



БЪЛГАРСКА АКАДЕМИЯ НА НАУКИТЕ
ИНСТИТУТ ПО БИОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ НА
РАЗМНОЖАВАНЕТО
„Акад. Кирил Братанов”



Молекулна основа на нарушени фертилни функции
при мъжа, предизвикани от съвременни
фактори на околната среда

Мая Начева Попова

АВТОРЕФЕРАТ

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

Научна специалност „Физиология на животните и човека“, шифър 01.06.17

Научен консултант
Проф. Росица Конакчиева, дбн

София, 2019 г.

Използвани съкращения:

Съкращения на български език:

СЗО – Световна Здравна Организация

цАМФ – цикличен аденозин монофосфат

Съкращения на английски език:

ALH - средна амплитуда на латерално движение на главичката

BCF - честота на пресичане на реалната траектория на сперматозоида със средно изчислената такава

ISAS – интегрирана система за спермален анализ

IVF – ин-витро оплождане (In Vitro Fertilization)

LIN - индекс за линейност

MT1 – мелатонинов рецептор 1А

MT2 – мелатонинов рецептор 2В

RT - qPCR – количествена полимеразна верижна реакция в реално време

SD – стандартно отклонение

STR - индекс за праволинейност

VAP - скорост за изминаване на средно разстояние

VCL - скорост на криволинейно движение

VSL - скорост на праволинейно движение

WOB - индекс за осцилация

ВЪВЕДЕНИЕ

В световен мащаб 48,5 милиона двойки страдат от безплодие като в 1/3 от случаите причина за това е т.н. мъжки фактор, изразяващ се в нарушение функцията на мъжката репродуктивна система. Стерилитетът при мъжа може да е резултат от варикоцеле, азооспермия (пълно отсъствие на сперматозоиди в еякулата), крипторхизъм, хипогонадизъм, ерекtilна дисфункция, хромозомни аномалии, имунологични причини с наличие на антиспермални антитела и др. Съществува, обаче, една значителна група пациенти (30-40%), при които инфертилитетът не се асоциира с точно определена причина и в този случай говорим за идиопатичен стерилитет. Известно е, че в основата на процеса оплождане залягат фини регулаторни механизми на клетъчно ниво, които са свързани с драматични промени в организацията на генетичния материал на гаметите, плазмената мембрана и цитоскелета. Предполага се, че нарушения в тези механизми биха могли да са причина за безплодието при мъже с идиопатичен стерилитет.

Мелатонинът е неврохормон, който повлиява репродуктивното поведение при много животински видове. Продукцията на мелатонин е пряко обвързана със светлината, но има предположения, че се влияе и от други фактори на околната среда. Класическите изследвания върху функциите на мелатонина при бозайниците доказват категорично неговата роля в контрола на сезонните репродуктивни цикли. Доказано е, че хормонът има антигонадотропно действие, т.е. подтиска отделянето на гонадотропни хормони от хипофизата. По този начин участва в размножителния процес като регулатор, който отчита промяната в осветлението през различните сезони. Най - вероятно при човека този фотопериодичен сигнал няма същото значение поради наличието на доминираща социална среда и променени външни условия, свързани с начина на живот и урбанизацията. Въпреки това, промените настъпващи в хронобиологичните характеристики на ритъма на секреция на мелатонина около пубертета и тези, наблюдавани при редица ендокринни смущения свидетелстват, че и при човека хормонът е тясно свързан с физиологията на репродуктивната система.

Хормоналният баланс при всеки индивид е от изключителна важност за правилното развитие във физиологично, анатомично и репродуктивно отношение. Затова андрогените и естрогените, основни двигатели за формирането на двата пола, заемат своето важно място и съжителстват в хармоничен баланс. В тестисите поддържането на този баланс е фино контролиран от ендокринни и паракринни фактори, но също и от активността на специфичен ензим, наречен ароматаза. Ароматазата катализира превръщането на андрогените в естрогени и е продукт на гена *CYP19*, локализиран в хромозома 15 при човека. Наличието на ароматазата в тестикуларните клетки е обект на интерес и обсъждания от дълго време. Тестисът продуцира естрогени и ролята

на тези хормони в репродукцията е установена при бозайници и примати. Важно е да се отбележи не само присъствието на тези хормони, но и наличието на специфични естрогенови рецептори (ER α и ER β) при човешки незрели полови клетки и еякулирани сперматозоиди, които могат да модулират експресията на таргетни гени посредством сигнални пътища. Поради тези причини потенциалната роля на естрогените за узряването на мъжките полови клетки, капацитацията и дори протичането на акрозомната реакция заслужава особено внимание.

Установено е, че зрелите сперматозоиди съдържат информационна РНК, чиято роля все още не е напълно разкрита, но се предполага, че е от значение за репродуктивната функция на гаметите и ранните етапи от развитието на ембриона. Във връзка с това са изследвани множество транскрипти в човешки сперматозоиди с цел търсене на кандидат биомаркери за фертилност измежду тях. Ароматазни транскрипти са установени в мъжки гамети и има данни, че експресията на ароматазния ген *CYP19* е асоциирана с параметрите на семенната течност и подвижността на сперматозоидите. Финото настройване на експресията на *CYP19* е в основата на мотилитета и оплодителната способност на гаметите. По-високата или по-ниската експресия на транскрипта, отразена съответно в естрогеновите нива, дава отражение върху фенотипа и може да бъде причина за субфертилитет. Известно е, че естрогените значително повишават скоростта на капацитация ин-витро. Това е предпоставка за намаляване на оплодителния потенциал в резултат на преждевременна капацитация и липса на акрозомна реакция.

В този дисертационен труд изследванията ни са фокусирани от една страна върху значението на мелатонина като ендокринен фактор под влияние на околната среда върху репродуктивната функция при мъжа. Те имат за основна цел да допринесат за изясняване на мишените на действие на хормона в половите клетки, като насочат вниманието към нови подходи за подобряване на мъжкия репродуктивен потенциал. Основание за избиране обекта на изследването е доказаната роля на цАМФ като интрацелуларен сигнален медиатор на мотилитета и активационните оплодителни характеристики на сперматозоидите при бозайниците. Научните доказателства, че мелатонин инхибира специфично синтеза на цАМФ, са основание за формулирането на експерименталните задачи.

Същевременно, основавайки се на предишни наблюдения на колектива за наличието на взаимовръзка между експресията на ароматазата и мембранни рецептори за мелатонин при състояния на нарушена фертилна функция при мъжа, проведохме изследване за изясняване вероятната роля на ензима в спермалната подвижност и установяване потенциала на ароматазните транскрипти в зрели човешки сперматозоиди да послужат като биомаркер за определяне на мъжкия репродуктивен потенциал.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящия дисертационен труд е да бъдат изследвани молекулни характеристики на зрели сперматозоиди в човешка семенна течност, които отразяват въздействието на фактори от околната среда и могат да имат отношение към нарушена фертилна функция при мъжа. Основно място е отделено на проучване на експресията на мембранни рецептори за мелатонин в зрели еякулирани сперматозоиди и въздействието на мелатонин ин-витро върху техните кинетични и функционални характеристики. Основавайки се на предишни наблюдения на колектива за наличието на взаимовръзка между експресията на ензима ароматаза и мембранни рецептори за мелатонин при състояния на идиопатичен субфертилитет, част от проучванията бяха насочени към сравнително изследване генната експресия на *CYP19* в сперматозоиди с различни кинетични и морфологични характеристики.

За изпълнение на поставената **цел** бяха разработени следните експериментални **задачи**:

1. Изолиране и характеризиране на чисти фракции на сперматозоиди от човешка сперма чрез различни методи на плътностно градиентно центрофугиране;
2. Сравнителна оценка на морфология и кинетични параметри на сперматозоиди от нативен еякулат и в пречистени фракции с помощта на автоматичен спермоанализатор ISAS (Integrated Sperm Analysis System);
3. Оценка на ефекта на мелатонин ин-витро върху функционални и кинетични характеристики на сперматозоиди;
4. Изследване експресията на мембранни рецептори за мелатонин от типа MT1 и MT2 в сперматозоиди чрез индиректна имуноцитохимия и имунофлуоресценция;
5. Оценка на цитоскелетния апарат в човешки сперматозоиди под влияние на мелатонин ин-витро чрез имунофлуоресценция;
6. Изследване експресията на гена за ароматаза *CYP19* в човешки сперматозоиди с различни кинетични характеристики.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследванията бяха проведени в периода 2013 – 2017 г. в ИБИР-БАН, Биологически факултет на СУ “Св.Климент Охридски“ и Медицински център по репродуктивна биология и медицина “РепроБиоМед“- гр.София. Част от използваните реактиви бяха придобити в рамките на Проект BG051PO001 – 3.3.06 - 0059 “Фундаментално и приложно обучение на докторанти, постдокторанти, специализанти и млади учени в интердисциплинарни биологични направления и иновационни биотехнологии“, осъществен с финансовата подкрепа на Оперативна програма „Развитие на човешките ресурси“ 2007-2013, съфинансирана от Европейския съюз чрез “Европейския социален фонд“. За целите на дисертационния труд бе използвана пряно еякулирана семенна течност от мъже в репродуктивна възраст след предоставяне на информирано съгласие в МЦ „РепроБиоМед“.

