



---

**ВЛИЯНИЕ НА НОВОСИНТЕЗИРАНИ ВЕЩЕСТВА ОТ ГРУПАТА НА  
МЕТИЛКСАНТИНИТЕ ВЪРХУ ФУНКЦИОНАЛНИ ПОКАЗАТЕЛИ  
НА МЪЖКИ ГАМЕТИ ПРЕДИ И СЛЕД КРИОКОНСЕРВАЦИЯ**

---

**АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИЯ**

за присъждане на образователната и научна степен „Доктор“ по специалност  
„Физиология на животните и човека“, шифър 01.06.17.

**ПЛАМЕНА АНГЕЛОВА СТАВРЕВА**

Научен ръководител: проф., дбн Пламен Тодоров

2022

ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА РАЗМНОЖАВАНЕТО – БАН

Дисертационният труд е написан на 81 страници и включва 23 фигури и 5 таблици. В библиографския списък са цитирани 110 литературни източника.

**Научно жури:**

***Вътрешни членове:***

Проф. Пламен Тодоров, дбн

Доц. Таня Милачич, дб

***Външни членове:***

Акад. Румен Панков, дбн

Проф. Радостина Александрова, дб

Проф. Алексей Савов, дб

Защитата на дисертационния труд ще се състои на ..... от ..... часа он-лайн. Материалите по защитата се намират на разположение в библиотеката на ИБИР – БАН и на сайта на Института.

*Забележка: Номерата на фигурите и таблиците не съответстват на тези в дисертационния труд*

## **СПИСЪК НА ИЗПОЛЗВАНИТЕ СЪКРАЩЕНИЯ**

**ART** – асистирани репродуктивни технологии

**IVF** – ин-витро оплождане (in vitro fertilization)

**ICSI** – вътрецитоплазмено инжектиране на сперматозоид (intracytoplasmic sperm injection)

**IUI** – интраутеринна инсеминация

**PTX** - пентоксифилин

**T-1** - 7-[(N- метил-N-циклохексил)аминоетил]- 1,3-диметилксантин хидрохлорид

**N-61** - 7-[(N-метил-N-циклохексил)аминоетил]-1,3-диметилксантин тартрат

**АТФ** - аденозинтрифосфат

**ц.АМФ** – цикличен аденозинмонофосфат

**ФДЕ** - фосфодиестераза

**sDF** – спермална ДНК-фрагментация

**CASA** – компютърно-асистиран спермален анализ

**HBA** – тест за прикрепване на сперматозоидите към хиалуронан

**TESA** – тестикуларна спермална аспирация

**ROS** – свободни кислородни радикали

## УВОД

Стерилитетът е важен медико-биологичен и социален проблем, засягащ около 10-15% от двойките в репродуктивна възраст. В голяма част от случаите (30-40%) той се дължи на така наречения „мъжки“ инфертилитет. Различни заболявания и екзогенни фактори влияят върху сперматогенезата и водят до влошаване на качеството на семенната течност, изразяващо се най-често в намалена концентрация и подвижност на сперматозоидите.

Използването на асистиран репродуктивни техники за лечение на стерилитета (интраутеринна инсеминация и *ин-витро* оплождане) дават възможност за употребата на вещества, стимулиращи мотилитета на мъжките гамети в процеса на тяхната обработка. Най-често това се налага при оплождането с астенозооспермични еякулати, замразена семенна течност (в процеса на криоконсервация част от гаметите губят подвижността си) или използването на тестикуларни сперматозоиди, получени чрез микрохирургични техники.

В клиничната практика за стимулиране на мотилитета се използват метилксантините пентоксифилин и теофилин (пуринови алкалоиди, които на клетъчно ниво инхибират цикличната нуклеотид-фосфодиестераза, повишавайки по този начин нивата на цикличния аденозинмонофосфат (ц.АМФ)). От друга страна има данни, че тези вещества, освен че стимулират подвижността, предизвикват предварителна акрозомна реакция и имат негативно влияние върху развитието на получените ембриони. Това предполага търсенето и проучване възможността за използване и на други вещества, стимулатори на мотилитета, включително новосинтезирани метилксантини.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационен труд е да се изследва влиянието на новосинтезирани вещества от групата на метилксантините върху функционални показатели на мъжки гаметни преди и след криоконсервация.

Така поставената цел предполагаше решаването на следните задачи:

- Да се подберат подходящи новосинтезирани вещества от групата на метилксантините;
- Да се изследва влиянието им върху подвижността и преживяемостта на гаметите в нативна семенна течност и сравни с това на пентоксифилина;
- Да се изследва ефектът им върху мотилитета на предварително сепарирани подвижни сперматозоиди;
- Да се изследва и сравни ефектът им върху гаметите след криоконсервация;
- Да се изследва влиянието им върху други физиологични показатели на гаметите;
- Да се изследва влиянието на МТХ върху оплодителната способност на сперматозоидите и възможностите за използване на препарата в програмите за асистирана репродукция.

## **МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ**

Изследванията са проведени в периода 2018 - 2021 г. в Института по биология и имунология на размножаването – БАН. За провеждането на експериментите е използвана семенна течност, получена от пациенти, участващи в програмите за асистирана репродукция в Инвитро АГ МЦ Димитров и АГ Болница „Селена“ – Пловдив, както и семенна течност от анонимни донори. За изследване влиянието на вещества от групата на метилксантините върху оплождането и развитието на получените предимплантационни ембриони са използвани донорски яйцеклетки.

Проучено е влиянието на новосинтезирани вещества от групата на метилксантините върху биологични показатели на човешки сперматозоиди, като действието им е сравнено с това на пентоксифилина. Веществата са синтезирани и предоставени от колеги от катедрата по неорганична химия на Фармацевтичния факултет към МУ-София. Използвани са следните методики:

### **Методи за оценка на сперматозоидите**

- Класически анализ на семенна течност (спермограма)
- Компютърен спермоанализ (CASA)
- Тест за виталност (оцветяване с еозин-нигрозин)
- Изследване степента на ДНК-фрагментация на гаметите (SCD-тест)
- Прикрепване към хиалуронан (HBA-тест)
- Оценка на оплождащата способност - IVF и ICSI

### **Методи за обработка на семенна течност**

- Обработка чрез центрофугиране с последващо наслояване (swim-up метод)
- Обработка с помощта на центрофугиране през плътностни градиенти

### **Криоконсервация на семенна течност**

#### **Методи за оплождане**

- Класическо ин-витро оплождане (IVF)
- Оплождане чрез инжектиране на сперматозоид в цитоплазмата на ооцита с помощта на микроманипулационни техники (ICSI)

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1.1. Резултати от спермалния анализ

Изследването на семенната течност е първото и задължително условие в андрологичната практика. То предоставя важна информация за цитогенната функция на тестисите и секреторната дейност на аксесорните полови жлези. Точното отчитане на параметрите на еякулата и отклоненията в основните показатели позволява своевременно насочване към използване на разширени диагностични методи - морфологични (цитологични, цитохимични, биопсични) хормонални, микробиологични, имунологични, специализирани апаратни (ехография и сцинтиграфия) и други. В нашите изследвания, предварителния спермален анализ бе важен и за уточняване на действието на изпитваните субстанции върху гаметите при различни случаи на патоспермия.

Бяха използвани 130 еякулата (от 79 мъже на възраст от 27 до 43 години) и 18 дози замразена донорска семенна течност. Средният обем на нативните еякулати бе 3,1 ml (от 1.7 до 6,3 ml). Изходната концентрация на сперматозоидите варираше от 9 до 108 млн/ml. В резултат на спермалните изследвания еякулатите бяха класифицирани както следва:

-нормоспермия	60
-астенозооспермия	37
-олигозооспермия	7
-олигоастенозооспермия	15
-левкоцитоспермия	11

Средната концентрация на сперматозоидите в размразените дози семенна течност бе 41 млн./ml, а общата им подвижност бе от 30% до 60%. В експериментите използвахме и 3 проби с мъжки гамети, получени от тестисите с помощта на микрохирургични техники. Тридесет и два от еякулатите (21 нормозооспермия и 11 астенозооспермия) бяха обработени за изолиране на фракция нормокинетични гамети.

### 1.2. Подбор на подходящи вещества от групата на новосинтезираните метилксантини и работна концентрация

От колегите от катедрата по неорганична химия на фармацевтичния факултет към МУ-София ни бяха предоставени 9 новосинтезирани вещества от групата на метилксантините.

По технически причини (неразтворимост в средите за инкубиране на сперматозоиди, дори след използване на сонификатор с амплитуда 70%), 5 от тях не бяха използвани в експериментите. Следва да се отбележи, че използването на разтворители в случая е неприемливо, тъй като самите разтворители са токсични за гаметите. Методите за повишаване разтворимостта на веществата чрез нагряване също са неподходящи, тъй като средата /разтворител/ съдържа белтъчни и други молекули, увреждащи се при по-високи от физиологичните температури. Поради тази причина използвахме само 4 от новосинтезираните метилксантини плюс пентоксифилин.

