



БЪГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

ГАЛИНА ТРАЙКОВА НЕНКОВА

АВТОРЕФЕРАТ

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

**ПРОУЧВАНЕ ДЕЙСТВИЕТО НА ДЕСФЕРАЛ ВЪРХУ
КАЧЕСТВОТО НА СПЕРМАТОЗОИДИ В УСЛОВИЯ НА
ОКСИДАТИВЕН СТРЕС**

Научна специалност:
4.3. „Биологични науки“ (Физиология на животните и човека)

Научни консултанти:
доц. д-р Албена Александрова и доц. д-р Росен Стефанов

СОФИЯ

2018

Дисертационният труд се състои от 109 страници, 19 фигури и 10 таблици. Списъкът с цитираната литература съдържа 173 заглавия.

Дисертацията е обсъдена и е предложена за защита на научен семинар на Института по невробиология – БАН, състоял се на 28 май 2018 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на2018 г. от.....часа в заседателната зала на Института по Невробиология при БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 23, ет. 2, на открито заседание на научното жури.

Материалите по защитата са на разположение в библиотеката на Института по Невробиология при БАН, ул. „Акад. Г. Бончев“, бл. 23, ет. 2.



БЪГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО НЕВРОБИОЛОГИЯ

Директор: Проф. д-р Рени Калфин

ГАЛИНА ТРАЙКОВА НЕНКОВА

**ПРОУЧВАНЕ ДЕЙСТВИЕТО НАДЕСФЕРАЛ ВЪРХУ
КАЧЕСТВОТО НА СПЕРМАТОЗОИДИ В УСЛОВИЯ НА
ОКСИДАТИВЕН СТРЕС**

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научна специалност:

4.3. „Биологични науки“ (Физиология на животните и човека)

Научни консултанти:

доц. д-р Албена Александрова и доц. д-р Росен Стефанов

Официални рецензенти:

проф. д-р Росица Замфирова, дмн
проф. д-р Мария Иванова, дссн

СОФИЯ

2018

1. ВЪВЕДЕНИЕ

В последните години проблемът с безплодието става все по-актуален, като обобщените данни показват, че в световен мащаб между 3-7% от всички двойки имат трайни репродуктивни проблеми. Според предвижданията, честотата на безплодие ще нараства прогресивно в следващото десетилетие и съотношението между инфертилни и фертилни двойки ще се промени от 1:7 до 1:3.

Много от двойките с репродуктивни проблеми прибегват до асистираните репродуктивни техники (АРТ). За съжаление успеваемостта при АРТ е сравнително ниска - около 30%. Една от причините както за безплодието, така и за ниската успеваемост при *in vitro* оплождането, е оксидативният стрес (ОС) – състояние, при което генерирането на активни форми на кислорода (АФК) надхвърля капацитета на антиоксидантната система на клетките да елиминира тяхната продукция и вредно действие.

Докато семенната плазма е богата на антиоксиданти (*Gallardo, 2007*), сперматозоидите съдържат ограничено количество цитоплазма и антиоксидантите в тях са малко. Отстраняването на семенната плазма при обработка за АРТ води до увеличаване на податливостта на сперматозоидите към оксидативно увреждане, поради недостиг на защитни системи. Един от мотивите за отстраняването на плазмата е присъствието в нея на мотилитетния инхибитор, произхождащ от семеногелин I и II (*Yoshida et al., 2003*), а също и наличието на левкоцити в някои еякулати (*Henkeland Schill, 2003*) - основен източник на АФК. Центрофугирането (*Chi et al., 2008*), както и процесът на замразяване-размразяване на семенния материал (*Di Santo et al., 2012*) са свързани с генериране на АФК. През 2000 г. *Bilodeau* и сътр. установяват, че АФК, генерирани по време на циклите на замразяване-размразяване, са определящи за функциите на сперматозоидите и че нивата на антиоксидантите намаляват при всеки следващ цикъл.

При възникване на оксидативен стрес се наблюдават следните процеси: 1) АФК увреждат мембраната на сперматозоидите, съдържаща голям брой полиненаситени мастни киселини, които са податливи на атаки от страна на АФК – т. нар. липидна пероксидация; това води до понижена подвижност и затруднена фузия между сперматозоида и яйцеклетката (*Agarwal et al., 1994 г.; Kobayashi et al., 2001; Zalata et al., 2004*); 2) АФК увреждат митохондриите, което понижава енергийната наличност в клетката и също може

да затрудни движението на сперматозоидите (*de Lamirande and Gagnon, 1992; de Lamirande et al., 1997, 1998*). Нарушеният мотилитет е причина по-малък брой сперматозоиди да достигнат до яйцеклетката, а това силно намалява вероятността да настъпи оплождане (*Whittington et al., 1999; Kao et al., 2007*). 3) АФК увреждат дезоксирибонуклеиновата киселина (ДНК) на сперматозоидите. СР са способни директно да атакуват както пуриновите и пиримидиновите бази, така и захарофосфатния скелет на ДНК. Много често, въпреки увредения си генетичен материал, сперматозоидите запазват оплодителната си способност, поради което е възможно да се развият ембриони с генетични изменения (*Moustafa et al., 2004; Tominaga et al., 2004; Javier, 2015*).

Първоначално се е предполагало, че H_2O_2 е основният токсичен агент, увреждащ сперматозоидите. Понастоящем е добре известно, че нито супероксидният анион радикал, нито продуктът от неговата дисмутация - H_2O_2 са в състояние да инициират липидна пероксидация, но е възможно да генерират хидроксилни радикали ($HO\cdot$) в присъствие на незначителни количества метали с променлива валентност (като желязо или мед). Хидроксилните радикали са силно реактивоспособни, с много кратък полуживот и с изключително ограничен радиус на дифузия. На практика те атакуват и окисляват първата срещната молекула. Днес се приема, че тези радикали имат най-силно увреждащо действие върху клетъчните структури (*Parekattil and Agarwal, 2012*).

Катализиращата роля на металните йони в Хабер-Вайсовата реакция лежи в основата на нашата хипотеза, че хелирането им ще предотврати образуването на $HO\cdot$ радикали. От една страна в спермата нормално присъстват метални йони и е установено, че мъже с тератозооспермия имат повишени концентрации на желязо, които корелират с нарушена морфология на сперматозоидите (*Marzec-Wróblewska et al., 2011*). От друга страна, повечето използвани среди (напр. *ALLGard Wash*) не съдържат антиоксиданти, но съдържат соли, обикновено с примеси на железни и медни йони.

Данните за ефекта от приложението на хелатора десферал са ограничени и повечето изследвания не са правени с човешка, а с животинска (говежда и овнешка) сперма (*Upreti et al., 1997*). Освен това липсва информация за прилагането на този хелатор при АРТ.

Актуалността на проблема с безплодието при човек определя необходимостта от проучвания, които да бъдат насочени към увеличаване на успеваемостта при *in vitro* оплождането и последващо развитие на здрав, без генетични аномалии, ембрион.

Настоящите изследвания целят проучването на възможността за запазване и подобряване на качеството на сперматозоидите, използвани при АРТ чрез прилагане на метални хелатори. Резултатите биха позволили разработване на научно-обосновани стратегии, повишаващи ефективността на тези техники.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Основната цел на настоящата работа е да се проучи възможността, чрез прилагане на метални хелатори, да се запази и подобри качеството на сперматозоидите, използвани при асистираните репродуктивни техники. Това би послужило като научна основа за изработване на стратегии, повишаващи успеваемостта при асистирана репродукция.

Научни задачи:

Установяване ефекта на различни прооксидантни фактори (H_2O_2 , желязни катиони, комбинация от H_2O_2 и желязни катиони) върху функционалните параметри и про/антиоксидантния статус на сперматозоиди.

Установяване ефекта на металния хелатор десферал върху функционалните параметри и про/антиоксидантния статус на сперматозоиди.

Установяване на концентрацията на микроелементи (*Fe, Cu, Zn, Se*) в семенна плазма при пациенти с отклонения от нормалната спермограма и вероятна корелация с показателите на оксидативен стрес и функционалните показатели подвижност и морфология.

Установяване на влиянието на морфологията на сперматозоидите върху развитието и имплантацията на нормални ембриони.

Изследване на ДНК-фрагментации чрез кометен анализ при човешки сперматозоидислед индукция на ОС при липса и наличие на десферал.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Бяха използвани семенни проби от нерези човешки семенни проби.

Приложихме следните методи:

Обработка на семенните проби чрез центрофугиране в плътностен градиент и *swim up*;

Анализ на концентрацията, подвижността и морфологията на сперматозоидите;

Отчитане на ДНК-фрагментациите чрез кометен тест;

Определяне ПОЛ чрез ТБК-тест (*Hunter et al.*, 1963);

Определяне на тоталния глутатион чрез метода на *Tietze*, 1969;

Определяне активността на каталаза по метода на *Aebi* (1970);

Определяне активността на глутатион пероксидаза по метода на *Gunzler* и сътр. (1972);

Определяне активността на супероксид дисмутаза по метода на *Beauchamp & Fridovich* (1971);

Определяне концентрацията на микроелементи в човешка семенна плазма чрез атомно-абсорбционна спектрофотометрия.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Нива на някои метални йони и антиоксидантна ензимна активност в семенни проби на мъже с репродуктивни проблеми

Дизайн на експеримента:

Бяха изследвани семенни проби от мъже на възраст 24-38 г., постъпили за спермограма в СБАЛГАР "Д-р Малинов". Пробите бяха категоризирани като:

- нормозооспермични (концентрация на сперматозоидите $\geq 15 \text{ mln/mL}$; подвижност на прогресивно подвижните сперматозоиди $\geq 32\%$; обща подвижност $\geq 40\%$ и нормална морфология на сперматозоидите $\geq 14\%$),
- олигозооспермични (концентрация на сперматозоидите - под норма),
- астенозооспермични (подвижност на сперматозоидите - под норма)
- и тератозооспермични (морфология на сперматозоидите - под норма).

От изследваните проби бяха подбрани 24 еякулата, по 6 в група. В семенните проби на здрави контроли (n=6) и пациенти с отклонения от нормата (общ брой n=18, три групи по 6) бяха определени: нива на ПОЛ и общ глутатион като маркери на ОС, а също и концентрация на желязо, мед, цинк и селен.

Резултати:

В **таблица 1** са представени средните стойности на изследваните характеристики на сперматозоидите при здрави контроли и при пациенти с отклонения от нормата. Броят, подвижността и процентът на сперматозоидите с нормална морфология бяха значително по-ниски при пациентите, отколкото при здравите контроли. В обема на еякулата не се наблюдаваха съществени разлики между групите изследвани лица.

	Нормо- Зооспермия (n=6)	Терато- зооспермия (n=6)	Астенотерато- зооспермия (n=6)	Олиготерато- зооспермия (n=6)
Възраст (години)	36,00±4.55	30.50±4.60	35.50±0.35	37.02±3.35
Обем на еякулата (mL)	2.53±0.93	2.9±0.07	3.03±0.69	3.29±0.56
Концентрация на сперматозоидите (million/mL)	101.12±18.9	61.98±16.38*	25.66±3.09*	8.57±0.43*
Подвижност на сперматозоидите (%)	72.89±6.79	59.56±4.98*	27.85±3.01*	50.47±5.49*
Морфология на сперматозоидите/патологични форми (%)	85.29±2.25	98.0±4.71*	90.75±5.94*	93.79±3.15*

Таблица 1. Концентрация, подвижност и морфология на сперматозоидите при изследваните групи пациенти.

Резултатите са представени като средна стойност ± стандартно отклонение (SD)

*статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо показателите на пациентите с нормозооспермия.