Бяха използвани следните методи:

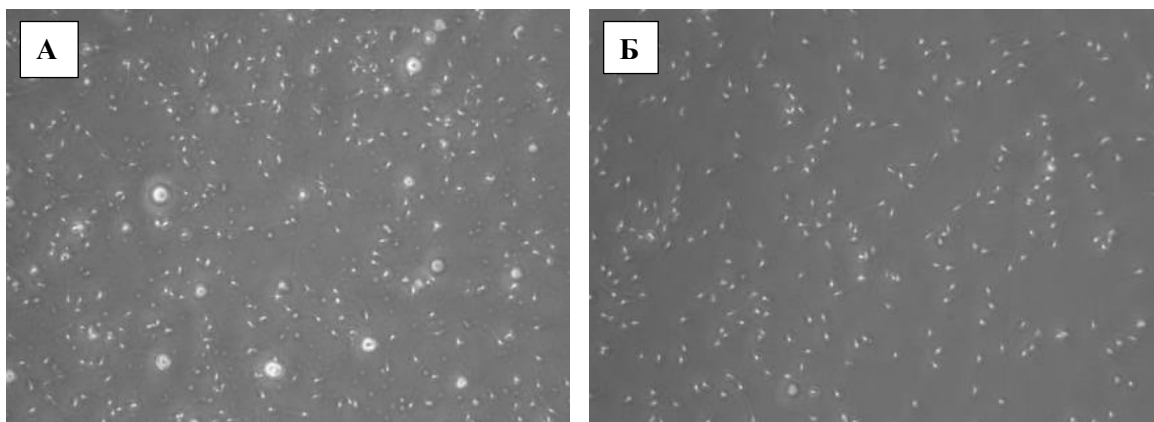
- Спермален анализ на семенна течност – анализ на физико-химичните характеристики на семенната течност и определяне концентрацията и подвижността на сперматозоидите чрез софтуер ISAS за компютърно-асистиран спермален анализ;
- Изследване морфологията на сперматозоидите по критериите на Крюгер;
- Обработка на семенна течност чрез плътностно градиентно центрофугиране;
- Ин-витро изследване физико-химични и функционални характеристики на пречистени фракции от сперматозоиди с повишаващи се концентрации на мелатонин 0.1 nM до 1 μ M;
- Изолиране на тотална РНК от сперматозоиди;
- Обратна транскрипция за получаване на кДНК;
- Real-time qPCR (RT-qPCR) – количествена полимеразна верижна реакция в реално време;
- Анализ на получените от qPCR резултати посредством REST (Relative Expression Software Tool) софтуер;
- Имунocyтохимия на мембранни и вътреклетъчни протеини:
 - индиректна имунocyтохимия с пероксидаза - конюгирани антители;
 - индиректна имуофлуоресцентна микроскопия;
- Статистическа обработка:
 - *Student t-test*;
 - корелационен анализ.

РЕЗУЛТАТИ

1. Сравнителен анализ на кинетични параметри на сперматозоидите след изолиране в двустепенен плътностен градиент

За изследване влиянието на мелатонин върху кинетични и други функционални характеристики на сперматозоидите бе извършен подбор на таргетна група от пациенти и подходящи контроли. Общо групата, означавана като **Група А**, включваше 16 участника и беше формирана от две подгрупи: А1 – експериментална (пациенти) и А2 - контроли. Критерий за включване в подгрупа А1 беше установена понижена подвижност на сперматозоидите в семенната течност на мъже в репродуктивна възраст (средна възраст $36,9 \pm 6,0$ год.), контролната подгрупа А2 включваше мъже без отклонения в параметрите на семенната течност, които са посетили МЦ“РепроБиоМед“ с цел профилактична спермограма.

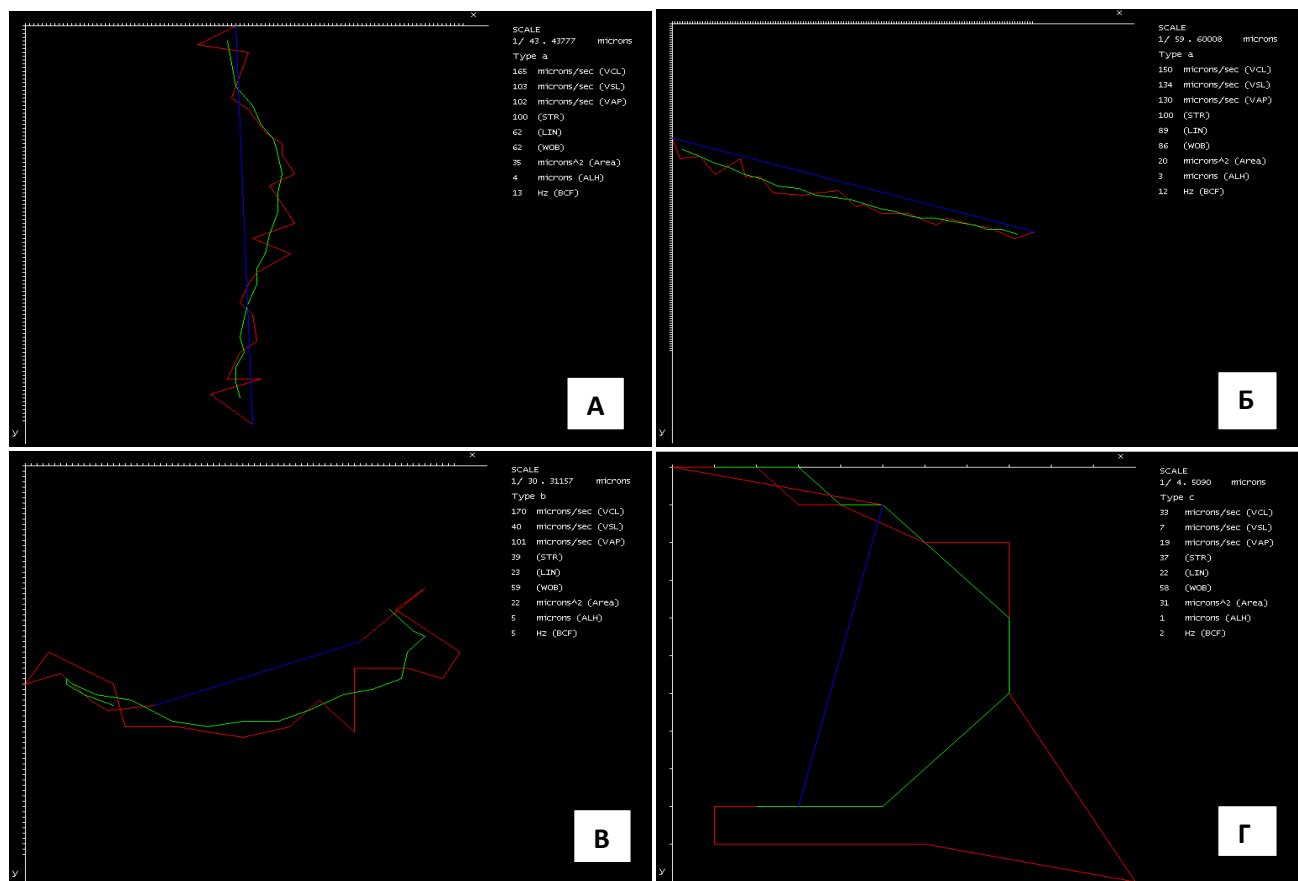
Нативният еякулат, дарен от участниците в група А, бе подлаган на обработка чрез двустепенен плътностен градиент (бяха използвани градиентни разтвори SilSelect (FertiPro) с процентна концентрация 40% и 80 %), с цел получаване на пречистена, богата на прогресивно подвижни гамети спермална фракция. Методът позволи да бъдат изолирани фракции от сперматозоиди с висок мотилитет, пречистени от клетки на сперматогенезата, левкоцити и детрит. На Фиг. 1 е илюстриран сравнителен резултат на представителни проби от нативен еякулат (А) и обработена семенна течност чрез двустепенен плътностен градиент (Б). След обработка на нативната семенна течност чрез центрофугиране в двустепенен плътностен градиент, на дъното на епруветката се формира утайка, предствалваща спермална фракция, обогатена с прогресивно подвижни сперматозоиди.



Фигура 1: Обработка на семенна течност чрез двустепенен плътностен градиент– микроскопско изследване: А – нативен (необработен) еякулат; Б – суспензия от пречистени сперматозоиди, получени след обработка с плътностен градиент.

✓ Компютърно-асистиран спермален анализ чрез софтуер ISAS

Получената обогатена фракция с подвижни сперматозоиди беше анализирана чрез автоматичен спермоанализатор и специализиран софтуер (ISAS). Посредством системата ISAS беше определяна скоростта на движение на сперматозоидите в нативната семенна течност и в съответната пречистена фракция, беше установена траекторията на движение на всеки един заснет сперматозоид и въз основа на това бе охарактеризирана спермалната кинетика чрез определяне на кинетичните параметри VSL, VCL, VAP, LIN, WOB, STR, ALH и BCF. Представителни данни за траекториите на движение на сперматозоидите при един от пациентите, участващи в научната разработка, са представени на Фиг. 2.



Фигура 2: Траектории на движение на сперматозоиди, определени чрез системата ISAS: А и Б – траектория на движение на сперматозоид със скорост на движение $>25 \mu\text{m/s}$ (тип А); В – траектория на движение на сперматозоид със скорост на движение от 5 до $25 \mu\text{m/s}$ (тип В); Г – траектория на движение на непрогресивно подвижен сперматозоид със скорост на движение по-малка от $5 \mu\text{m/s}$ (тип С). **Легенда:** ---- реална траектория на движение на сперматозоида; ---- средно изчислена траектория на движение на сперматозоида; ---- траектория на праволинейно движение на сперматозоида.

В пациентската група (подгрупа А1) в пречистените фракции концентрацията на прогресивно подвижните сперматозоиди (тип А + тип В) бе статистически достоверно по-висока,

отколкото в нативната семенна течност (Таблица 1). Същевременно бе установено понижаване на концентрацията и съответно дяловото разпределение на непрогресивно подвижните и неподвижните сперматозоиди в пречистената фракция в сравнение с нативния еякулат, но данните нямаха статистическа значимост. За разлика от пациентската подгрупа, при контролната не бяха установени статистически значими различия в процентното съотношение на подвижни и неподвижни сперматозоиди след пречистване с двустепенен плътностен градиент в сравнение с нативен еякулат.