При избора на работна концентрация изхождахме от препоръчваните в литературата за пентоксифилин. И при петте вещества тествахме концентрации от 1.8 до 10.8 mM. Експериментите показаха, че при 1,8 mM не се наблюдава ефект на изпитваните субстанции върху подвижността на гаметите, а дози над 10,8 mmol/ml са токсични за тях. И при четирите изследвани вещества (AF-12, № 61, T-1, етофилин и пентоксифилин) в работен разтвор от 10,8 mM след 5-часова инкубация наблюдавахме значително снижение на подвижността на сперматозоидите. В табл. 1 е представено влиянието на различни концентрации на N-61 върху мотилитета и преживяемостта на гаметите.

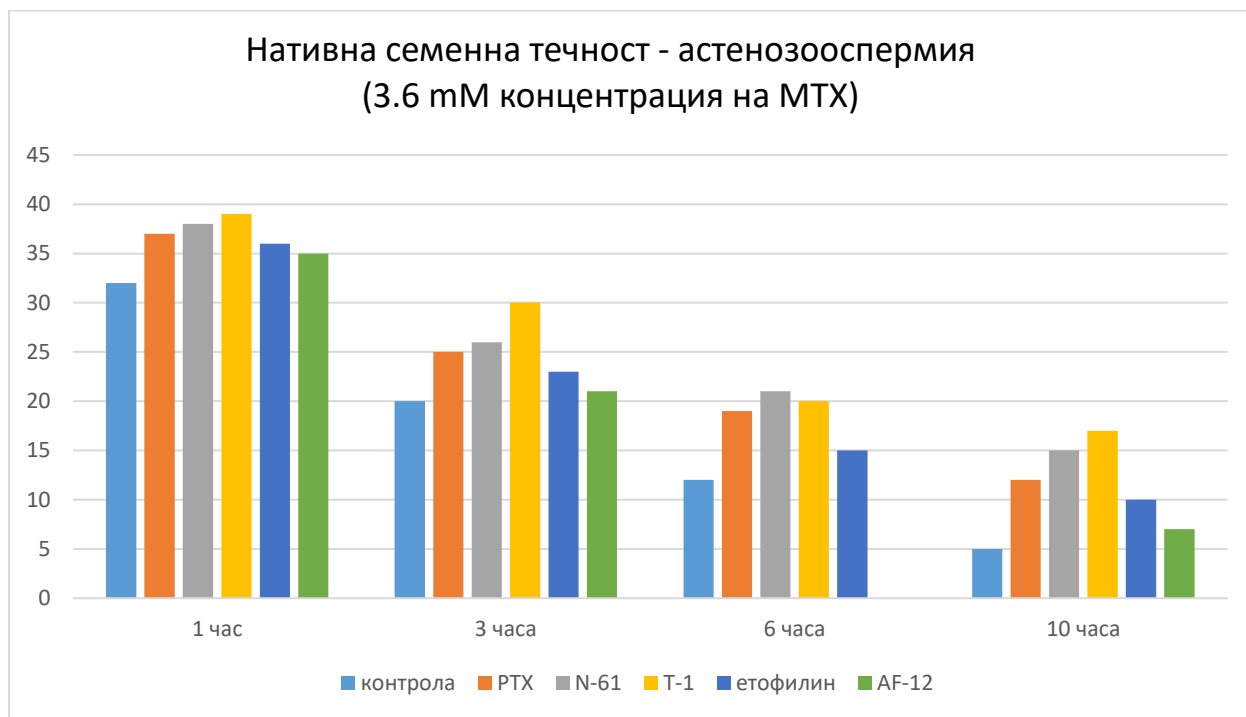
Концентрация на МТХ N-61	1 час	3 часа	5 часа	8 часа	12 часа	18 часа	24 часа
контрола	65%	45%	30%	20%	10%	единични	-
1.8 mM	65%	45%	30%	20%	12%	единични	-
3.6 mM	65%	55%	50%	35%	25%	10%	единични
7.2 mM	65%	55%	50%	38%	25%	10%	единични
10.8 mM	55%	25%	10%	единични	-	-	-

Табл. 1: Влияние на различни концентрации на N-61 върху мотилитета и преживяемостта на сперматозоиди (резултатите са репрезентативни, от един еякулат, нормозооспермия).



Данните показват, че най-добри резултати се получават при 3.6 и 7.2 mM за N-61 и AF-12 и 3.6 mM за T-1, етофилин и пентоксифилин. Тези наши резултати се съгласуват с данните на други автори, препоръчващи използването на пентоксифилин в 3.6 mM концентрация. Следва да се отбележи, че 3,6 mM се препоръчва и при използване на кофеин или теофилин като стимуланти на мотилитета. Това ни даде основание в последващите експерименти да работим с 3,6 mM разтвор на изследваните метилксантини.

Големият брой предоставени ни новосинтезирани вещества не позволяваше комплексната им оценка поради недостига на експериментален материал (семенна течност и донорски ооцити). Поради тази причина, проведохме сравнителни изследвания относно действието на различните метилксантини върху мотилитета на гаметите (визуална оценка на подвижността) с оглед подбор на два най-подходящи за бъдещите експерименти новосинтезирани метилксантини (Фиг.1). Получените резултати ни дадоха основание да съсредоточим последващите изследвания върху действието на T-1, N-61 и PTX.



Фиг. 1: Влияние на новосинтезирани вещества от групата на метилксантините върху общата подвижност на сперматозоиди. (Резултатите са репрезентативни, от изследване на един еякулат).

### **1.3. Влияние на изследваните метилксантини върху подвижността и преживяемостта на сперматозоидите в нативна семенна течност**

#### **1.3.1. Нормозооспермия**

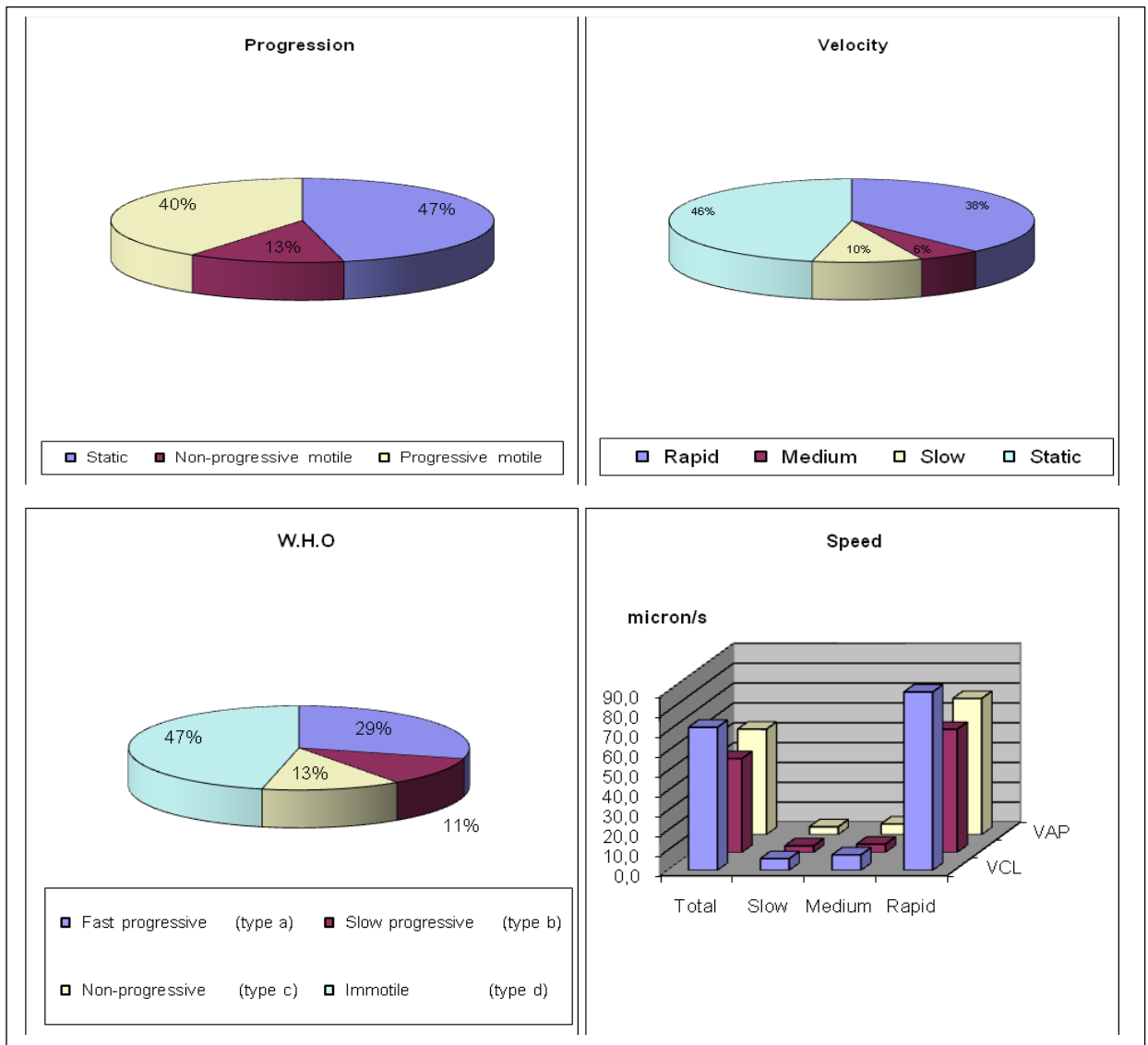
След разреждане на семенната течност с хранителна среда, в която предварително добавяхме изследваните МТХ, тя се инкубираше при 37°C в присъствието на 6% CO<sub>2</sub> и резултатите се отчитаха през няколко часа. За по-точно изследване на кинетичните характеристики на гаметите използвахме компютърен спермоанализатор (Фиг.2)

Получените резултати относно влиянието на изследваните вещества върху мотилитета и преживяемостта на сперматозоидите са представени на фиг.3.

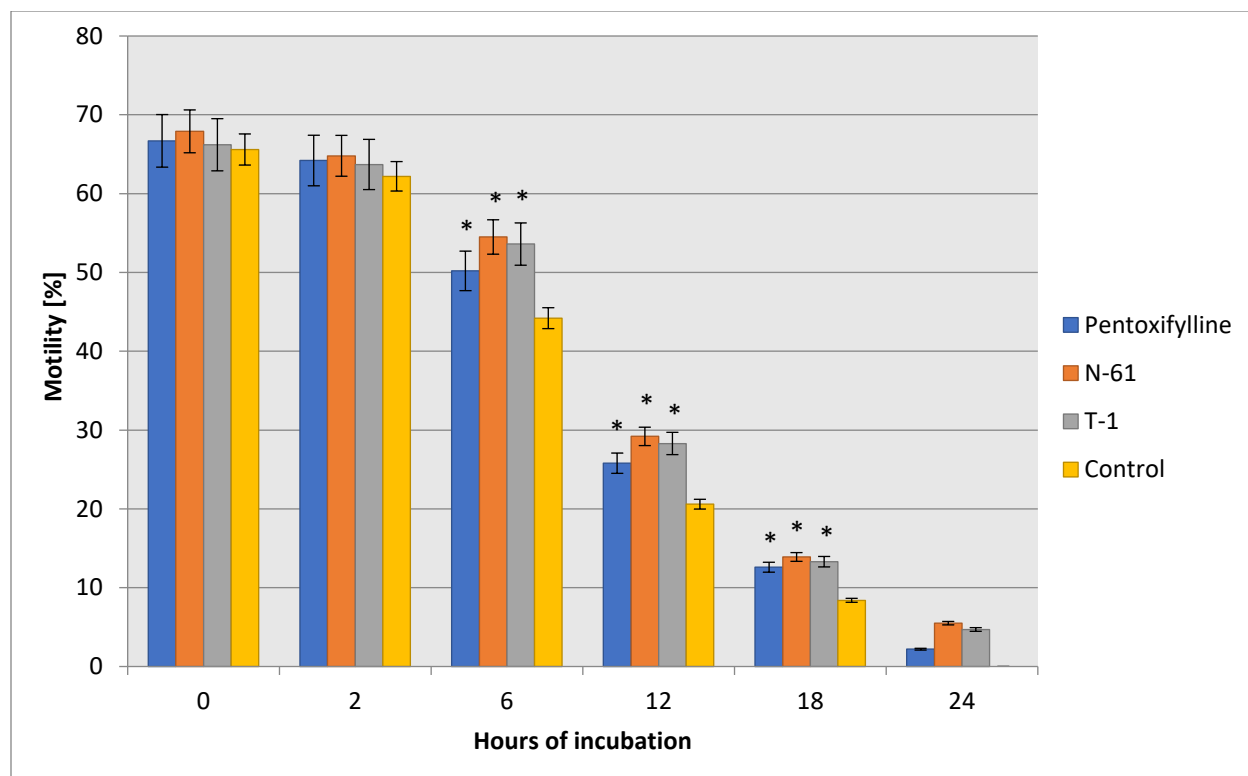
Следва да се отбележи, че след едночасова инкубация се наблюдава незначително повишаване на подвижността на сперматозоидите във всички проби. Това най-вероятно се дължи на факта, че семенната течност е разреждана с хранителна среда, при което се внасят важни за метаболизма на гаметите вещества. По този начин се засилва обмяната на веществата в сперматозоидите, което осигурява необходимата за движението им енергия. Известно е също така, че наличието на белтъчни молекули в средата подпомага капацитацията (и съответно хиперактивацията) на гаметите.

След 2 часа инкубация се наблюдава тенденция към увеличение на подвижността на сперматозоидите в пробите съдържащи МТХ в сравнение с контролните. Едва след 6 часа, се отчитат статистически достоверни разлики в мотилитета между експерименталните и контролните групи. След 24-часова инкубация в контролните проби не се откриват подвижни гамети. Интерес представлява фактът, че независимо от разликата в мотилитета, не наблюдавахме различия в процента живи/мъртви сперматозоиди.

В табл.2 са представени различни кинетични параметри на гаметите след 2-часова инкубация с метилксантините. Не се отчита разлика в скоростта и характера на движение между опитната и контролните проби. Някои автори застъпват становището, че МТХ, в т.ч. и РТХ е необходимо да се отмиват след кратковременна инкубация с половите клетки, защото е възможно да оказват отрицателно въздействие при по-продължителна експозиция. В нашето изследване не бе наблюдавано такова влияние от страна на изследваните МТХ върху биологичните показатели на сперматозоидите.



Фиг.2: Оценка на мотилитета на гаметите с помощта на CASA. (Резултатите са репрезентативни, от изследване на един еякулат).



Фиг.3: Средна обща подвижност (%) на сперматозоиди от нативни нормозооспермични еякуланти (n = 14), инкубирани с PTX, N-61 и T-1; \*p ≤ 0,05.

			Total	Slow	Medium	Rapid	Unit
<b>Curvilinear Velocity</b>	VCL		67,6	42,8	80,8	118,8	µm/s
<b>Straight-line Velocity</b>	VSL		22,1	17,0	24,9	28,7	µm/s
<b>Average Path Velocity</b>	VAP		30,8	22,4	34,9	45,3	µm/s
<b>Linearity</b>	LIN		32,7	39,8	30,7	24,1	%
<b>Straightness</b>	STR		71,9	76,2	71,1	63,2	%
<b>Wobble</b>	WOB		45,5	52,2	43,2	38,2	%

Табл.2: Кинетични параметри на гамети след 2-часова инкубация в 3.6 mM разтвор на N-61.

В опитните групи наблюдавахме тенденция към по-ниско латерално отклонение на главичките на сперматозоидите в сравнение с контролата (ALH), но по-голяма BCF (Табл.3).

А

Amplitude of lateral head displacement		Total	Medium Progr.	Rapid Progr.	Unit
	ALH	3,8	3,4	4,1	µm
Beat/Cross Frequency	BCF	11,2	11,0	9,6	Hz