В **таблица 2** са представени нивата на ТБК-РС и *GSH* в семенна плазма при мъже с нормозооспермия, тератозооспермия, астенотератозооспермия и олиготератозооспермия. Нивата на ТБК-РС бяха значително завишени при патологичните групи, като при пациенти с тератозооспермия бяха три пъти по-високи, а при такива с астенотератозооспермия - четири пъти по-високи. Нивата на *GSH* бяха най-високи при мъже с нормозооспермия, но почти два пъти по-ниски при мъже с астенотератозооспермия (**таблица 2**). Беше наблюдавана по-слаба, но статистически достоверна разлика в нивата на глутатион при пациенти с тератозооспермия и олиготератозооспермия в сравнение с нормозооспермичните контроли.

	Нормо- зооспермия (n=6)	Терато- зооспермия (n=6)	Астенотерато- зооспермия (n=6)	Олиготератозоо- спермия (n=6)
ТБК-РС (nmol/mL сперма)	0.92±0.06	2.57±0.20*	3.30±0.35*	1.26±0.14*
<i>GSH</i> (µmol/L)	78.13±7.00	63.50±3.18*	36.10±7.14*	56.00±8.23*

Таблица 2. Нива на ТБК-РС и *GSH* в семенна плазма при мъже с нормозооспермия, тератозооспермия, астенотератозооспермия и олиготератозооспермия. Резултатите са представени като средна стойност ± стандартно отклонение (*SD*) * статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо показателите на пациентите с нормозооспермия.

Концентрацията на микроелементите в семенната плазма е представена в **таблица 3**. Нивата на цинк и селен бяха значително по-ниски в патологичните групи, отколкото в контролната. Концентрацията на желязо беше по-висока в астенотератозооспермичната група в сравнение с нормозооспермичната ($4,25 \pm 0,53$ спрямо $2,70 \pm 0,19$ mg/L). Не бяха открити значителни разлики в концентрацията на мед в изследваните групи.

	Нормо- зооспермия (n=6)	Терато- зооспермия (n=6)	Астенотерато- зооспермия (n=6)	Олиготератозоо- спермия (n=6)
Желязо (mg/L)	2,70±0,19	3,05±0,24	4,25±0,53*	2,90±0,30
Мед (mg/L)	136.33±10.71	126.00±11.31	144.00±2.83	120.20±15.32
Цинк (mg/L)	150.67±4.75	127.00±12.37*	127.50±5.30*	120.40±13.98*
Селен (µg/L)	72.00±3.86	61.98±6.38*	60.00±3.54*	59.00±5.40*

Таблица 3. Концентрация на желязо, мед, цинк и селен в семенна плазма при мъже с нормозооспермия, тератозооспермия, астенотератозооспермия и олиготератозооспермия. Резултатите са представени като средна стойност ± стандартно отклонение (*SD*) *статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо показателите на пациентите с нормозооспермия.

Както се вижда от **таблица 4**, концентрацията на *Fe* корелира позитивно с нивата на ТБК-РС и негативно с тези на *GSH*. Редуцираният глутатион в семенната плазма корелира положително с подвижността на сперматозоидите.

	Възраст	Обем	Концентрация	Подвижност	Морфология	Fe	Cu	Zn	Se	MDA
Възраст										
Обем	-.618 .032									
Концентрация	-.351 .263	-.006 .984								
Подвижност	-.549 .065	.543 .068	.483 .111							
Морфология	.031 .923	.174 .588	-.809 .001	-.493 .103						
Fe	-.053 .869	.018 .957	-.195 .543	-.403 .193	.361 .249					
Cu	-.468 .125	.447 .146	.296 .350	.261 .412	-.153 .635	.451 .141				
Zn	.057 .860	-.135 .676	.375 .230	.335 .287	-.513 .088	-.436 .156	-.061 .851			
Se	-.545 .067	.006 .985	.479 .115	.267 .402	-.419 .176	-.261 .412	-.027 .934	.098 .762		
ТБК-РС	.098 .763	-.204 .525	-.214 .504	-.488 .108	.477 .117	.666 .018	.165 .608	-.180 .576	-.428 .165	
GSH	.002 .996	-.139 .668	.408 .188	.589 .044	-.562 .057	-.689 .013	-.157 .627	.406 .190	.398 .200	-.567 .055

Таблица 4. Връзка между характеристиките на сперматозоидите, прооксидантните/антиоксидантните маркери и химичните елементи в човешка семенна плазма. На горните редове са представени корелационните коефициенти. На долните редове е представена прецизността на корелационните коефициенти. Значимите корелации са означени в зелено.

Бяха изследвани и активностите на антиоксидантните ензими в семенната плазма на пациентите с отклонения в спермалните показатели спрямо тези на здрави контроли (таблица 5).

	Нормо-зооспермия (n=6)	Терато-зооспермия (n=6)	Астенотерато-зооспермия (n=6)	Олиготерато-зооспермия (n=6)
<i>CAT</i> <i>ΔA₂₄₀/min/ mg protein</i>	88.78±7.22	41.76±5.01*	37.76±2.22*	42.68±4.87*
<i>SOD</i> <i>U/mg protein</i>	6.51±0.55	6.68±0.37	6.55±0.48	6.44±0.59
<i>GPx</i> <i>U/mg protein</i>	4.94±0.39	3.29±0.58*	3.08±0.51*	3.16±0.37*

Таблица 5. Активност на антиоксидантните ензими в семенна плазма на пациенти в норма и патология.

Резултатите са представени като средна стойност ± стандартно отклонение (*SD*)

*статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо показателите на пациентите с нормозооспермия.

Получените резултати показаха по-ниски активности на *CAT* и *GPX* в семенните плазми на мъже с патологии в сравнение с тези на мъже с нормални семенни показатели, но не бяха регистрирани разлики в активността на *SOD*.

4.2. Ефект на десферал върху сперматозоиди от нерез, подложени на оксидативен стрес

При изработване на настоящата дисертация първоначално тествахме ефекта на десферал върху еякулати от нерез. Семенните проби от тези животни бяха подходящи поради сравнително големия си обем (120-450 mL при нерез срещу 2-4 mL при човек (Knox, 2015; WHO, 2010)). Този обем позволяваше установяването на основните спермални параметри при прилагането на различни комбинации от прооксиданти в отсъствие и присъствие на десферал. Освен това устройството на сперматозоидите при нерез е много сходно с това при човек, а при разреждане концентрацията им може да се сведе до такава, характерна за човешките еякулати (над 200mln/mL при нерез и над 15 mln/mL при човек (Knox, 2015; WHO, 2010)).

Друга характерна особеност на сперматозоидите от нерез, която ги прави подходящ модел при изследване на човешки еякулати, е структурата на цитоплазмената им мембрана. При представителите и на двата вида количеството на докозахексаеновата киселина в мембраните на сперматозоидите е пряко свързано с броя на прогресивно подвижните клетки и тяхната морфология (*Lenzi et al.*, 2000; *Am-in et al.*, 2011).

Спермалната мембрана при нерези, подобно на останалите бозайници, съдържа голямо количество ПНМК, което ги прави силно податливи на ПОЛ (*Satorre et al.*, 2012). Доказано е, че една от основните причини за безплодие при бозайниците, е именно липидната пероксидация в мембраните на мъжките полови клетки (*Chen et al.*, 2013). Високите нива на ТБК-РС при еякулати от нерез се асоциират с влошена подвижност (*Kumaresan et al.*, 2009). Ето защо поддържането на равновесието между продукцията на СР и антиоксидантната защита има значение за качеството на еякулата и оплодителния му потенциал. Балансът между антиоксиданти и прооксиданти в еякулати както при нерез, така и при хора, е необходим за протичането на редица физиологични процеси - капацитация, акрозомна реакция, проникване в яйцеклетката, докато ПОЛ понижава вероятността от оплождане в условия *in vivo* (*Bailey et al.*, 2000).

Подобно на човешките еякулати, основните антиоксиданти, имащи значение за обезвреждане на СР в еякулат от нерез, са *SOD*, *CAT*, *GSH-Px*, *GSH*, *GSSH-Red* (*Surai*, 2006). По-големият обем на пробите от нерез ни подтикна първоначално да определим антиоксидантната ензимна активност и нивата на *GSH* в тях преди да преминем към работа с човешки семенни проби. За целта индуцирахме ОС, използвайки комбинации от различни прооксиданти при наличие и липса на десферал.

Получените резултати от експериментите със сперма от нерез ни дадоха основание да повторим опитните постановки и да проверим ефекта на десферал и при човешки еякулати.

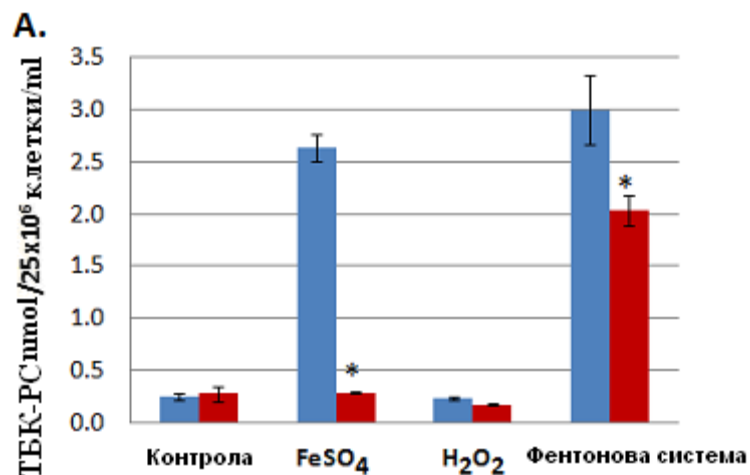
Дизайн на експеримента:

Непосредствено след доставянето на семенните проби от нерез (n=18) до лабораторията, всеки от еякулатите се разделяше на по две равни части. След определяне на изходната концентрация на сперматозоидите, едната от тези части се разреждаше във физиологичен разтвор (Експеримент 1), а другата – в търговски разреждател „Средец“ (Експеримент 2).

Всеки от еякулатите (от експеримент 1 и 2) беше инкубиран в аеробни условия за 30 min без добавка (контрола) и с добавка на H_2O_2 (0,5 mM), железни катиони (0,1 mM $FeSO_4$), комбинация от железни катиони и H_2O_2 (Фентонова система) в отсъствие и присъствие на десферал (1 mM). Така бяха получени общо по осем експериментални групи, при пробите, разредени с физиологичен разтвор (Експеримент 1) и при тези, разредени със „Средец“ (Експеримент 2): 1) само разредена сперма; 2) разредена сперма + $FeSO_4$; 3) разредена сперма + H_2O_2 ; 4) разредена сперма + $FeSO_4$ + H_2O_2 ; 5) разредена сперма + десферал; 6) разредена сперма + десферал + $FeSO_4$; 7) разредена сперма + десферал + H_2O_2 ; 8) разредена сперма + десферал + $FeSO_4$ + H_2O_2 . След 30-минутната инкубация измененията в подвижността и морфологията на сперматозоидите бяха повторно отчетени. Бяха определени нивата на липидната пероксидация и общия глутатион, както и антиоксидантната ензимна активност.

