  $6CFDA^+$ .
- Б. Апоптични сперматозоиди – Анексин  $V^+/6CFDA^+$  - светят червено и зелено.
- В. Мъртви – Анексин  $V^+/6CFDA^-$  - светят червено

В заключение – сперматозоидите от кучета показват различна по степен криочувствителност при замразяване, която във висока степен зависи от индивида.

След размразяване, процентът на реанимирани сперматозоиди е близък по стойност до този при други бозайници, напр. коч, но при морфологичния анализ се установяват промени, свързани, както с набъбване на акрозомата, така и висок % сперматозоиди имат разкъсвания, подобно на сперматозоидите от нерез.

Поведението на ПМ показва, че голяма част от сперматозоидите имат екстернализиран ФС на повърхността на ПМ след размразяване, като значителен брой от тях са умрели.

Съхранението на структурната цялост на ПМ при кучета е свързано с криотолерантността на сперматозоидите от определени еякулати.



# Защо е необходимо изследването?

Резултатите от проведените изследвания поставят открити въпросите:

- Дали във всички случаи морфологично установените набъбнали акрозоми означават, че сперматозоидите са с функционални нарушения?
- Екстернализацията на ФС в акрозомалния регион означава ли, че при такива сперматозоиди е стартиран процес на клетъчна смърт чрез апоптозо подобен процес, или е свързано с процеса капацитация?
- Наличието на екстернализиран ФС на външния монослой на ПМ в областта на mid piece, може ли да се свърже с нарушения в мотилитета и функционалната компетентност на сперматозоидите при кучета?

Тези въпроси ни дадоха основание да предложим следната разработка по проектната програма.

Темата на проекта, по който ще работя като участник в целевата група е:

Разработване на прогностичен тест за замразяемост на сперматозоиди от кучета, чрез комбиниран спермокомпютърен анализ, PI/SYBR-14 и JC-1 анализи на вътрешния митохондриален мембранен потенциал при гамети от кучета с различия в криотолератността

За провеждане на експериментите се предвижда да бъдат използвани методи за сепариране на протеини от спермална плазма чрез HPLC хроматография, имунохимични методи за характеристика на селектирани протеини, изследвания в работна станция за клетъчни технологии и микроманипулации, както и практическо ползване на цялостното оборудване относно биотехнологии за дълготрайно съхранение на ниски температури, анализ на биологичната роля на протеини от семиналната плазма. Ще се изследват морфологията на сперматозоидите, интегритета на ДНК, мотилитет и др. чрез SCA анализи. Ще се проучи състоянието на ПМ и митохондриите, чрез анализ на митохондриалния потенциал, във връзка с криотолерантността на гаметите.

Получените резултати от изследванията ще позволят да се направи прогностичен тест за замразяемост на сперматозоиди от кучета.



Европейски съюз



ЕВРОПЕЙСКИ СОЦИАЛЕН ФОНД 2007 – 2013  
МИНИСТЕРСТВО НА ОБРАЗОВАНИЕТО И НАУКАТА  
ОПЕРАТИВНА ПРОГРАМА „РАЗВИТИЕ НА ЧОВЕШКИТЕ РЕСУРСИ”  
BG051PO001-3.3.06 -0059

### Необходими химикали:

- PI / SYBR – 14 (Sigma) code P4170 25 mg
- JC – 1 (Sigma) code T4069 5 mg
- ANNEXIN V CY 3.18/6 CFDA (Sigma)
- POLY L Lysine code P8920 100 ml
- Anti Caspase 3 (Sigma) code C9598
- Криофиолки
- Камери за SCA

# БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО