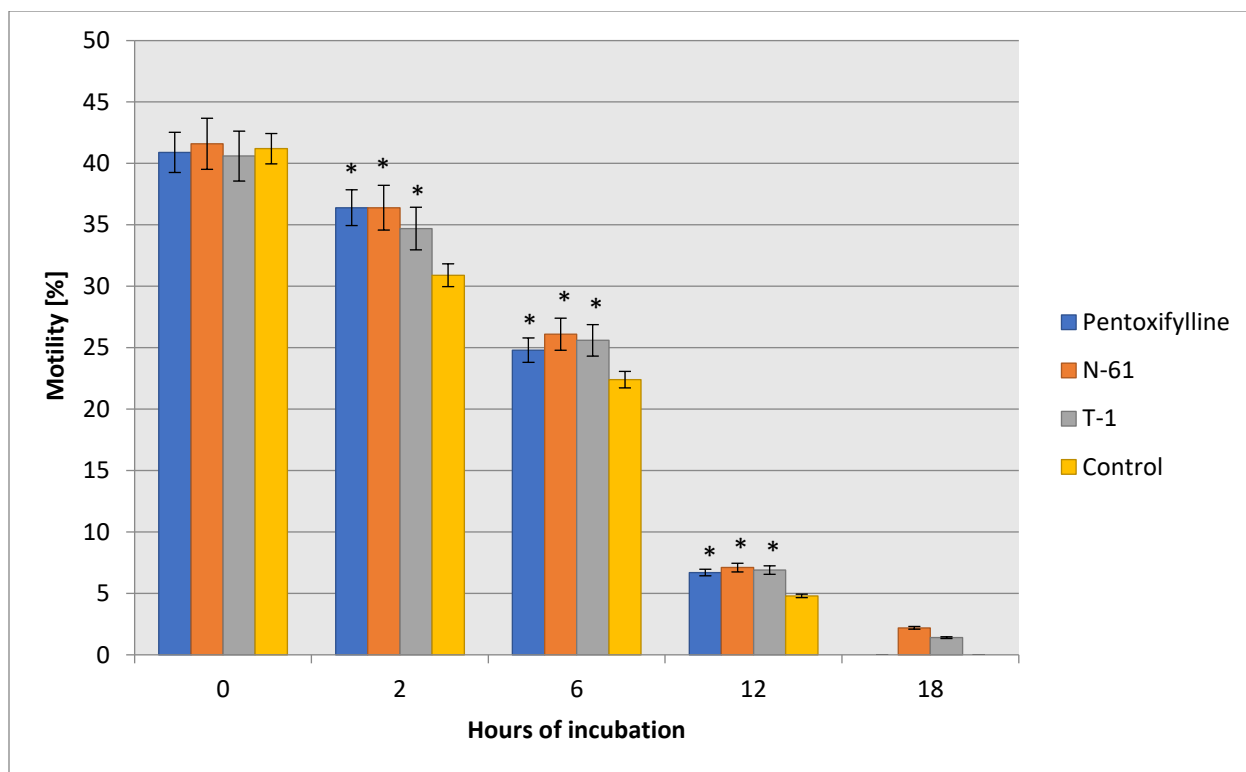
В

Amplitude of lateral head displacement		Total	Medium Progr.	Rapid Progr.	Unit
	ALH	3,2	2,7	1,0	µm
Beat/Cross Frequency	BCF	12,3	10,6	3,2	Hz

Табл.3: ALH и BCF на сперматозоиди след 2-часова инкубация. (Резултатите са репрезентативни, от изследване на един еякулат). А: 3.6 mM разтвор на N-61; В: контрола.

### 1.3.2. Астенозооспермия

В случаите на астенозооспермия (влошена подвижност на гаметите) отново наблюдавахме стимулиращ ефект на изпитваните от нас вещества. Още на 2-рия час инкубация отчитахме достоверно по-добър мотилитет в опитните проби в сравнение с контролата. Следва да се отбележи, че до 12-ия час не наблюдавахме разлика в ефекта на двете тествани вещества и пентоксифилина, докато след 18-часова инкубация единични подвижни сперматозоиди имаше само в пробите, съдържащи N-61 и Т-1 (Фиг.4).



Фиг.4: Подвижност на сперматозоидите от нативни астенозооспермични еякулати (n = 12), инкубирани с РТХ, N-61 и Т-1; \*p ≤ 0,05.

#### 1.4. Влияние на изследваните метилксантини върху мотилитета на гаметите след криоконсервация

Криоконсервацията на гамети намира все по-широко приложение в програмите за асистирана репродукция и/или за запазване на фертилитета на определени групи пациенти. В сравнение с други типове клетки, сперматозоидите са сравнително криоустойчиви вследствие високия флуидитет на мембраната, ниското съдържание на вода, високото повърхностно обемно съотношение и др. фактори. Независимо от това, замразяването води до увреждане на структурата и функциите на голяма част от гаметите. Основните причини за това са температурният шок, интра- и екстрацелуларната кристализация и рекристализация, клетъчната дехидратация, повишаващата се концентрация на соли в заобикалящата ги среда в процеса на охлаждане, прекисното окисление на липидите. Най-чувствителни към действието на ниските температури са акрозомата и плазмената мембрана на сперматозоидите. Увреждането на митохондриите в процеса на замразяване

води до намаляване или пълна загуба на мотилитета. В повечето случаи, общата подвижност на клетките намалява с 20-40%. Особено често, това се наблюдава в случаите на астенозооспермия или замразяване на тестикуларни сперматозоиди, когато мотилитетът по принцип е нисък. Това прави актуален въпроса за използване на стимулатори на подвижността. Положителните резултати, получени при нативна семенна течност, ни дадоха основание да изследваме влиянието на новосинтезираните метиксантини върху кинетичните характеристики на сперматозоидите след криоконсервация. За целта, размразените проби бяха отмивани от криопротектора чрез центрофугиране и получената утайка бе ресуспендирана със среда, съдържаща тестваните вещества, като през определени периоди отчитаме подвижността на гаметите. Резултатите са представени в табл.4.

<b>MTX</b>	<b>1 час</b>	<b>3 часа</b>	<b>6 часа</b>	<b>9 часа</b>	<b>12 часа</b>
<b>контрола</b>	57.1 ± 5.2	40.2 ± 4.3	25.2 ± 2.9	11.6 ± 2.5	единични
<b>PTX</b>	58.3 ± 4.9	45.4 ± 4.6	29.3 ± 4.1	19.4 ± 4.0 *	5.5 ± 3.1 *
<b>N-61</b>	57.3 ± 5.0	45.2 ± 4.8	32.5 ± 3.3 *	21.6 ± 3.4 *	7.4 ± 2.9 *
<b>T-1</b>	56.2 ± 4.8	43.1 ± 4.3	30.4 ± 3.9	19.5 ± 3.7 *	6.2 ± 2.6 *

Табл.4: Подвижност на сперматозоидите (%) след криоконсервация (n= 18). \*p<0.05

При използване на веществото N-61 след 6-часова инкубация се наблюдава статистически достоверна разлика в мотилитета на гаметите в опитната и контролната група, а при ПТХ и Т-1 – след 9 часа. След 12-часова инкубация подвижността им се запазва единствено в опитните групи, макар и да е силно редуцирана.

В нашите изследвания използвахме единствено 3.6 mM разтвор на веществата, независимо че някои автори считат, че специално в случаите на замразена семенна течност е желателно да се използват по-високи концентрации. Има изследвания, показващи, че ниските температури не променят структурата на метилксантините и те могат да се добавят и към средата за криоконсервация непосредствено преди замразяване, но този подход е използван при сперма от куче, където пробите не се центрофугират след размразяване. Други автори

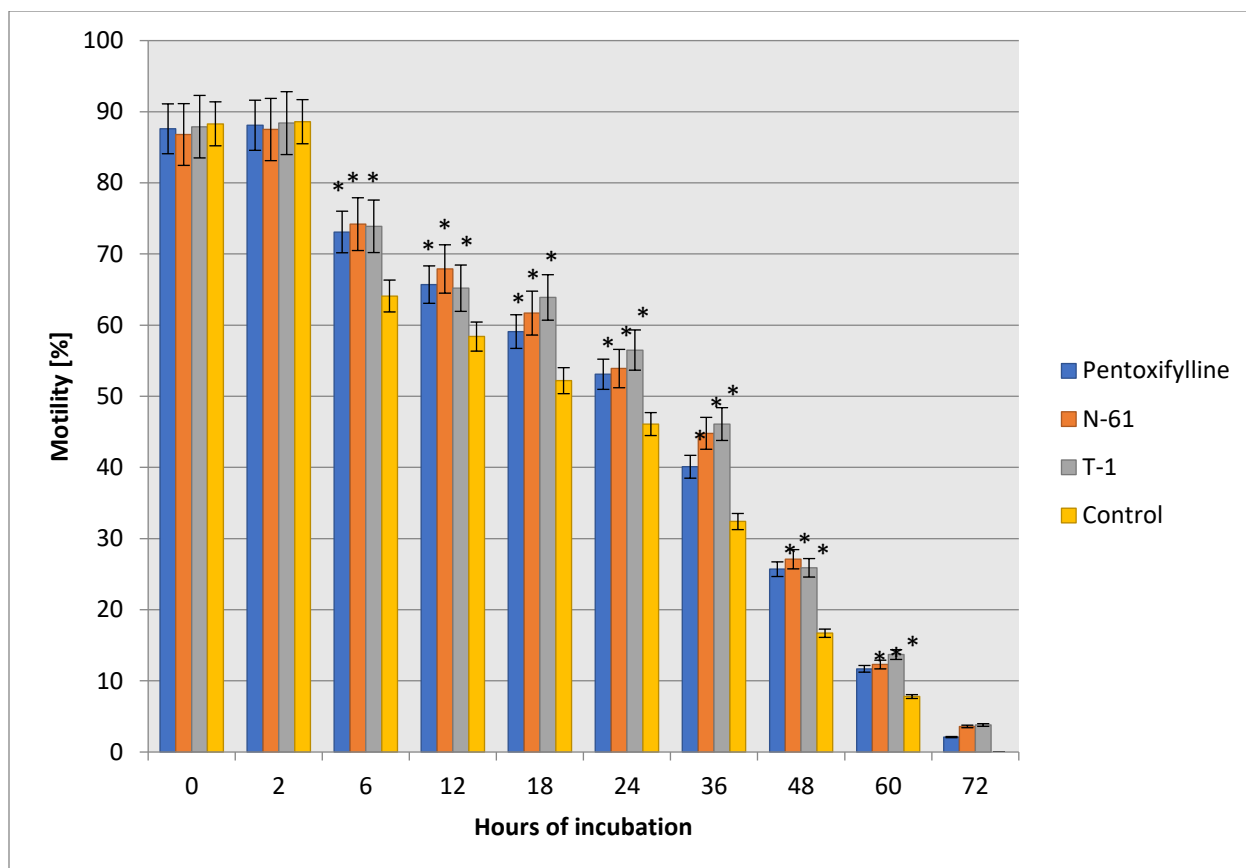
предполагат, че добавянето на пентоксифилин към средите за криоконсервация не само помага за по-добро запазване на подвижността, но и намалява степента на пероксидация на липидите в сперматозоидната мембрана. Не сме си поставяли за цел провеждането на подобни експерименти, които несъмнено са актуални с оглед бъдещи изследвания в тази област.