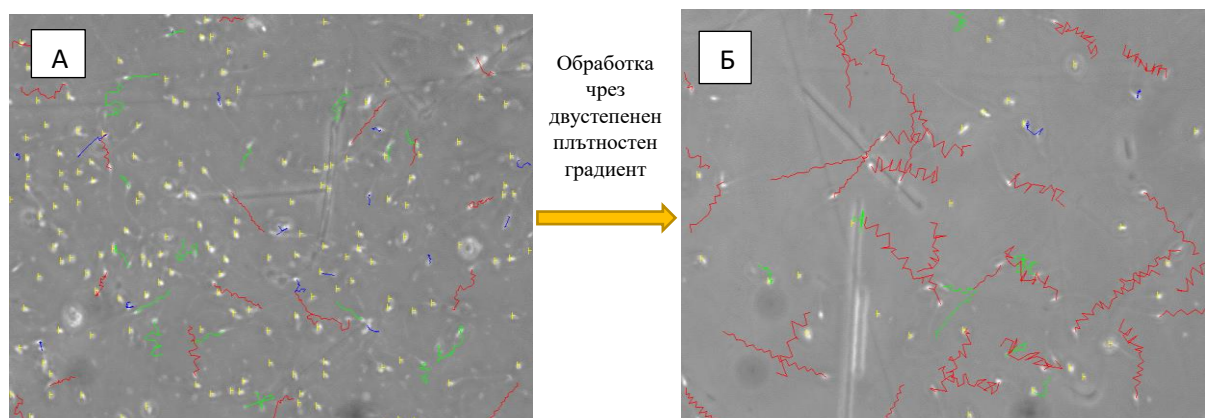
Таблица 1: Мотилитет и кинетични характеристики на сперматозоидите в нативен еякулат и след обработка с двустепенен плътностен градиент. Данните са представени като средна стойност \pm SD.

Параметър	Група А			
	Подгрупа А1		Подгрупа А2	
	Нативен еякулат	Пречистена фракция	Нативен еякулат	Пречистена фракция
Прогресивно подвижни сперматозоиди (Тип А+ В), %	27,3 \pm 16,2	48,7 \pm 19,6**	79,1 \pm 14,4	77,1 \pm 25,4
Непрогресивно подвижни сперматозоиди (Тип С), %	7,1 \pm 5,5	4,8 \pm 5,3	4,0 \pm 2,8	4,2 \pm 5,2
Неподвижни сперматозоиди (Тип D), %	65,6 \pm 21,0	46,6 \pm 18,6	16,9 \pm 13,1	18,7 \pm 20,2
VSL, μ m/s	34,9 \pm 15,7	59,8 \pm 28,1**	59,8 \pm 21,2	104,5 \pm 52,2
VAP, μ m/s	41,9 \pm 15,7	63,7 \pm 26,6*	71,5 \pm 19,9	110,4 \pm 51,4
VCL, μ m/s	61,7 \pm 20,3	96,6 \pm 30,0*	104,0 \pm 18,3	138,5 \pm 52,4
STR, %	81,4 \pm 7,1	91,7 \pm 7,2*	82,2 \pm 10,2	93,0 \pm 7,7**
LIN, %	55,4 \pm 11,7	59,4 \pm 12,7	56,5 \pm 15,3	71,8 \pm 16,2**
WOB, %	67,5 \pm 8,6	64,4 \pm 10,1	67,8 \pm 11,3	76,6 \pm 12,0**
ALH, μ m	2,3 \pm 0,8	3,3 \pm 0,4*	3,2 \pm 0,3	3,3 \pm 0,5
BCF, Hz	7,6 \pm 1,9	9,5 \pm 1,9**	9,3 \pm 0,7	9,7 \pm 0,8

* $p < 0,01$ между пречистена фракция и нативен еякулат от съответната подгрупа

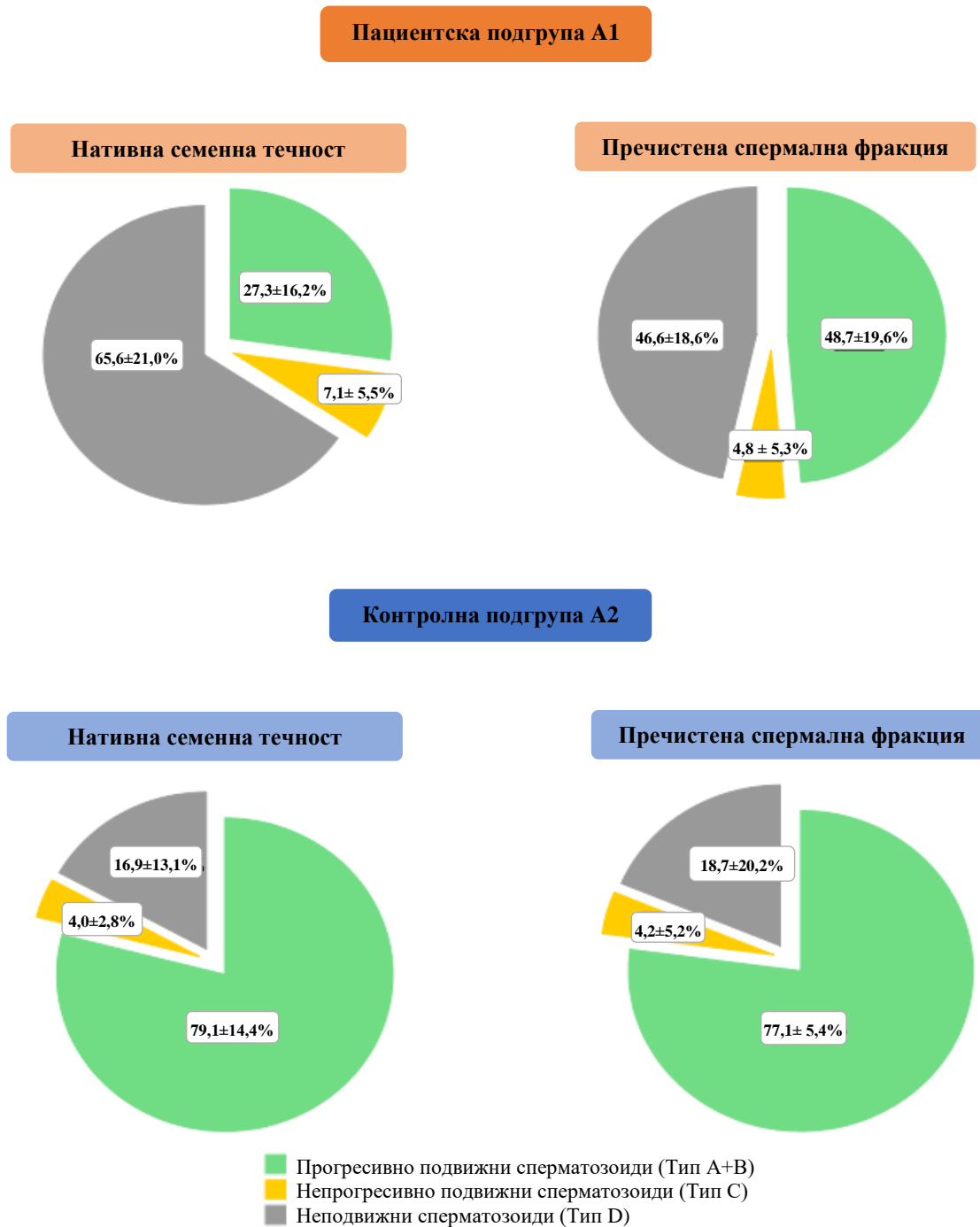
** $p < 0,05$ между пречистена фракция и нативен еякулат от съответната подгрупа

На Фиг. 3 са представени микрофотографии от спермален анализ, направен чрез ISAS софтуера на нативен еякулат (Фиг. 3А) и пречистена фракция (Фиг. 3Б) при един от пациентите.



Фигура 3: Сравнителен анализ на мотилитета и концентрацията на сперматозоиди посредством софтуер ISAS в нативна семенна течност и след пречистване в двустепенен градиент. А – нативен еякулат; Б – спермална фракция след пречистване в двустепенен градиент (Легенда: червени линии - сперматозоиди тип А, зелени линии – тип В, сини – тип С, жълти кръстчета – тип D).

Дяловото разпределение на сперматозоидите в проби от нативна семенна течност и в пречистена фракция при пациенти и контроли според типа подвижност на сперматозоидите е представено на Фиг. 4.



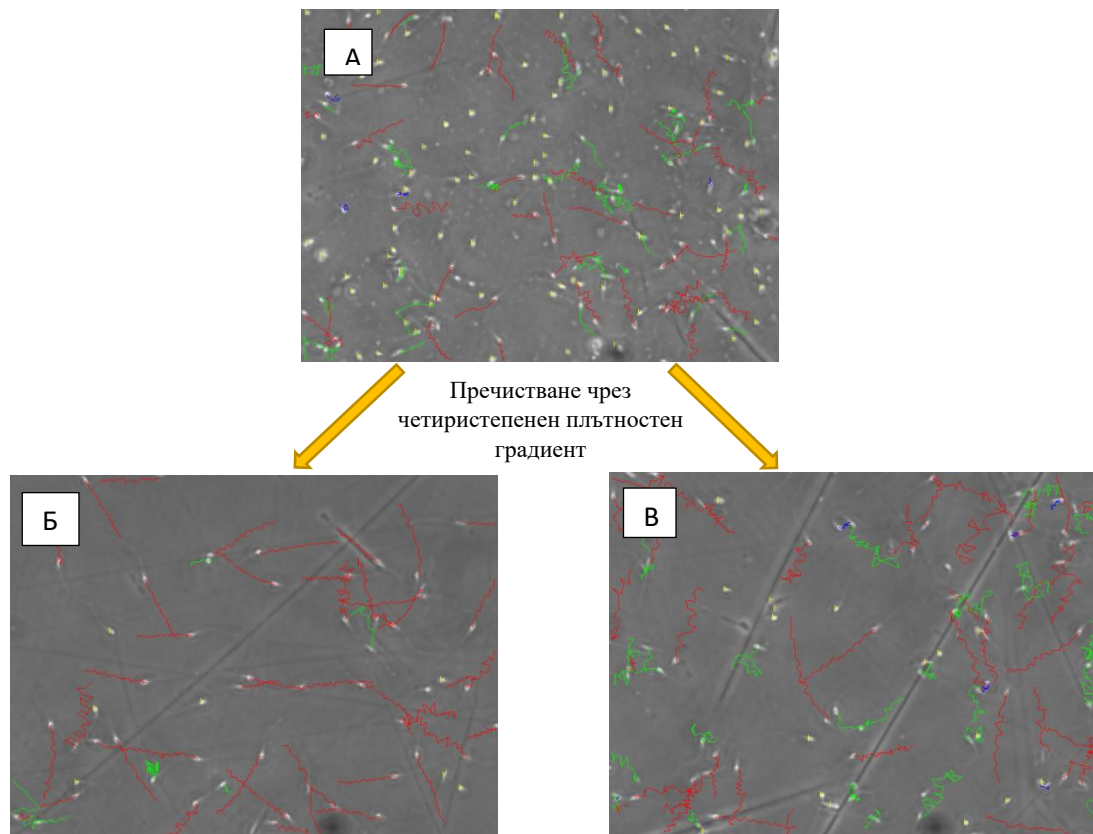
Фигура 4: Представителна диаграма при пациенти с астенозооспермия и контроли, визуализираща дяловото разпределение на гаметите според тяхната подвижност в нативна семенна течност и пречистена фракция. Данните са представени като осреднени стойности \pm SD.