Резултати:

Експеримент 1: Резултатите след прилагане на тестваните оксиданти в еякулатите, разредени във физиологичен разтвор, върху нивата на ПОЛ са представени на **фигура 1А**. Инкубирането на сперматозоидите в комбинация от H_2O_2 и $FeSO_4$ доведе до приблизително десетократно увеличаване на ПОЛ. Прибавянето към пробите единствено на $FeSO_4$ доведе до нива на ТБК-РС, близки до тези, генерирани при протичане на Фентонова реакция. В присъствието на десферал в пробите с $FeSO_4$ се наблюдаваше статистически достоверно намаляване на ПОЛ и стойности на ТБК-РС, близки до тези в контролната група проби. Добавянето на хелатор към Фентоновата система доведе до статистически достоверно понижаване на ПОЛ с около една трета (2.99 ± 0.33 спрямо 2.03 ± 0.14 nmol ТБК-РС/mL) – **фигура 1А**.



Фигура 1А. Ефект на $FeSO_4$ (0.1 mM), H_2O_2 (0.5 mM) и $H_2O_2+FeSO_4$ (Фентонова система) в отсъствие и присъствиена десферал върху нивата на ТБК-РС след индуциране на ПОЛ в пробите от нерез, разредени във физиологичен разтвор.

*статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо пробите, инкубирани в отсъствие на десферал.

Добавянето в инкубационната среда на H_2O_2 , както и на $H_2O_2+FeSO_4$ доведе до статистически достоверно понижаване броя на бързо- и бавноподвижните сперматозоиди и до увеличаване този на неподвижните в сравнение с контролата (**таблица 6А**). Инкубирането на пробите само с $FeSO_4$ също понижи статистически достоверно броя на бързо- и бавноподвижните прогресивни сперматозоиди в сравнение с контролата (7% и 14% спрямо 21% и 62% в контролата). Добавянето на десферал към пробите, инкубирани с прооксиданти, доведе до статистически достоверно повишаване на прогресивноподвижните сперматозоиди и намаляване на неподвижните в сравнение с пробите без добавен десферал.

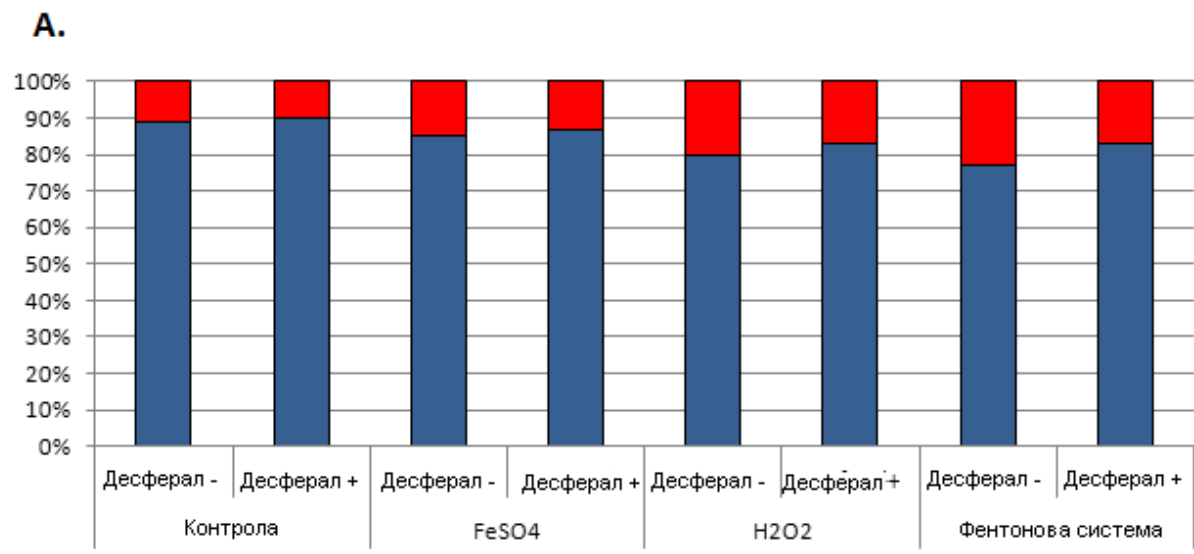
	Контрола		FeSO ₄		H ₂ O ₂		Фентонова система	
	-	Десферал	-	Десферал	-	Десферал	-	Десферал
Сперматозоиди (%)	-	Десферал	-	Десферал	-	Десферал	-	Десферал
Бързо прогресивни	21±0,2	28±1,3	7±0,3	18±0,7*	0	5±0,1*	0	0
Бавно прогресивни	62±1,3	60±1,6	14±0,9	49±0,8*	3±0,1	14±0,3*	0	5±0,1*
Непрогресивни	12±0,8	8±0,2	20±0,5	10±0,5*	25±0,9	20±0,8	13±1,0	21±1,2*
Неподвижни	5±0,1	4±0,1	59±1,2	23±0,7*	72±1,8	61±1,5*	87±2,5	74±1,9*

Таблица 6 А. Ефект на $FeSO_4(0.1\text{ mM})$, $H_2O_2(0.5\text{ mM})$ и $H_2O_2+FeSO_4$ (Фентонова реакция) при наличие или липса на десферал върху спермалната подвижност на проби от нерез, разредени във физиологичен разтвор.

Резултатите бяха изразени като средни стойности \pm SE, n=18;

*статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо пробите, инкубирани в отсъствие на десферал.

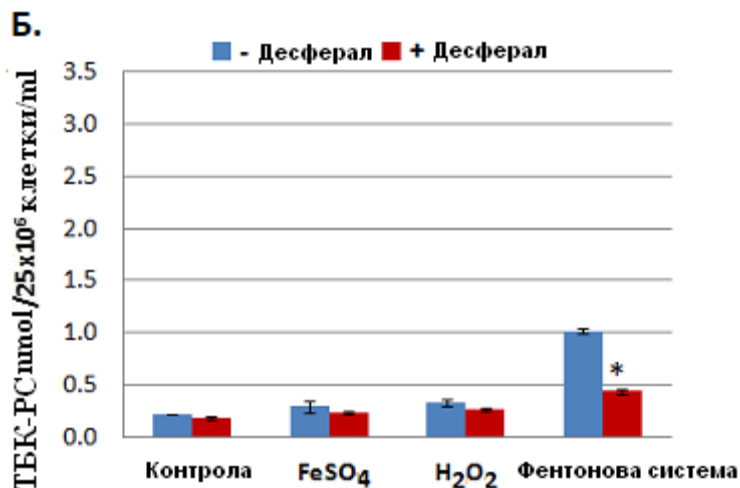
След инкубиране на сперматозоидите с $FeSO_4$, H_2O_2 или $FeSO_4 + H_2O_2$ бяха установени нарушения в морфологията им. Процентът на сперматозоидите с нормална морфология намаляваше статистически достоверно в сравнение с контролната група (89%) след инкубиране на пробите с $FeSO_4(85\%)$, $H_2O_2(80\%)$ или $FeSO_4+H_2O_2(78\%)$. Добавянето на десферал показва, макар и слаба, тенденция към подобряване морфологията на мъжките полови клетки (фигура 2А).



Фигура 2А. Ефект на $FeSO_4(0.1 \text{ mM})$, $H_2O_2 (0.5 \text{ mM})$ и $H_2O_2+FeSO_4$ (Фентонова реакция) при наличие и липса на десферал върху спермалната морфология в проби от нерез, разредени във физиологичен разтвор.

Експеримент 2: Резултатите при еякулатите, разредени със „Средец“ показаха, че:

- 1) в сравнение с контролната група, добавянето само на $FeSO_4$ към пробите, не оказва съществено влияние върху количеството ТБК-РС (0.21 ± 0.02 спрямо $0.29 \pm 0.02 \text{ nmol ТБК-РС/mL}$);
- 2) инкубирането на пробите само с H_2O_2 слабо увеличаватези съединения (0.21 ± 0.02 спрямо $0.33 \pm 0.01 \text{ nmol ТБК-РС/mL}$) и
- 3) добавянето на комбинация от Fe^{2+} и H_2O_2 в инкубационната среда води до приблизително петкратно увеличаване нивата на ТБК-РС (0.21 ± 0.02 спрямо $1.02 \pm 0.02 \text{ nmol ТБК-РС/mL}$) (**фигура 1Б**). Повишаването на липидната пероксидация при сперматозоидите след добавяне на H_2O_2 в средата, вероятно се дължи на наличието на следи от метали, въпреки че беше използвана дейонизирана вода за приготвяне на работните разтвори. Добавянето на десферал (желязо-хелиращ агент) доведе до статистически значимо понижаване на липидната пероксидация във Фентоновата система.



Фигура 2Б. Ефект на $FeSO_4$ (0.1 mM), H_2O_2 (0.5 mM) и $H_2O_2+FeSO_4$ (Фентонова система) в присъствие и отсъствие на десферал върху нивата на ТБК-РС след индуциране на ПОЛ в проби от нерез, разредени в „Средец“.

*статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо пробите, инкубирани в отсъствие на десферал.

При пробите, разредени със „Средец“, тридесет минутната инкубация с H_2O_2 доведе до статистически достоверно намаляване на процента прогресивно подвижни сперматозоиди в сравнение с контролата. Това се отнасяше както за бързопрогресивните, така и за бавнопрогресивните форми (**таблица 6Б**). Намаленият процент прогресивно подвижни сперматозоиди беше за сметка на увеличаване процента на непрогресивно подвижните и неподвижните. Прилагането на хелатор оказваше благоприятен ефект като броят на прогресивно подвижните сперматозоиди нарастваше статистически достоверно, докато този на непрогресивно подвижните и неподвижните намаляваше. Инкубирането на сперматозоиди във Фентонова система ($H_2O_2 + Fe^{2+}$) доведе до статистически значимо понижаване подвижността на сперматозоидите: 73% неподвижни (при 1% в контролата). Наличието на десферал в инкубационната среда оказваше благоприятен ефект. Процентът на неподвижните сперматозоиди намаля статистически достоверно от 73% до 53% (**таблица 6Б**), а този на прогресивно подвижните се увеличи – 1% бързо прогресивно подвижни и 8% бавно прогресивно подвижни срещу 0% бързо прогресивно подвижни и 2% бавно прогресивно подвижни в пробите без десферал. В сравнение с контролата, добавянето на $FeSO_4$ в средата не доведе до промяна в спермалния мотилитет.