### **1.5. Влияние на изследваните метилксантини върху подвижността на сперматозоидите в обработена семенна течност (предварително изолирана фракция нормокинетични гамети)**

Сперматозоидите на бозайниците (включително и човека) в момента на еякулация са в протектирано, стабилно състояние и не са способни за оплождане при директен контакт с яйцеклетката. Необходим е последващ период за финалната им матурация, през който те претърпяват промени и придобиват капацитет да преминат през кумулусните маси и да оплодят ооцита. Този процес, който е описан от Аустинг и Чанг през 1951 г., се нарича „капацитация“ и се възпрепятства от фактори (decapacitation factors), съдържащи се в спермалната плазма и е важен не само при естественото зачеване, а и при оплождането *in vitro*. Продължителната инкубация на семенната течност след еякулация не само препявства естествената капацитация, но влияе негативно върху способността на гаметите да пенетрират през цервикалната слуз, акрозомната реакция и оплождащата им способност като цяло. Това налага отделяне на сперматозоидите от семенната плазма преди използването им за асистирана репродукция. Нещо повече, предварителната обработка на еякулата позволява да се отделят мъртвите сперматозоиди, левкоцитите, епителните клетки и др. примеси и да се сепарират фракция морфологично нормални, нормокинетични гамети и само те да бъдат използвани за оплождане.

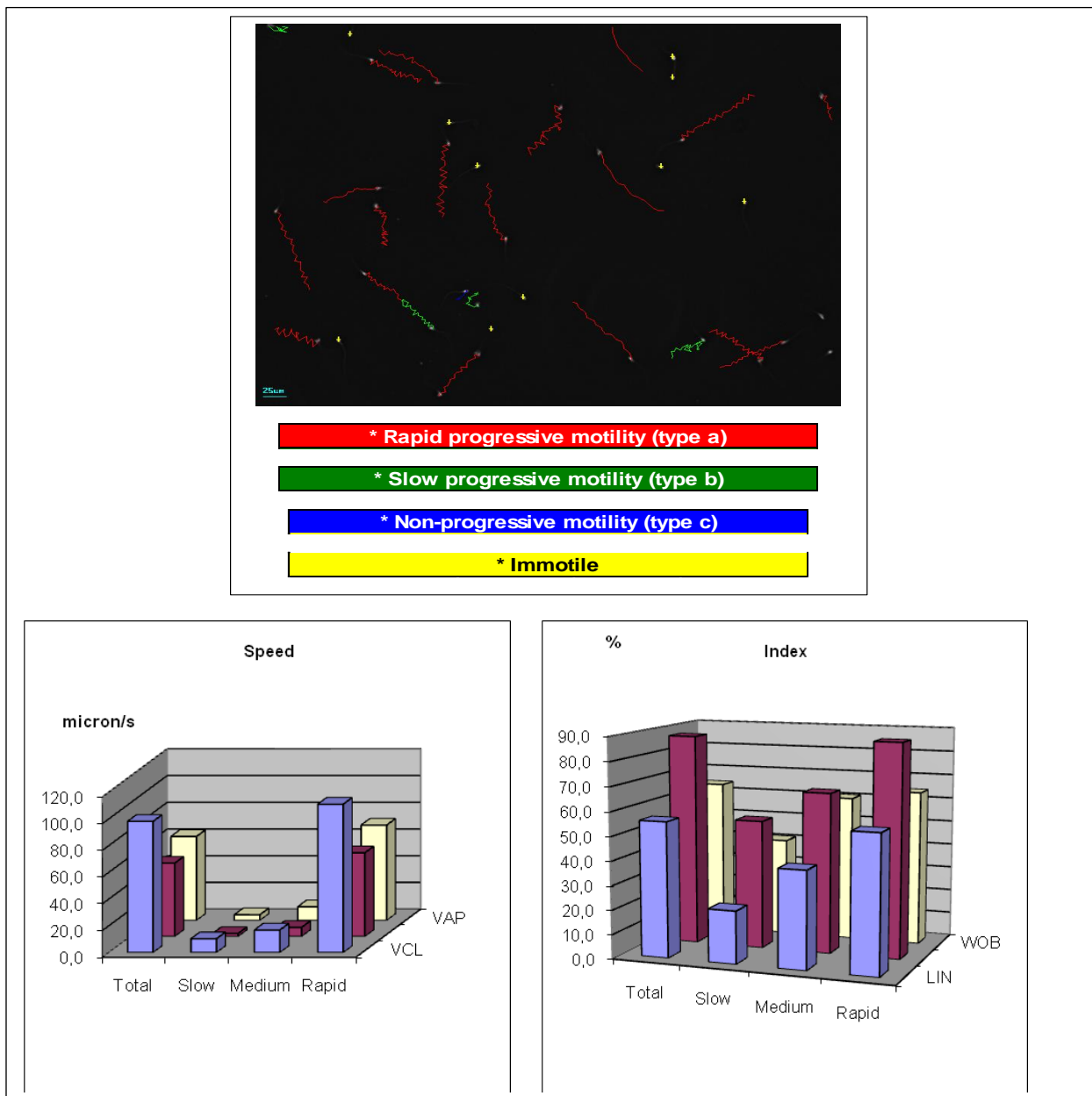
В нашите изследвания използвахме два метода за обработка на семенната течност – миграция на гаметите за сметка на собствената им подвижност (swim-up) и центрофугиране през плътностни градиенти. Сепарираната фракция подвижни сперматозоиди бе разреждана и инкубирана в среда, съдържаща тестваните метилксантини, като през определени времеви интервали бяха изследвани кинетичните им характеристики. Резултатите са представени на Фиг.5.





Фиг.5: Подвижност на сперматозоидите от обработени нормозооспермични еякулати, инкубирани с РТХ, N-61 и Т-1; (n=21)( \*p ≤ 0,05.

След 1-2 часа инкубация във всички проби (и опитните, и контролните) се наблюдава незначително, статистически недостоверно увеличение на подвижността на гаметите. Предполагаме, че това се дължи на хиперактивацията на сперматозоидите, която се наблюдава в процеса на капацитация. Освен с увеличаване на скоростта на движение, хиперактивацията се характеризира и с промени на други кинетични характеристики – увеличена амплитуда на отклонение на опашката, изменения в честотата на трептене и др., които са трудни за регистриране при мануален анализ на пробата. Механизмите, които провокират процеса на хиперактивация, са слабо проучени. Предполага се, че са свързани с повишаване количеството на  $Ca^{2+}$  - катийони във флагелума (навлизане през CatSper-каналите на плазмената мембрана, калмодулин/калмодулин-киназен път и др.). За разлика от капацитацията, хиперактивацията и последващата я акрозомна реакция са необратими процеси.



Фиг.6: Оценка на мотилитета на предварително сепарирани нормокинетични гаметни. (Резултатите са репрезентативни, от изследване на една проба).

За нас беше важно да проследим в каква степен тестваните от нас метилксантини влияят върху различни кинетични параметри на гаметите в процеса на хиперактивация. За целта с помощта на компютърен спермоанализатор отчитаме скоростта на движение, VCL, VAP, LIN, WOB и др. (Фиг.6).