Кинетичният анализ на сперматозоидите в пациентската подгрупа (A1) преди и след обработка, който включваше изследване на кинетичните параметри VSL, VCL, VAP, LIN, WOB, STR, ALH и BCF, установи достоверно повишаване на VSL, VCL, VAP, STR, ALH и BCF след пречистване на семенната течност (Таблица 1). Стойностите за LIN и WOB не показаха значителни изменения в нативната семенна течност и пречистената фракция при пациентите (подгрупа A1). За разлика от тях, при изследваните контроли (подгрупа A2), бяха установени достоверно по-високи стойности в пречистената фракция за параметрите STR, LIN и WOB ($p < 0,05$) спрямо съответните стойности преди обработка с плътностен градиент. Параметрите VSL, VCL и VAP също показаха повишение след обработка, но без статистическа достоверност. Градиентното сепариране не се отрази върху стойностите на ALH и BCF в контролната група.

2. Сравнителен анализ на кинетични параметри на сперматозоиди, получени след изолиране в четиристепенен плътностен градиент

За сравнителна оценка на генната експресия на сперматозоидите беше използвано допълнително разделяне на спермалните фракции на бързо подвижни („бърза“ фракция) и бавно подвижни сперматозоиди („бавна“ фракция). За целта беше използван четиристепенен плътностен градиент (бяха използвани градиентни разтвори SilSelect (FertiPro) с процентна концентрация 20%, 40%, 60% и 80 %), който позволи от една страна пречистване от семенната плазма и същевременно сепариране на двете целеви фракции сперматозоиди. В изследването участваха общо 15 мъже на средна възраст $34,3 \pm 5,5$ години. Групата с общо обозначение „Б“ бе разделена на три подгрупи: Б1, Б2 и Б3. В подгрупа Б1 бяха включени инфертилни пациенти с влошени параметри на семенната течност, а в Б2 – пациенти с идиопатичен стерилитет, при които не са установени отклонения при спермален анализ. Подгрупа Б3 включваше мъже контроли с доказана фертилна функция.

В резултат на разпределението в четиристепенния плътностен градиент, бързо подвижните сперматозоиди се утаяват на дъното на центрофужната епруветка, фракцията с бавно подвижните гамети се задържа във фазата между 80% и 60% градиентен разтвор, а патологичните и по-бавни или неподвижни сперматозоиди, както и детрити, левкоцити и герминативни клетки се задържаха в по-горните градиенти. Получените две целеви фракции сперматозоиди бяха изследвани микроскопски, за да бъде установено наличие/липса на други клетки освен зрели сперматозоиди и беше констатирана тяхната чистота по отношение на други клетки. Така получените фракции от бързи и бавни сперматозоиди бяха съответно подложени на експресионен анализ след изолиране на РНК.



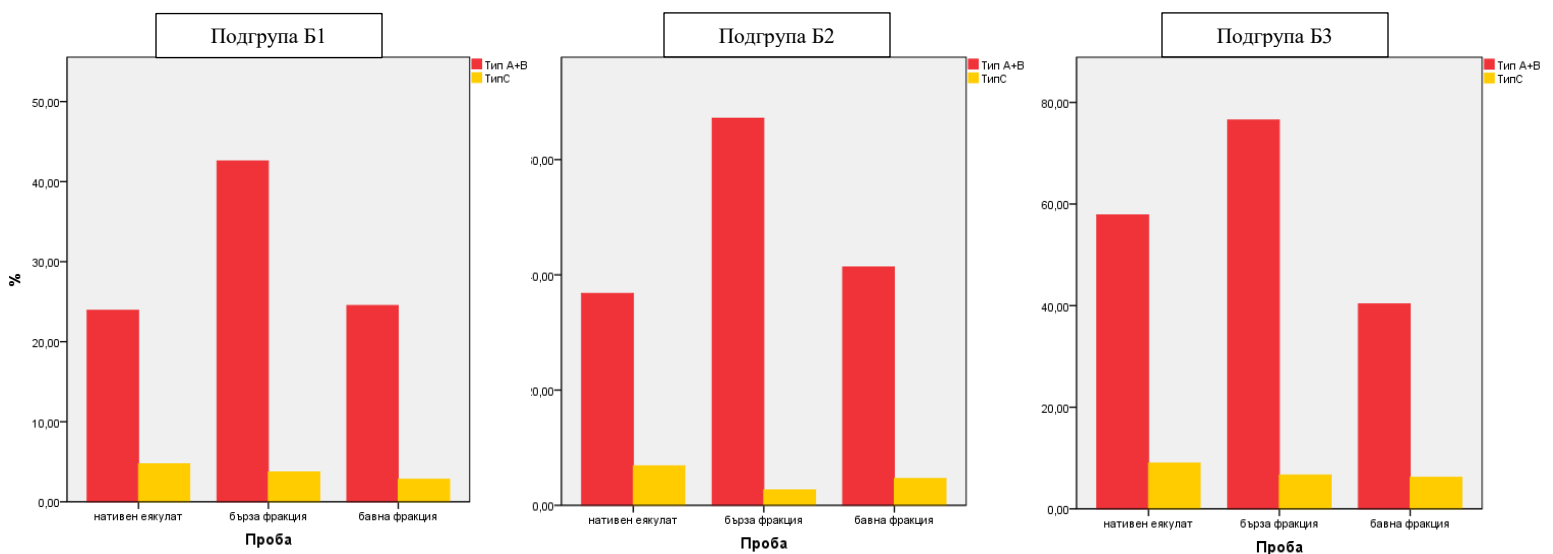
Фигура 5: Микрофотографии на сперматозоидите в нативен еякулат и след обработка с четиристепенен плътностен градиент, направени чрез ISAS софтуера. А – подвижност и концентрация на сперматозоиди от нативен еякулат; Б - подвижност и концентрация на сперматозоиди в обогатена с бързи прогресивно подвижни сперматозоиди фракция; В - подвижност и концентрация на сперматозоидите в обогатена с бавно подвижни сперматозоиди фракция. Легенда: - с червени линии са обозначени сперматозоидите от тип А, със зелени – тип В, със сини – тип С и с жълти кръстчета – тип D.

✓ Компютърно-асистиран спермален анализ чрез софтуера ISAS

Компютърно-асистиран спермален анализ бе проведен както на семенната течност преди обработка с четиристепенен плътностен градиент, така и на получените след обработка две фракции сперматозоиди. На Фиг. 5 е визуализирано определяне концентрацията и мотилитета на сперматозоидите чрез ISAS софтуера. На Фиг. 5Б ясно се различава присъствието предимно на бързи прогресивно подвижни сперматозоиди в утайката, докато фракцията, изолирана от интерфазата между 80% и 60%, както и от 60%-ия градиентен разтвор, е обогатена с бавно подвижни сперматозоиди (Фиг. 5В). Въз основа на получените от ISAS данни за мотилитета на сперматозоидите, би могло да се заключи, че изолираните две целеви фракции отговарят на изискванията, заложили при планирането на експерименталната дейност, а именно: 1)

обозначената от нас „бърза“ фракция е богата на бързи прогресивно подвижни сперматозоиди тип А с предпологаем най-висок фертилизационен потенциал – изолира се от утайката, получена след плътностно градиентно центрифугиране; 2) фракцията, изолирана от интерфазата между 80% и 60%, и от 60%-ия градиентен разтвор, наречена „бавна“ фракция, съдържа понижена концентрация на тип А сперматозоиди и е обогатена с бавни прогресивно или непрогресивно подвижни гамети.

На Фиг. 6 графично е представено дяловото разпределение на непрогресивно подвижните сперматозоиди (Тип С) и прогресивно подвижните такива (ТипА+В) преди и след обработка на семенната течност.



Фигура 6: Мотилитет на сперматозоидите в нативен еякулат, „бърза“ и „бавна“ фракции, получени след обработка чрез четиристепенен плътностен градиент.

Комплексният кинетичен анализ на цитираните фракции включваше изследване на параметрите VSL, VCL, VAP, LIN, WOB, STR, ALH и BCF. При пациентите с влошени параметри на семенната течност в нативния еякулат не бе наблюдавано статистически достоверно различие между кинетичните параметри на сперматозоидите от получените след обработка две спермални фракции с изключение на скоростта на криволинейно движение на сперматозоидите VCL, която бе сигнификантно по-ниска в „бавната“ фракция в сравнение с „бързата“.

Същевременно в „бавната“ фракция от сперматозоиди при мъжете с нормозооспермия от пациентската подгрупа Б2 бе наблюдавано понижаване на скоростта на праволинейно движение – VSL ($p < 0,05$), на криволинейно движение – VCL ($p < 0,01$) и скоростта за придвижване на гаметите по средно изчислената им траектория – VAP ($p < 0,01$) в сравнение с “бързата“

спермална фракция. В стойностите на STR, LIN, ALH и BCF не бе установена разлика при бързо и бавно подвижните сперматозоиди. При „бавната“ фракция индексът на осцилация WOB бе по-нисък в сравнение с бързата такава, но без статистическа достоверност ($p = 0,07$).

При извършения кинетичен анализ на фракциите от бързи и бавно подвижни сперматозоиди на мъже от контролната подгрупа Б3, не бе установено сигнификантно различие в кинетичните параметри на двете фракции.