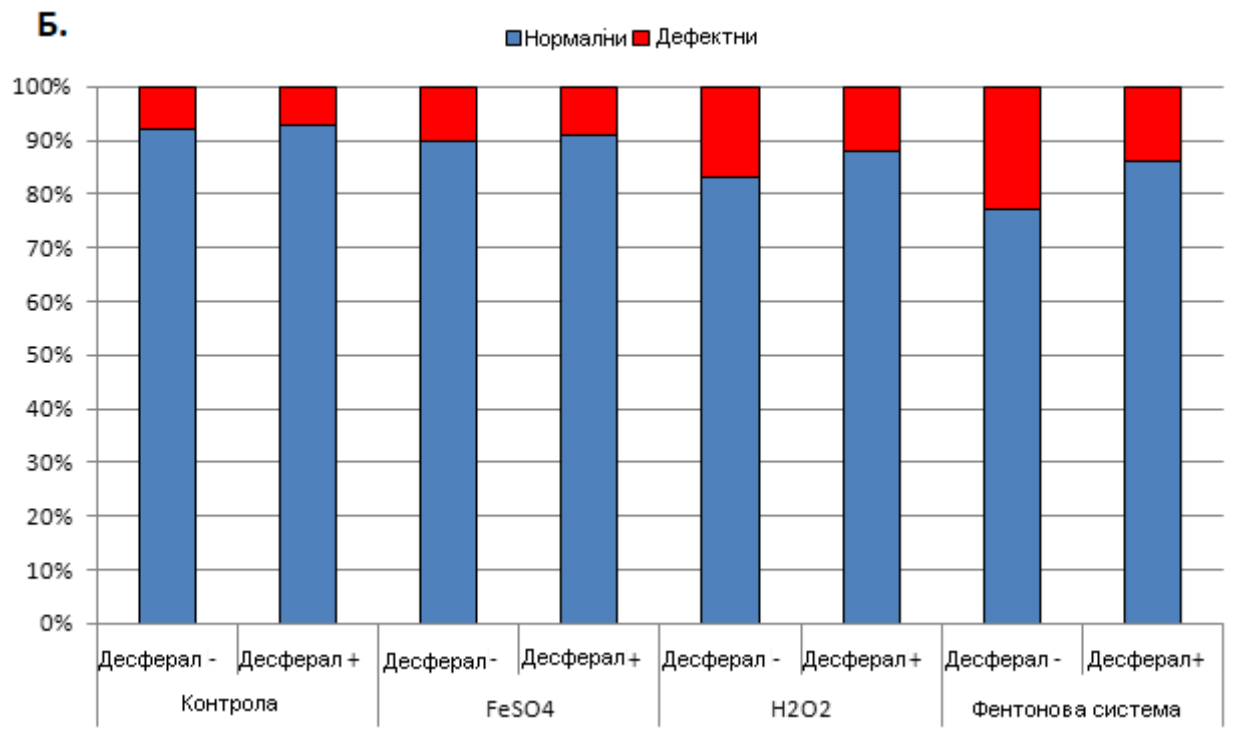
	Контрола		FeSO ₄		H ₂ O ₂		Фентонова система	
	-	Десферал		Десферал		Десферал		Десферал
Сперматозоиди (%)								
Бързо прогресивни	38±0,8	37±0,5	32±0,5	35±0,9	2±0,1	8±0,2*	0	1±0,1*
Бавно прогресивни	54±1,3	57±1,2	32±1,2	35±1,2	7±0,2	20±1,3*	2±0,1	8±0,3*
Непрогресивни	7±0,4	5±0,2	24±0,9	20±0,2	35±1,2	27±1,8*	25±0,8	38±0,8*
Неподвижни	1±0,2	1±0,1	12±0,8	10±0,3	56±1,2	45±0,6*	73±2,2	53±1,9*

Таблица 6 Б. Ефект на $FeSO_4$ (0.1 mM), H_2O_2 (0.5 mM) и $H_2O_2+FeSO_4$ (Фентонова реакция) при наличие или липса на десферал върху спермалната подвижност на проби от нерез, разредени в „Средец“.

Резултатите са изразени като средни стойности $\pm SE$, $n=18$;

*статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо пробите, инкубирани в отсъствие на десферал.

Излагането на сперматозоидите на действието само на $FeSO_4$, както и само на H_2O_2 доведе до намаляване броя на морфологично нормалните форми. Прилагането на десферал редуцира този ефект (**фигура 2Б**). Процентът на сперматозоидите с нормална морфология намаля значително в сравнение с контролната група (92% спрямо 77%). Наличието на десферал доведе до подобряване на спермалната морфология, като броят на нормалните сперматозоиди се повиши от 77% до 86%.

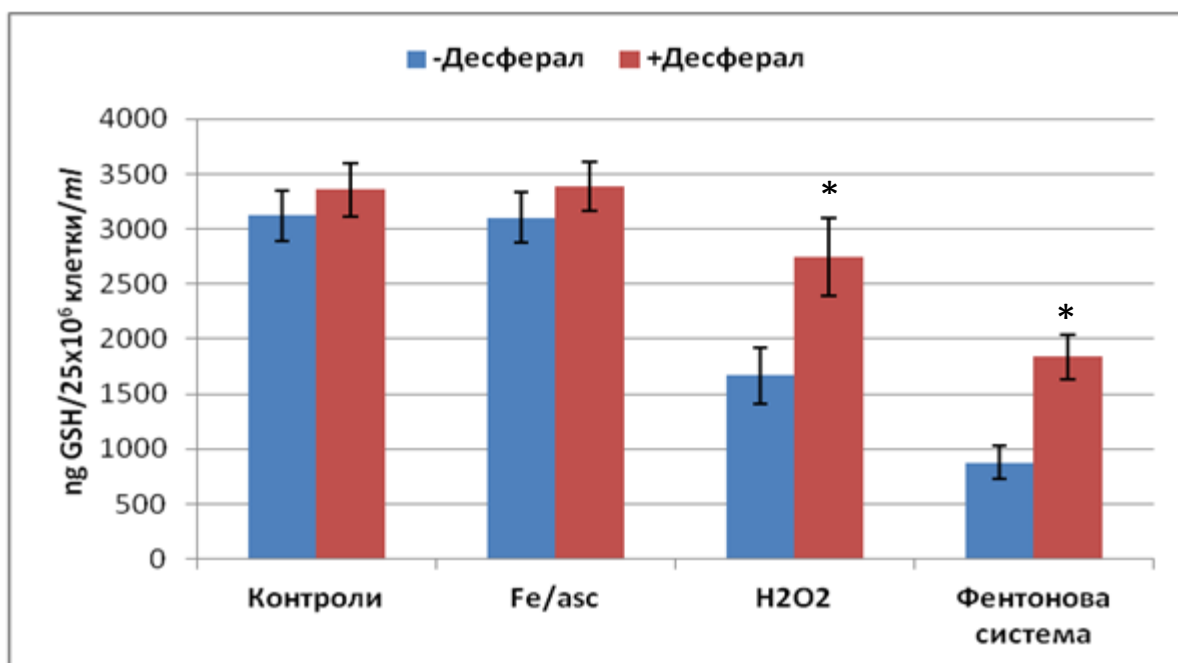


Фигура 2Б. Ефект на $FeSO_4$ (0.1 mM), H_2O_2 (0.5 mM) и $H_2O_2+FeSO_4$ (Фентонова реакция) при наличие и липса на десферал върху спермалната морфология в проби от нерез, разредени в „Средец“.

Аналогично на Експеримент 1, и при Експеримент 2 добавянето в инкубационната среда на H_2O_2 , както и на $H_2O_2+FeSO_4$ понижи статистически достоверно броя на бързо- и бавноподвижните сперматозоиди и увеличи този на неподвижните в сравнение с контролата (**таблица 6Б**). За разлика от експеримент 1, инкубирането на пробите от експеримент 2 само с $FeSO_4$ доведе до по-слабо понижаване броя на бързоподвижните прогресивни сперматозоиди в сравнение с контролата (32% спрямо 38% в контролата). Това би могло да се обясни с наличието на $EDTA$ в разредителя „Средец“ и липсата на този хелатор във физиологичния разтвор. Наличието на десферал оказваше благоприятен ефект най-вече при пробите, инкубирани с H_2O_2 и $H_2O_2+FeSO_4$, намалявайки статистически достоверно броя на неподвижните и увеличавайки този на прогресивно подвижните (**таблица 6Б**). Дисморфизмите при еякулатите, разредени както със „Средец“, така и с физиологичен разтвор, се наблюдаваха основно в областта на главата и опашката.

Така получените резултати показаха, че дори при използването на търговски разредител, в състава на който са вложени редица компоненти, целящи да запазят качествата на сперматозоидите, прилагането на специфичен хелатор има положителен ефект в условия на оксидативен стрес.

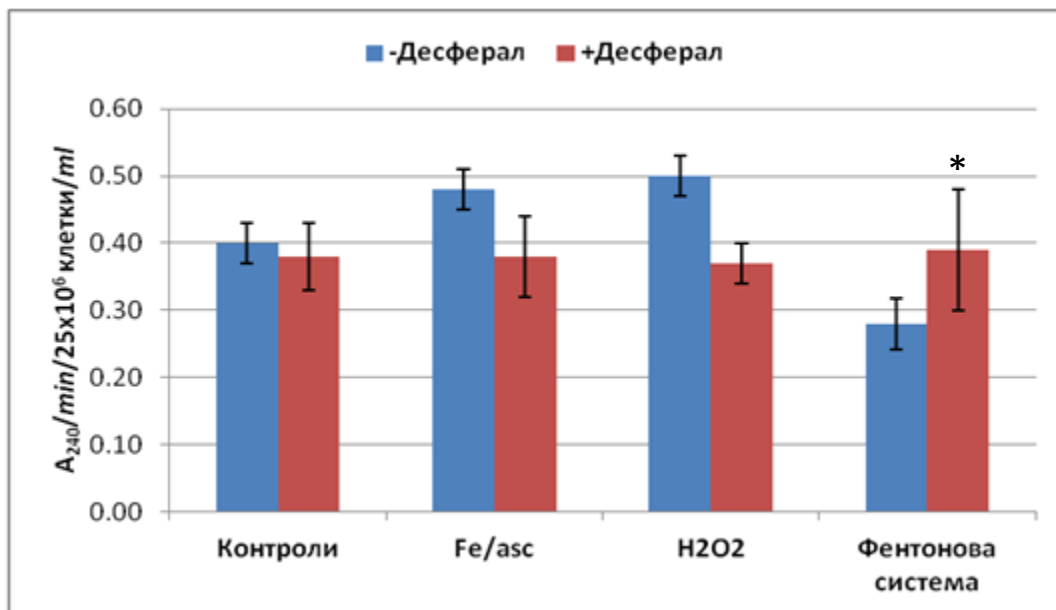
Ефектът на десферал върху антиоксидантната защитна система на сперматозоидите беше изследван само в условията на Експеримент 2 (еякулати, разредени с разредител „Средец“).



Фигура 3. Влияние на десферал върху нивата на *GSH*

Най-високи нива на общ глутатион бяха отчетени в контролата (**фигура 3**). Добавянето на желязо в средата не оказва съществено влияние, докато добавянето само на H_2O_2 , както и протичането на Фентонова реакция доведоха до статистически значимо понижаване на общия глутатион. Най-ниски нива на трипептида се наблюдаваха във Фентоновата система. Добавянето на десферал оказваше благоприятен ефект във всички комбинации, включително и в контролата, но този ефект беше най-ясно изразен в пробите, в които протичаше Фентонова реакция и в тези, съдържащи само H_2O_2 .

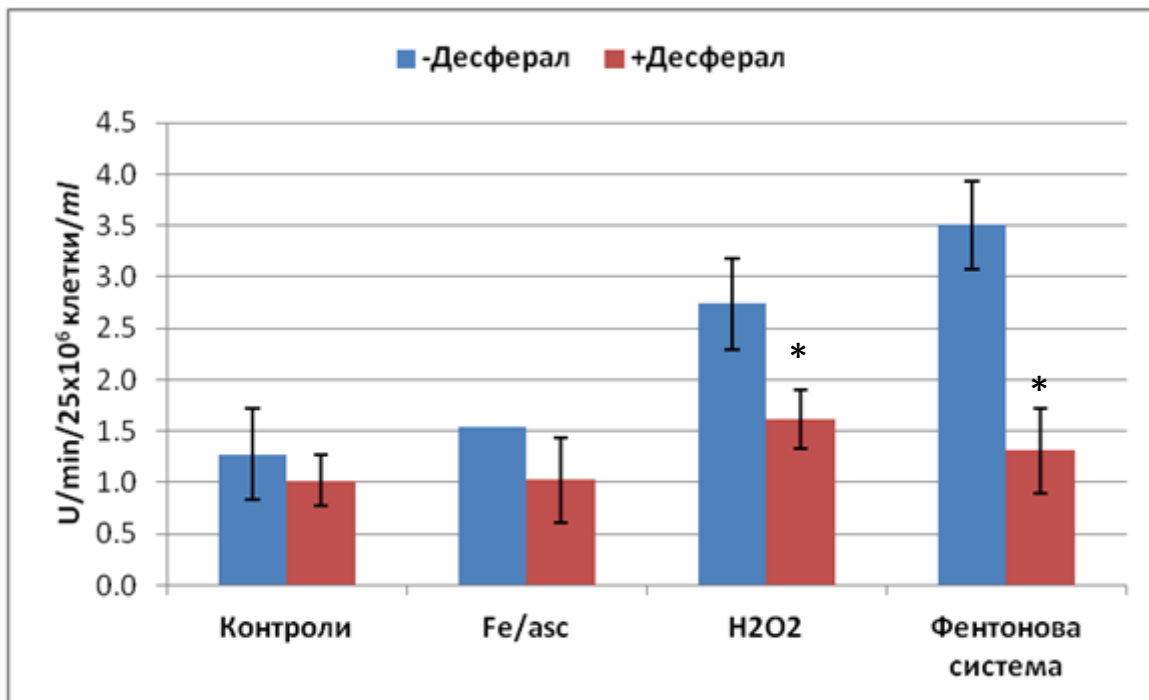
Резултатите показаха, че антиоксидантната ензимна активност се променя в условия на оксидативен стрес.