## **1.6. Влияние на новосинтезирани вещества от групата на метилксантините върху степента на ДНК-фрагментация на гаметите**

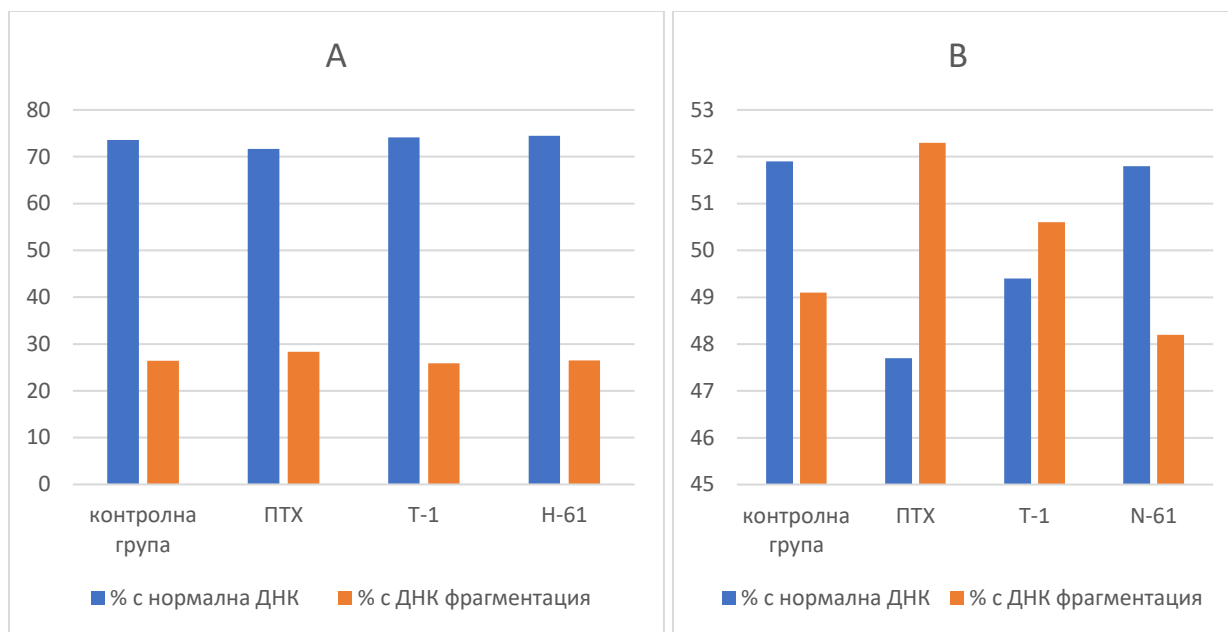
Под увреждане на спермалната ДНК се подразбират каквито и да било промени в нормалната ѝ структура. ДНК-фрагментацията (sDF) е едно от най-често срещаните нарушения, засягащи генетичния материал под формата на единични или двойноверижни разкъсвания. Резултат е на различни процеси (дефекти в пакетирането на ДНК по време на сперматогенезата, апоптоза, оксидативен стрес и др.) и се асоциира с редица патологични състояния на организма и външни въздействия.

Въпреки, че оплождащият потенциал на гаметите с ДНК-фрагментация може и да не намалява, в последните години са публикувани редица мета-анализи, индикиращи, че това се отразява на развитието на получените ембриони, имплантацията и протичането на бременността. Известно е също така, че ДНК-фрагментацията преобладава при мъжете с абнормални параметри на еякулата (астенозооспермия, тератозооспермия) и е свързана с някои случаи на инфертилитет при пациенти с нормоспермични такива.

С оглед изясняване действието на използваните от нас новосинтезирани метилксантини върху биологичния статус на гаметите, изследвахме влиянието им върху степента на ДНК-фрагментация. За целта използвахме нормоспермични еякулати (нативна семенна течност), като изследвахме дисперсията на спермалния хроматин (SCD – тест) преди и след 24-часова инкубация с веществата.

Проведините експерименти показаха, че във всички групи (опитни и контролни) след 24 часа се наблюдава значително увеличение на процента сперматозоиди с ДНК-фрагментация (Фиг.7). Репрезентативни снимки от един експеримент са представени на Фиг.8. Тези наши резултати се съгласуват с данните, представени от други автори, че продължителното инкубиране на гаметите в *ин-витро* условия води до увеличаване нивата на ДНК-фрагментация. Неслучайно повечето специалисти препоръчват използването на сперматозоидите за АРТ процедури да става след не повече от 2 часа инкубация при 37<sup>0</sup>С.

От друга страна, не отчетохме разлики в нивата на фрагментация на сперматозоидите от опитните и контролната групи. Това ни дава основание да преположим, че изследваните от нас вещества от групата на метилксантините не увреждат структурата на ДНК на мъжките гамети.



Фиг.7: ДНК-фрагментация на сперматозоидите (нормозооспермични еякулати, n = 9);

A - след 30-минутна инкубация с изследваните вещества (SCD – тест);

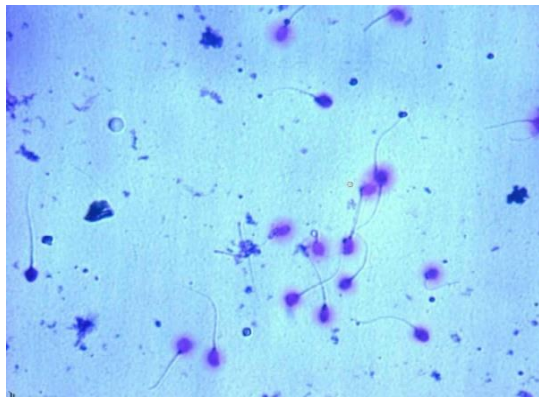
B – след 24-часова инкубация с MTX.

### 1.7.Влияние на вещества от групата на метилксантините върху способността на сперматозоидите да се прикрепват към хиалуронан (HBA-тест)

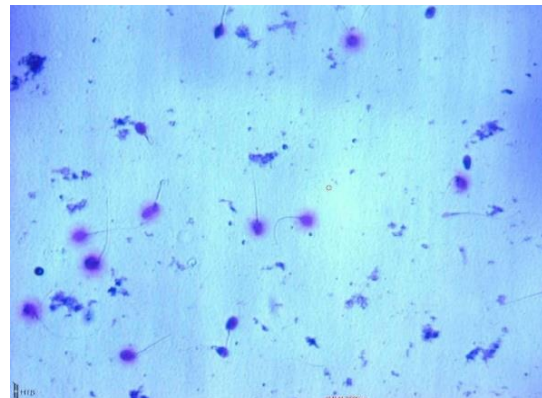
При естествено оплождане, зрелите сперматозоиди реагират с хиалуронан, който е основен компонент на матрикса на *cumulus oophorus*, за разлика от незрелите. Могат да се прикрепват и към хиалорунан, химически свързан с носител. Наблюдавани под микроскоп, реагиралите гаметиди се различават от останалите по подвижните опашки с глави, които не извършват постъпателно движение.

Свързването с хиалуронан показва успешното завършване на спермиогенните събития, опосредствани от шаперона HspA2. При липсата му, могат да възникнат дефицити при мейозата, възстановяването на ДНК, прикрепването към хиалуронан и при други етапи от съзряването на сперматозоидите. Неспособните да се свържат сперматозоиди притежават много сходни черти: те запазват интактни цитоплазма и хистони, като същевременно демонстрират по-висока честота на аберантна морфология, имат по-нисък геномен

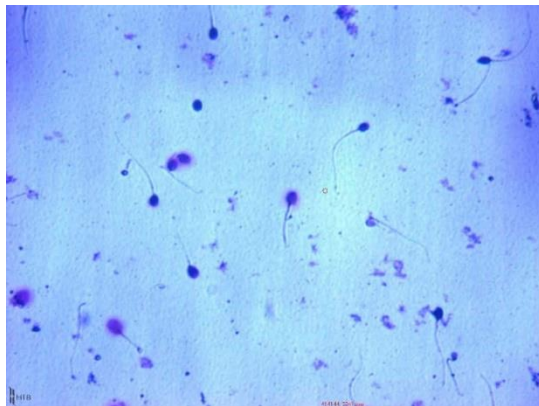
интегритет в сравнение с тези, които могат да се свързват и 4 до 6 пъти по-висока честота на хромозомните анеуплоидии. Също така, се стимулира и подвижността на мъжките гамети след реакцията им с хиалуронан. По този начин, способността за свързване с този глюкозаминогликан обозначава процента зрели, функционално нормални сперматозоиди в пробата семенна течност. В нашите изследвания не наблюдавахме влияние на тестваните вещества върху способността на сперматозоидите да се свързват с хиалуронан.