Бяха установени статистически достоверно по-високи стойности за VSL и VAP в бързата и бавна фракция сперматозоиди при инфертилните пациенти с нормозооспермия (Б2) в сравнение с контролната група (Б3), като в бавната фракция при нормозооспермичните пациенти индексът за праволинейност (STR) бе също повишен ($p < 0,05$) в сравнение със същата фракция при контролите. Същевременно не бе наблюдавано различие между стойностите на кинетичните характеристики на бързо и бавно подвижните гамети при пациентите с влошени параметри на семенната течност (Б1) и тези на контролната група (Б3). Резултатите са показани в Таблица 2.

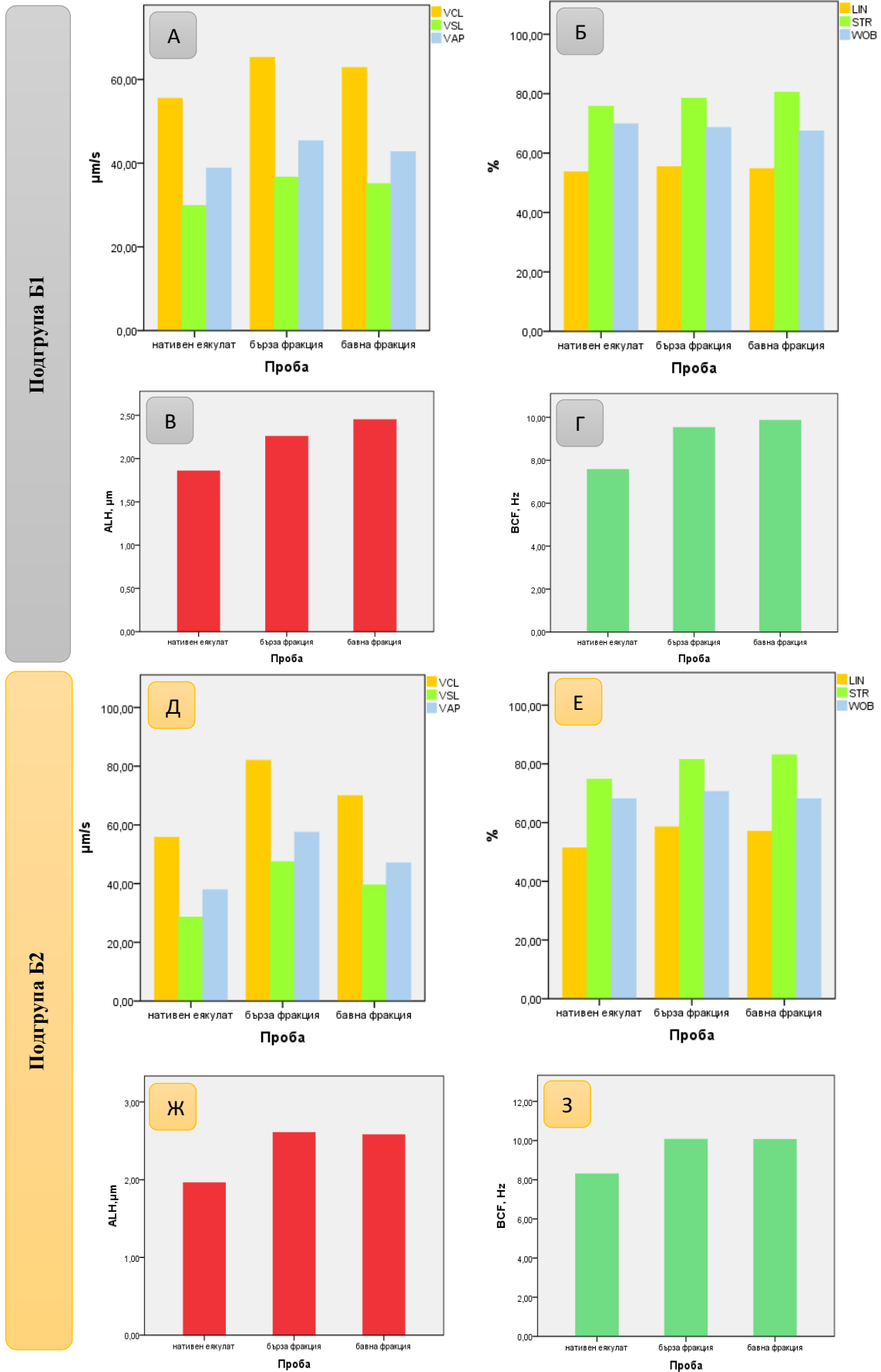
Таблица 2: Зависимост между кинетични характеристики на бързо и бавно подвижни сперматозоиди на мъжете от трите подгрупи Б1, Б2 и Б3 (данните в таблицата са представени като средна стойност \pm SD).

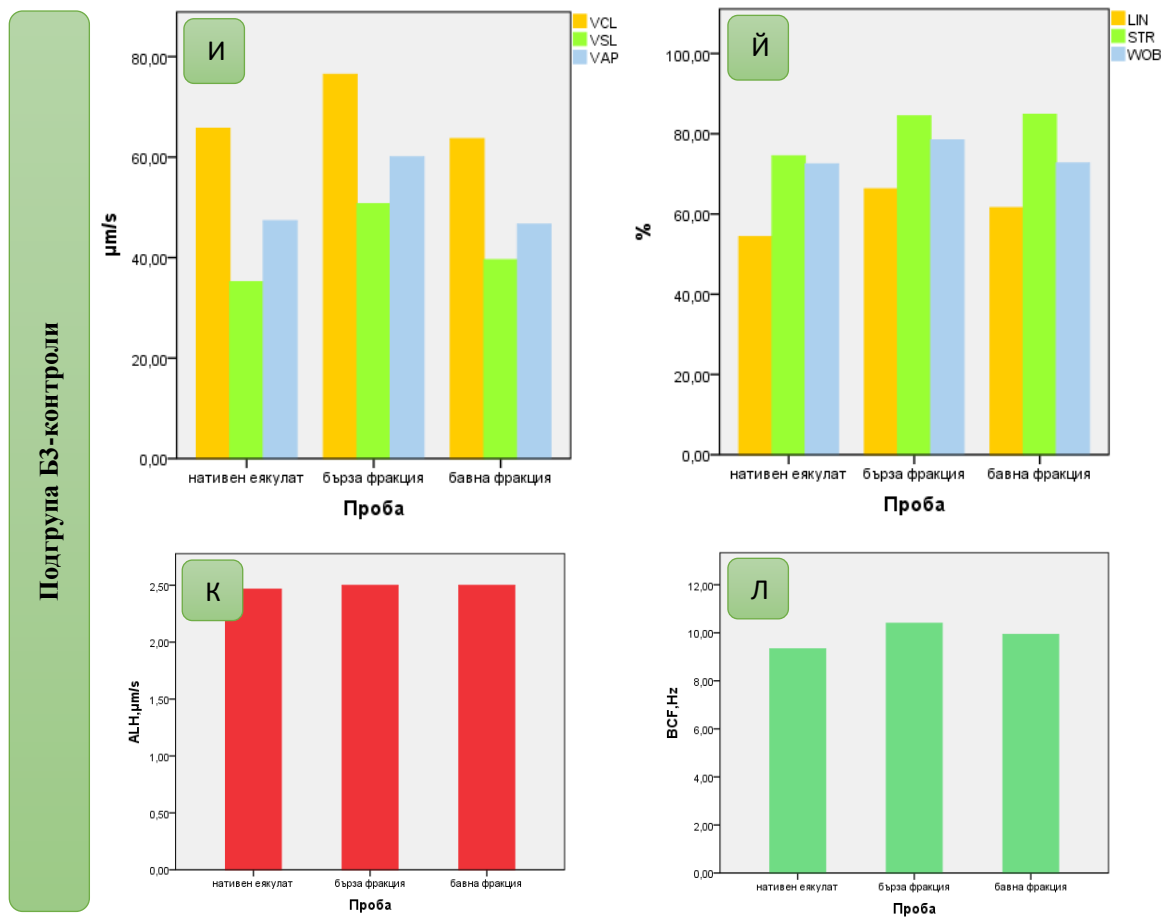
Параметър	Бърза фракция сперматозоиди					Бавна фракция сперматозоиди				
	Подгрупа Б3	Подгрупа Б1	P^*	Подгрупа Б2	P^{**}	Подгрупа Б3	Подгрупа Б1	P^*	Подгрупа Б2	P^{**}
VSL, $\mu\text{m/s}$	50,7 \pm 3,9	42,1 \pm 16,1	0,239	60,2 \pm 6,0	0,014	39,6 \pm 8,8	35,7 \pm 12,2	0,425	46,2 \pm 7,1	0,010
VAP, $\mu\text{m/s}$	60,0 \pm 4,0	51,7 \pm 13,4	0,261	72,3 \pm 8,2	0,033	46,6 \pm 10,3	43,6 \pm 11,3	0,651	52,8 \pm 6,9	0,026
VCL, $\mu\text{m/s}$	76,5 \pm 3,0	71,9 \pm 12,7	0,331	91,4 \pm 16,5	0,282	63,7 \pm 9,2	63,1 \pm 13,7	0,563	69,6 \pm 12,1	0,256
STR, %	84,4 \pm 2,7	79,7 \pm 15,1	0,255	83,5 \pm 7,0	0,802	84,8 \pm 0,9	80,0 \pm 12,9	0,096	87,5 \pm 4,5	0,027
LIN, %	66,2 \pm 2,5	59,4 \pm 21,8	0,246	67,4 \pm 13,5	0,796	61,6 \pm 5,4	55,3 \pm 12,7	0,357	67 \pm 8,4	0,317
WOB, %	78,5 \pm 3,0	72,3 \pm 14,7	0,244	80,1 \pm 9,5	0,656	72,7 \pm 6,1	68,4 \pm 5,9	0,701	76,4 \pm 6,6	0,489
ALH, μm	2,5 \pm 0,2	2,2 \pm 0,3	0,270	2,7 \pm 0,8	0,889	2,5 \pm 0,0	2,4 \pm 0,3	0,500	2,4 \pm 0,6	0,776
BCF, Hz	10,4 \pm 0,8	9,8 \pm 0,7	0,220	10,4 \pm 0,7	0,770	9,9 \pm 1,0	9,8 \pm 1,4	0,295	10,5 \pm 1,0	0,738

* p-стойност при сравнение на контролна група Б3 с пациентска група Б1

** p-стойност при сравнение на контролна група Б3 с пациентска група Б2

На Фиг. 7 графично е представено изменението на кинетичните параметри на сперматозоидите след обработка на нативен еякулат с четиристепенен плътностен градиент в контролната (Б3) и двете пациентски подгрупи (Б1 и Б2).