Фигура 4. Ефект на десферал върху каталазната активност след индуциране на ОС в еякулат от нерез.

*статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо пробите, инкубирани в отсъствие на десферал.

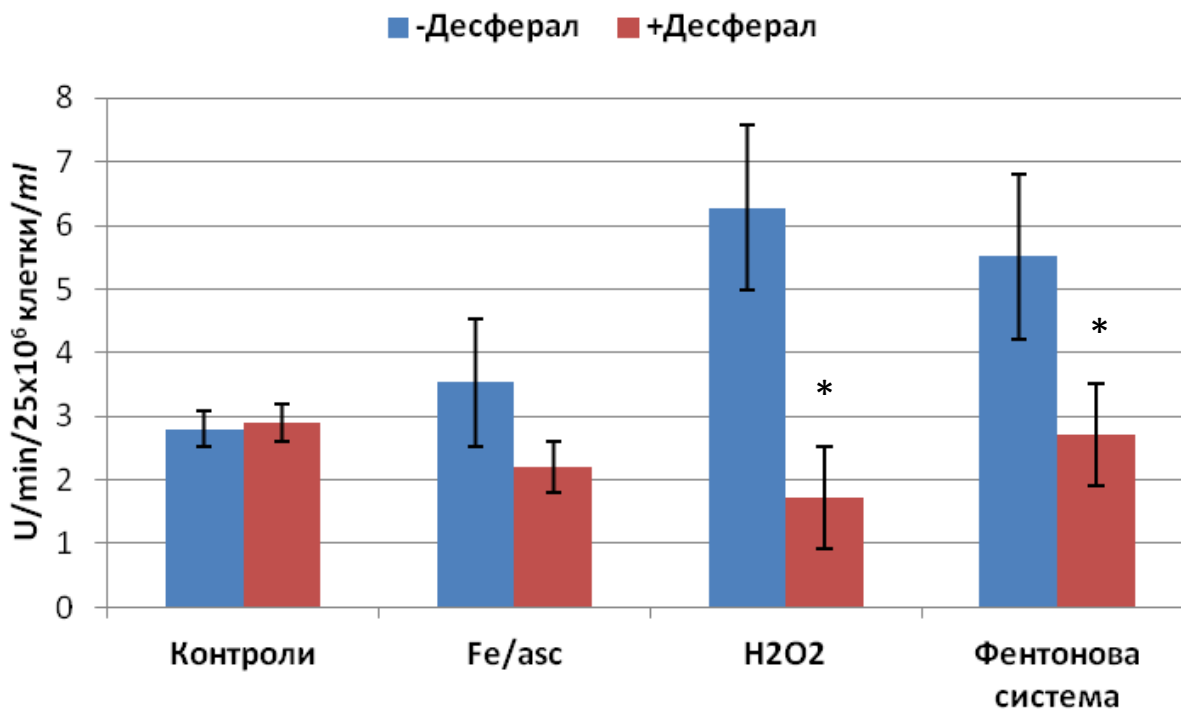
По-висока активност на каталазата беше отчетена в проби, инкубирани с *Fe/asc* и *H₂O₂* в сравнение с тази на контролите (**фигура 4**). Хидроксилните радикали, генерирани във Фентоновата система, обаче, инхибираха каталазната активност. Добавянето на хелатор възстановяваше ензимната активност до стойностите на ензима в контролните проби.



Фигура 5. Ефект на десферал върху *SOD* активност след индуциране на ОС в еякулат от нерез.

*статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо пробите, инкубирани в отсъствие на десферал.

При протичане на Фентонова реакция активността на ензима *SOD* се повиши почти трикратно в сравнение с контролата (**фигура 5**). Добавянето на H_2O_2 също доведе до статистически достоверно повишаване на *SOD* активността, макар и в по-ниска степен. Инкубирането с десферал доведе до статистически значимо понижаване на ензимната активност в пробите, инкубирани само с H_2O_2 и комбинация $H_2O_2 + FeSO_4$.



Фигура 6. Влияние на десферал върху активността на *GSH-Px* след индуциране на ОС в еякулат от нерез.

*статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо пробите, инкубирани в отсъствие на десферал.

Активността на ензима *GSH-Px* също показва най-високи стойности в присъствие на H_2O_2 . Добавянето на десферал възстанови ензимната активност във всички експериментални комбинации до стойностите в контролните проби (**фигура 6**).

От получените резултати се вижда, че в условия на ОС повишените активности на антиоксидантните ензими не са в състояние да предпазят сперматозоидите от увреждане. При добавяне на H_2O_2 към разредената сперма, както и при протичане на Фентонова реакция, процентът на прогресивноподвижните сперматозоиди е най-нисък за сметка на по-висок процент непрогресивноподвижни и неподвижни. Прави впечатление също и значително влошената морфология на сперматозоидите в тези две комбинации.

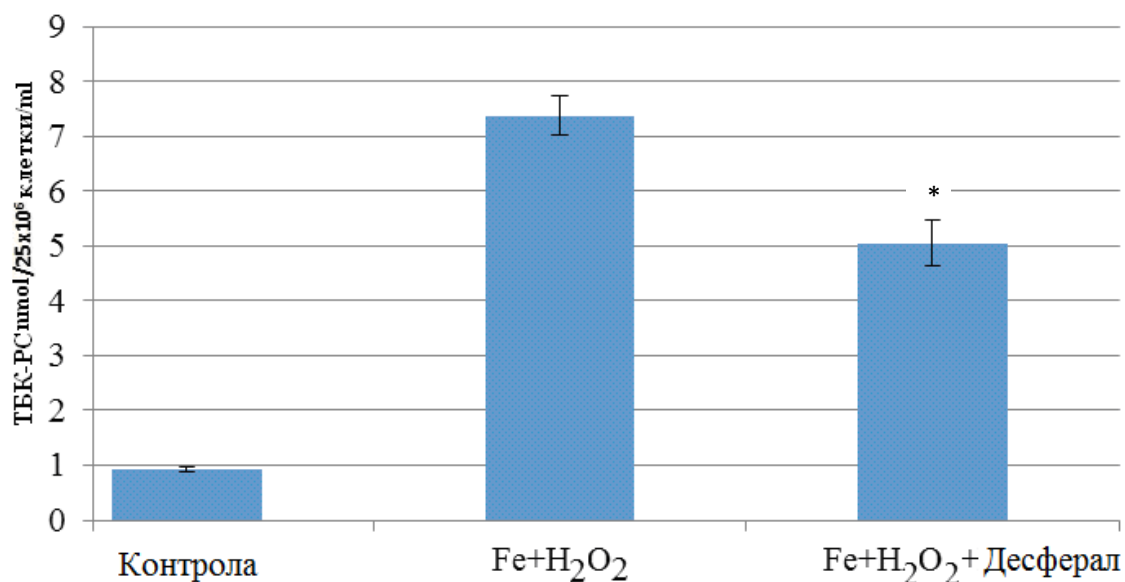
4.3. Ефект на Десферал върху човешки сперматозоиди, подложени на оксидативен стрес

Дизайн на експеримента:

След втечняване и първоначален анализ на концентрацията на сперматозоидите човешките семенни проби бяха обработени и разредени до крайна концентрация 25×10^6 клетки/*mL*. Сперматозоидите бяха инкубирани за 30 мин. на стайна температура без добавка (контрола) и с добавка на комбинация от $0,1 \text{ mM FeSO}_4$ и $0,5 \text{ mM H}_2\text{O}_2$ (Фентонова система), последната в отсъствие и присъствие на десферал (1 mM). Така бяха формирани 3 експериментални групи. Редуцирането на групите в сравнение с предходния експеримент бе наложено от значително по-малкия обем на човешките еякулати, а също и предвид получените резултати от експеримента с пробите от нерез. Бяха определени подвижността и морфологията на сперматозоидите, както и нивото на ПОЛ.

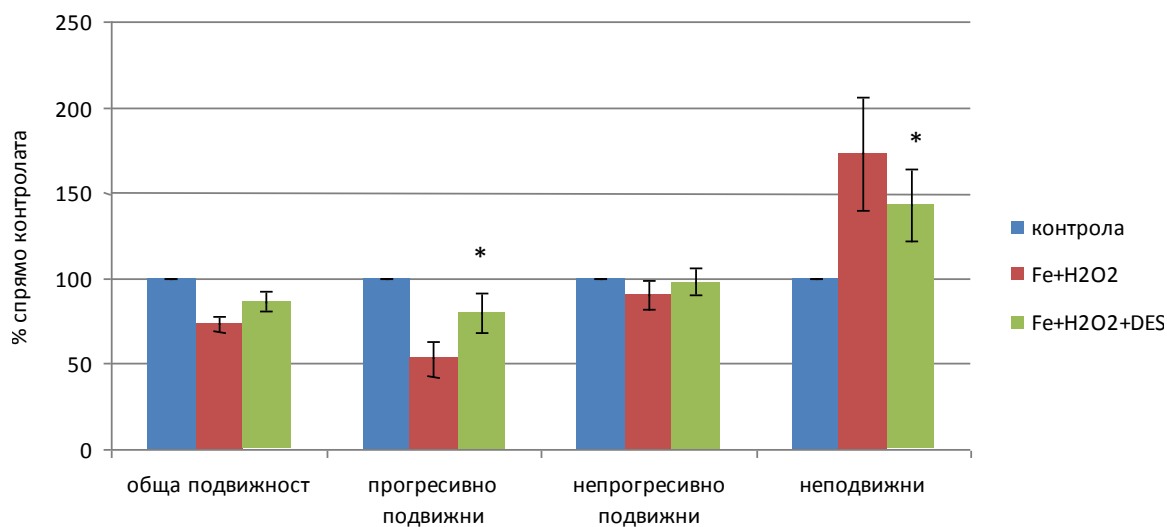
Резултати:

Резултатите бяха аналогични на тези, проведени с еякулати от нерез. Инкубирането на сперматозоидите в присъствие на водороден пероксид и железни йони (Фентонова система) доведе до статистически достоверно увеличаване на нивата на ТБК-РС, а добавянето на хелатор и в този експеримент понижи нивата на ТБК-реагиращите съединения (**фигура 7**).



Фигура 7. Влияние на десферал върху нивата на ТБК-РС на човешки сперматозоиди, подложени на оксидативен стрес.

*статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо пробите, инкубирани в отсъствие на десферал.