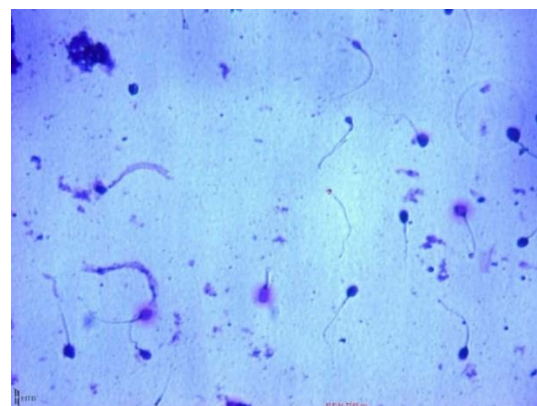
**A**



**B**



**C**



**D**

Фиг.8: ДНК фрагментация на сперматозоиди (SCD – тест, 100x); А – контролна проба 30 мин след разреждане; Б – семенна течност след 30-минутна инкубация в среда с Т-1; С – контролна проба след 24 часа; D – инкубирани в среда с Т-1 сперматозоиди след 24 часа.

## **1.8. Влияние на новосинтезирани метилксантини върху оплодителната способност на сперматозоидите и развитието и качеството на получените ембриони**

За изследване влиянието на изследваните от нас новосинтезирани метилксантини върху оплодителната способност на сперматозоидите, третирани с веществата Т-1 и N-61 гамети, използвахме за оплождане на свежи и размразени донорски ооцити ( $n = 27$ ). Яйцеклетките бяха разделени на случаен принцип на 4 групи: **Първата** включваше 6 ооцита, подложени на оплождане чрез конвенционално IVF с третирани с N-61 сперматозоиди, **втората** – 8, оплодени чрез ICSI също с инкубирани с N-61 мъжки гамети, **третата** и **четвъртата група** - яйцеклетките бяха оплодени съответно чрез конвенционално IVF ( $n = 7$ ) и ICSI ( $n = 6$ ) с третирани Т-1 сперматозоиди.

Получихме следните резултати:

*Група 1:* Оплодиха се 4 от 6 ооцита (66%). Един от получените ембриони спря развитието си на стадий 4 бластомера (2-ри ден след оплождането), 3 достигнаха до стадий „експандирал бластоцист“ на 5-ти ден (75%). При два от тях наблюдавахме спонтанен хетчинг („излюпване“) (Фиг.9 А и Б).

*Група 2:* Оплодиха се 8 от 8 ооцита (100%), 6 от тях достигнаха до стадий експандирал бластоцист, при 2 протече естествен хетчинг (Фиг.9 С и D).

*Група 3:* Оплодиха се 7 от 8 ооцита (85.7%), 4 от тях формираха експандирали бластоцисти (66.7%). При 3 наблюдавахме хетчинг (Фиг.10, А и В).

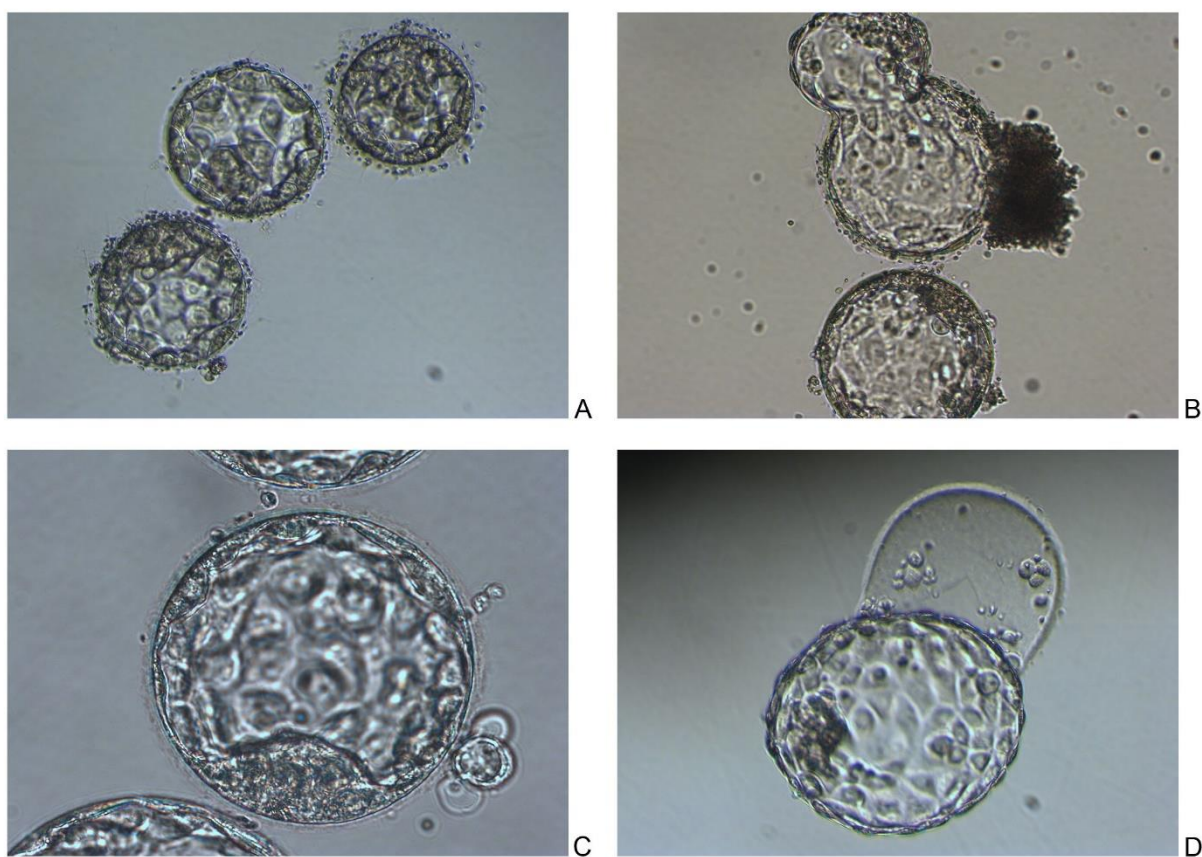
*Група 4:* Оплодиха се 5 от 6 ооцита (83.3%), 3 достигнаха до стадий експандирал бластоцист (60%), при 2 протече хетчинг (Фиг.10, С и D).

Всички ембриони (и в четирите групи) имаха добър пронуклеарен и ембрионален скор. Получените от нас резултати (като процент оплождане и ембриони, развиващи се до стадий бластоцист) са сходни с клиничните данни на медицинския център през последните години и съответстват на критериите за добра лабораторна практика.

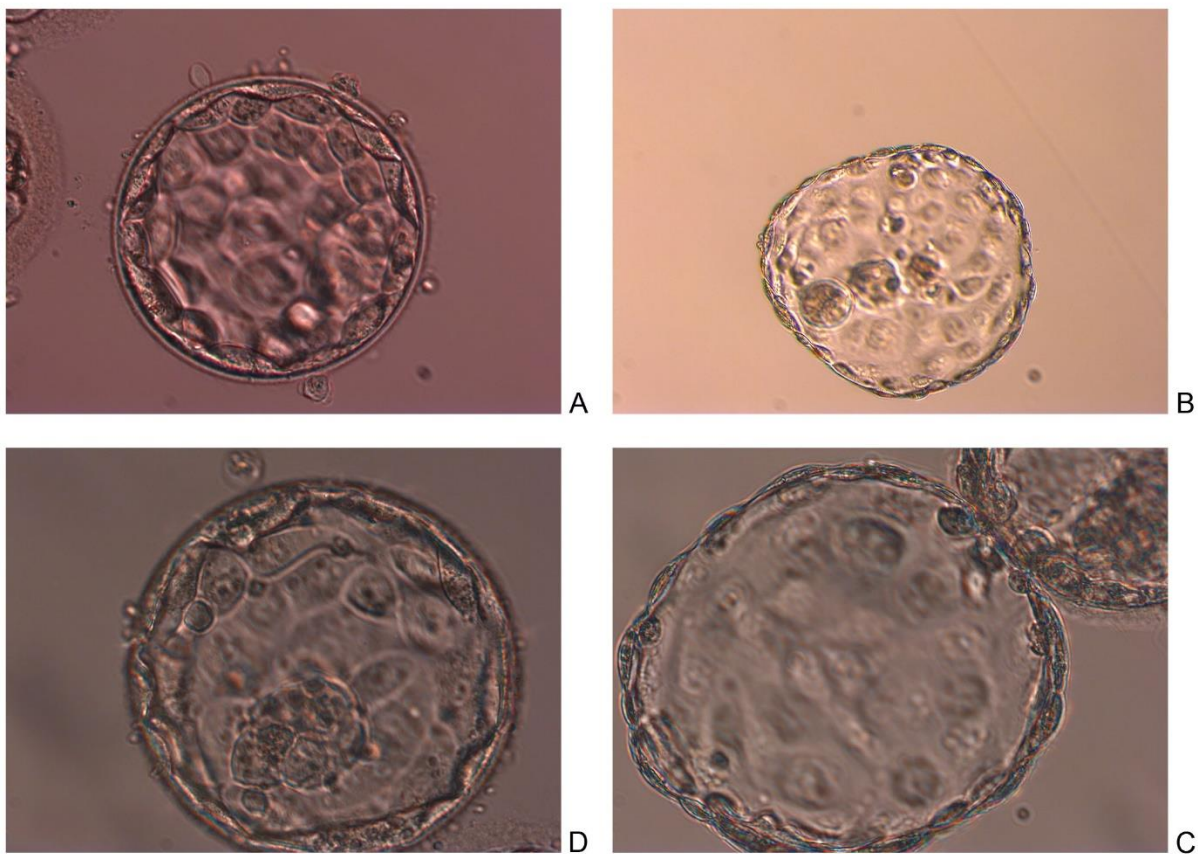
На базата на обобщени лабораторни и клинични резултати в световен мащаб е приет консенсус за референтните стойности на ключови показатели, свидетелстващи за нивото на работа в ин-витро центровете - процент оплодени яйцеклетки, процент делеящи се ембриони, такива, достигнали до стадий бластоцист и др. Процентът оплодени ооцити следва да е не

по-нисък от 60 при конвенционално IVF и 65 след ICSI. В нашите експерименти и при двете изследвани вещества наблюдавахме значително по-високи нива на фертилизация както при IVF, така и при ICSI.