Фигура 7: Изменение в кинетиката на сперматозоидите преди и след четиристепенен плътностен градиент: **А** - VCL, VSL и VAP в нативен еякулат, бърза и бавна фракция сперматозоиди в подгрупа Б1; **Б** - STR, WOB и LIN в нативен еякулат, бърза и бавна фракция сперматозоиди в подгрупа Б1; **В** – ALH в нативен еякулат, бърза и бавна фракция сперматозоиди в подгрупа Б1; **Г** – BCF в нативен еякулат, бърза и бавна фракция сперматозоиди в подгрупа Б1; **Д** - VCL, VSL и VAP в нативен еякулат, бърза и бавна фракция сперматозоиди в подгрупа Б2; **Е** - STR, WOB и LIN в нативен еякулат, бърза и бавна фракция сперматозоиди в подгрупа Б2; **Ж** - ALH в нативен еякулат, бърза и бавна фракция сперматозоиди в подгрупа Б2; **З** - BCF в нативен еякулат, бърза и бавна фракция сперматозоиди в подгрупа Б2; **И** - VCL, VSL и VAP в нативен еякулат, бърза и бавна фракция сперматозоиди в подгрупа Б3; **Й** - STR, WOB и LIN в нативен еякулат, бърза и бавна фракция сперматозоиди в подгрупа Б3; **К** - ALH в нативен еякулат, бърза и бавна фракция сперматозоиди в подгрупа Б3; **Л** - BCF в нативен еякулат, бърза и бавна фракция сперматозоиди в подгрупа Б3.

✓ Корелационен анализ

Извършеният корелационен анализ на данните, получени от кинетичния анализ на подгрупа Б1 показва:

- положителна линейна корелация между процентното съотношение на най-бързите прогресивно подвижни сперматозоиди Тип А, както и Тип А + В и кинетичните параметри VCL, VSL, VAP ($p < 0.01$);

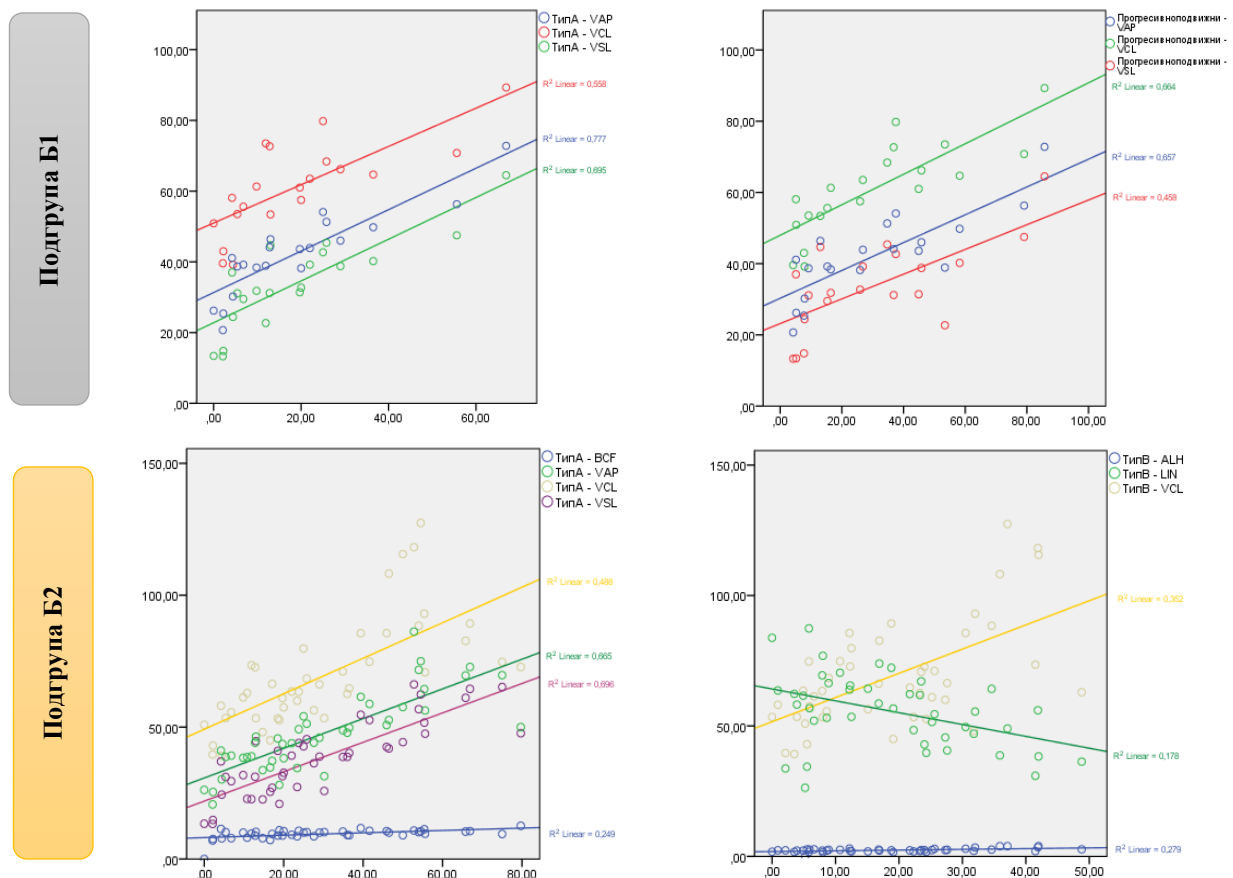
- положителна линейна корелация между Тип А гаметите (%) и параметрите LIN и WOB ($p < 0,05$);
- положителна линейна корелация между Тип В гаметите (%) и VCL ($p < 0,01$);
- положителна линейна корелация между сперматозоидите Тип А (%) и STR ($p < 0,05$);
- не бе установена корелация между ALH и BCF и дяловото разпределение на типовете сперматозоиди.

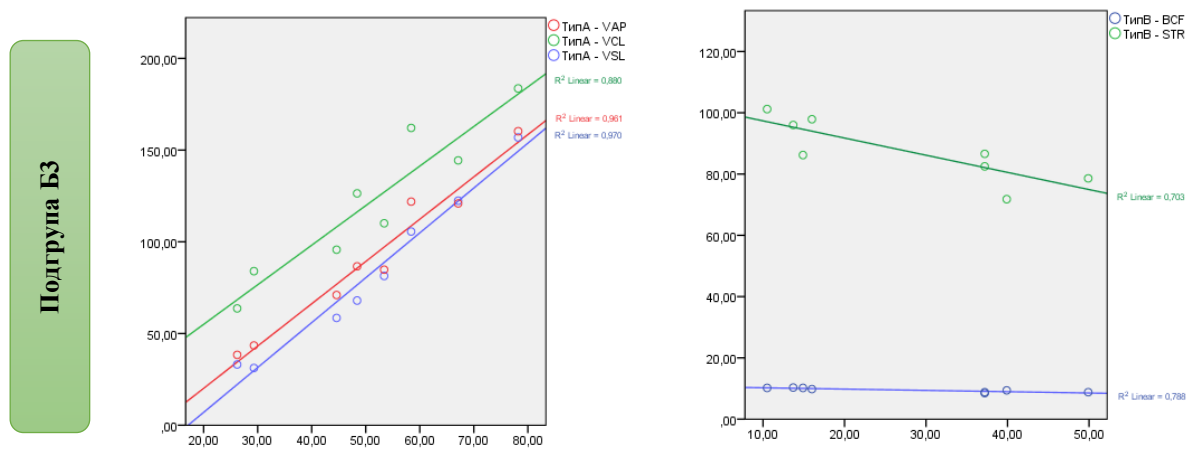
При подгрупа Б2 (нормозооспермични мъже с идиопатичен инфертилитет) линейна положителна корелация бе установена между:

- дяловото разпределение на прогресивно подвижните сперматозоиди (Тип А + В) и VCL, VSL, VAP, ALH и BCF ($p < 0,01$);
- процентното съотношение на Тип А сперматозоидите и VCL, VSL, VAP, LIN, STR, BCF ($p < 0,01$), ALH и WOB ($p < 0,05$);

Същевременно в подгрупа Б2 бе установена положителна корелация между Тип В (%) и VCL и VAP и отрицателна линейна корелация между дяловото разпределение на Тип В сперматозоидите и LIN ($p < 0,01$), STR и WOB ($p < 0,05$), както и на непрогресивно подвижните Тип С и VCL, VSL ($p < 0,01$), VAP и STR ($p < 0,05$).

На Фиг. 8 графично са представени част от установените корелационни зависимости.





Фигура 8: Графики на разсейване, показващи част от резултатите със статистическа достоверност, получени в следствие на направен корелационен анализ в подгрупи Б1, Б2 и Б3.

В контролната подгрупа Б3 процентното съотношение на прогресивно подвижните сперматозоиди корелира позитивно с VCL и ALH ($p < 0,05$), а това на Тип А сперматозоидите – с VCL, VAP, VSL, WOB, LIN ($p < 0,01$) и STR ($p < 0,05$). При Тип В сперматозоидите бе установена отрицателна линейна корелация между дела на тези гамети (%) и STR и BCF ($p < 0,01$).

3. Сравнителен морфологичен анализ на сперматозоиди преди и след обработка с четиристепенен плътностен градиент

Сравнително изследване на морфологията на пречистени фракции от сперматозоиди беше проведено при мъже с нормозооспермия и такива с отклонения в спермалната подвижност. Пробите бяха групирани в две сравнителни серии, съответно пациенти – В1 и контролна подгрупа В2. Подгрупа В1 включваше инфертилни астенозооспермични мъже с добра концентрация и морфология на сперматозоидите, но със слаба прогресивна подвижност съгласно нормите на СЗО 1999 г. Критерий за подбор на мъже контроли в подгрупа В2 беше наличието на нормални параметри на семенната течност.