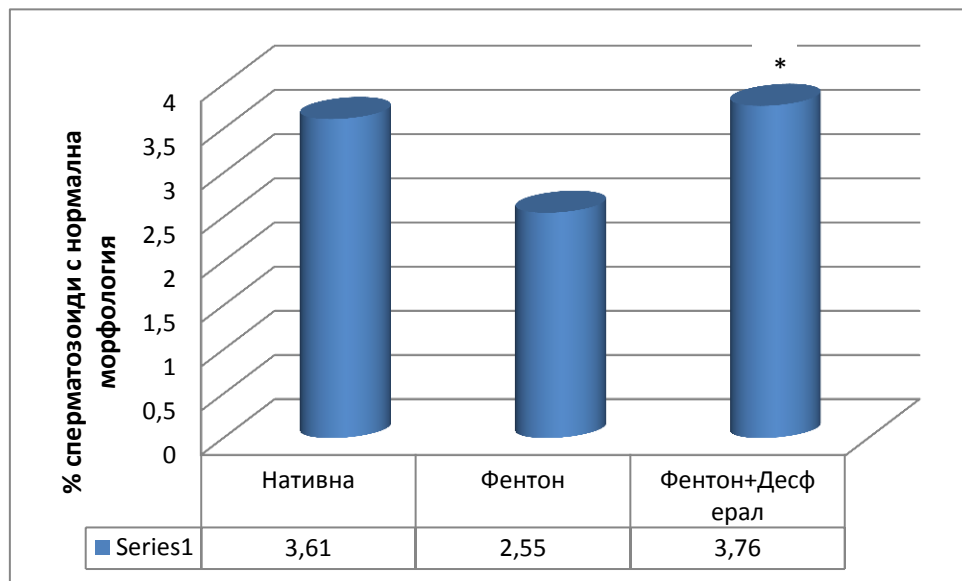


Фигура 8. Влияние на десферал върху подвижността на човешки сперматозоиди, подложени на оксидативен стрес.

*статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо пробите, инкубирани в отсъствие на десферал.

Инкубирането на сперматозоидите във Фентонова система водеше до статистически достоверно (50%) намаляване на прогресивноподвижните и до

увеличаване на процента на неподвижните (**фигура 8**). Добавянето на десферал в системата значително подобри намалената подвижност на сперматозоидите като увеличи процента на прогресивноподвижните клетки.



Фигура 9. Влияние на десферал върху морфологията на човешки сперматозоиди, подложени на оксидативен стрес.

*статистическа достоверност при $P < 0.005$ спрямо пробите, инкубирани в отсъствие на десферал.

След индуциране на Фентонова реакция, процентът сперматозоиди с нормална морфология се понижи в сравнение с този, наблюдаван в контролните проби (2.55% спрямо 3.61%). Добавянето на десферал оказва положителен ефект, възвръщайки изходните стойности (**фигура 9**).

4.4. Влияние на морфологията на сперматозоидите върху развитието на нормални ембриони и имплантирането:

Дизайн на експеримента:

В периода април 2012 г. – април 2014 г. в клиника „Малинов” бяха направени 792 разширени спермограми на мъже на възраст 18-52 години. Анализът на концентрацията и подвижността на сперматозоидите беше извършен съгласно изискванията на *WHO* (2010), а анализът на морфологията - съгласно стриктните критерии на Крюгер. Позовавайки се на последните, разделихме пациентите, постъпили в СБАЛГАР "Д-р Малинов" за

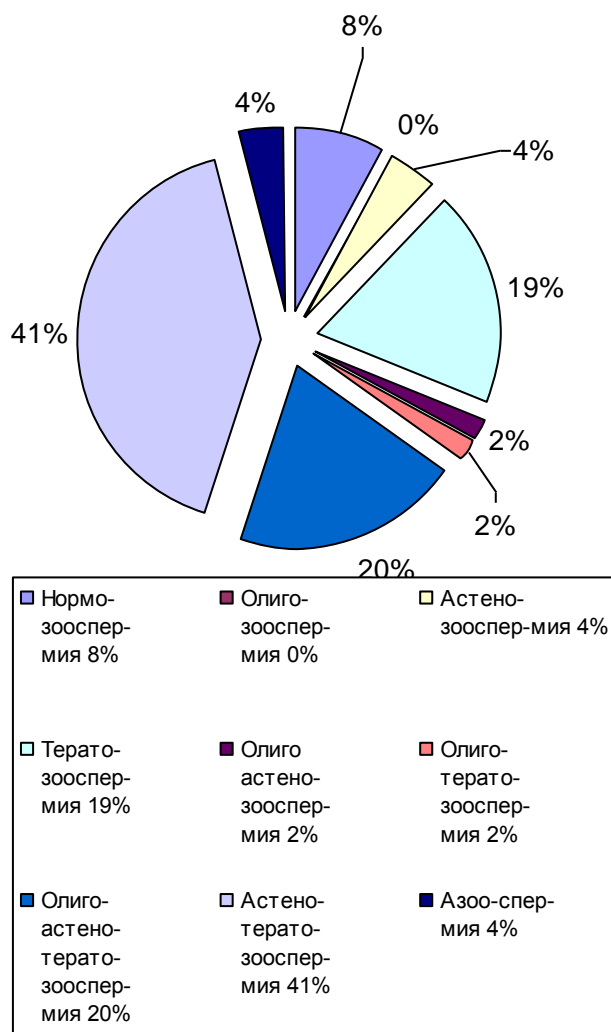
спермограми или кандидатствали за *in vitro* процедури, в три основни групи в зависимост от процента на сперматозоидите им с нормална морфология. В изследването се проследяваше влиянието на морфологията на сперматозоидите върху развитието на нормални ембриони и имплантацията.

Резултати:

Резултатите показаха, че най-често срещаните диагнози са астенотератозооспермия, олигоастенотератозооспермия и тератозооспермия (**таблица 7; фигура 10**). И при трите вида отклонения от нормата беше засегната морфологията на сперматозоидите, като преобладаващи дефекти се наблюдаваха в областта на главата. Засегнати бяха също концентрацията и подвижността, но те не са от такова ключово значение в случай, че оплождането на яйцеклетките се извършва по метода *IMSI*.

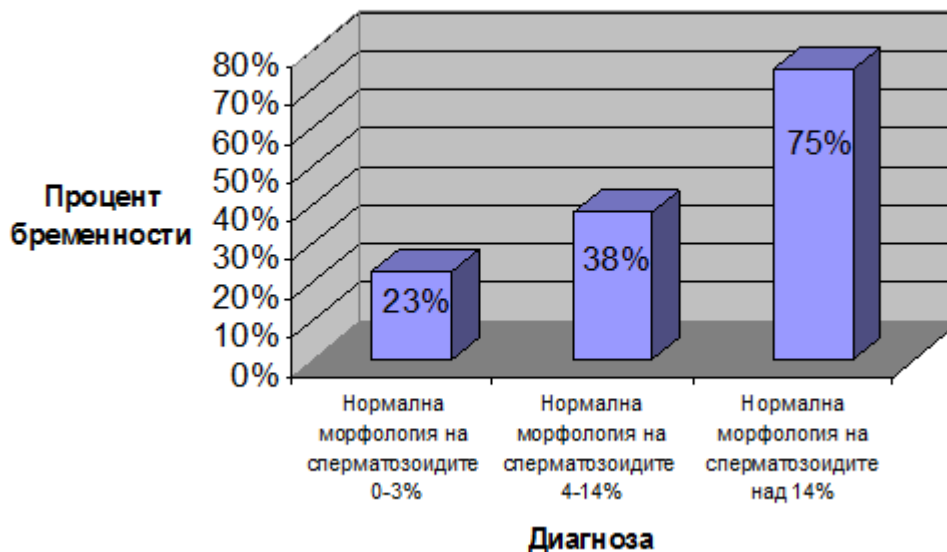
Нормозооспермия:	Състояние, при което спермалните параметри попадат в рамките на референтните стойности на <i>WHO</i> (т.е. > 15 милиона сперматозоиди /mL сперма, > 39 милиона/еякулат; нормална морфология на сперматозоидите)
Олигозооспермия:	Състояние, при което концентрацията на сперматозоидите е по-ниска от референтните стойности на <i>WHO</i> . 5-15 000 000 сперматозоиди /mL семенна проба - показва лека до умерена олигозооспермия; концентрация < 5 милиона / mL - показва тежка олигозооспермия.
Астенозооспермия:	Състояние на намалена подвижност на сперматозоидите, в сравнение с референтните стойности на <i>WHO</i> ; прогресивни – под 32%, обща подвижност – под 40%.
Тератозооспермия:	Състояние, при което сперматозоидите с нормална морфология са < 4% (<i>WHO</i>) или < 14% (Крюгер);
Олигоастенотератозооспермия:	Състояние, при което всички спермални параметри са с поднормални стойности в сравнение с референтните на <i>WHO</i> ;
Азооспермия:	Състояние, при което в отделения еякулат не се откриват никакви сперматозоиди;

Таблица 7. Критерии за поставяне на диагноза след направена разширена спермограма.



Фигура 10. Заключение от спермограмите.

В изследвания период, за *in vitro* процедури кандидатстваха общо 713 двойки, от които 266 (37%) бяха с доказан мъжки фактор. Резултатите показаха, че най-висок процент бременности (75%) има при двойките, при които сперматозоидите с нормална морфология са над 14%, по-малък процент бременности (38%) беше налице в случай, че сперматозоидите с нормална морфология бяха между 4-14% и най-малък процент забременели (23%) бе отчетен при двойките, при които сперматозоидите с нормална морфология бяха между 0-3% (**фигура 11**).



Фигура 11. Корелация между процента сперматозоиди с нормална морфология в еякулата и процента бременности.

4.5. Кометен анализ на ДНК-фрагментации в човешки сперматозоиди след индуциране на оксидативен стрес в присъствие и отсъствие на десферал.

Дизайн на експеримента:

Анализът беше проведен върху семенни проби на трима пациенти на възраст до 35г. след предварително подписване на информирано съгласие от тяхна страна. Еякулатите бяха обработени по метода *swim up*, след което сперматозоидите бяха ресуспендирани в *AllGrad Wash (LifeGlobal)* до крайна концентрация 25×10^6 клетки/*mL*.

Всеки така обработен еякулат беше разделен на по три аликвоти:

1. контрола;
2. проба, третирана с H_2O_2 (0,5 mM) и $FeSO_4$ (0,1 mM) (Фентонова реакция);
3. проба с десферал (1 mM), третирана с H_2O_2 (0,5 mM) и $FeSO_4$ (0,1 mM).

След приключването на едночасовата инкубация на стайна температура, пробите бяха оценени чрез методиката за кометен анализ на сперматозоиди, разработена в Лабораторията по молекулярна генетика към ИМБ – БАН (*Miteva et al., 2009*).

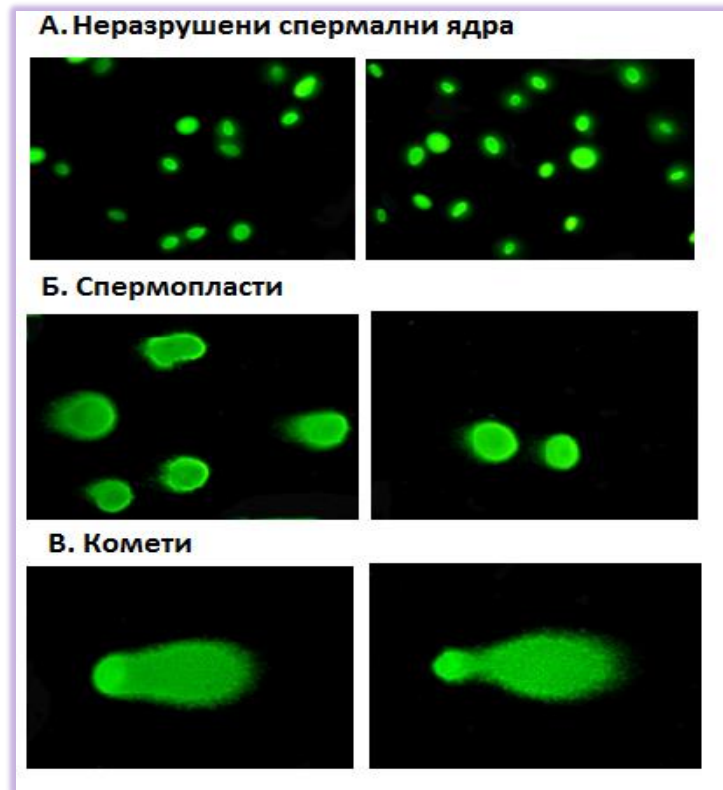
Резултати:

В **таблица 8** са представени резултатите от спермограмите на изследваните еякулати.