Показател за добра лабораторна практика е достигане до стадий бластоцист на повече от 40% от оплодените яйцеклетки, при нас в четирите експериментални групи резултатите бяха съответно 75% (групи 1 и 2), 66.7% (група 3) и 60% (група 4). Това показва, че третирането на мъжки гамети с новосинтезираните метилксантини Т-1 и N-61 не оказва влияние върху оплодителната им способност и качеството на получените ембриони.



Фиг.9: Ембриони, получени след оплождане със сперматозоиди, икубирани N-61; А: Бластоцисти след конвенционално IVF (x100); В: „Излюпващ се“ (hatching) бластоцист след IVF (x100) ; С: Бластоцист след ICSI (x200); D: „Излюпващ се“ (hatching) бластоцист след ICSI (x150).



Фиг.10: Ембриони, получени след оплождане със сперматозоиди, третирани с Т-1; А: Бластицист след конвенционално IVF (x200); В: „Излюпен“ (hatched) бластоцист IVF (x100); С: Бластицист след ICSI (x200); D: „Излюпващ се“ (hatching) бластоцист след ICSI (x200).

Има интересни данни относно съдържанието на метилксантини в средата за култивиране на ембриони от мишки върху развитието на зиготите. Показано е, че добавянето 3.6 и 7.2 mM пентоксифилин инхибира дробенето на предимплантационните ембриони на 2-клетъчен стадий, а в редките случаи, когато те се развият до стадий бластоцист, броят на клетките във вътреклетъчната маса е значително по-нисък от тези в контролната група. Това дава основание на авторите да предложат сперматозоидите, третирани с метилксантини, да бъдат допълнително промивани преди оплождане. В нашите изследвания не сме очиствали гаметите от стимулиращите вещества, но това не се отрази на качеството на получените



ембриони. Предполагаме, че в случаите на ICSI попадането на метилксантините в яйцеклетката е невъзможно (инжектира се само сперматозоида, без среда, още повече, че същият предварително е мигрирал до края на капката с ПВП). В случаите на конвенционално IVF към средата с яйцеклетките (0.4-0.5 мл) се добавя минимално количество сперма (от порядъка на 5-10 микролитра), което води до значително разреждане на метилксантините и те не могат да окажат ефект върху развитието на ембрионите. Тези наши наблюдения се съгласуват с данните на други автори, които също не наблюдават цитотоксичен ефект на пентоксифилина върху зиготи.

Следва да се отбележи, че не сме трансферирали получените ембриони на пациенти, тъй като яйцеклетките бяха използвани специално за нуждите на настоящето изследване, като едно от условията беше да култивираме ембрионите не повече от 6 дни. Поради недостиг на ооцити не сме проучвали влиянието на останалите вещества върху оплождащата способност на сперматозоидите и развитието и качеството на ембрионите.

Недостатъчният брой проби ( $n=3$ ) не ни позволи да направим достоверни изводи относно влиянието на тестваните вещества върху подвижността на тестикуларни сперматозоиди, макар че и в тези случаи наблюдавахме тенденция към увеличаване на мотилитета.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мотилитета е критичен фактор за осъществяване на функциите на сперматозоида – да оплоди и активира към делене зрялата яйцеклетка. За сметка на собственото си движение мъжките гамети преминават през цервикалната слуз, мигрират през матката и фалопиевите тръби, за да достигнат до мястото на оплождане, пенетрират през кумулус-ооцитния комплекс. Отклоненията в кинетичните характеристики на сперматозоида (вследствие на ендогенни и екзогенни фактори) са една от основните причини за мъжкия инфертилитет. Използването на техники за асистирана репродукция (интраутеринна инсеминация, ин-витро оплождане) предполага предварителна обработка на семенната течност, което дава възможност за изкуствено стимулиране на мотилитета на гаметите. От изследваните различни вещества, стимулатори на мотилитета, приложение в практиката намират два метилксантина – теофилин и пентоксифилин, които съответно са и разрешени за клинично използване. Най-често те се използват в случаите на астенозооспермия, след криоконсервация или работа със сперматозоиди, получени от тестиса с помощта на микрохирургични техники. За съжаление, наред със стимулиране на подвижността, някои автори докладват и отрицателни ефекти на тези вещества върху гаметите – преждевременна акрозомна реакция, детриментален ефект върху предимплантационните ембриони при лабораторни животни и др. Това предполага търсенето на нови вещества, стимулатори на мотилитета. В нашите изследвания проучихме действието на два новосинтезирани метилксантина (Т-1 и N-61), предоставени ни от колеги от катедрата по неорганична химия към фармацевтичния факултет на МУ-София.

Получените от нас резултати показаха, че новосинтезираните вещества подобряват мотилитета и преживяемостта на гаметите, без да оказват влияние върху други техни функционални показатели (ДНК-фрагментация, способност за прикрепване към хиалуронан, оплождаща способност). Това ги прави подходящ обект за евентуално използване в програмите за асистирана репродукция. От друга страна, тестваните вещества са нови и не са разрешени за клинично използване, което налага разширяване на изследванията върху ефекта им и евентуалните странични ефекти. Независимо, че не наблюдавахме отклонения в развитието на получените ин-витро предимплантационни ембриони, нямаме данни как третирането на сперматозоидите с тези вещества би се отразило след оплождане на процеса на имплантация, бременността и честотата на

конгенитални малформации. В този аспект интерес представляват изследвания върху животински модели (лабораторни и селскостопански животни), което ще бъде обект на бъдещата ни работа.

## ИЗВОДИ

- Новосинтезираните метилксантини **T-1** (7-[(*N*-метил-*N*-циклохексил)аминоетил]-1,3-диметилксантин хидрохлорид) и **N-61** (7-[(*N*-метил-*N*-циклохексил)аминоетил]-1,3-диметилксантин тартрат) в 3.6 mM концентрация подобряват подвижността и преживяемостта на гаметите в нативна семенна течност (нормозооспермия и астенозооспермия), като стимулиращият им ефект е съпоставим с този на пентоксифилина;
- Веществата **T-1** и **N-61** подобряват мотилитета и преживяемостта на мъжките гамети след криоконсервация;
- Веществата **T-1** и **N-61** стимулират подвижността на предварително сепарирани нормокинетични гамети;
- Веществата **T-1** и **N-61** не влияят върху степента на ДНК-фрагментация на сперматозоидите и способността им да се прикрепят към хиалуронан;
- Третирането на мъжки гамети с новосинтезираните метилксантини **T-1** и **N-61** не оказва влияние върху оплодителната им способност и качеството на получените ембриони.

## ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМАТА НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Hristova M., Stavreva P., Hristova E., **TODOROV P.** Influence of human ovarian cells on motility and longevity of male gametes. *Годишник на Софийски Университет „Св. Климент Охридски“ 2019, 104: 100-107*
2. Stavreva P., Hristova E., Zlatkov A., Todorov P. Effect of newly synthesized methylxanthines on motility, fertilization capacity of male gametes and embryo quality. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences 2022, in press (Q-2)*

## ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ НА НАУЧНИ ФОРУМИ

1. Stavreva P., Todorov P., Hristova E., Georgieva M., Zlatkov A. The effect of methylxanthines on the functional parameters of human spermatozoa. *International Scientific Conference “Kliment’s Days 2018”, Sofia, 2018* - доклад
2. Тодоров П., Ставрева П., Христова Е. Използване на биологични субстанции и химични вещества за подобряване мотилитета на сперматозоидите в ин-витро условия. *20-ти Национален Конгрес по стерилитет и репродуктивно здраве с международно участие, Боровец 2019* - доклад