Отделената от мъжете семенна течност бе подложена на обработка с четиристепенен плътностен градиент с цел изолиране на фракции от бързо подвижни и бавно подвижни сперматозоиди. След обработка бе направен кинетичен анализ чрез ISAS на сперматозоидите в двете фракции, като изследваните параметри бяха VSL, VCL, VAP, STR, LIN, WOB, ALH и BCF. Данни от анализа се представени в Таблицы 3 и 4.

Таблица 3: Резултат от кинетичен анализ на бързо и бавно подвижни сперматозоиди на пациенти с понижена подвижност, съставлящи подгрупа В1 (данните в таблицата са представени като средна стойност \pm SD).

Група В		
Параметър	Пациенти с нарушения в подвижността на сперматозоидите (подгрупа В1)	
	Порция	
	Бърза фракция	Бавна фракция
VSL, $\mu\text{m/s}$	53,4 \pm 12,8	34,6 \pm 10,3
VAP, $\mu\text{m/s}$	66,3 \pm 12,3	43,6 \pm 12,9
VCL, $\mu\text{m/s}$	121,5 \pm 8,3	84,1 \pm 34,1
STR, %	80,1 \pm 4,5	79,4 \pm 0,2
LIN, %	43,7 \pm 7,6	42,2 \pm 4,9
WOB, %	54,4 \pm 6,4	53,1 \pm 6,2
ALH, μm	3,9 \pm 0,0	3,2 \pm 1,1
BCF, Hz	9,8 \pm 1,1	9,3 \pm 1,0

Установи се, че при подгрупа В1 във фракцията с бързи сперматозоиди стойностите на VSL, VAP и VCL са по-високи в сравнение с фракцията, обогатена с бавно подвижни сперматозоиди. Останалите кинетични параметри не показаха съществени различия в стойностите си между двете фракции.

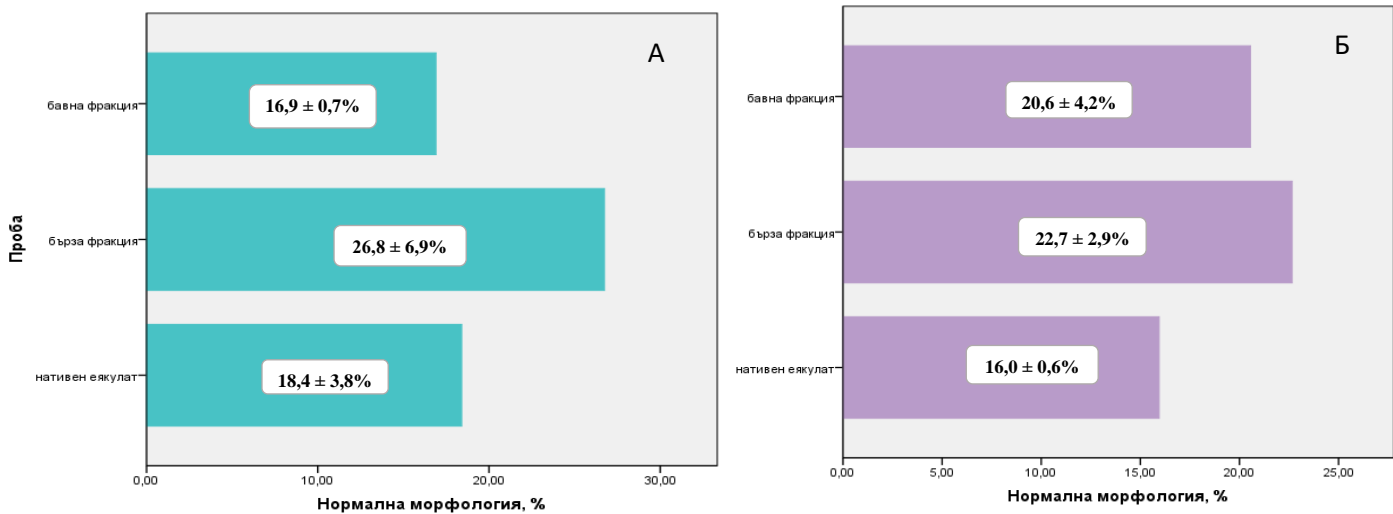
В контролната подгрупа В2 всички изследвани кинетични параметри с изключение на ALH и BCF бяха леко завишени в „бързата“ фракция в сравнение с „бавната“ (Таблица 4). При ALH и BCF не се наблюдаваха изменения в стойностите между двете фракции.

Таблица 4: Резултат от кинетичен анализ на бързо и бавно подвижни сперматозоиди на контроли, съставлящи подгрупа В2 (данните в таблицата са представени като средна стойност \pm SD).

Група В		
Параметър	Контроли (подгрупа В2)	
	Порция	
	Бърза фракция	Бавна фракция
VSL, $\mu\text{m/s}$	49,1 \pm 2,0	36,0 \pm 9,3
VAP, $\mu\text{m/s}$	54,0 \pm 5,7	42,9 \pm 11,2
VCL, $\mu\text{m/s}$	74,8 \pm 2,8	69,4 \pm 23,0
STR, %	91,2 \pm 5,9	83,9 \pm 0,6
LIN, %	65,7 \pm 0,2	52,5 \pm 4,0
WOB, %	72,2 \pm 4,9	62,5 \pm 4,5
ALH, μm	2,4 \pm 0,4	2,7 \pm 0,3
BCF, Hz	11,9 \pm 1,1	10,8 \pm 0,3

Бе изследвано изменението в броя и процентното съотношение на сперматозоидите с нормална морфология и на тези с морфологични дефекти след обработка на семенната течност с четиристепенен плътностен градиент. За целта бе анализирана спермалната морфология в нативния еякулат и в двете целеви фракции - фракцията с бързо подвижни сперматозоиди и тази с

бавно подвижните. Както при пациентите, така и при контролите наблюдавахме повишаване на броя сперматозоиди с нормална морфология и съответно понижаване концентрацията на морфологично анормалните гамети в „бързата“ фракция в сравнение с нативния еякулат (Фиг.9).



Фигура 9: Дялово разпределение на сперматозоиди с нормална морфология в необработена семенна течност и в изолирани след плътностно градиентно центрофугиране фракции: А – пациентска подгрупа V1; Б – контролна подгрупа V2.

В контролната подгрупа V2 концентрацията на сперматозоидите с нормална морфология в „бавната“ фракция бе по-висока от тази в необработената семенна течност, но по-ниска в сравнение с фракцията, богата на бързо подвижни сперматозоиди. При един от пациентите от подгрупа V1 в „бавната“ фракция гаметите с добра морфология бяха с понижена концентрация в сравнение с нативния еякулат и „бързата“ фракция. Същевременно при втория пациент от същата подгрупа подобно на контролите сперматозоидите с нормална морфология във фракцията с бавно подвижни гамети бе по-висока сравнено с необработената семенна течност, но по-ниска в сравнение с „бързата“ фракция.

В Таблица 5 са включени данни за типовете установени морфологични аномалии при сперматозоидите в нативната семенна течност и двете фракции.

Таблица 5: Морфологични дефекти, установени при сперматозоидите. Стойностите са представени осреднени \pm SD като процентно съотношение спрямо броя анализирани сперматозоиди с аномална морфология съответно в необработената семенна течност и в двете фракции.

	Сперматозоиди, %					
	Пациентска подгрупа В1			Контролна подгрупа В2		
	Нативна семенна т-т	„Бърза“ фракция	„Бавна“ фракция	Нативна семенна т-т	„Бърза“ фракция	„Бавна“ фракция
Размер на главичката:						
Уголемена главичка,%	13,9 \pm 0,2	11,7 \pm 7,7	16,0 \pm 9,1	18,4 \pm 8,4	7,5 \pm 1,8	14,3 \pm 7,8
Малка главичка,%	14,4 \pm 10,0	8,4 \pm 4,6	6,9 \pm 4,8	17,7 \pm 3,6	7,7 \pm 4,4	8,3 \pm 1,6
Форма на главичката:						
Кръгла,%	2,3 \pm 1,0	0,9 \pm 1,3	0,8 \pm 0,4	1,2 \pm 0,1	0	0
Игловидна,%	7,0 \pm 1,1	6,1 \pm 7,0	1,0 \pm 1,4	9,3 \pm 2,4	1,4 \pm 0,5	4,0 \pm 1,8
Конусовидна	26,6 \pm 0,5	16,8 \pm 0,5	18,0 \pm 1,4	13,6 \pm 4,6	2,5 \pm 1,4	6,4 \pm 2,8
Аморфна	51,8 \pm 0,8	38,4 \pm 11,2	41,6 \pm 7,8	60,0 \pm 17,5	39,2 \pm 12,8	44,1 \pm 13,4
Вакуолизирана	27,0 \pm 2,3	30,1 \pm 17,8	35,3 \pm 26,5	41,1 \pm 10,7	23,4 \pm 12,6	17,9 \pm 1,3
С малка акрозома	19,8 \pm 1,5	20,7 \pm 14,8	18,7 \pm 10,2	19,1 \pm 4,8	8,1 \pm 1,6	10,7 \pm 1,1
Двойна	0,8 \pm 0,3	0	0,3 \pm 0,4	0,3 \pm 0,4	0	0
Шийка:						
Тънка	8,0 \pm 1,2	0,5 \pm 0,7	0,8 \pm 1,1	1,7 \pm 1,7	0,8 \pm 1,1	0,3 \pm 0,4
Дебела	12,1 \pm 2,3	3,6 \pm 1,8	2,7 \pm 0,5	6,8 \pm 3,5	2,9 \pm 2,4	1,6 \pm 0,7
Асиметрично свързана	5,7 \pm 3,0	5,6 \pm 0,7	6,0 \pm 1,3	10,7 \pm 2,9	2,7 \pm 0,6	4,0 \pm 0,3
Пречупена	5,5 \pm 6,1	3,0 \pm 1,0	4,7 \pm 2,3	12,2 \pm 8,1	4,8 \pm 2,7	5,0 \pm 4,7
Опашка:						
Дълга	35,8 \pm 18,4	28,0 \pm 14,8	29,8 \pm 18,0	43,5 \pm 16,5	25,8 \pm 6,1	22,3 \pm 5,8
Къса	5,3 \pm 0,6	1,5 \pm 2,1	3,1 \pm 2,2	5,9 \pm 0,1	1,4 \pm 0,5	1,9 \pm 1,2
Пречупена	5,5 \pm 1,8	0,5 \pm 0,8	1,1 \pm 0,6	8,5 \pm 4,4	2,5 \pm 0,2	3,2 \pm 0,1
Извита	16,1 \pm 5,1	18,2 \pm 1,0	20,3 \pm 5,4	24,6 \pm 1,2	17,6 \pm 3,7	16,4 \pm 3,3
Двойна	3,1 \pm 4,4	0,3 \pm 0,4	0	1,2 \pm 1,6	0,5 \pm 0,7	0,5 \pm 0,7
Сперматозоиди с цитоплазмен остатък	5,1 \pm 4,6	1,2 \pm 0,8	3,9 \pm 2,6	7,3 \pm 0,4	1,1 \pm 0,1	2,1 \pm 0,7