Спермални параметри		Диагнози от направените спермограми		
		Нормозоо спермия	Олиго астенотератозооспермия	Астено тератозооспермия
Концентрация на сперматозоидите	$mln/mL \geq 15$ mln/mL	30.78	12.60	10.03
	$mln/еякулат$ ≥ 39 mln/mL	43.36	28.02	26.97
Подвижност на сперматозоидите	Прогресивно подвижни $\geq 32\%$	37.08%	28.40%	22.08%
	Обща подвижност $\geq 40\%$	46.22%	31.10%	28.02%
Морфология на сперматозоидите	нормални $\geq 14\%$	16.00%	3.00%	1.50%
	Дефектни	84.00%	97.00%	98.50%

Таблица 8. Спермални параметри на еякулатите, изследвани с помощта на кометен анализ.

След провеждането на кометния тест бяха наблюдавани неувредени ядра на сперматозоиди, слабо увредени ядра и комети.



Фигура 12. Наблюдаване на спермални ядра, спермопласти и комети след проведен кометен тест.

От **фигура 12** се вижда, че при сперматозоидите без ДНК увреждания хроматинът представляваше компактна структура (**фигура 12А**), докато при сперматозоидите със слабо увредени ядра (спермопласти) той беше по-диспергиран (**фигура 12Б**). Тази рехавост на хроматина беше индикатор за наличие на малък процент разкъсвания в ДНК. Колкото повече разкъсвания в ДНК бяха налице, толкова по-ясно изразена „опашка на кометата” се наблюдаваше (тъй като повече фрагменти се бяха придвижили към анода по време на електрофорезата) (**фигура 12В**).

Резултатите от изследването са представени в **таблица 9**.

Диагноза	Проби	Третиране	Спермални ядра	Спермопласти	Комети
			%	%	%
Нормозооспермия	1 ¹	Контрола	99,8	0	0.2
	1 ²	Фентон	96.6	0	3.4
	1 ³	Фентон+Десферал	100	0	0
Олигоастенотератозооспермия	2 ¹	Контрола	1.0	98.7	0.3
	2 ²	Фентон	1.7	97	1.3
	2 ³	Фентон+Десферал	99.8	0	0.2
Астенотератозооспермия	3 ¹	Контрола	22	74	4
	3 ²	Фентон	0	100	0
	3 ³	Фентон+Десферал	99.6	0.4	0

Таблица 9. Влияние на Фентонова реакция и десферал върху целостта на спермалния хроматин.

От таблицата се вижда, че при пациента с нормозооспермия почти всички сперматозоиди в контролата (99.8%) бяха с неувредена ДНК. След индуциране на Фентонова реакция, кометите в този еякулат се увеличиха с 3.4%, докато добавеният десферал оказваше благоприятно влияние и водеше до елиминиране на ДНК скъсванията при 100% от отчетените сперматозоиди.

Еякулатът на пациента с олигоастенотератозооспермия съдържаше изключително висок процент – 98.7% сперматозоиди със слабо увредена ДНК (спермопласти) и едва 1% сперматозоиди без разкъсвания в ДНК веригата. Индуцирането на Фентонова реакция в този случай увеличи процентът на кометите до 1.3%, докато добавянето на десферал подобри целостта на хроматина при 99.8% от анализираниите гамети.

В семенната проба на пациента с астенотератозооспермия бяха отчетени 22% спермални ядра без ДНК фрагментации, 74% спермопласти и 4% комети. В условия на ОС, спермопластите се повишиха до 100%, а добавеният десферал възстанови целостта на генетичния материал при 99.6% от сперматозоидите.

5. ДИСКУСИЯ

В настоящето изследване на спермални проби от пациенти с нарушени репродуктивни функции бяха установени повишени концентрации на желязни йони в семенната плазма в сравнение с нивата при проби от здрави мъже (**таблица 3**). Наличието на увеличени нива на желязни йони предполага свръхгенериране на СР по механизма на Фентонова реакция и индуциране на оксидативен стрес (ОС). Тази зависимост беше потвърдена от установената статистически достоверна положителна корелация между високите нива на желязо и липидната пероксидация (ЛПО), измерена чрез ТБК-РС, в пробите на пациенти с тератозооспермия, астенотератозооспермия и олиготератозооспермия, както и отрицателна връзка между концентрацията на желязо и нивата на глутатион (**таблица 4**). Високите нива на ТБК-РС и пониженото съдържание на глутатион могат да бъдат една от причините за влошена подвижност и морфология на сперматозоидите. *Huang* и сътр. (2000) също отчитат високи нива на желязо при мъже с астенозооспермия, съпроводени с повишени нива на ТБК-РС. Инкубирането на човешка сперма с желязо (5 mg/L) значително намалява подвижността на сперматозоидите и увеличава нивата на ТБК-РС (*Huang et al.*, 2001). Това навежда на мисълта, че увеличената липидна пероксидация, в отговор на присъствие на желязни йони, може да наруши подвижността на сперматозоидите. Съществуват редица доказателства, че високите стойности на ТБК-РС са негативно свързани с концентрацията, подвижността и морфологията на сперматозоидите (*Rao et al.*, 1989; *Atig et al.*, 2012; *Colagar et al.*, 2013), а също така нарушават и фузията между сперматозоида и яйцеклетката (*Aitken et al.* 1989).

Значителна част от литературните източници сочат, че H_2O_2 е най-токсичната АФК за сперматозоидите (*de Lamirande and Gagnon*, 1992; *Aitken et al.*, 1993; *Guzman et al.*, 2001; *Zini and Al-Hathal*, 2011). Същевременно, обаче, е добре известно, че водородният пероксид и супероксидните анион радикали, както и некатализираната реакция между тях, не са в състояние да инициират ЛПО директно. Необходимо е наличие на метален йон, който да катализира образуването на по-реактивен краен окислител, а именно хидроксилен радикал. За да проверим тази хипотеза, аликвоти от сперма на нерез бяха инкубирани само с Fe^{2+} , само с H_2O_2 и в комбинация с $H_2O_2 + Fe^{2+}$. Получените резултати категорично доказаха, че присъствието на метални йони, а не H_2O_2 , в инкубационната

среда, индуцира ЛПО. На базата на горе получените резултати (повишени нива на желязо в семенна плазма на мъже с репродуктивни проблеми и необходимост от присъствие на желязни йони за инициализиране на ЛПО), както и на факта, че повечето среди, използвани за обработка на човешки сперматозоиди в АРТ (като *ALLGard Wash*) съдържат следи от мед и желязо без антиоксиданти сред компонентите им, ние изградихме хипотеза, че специфичния за желязо хелатор десферал може да окаже положително влияние върху подвижността и морфологията на сперматозоидите чрез намаляване на ОС. Благоприятният ефект на десферал е доказан при редица заболявания с оксидативна етиология и повишени нива на желязо като Паркинсон, сепсис, чернодробна недостатъчност, болест на Уилсън-Коновалов и др. (*Imaizumi et al., 2015; Ritter et al., 2004*). При АРТ, прилагането на метални хелатори (*DL*-пенициламин, 2,3-димеркаптопропан-1 сулфонат и мезо-2,3-димеркапто-секциниламинна киселина) в ин витро условия води до подобряване качеството на сперматозоидите и вероятно би оказало благоприятен ефект върху изхода от манипулациите (*Wroblewski et al, 2003*).

Присъствието на Десферал в реакционната среда, в която се индуцира ОС чрез $FeSO_4$ при сперматозоиди разредени с физиологичен разтвор намалява ЛПО от 2.64 ± 0.13 до $0,28 \pm 0,01 \text{ nmol MDA}/25 \times 10^6$ клетки/ mL (**фигура 1А**). От нашите резултати стана ясно, че наличието на *EDTA* в състава на сперморазредителя „Средец“ намалява ЛПО в сперматозоиди при индуциране на ОС чрез Fe^{2+} и $Fe^{2+} + H_2O_2$ (**фигура 1Б**). Добавянето на десферал в реакционната среда, независимо от наличието на *EDTA* в сперморазредителя, статистически достоверно намалява нивата на ТБК-РС при индуциране на ОС чрез Фентонова система.

Известно е, че Fe^{2+} участва в електронния трансфер, необходим за трансформирането на O_2 до силно реактивоспособния $\cdot OH$, който е в състояние да инициира ЛПО. Според едно от предположенията, образуването на $\cdot OH$ е място-специфично и в протичането на реакцията участват свързани с мембраната желязни йони (*Halliwell and Gutteridge, 1989*). Механизмът на процеса изисква окисляване на Fe^{2+} от H_2O_2 , което означава, че за протичане на ЛПО са необходими както Fe^{2+} , така и Fe^{3+} . Най-голяма вероятност за инициране на ЛПО съществува когато съотношението $Fe^{2+}:Fe^{3+}$ е 1:1 (*Minotti and Aust, 1987*). Генерираните по време на Фентонова реакция хидроксилни радикали стимулират окислението на липидите, декомпозирайки пероксидите до пероксидови

и алкоксилови радикали, което инициира верижно протичащата реакция (*Oschendorf, 1999*). Поради тази причина, улавянето на метални йони, в частност медни и железни, предотвратява ЛПО (*Seis, 1993*), което ясно личи от нашите резултати.

Добавянето на десферал в пробите, разредени с физиологичен разтвор (Експеримент 1) значително увеличи процента на прогресивно подвижните сперматозоиди и съответно намали процента на непрогресивно подвижните и неподвижни гамети при индуциране на ОС както с $FeSO_4$, така и с H_2O_2 и $Fe^{2+}+H_2O_2$. При сперматозоидите, разредени със „Средец“ (Експеримент 2), десфералът имаше подобен ефект при индуциране на ОС с H_2O_2 и $Fe^{2+}+H_2O_2$.

Според редица литературни източници, ОС влошава не само подвижността на сперматозоидите, но и тяхната морфология. Проучването на *Aziz* и сътр. (2004) при здрави фертилни донори и мъже с доказано безплодие показва достоверна отрицателна корелация между нивата на АФК и процента сперматозоиди с нормална форма.

Нашите резултати при провеждане и на двата експеримента (с разредител „Средец“ и с разредител физиологичен разтвор) показаха, че инкубирането на сперматозоидите с $FeSO_4$, с H_2O_2 , както и с комбинация от $FeSO_4$ и H_2O_2 води до увеличаване броя на клетките с патологична морфология. При инкубирането на сперматозоидите в среда, съдържаща Фентонова система, повечето патологични изменения бяха локализирани в опашната област, докато наличието на H_2O_2 в средата доведе до значително увеличаване броя на формите с дефекти в областта на главата. Добавянето на Десферал към всички проби, съдържащи прооксиданти, оказваше благоприятен ефект върху морфологията на сперматозоидите.

Оксидативният стрес повлиява не само липидите, но и другите биомолекули – белтъци, нуклеинови киселини. Има данни, че окислителното модифициране на ензими инхибира тяхната активност (*Stadtman, 1990; Fucci et al., 1983*). По отношение на антиоксидантните ензими, приема се, че първоначално синтезът и активността им се увеличават при индуциране на ОС, след което активността им намалява поради настъпили оксидативни изменения и в тяхната структура.

Получените от нас резултати показаха повишена активност на *CAT*, *SOD* и *GSH-Px* в присъствието на H_2O_2 и $FeSO_4$. Активността на *SOD* и *GSH-Px* беше увеличена и в

присъствието на комбинацията $H_2O_2 + FeSO_4$, но активността на *CAT* беше достоверно намалена. Вероятно индуцираният ОС активира антиоксидантните ензими, тъй като е необходимо клетките да бъдат предпазени от действието на АФК. Като белтъчни молекули, обаче, ензимите също са податливи на увреждане, индуцирано от оксидативен стрес. Резултатите от нашето изследване показват, че добавянето на десферал в реакционната среда, съдържаща прооксидантите H_2O_2 , Fe^{2+} и $H_2O_2 + Fe^{2+}$, води до възстановяване на активността на антиоксидантните ензими до стойности, наблюдавани при контролната група (т в среда без H_2O_2 , Fe^{2+} и $H_2O_2 + Fe^{2+}$). Този резултат подсказва, че наличието на хелатор в реакционната среда намалява ОС и последиците от него. При направеното от нас проучване, за първи път в настоящата работа се установи влиянието на хелатор върху активността на антиоксидантните ензими в еякулати, подложени на оксидативен стрес.

Проведените експерименти с човешки сперматозоиди (инкубиране в среда, съдържаща Фентонова система в отсъствие и присъствие на десферал) показаха аналогични резултати. Специфичният железен хелатор намалява ЛПО и възстановява активността на антиоксидантните ензими при индуциране на ОС.

Резултатите от извършените експерименти показват, че прилагането на метални хелатори намалява ЛПО и подобрява на спермалните параметри подвижност и морфология при индуциране на ОС. Освен подвижността и морфологията, интегритетът на генетичния им материал е един от най-важните характеристики, определящи качеството на сперматозоидите (*Kruger et al.*, 1986; *Martinez et al.*, 2000).

Нашите резултати показаха, че еякулатите на пациенти с олигоастенозооспермия и астеногератозооспермия съдържаха значително по-висок процент сперматозоиди с увредена ДНК, в сравнение с еякулатите на нормозооспермични мъже. Въпреки индуцирането на ОС, процентът на кометите се увеличи съвсем слабо, което отдаваме на изключително плътната компактизация на хроматина при мъжките гамети. За разлика от кометите, спермопластите достигнаха до 97% и 100% в условия на ОС при пациентите с отклонения от нормата. Това показва, че е иницииран процес на разкъсване на ДНК веригите, но броят на получените фрагменти е недостатъчен за образуването на кометна опашка. При увеличаване на дозите на реагентите, необходими за протичането на Фентонова реакция или на времето за инкубиране на пробите, се очаква да бъдат отчетени повече комети.

Добавянето на десферал в условия на Фентонова реакция води до подобряване на спермалния ДНК интегритет (както при нормозооспермия, така и при проблемна спермограма). При пациентите с отклонения от нормата, процентът на сперматозоидите с нормална ДНК значително нарасна в сравнение с нетретираните аликвоти. Това ни дава основание да твърдим, че добавянето на хелатор на железни катиони към средите за обработка на семенните проби, би допринесло за съхраняване на целостта на генетичния материал на сперматозоидите до момента на тяхната употреба за АРТ.

При направената от нас литературна справка, не бяха открити резултати относно влиянието на генерираните чрез Фентонова система *OH* върху интегритета на ДНК и ефекта на специфичния за железни йони хелатор Десферал посредством компетентен анализ.

Подобно изследване с човешки сперматозоиди, подложени на действието на системата ксантин/ксантин оксидаза (*X/XO*), е направено с използване на метода на *TdT*-медирано крайно маркиране на ДНК (*TUNEL* тест) (*Lopez et al.*, 1998). Целта на това изследване е била да се оцени ефектът от генерирането на АФК върху целостта на ДНК на сперматозоидите и да се определи дали предварителното третиране с антиоксиданти (N-ацетилцистеин (0.1 mM), каталаза (500 U/mL), редуциран глутатион (10 mM) и хипотаурин (10 mM)) може да намали увреждането на ДНК. За инкубацията с *X/XO* са били избрани интервали от време, имитиращи клиничната ситуация на престой на сперматозоидите след *swim up*, докато овоцитите се подготвят за *ICSI*. Резултатите са показали значително увеличение на ДНК-уврежданията при мъжките гамети, инкубирани с *X/XO* за интервали от 1 час и 2 часа, но не и по-малко от 1 час ($P = 0.0001$). Добавянето на антиоксиданти значително намалява степента на ДНК увредите, предизвикани от генерирането на АФК ($P < 0.04$).

Следователно и в тези експерименти се налагат изводите, че 1) ОС може да причини увеличаване на фрагментацията на ДНК на сперматозоидите и 2) третирането с антиоксиданти може да намали увреждането на спермалната ДНК.

Резултатите от извършените експерименти потвърждават необходимостта от прилагане на метални хелатори за подобряване на качеството на материала, използван при АРТ и евентуално благоприятно повлияване върху успеваемостта на процедурата.

ИЗВОДИ

1. Високата концентрация на желязо в семенната плазма при мъже с патология корелира отрицателно с нивата на глутатион и положително с тези на ТБК-РС;
2. Прилагането на десферал в семенни проби, в които е индуциран ОС, намалява ПОЛ;
3. Прилагането на десферал в семенни проби, в които е индуциран ОС подобрява подвижността и морфологията на сперматозоидите;
4. Морфологията на сперматозоидите оказва влияние върху имплантацията на ембрионите;
5. Прилагането на десферал в семенни проби, в които е индуциран ОС, понижава процента на сперматозоидите с ДНК фрагментации.

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. За пръв път е установен ефекта на десферал в човешки еякулат след индукция на ОС.
2. За пръв път е установено влиянието на този хелатор върху активността на антиоксидантните ензими *CAT*, *SOD* и *GSH-Px*.
3. Изведени са корелационни зависимости между показателите на ОС (ТБК-РС и *GSH*) и спермалните параметри (подвижност и морфология).
4. За пръв път е проведен кометен анализ, модифициран за изследване на фрагментациите на спермална ДНК.

Приложения:

Публикации във връзка с дисертационния труд:

1. NENKOVA G, Alexandrova A. Oxidative stress and its role in reproduction, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, Special issue on Oxidative Stress and its Complications in Human Health. 2013, 4:37-43. IF 1.778
2. Stefanov R, Okoliyski S, Chervenkov M, Abadjieva D, Georgiev B, NENKOVA G, Alexandrova A. Alterations in antioxidant defense system activity in boar ejaculates subjected to oxidative stress. *Comptes rendue de l'Academie Bulgare des Sciences*. 2016, 69(8):1013-1018. IF 0.233
3. NENKOVA G., Stefanov R., Chervenkov M., Alexandrova A. Preventive effect of Desferal on sperm motility and morphology. *Cell Biochemistry and Function*. **2016**, 34: 423–428.; IF 2.186

Научни съобщения по темата на дисертационния труд:

1. G. NENKOVA, Density gradient centrifugation, separation of mature from immature sperm and risk assessment of implementing assisted reproduction techniques in men with impaired spermatogenesis III Workshop on Experimental models and methods in the biomedical researches. April, 23-25, 2012, Sofia, Bulgaria
2. G. NENKOVA, Zinc deficiency and infertility.V Workshop on Biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, November, 27-29, 2012, Sofia, Bulgaria
3. D. Kacheva, R. Stefanov, M. Chervenkov, P. Tauhanova, A. Alexandrova, G. NENKOVA, E. Kistanova, V. Mladenova, B. Georgiev. Influence of enrofloxacin and gentamicin over some parameters of boar sperm. 28th Annual Meeting A.E.T.E, September, 7-8, 2012, Saint Malo, France
4. G. NENKOVA, Biological activity of glutathione VI Workshop on Biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, 29-30 November, 2011, Sofia, Bulgaria
5. G. NENKOVA, R. Stefanov, D. Kacheva, A. Alexandrova, P. Taushanova, B. Georgiev. Nutrition and reproduction. Antioxidant therapy in male infertility. First National Scientific Conference "Nutrition", 22.03.2013, NBU, Sofia, Bulgaria
6. D. Kacheva, G. NENKOVA, R. Stefanov, A. Alexandrova, P. Taushanova, M. Chervenkov, B. Georgiev. Effect of desferal on membrane lipid peroxidation, motility and morphology of boar sperm, subjected to oxidative stress. 17TH ESDAR Conference, 11-14 September, 2013, Bologna, Italy
7. G. NENKOVA, D. Kacheva, R. Stefanov, P. Taushanova, B. Georgiev, M. Chervenkov, A. Alexandrova. Oxygen toxicity and male infertility. Fourth National Congress of Clinical Toxicology with International Participation and Annual Meeting of Bulgarian Toxicological Society, 7-8 November 2013, Sofia, Bulgaria
8. G. NENKOVA, A. Georgieva, E. Tzvetanova, A. Alexandrova. Metal ions in human sperm. VIII Workshop on Biological activity of metals, synthetic compounds and natural products, 27-29, November, 2013, Sofia, Bulgaria
9. NENKOVA G., Alexandrova A. The impact of sperm morphology on normal embryo development and successful implantation. 25th International Scientific Conference of the Union of Scientists in Stara Zagora, 4-5 June 2015, Stara Zagora, Bulgaria

Цитирания на публикациите, свързани с темата на дисертационния труд (до м. март 2018 г):

NENKOVA G, Alexandrova A. Oxidative stress and its role in reproduction, *Advances in Bioscience and Biotechnology, Special issue on Oxidative Stress and its Complications in Human Health.*2013, 4:37-43.IF 1.778:

Цитирана от:

1. Agarwal A., Durairajanayagam D. (2017) Antioxidant Therapy in Assisted Reproductive Technologies. In: Al-Gubory K., Laher I. (eds) *Nutritional Antioxidant Therapies: Treatments and Perspectives.* Springer, Cham

2. Li Hui, Zhang Jianfang, Wang Haiyan, Li Jianyuan. (2016) Antioxidant defense system in human semen. *Chinese Journal of Family Planning.*2016, 12: 850-854.

3. Uddin N, Ahmed N, Rahman A, Rasheda R, Akter R. (2016) Antioxidative Potential of the Polyphenolics of *Stephania japonica* var. *Discolor* (Blume) Forman: A Chromatographic (HPLC) and Spectrophotometric Measure *International Journal of Food Properties.*, 911-928.

4. Abd-Aziz N.A.A., Chatterjee A., Chatterjee R., Durairajanayagam D. (2014) Corticosterone-induced oxidative stress alters epididymal sperm fertility in rats. *ASM Sci. J.*, 2014, 8(2):117–124

NENKOVA G., Stefanov R., Chervenkov M., Alexandrova A. Preventive effect of Desferal on sperm motility and morphology. *Cell Biochemistry and Function.* **2016**, 34: 423–428.; **IF 2.186**

Цитирана от:

1. Keith Schofield. The Metal Neurotoxins: An Important Role in Current Human Neural Epidemics? *Int J Environ Res Public Health.* 2017 Dec; 14(12): 1511