При пациентската подгрупа В1 осредненото дялово разпределение на сперматозоидите с уголемени главички във фракцията с бавно подвижни сперматозоиди бе по-високо отколкото в необработената семенна течност, докато в „бързата“ фракция – малко по-ниско отколкото в нативния еякулат. След обработка концентрацията на гаметите с малък размер на главичката бе понижена и в двете фракции. При контролите сперматозоидите с уголемена и малка главичка в двете фракции бяха по-малко отколкото в необработената семенна течност, като концентрацията им в „бавната“ фракция бе по-висока отколкото в „бързата“ такава. И в двете подгрупи броят на гамети с дефекти във формата на главичката, шийката и опашката, както и такива с цитоплазмен остатък се понижи след плътностното градиентно центрофугиране. Само при някои морфологични дефекти в пациентската подгрупа В1 това не бе наблюдавано, а именно: сперматозоидите с извити опашки и вакуолизирани главички слабо повишиха концентрацията си в двете фракции след обработка, докато тези с асиметрично свързани шийки и малки акрозоми не се изменяха съществено. При сравнение на морфологичните дефекти на сперматозоидите в двете фракции, в пациентската подгрупа В1 ние наблюдавахме 1) понижена концентрация на сперматозоидите с

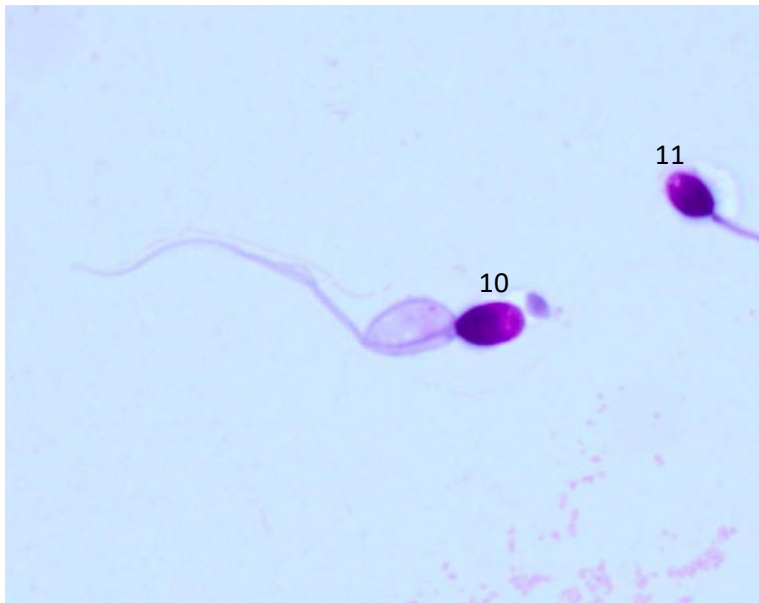
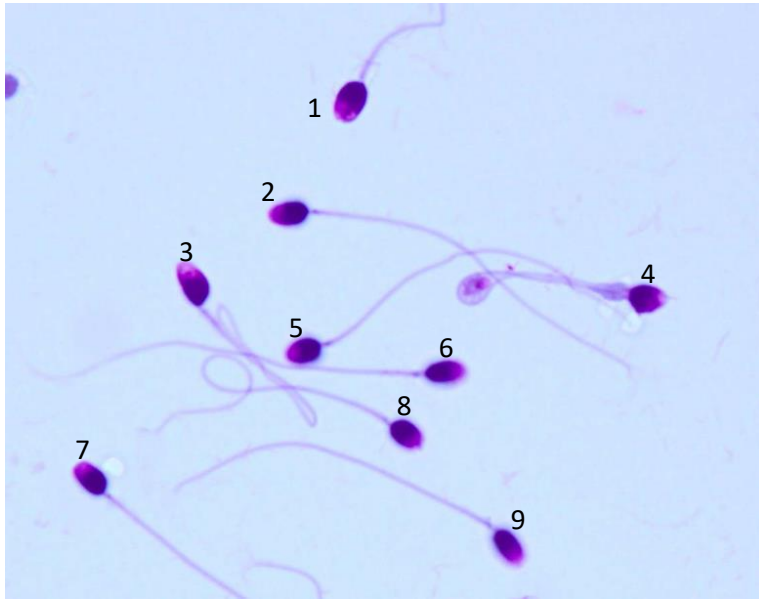
конусовидна, аморфна, вакуолизирана и двойна главичка, тънка и пречупена шийка, къса, пречупена и извита опашка и сперматозоиди с цитоплазмен остатък в „бързата“ фракция в сравнение в „бавната“; 2) повишена концентрация на гаметите с уголемена, малка, изгловидна глава, гамети с малка акрозома, дебела шийка и двойна опашка в „бързата“ фракция в сравнение в „бавната“; 3) приблизително еднаква концентрация на сперматозоидите с кръгла главичка, асиметрично свързана шийка и дълга опашка в „бързата“ фракция в сравнение в „бавната“. В контролната подгрупа В2 в „бързата“ фракция установихме 1) по-ниска концентрация на сперматозоиди с уголемена, игловидна, конусовидна, аморфна главичка, гамети с малка акрозома, асиметрично свързана шийка и цитоплазмен остатък; 2) по-виока концентрация на сперматозоиди с вакуолизирана главичка, тънка и дебела шийка и дълга опашка; 3) непроменена концентрация на сперматозоиди с малка, кръгла, двойна главичка, пречупена шийка, къса, пречупена, извита и двойна опашка в сравнение с „бавната“ фракция. В Таблица 6 е посочен броят на установените морфологични дефекти при главичката, шийката и опашката в двете подгрупи.

Таблица 6: Брой установени морфологични дефекти в главичка, шийка и опашка в подгрупи В1 и В2.

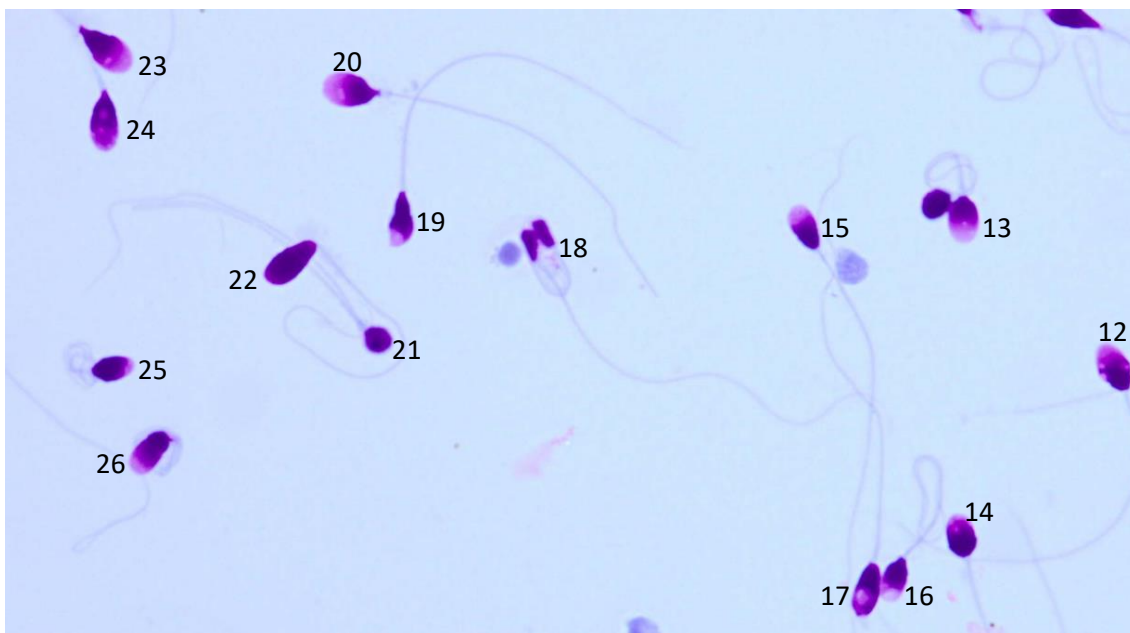
	Подгрупа В1			Подгрупа В2		
	Нативна семенна т-т	„Бърза“ фракция	„Бавна“ фракция	Нативна семенна т-т	„Бърза“ фракция	„Бавна“ фракция
Брой дефекти на главичката	666	506	556	562	275	348
Брой дефекти на шийката	117	55	56	108	30	37
Брой дефекти на опашката	248	179	197	288	159	166

Наблюдавахме значително понижаване в броя дефекти на шийката след обработка с плътностен градиент както в пациентската (В1), така и в контролната група (В2). Дефектите на опашката и главичката също бяха по-малко в двете фракции в сравнение с нативния еякулат в подгрупите В1 и В2. Не установихме съществени различия в броя дефекти на опашката и шийката между двете фракции както при пациенти, така и при контроли. Същевременно броят на сперматозоиди с главични дефекти и в двете подгрупи бе по-нисък в бързата фракция, изолирана от утайката на 80% градиентен слой в сравнение с бавната такава, изолирана от 60% слой след градиентното плътностно центрофугиране.

На Фиг. 10 е представен репрезентативен снимков материал от морфологичен анализ на пациенти от подгрупа В1. В таблицата, разположена до снимките на Фиг. 10, е въведена информация за морфологичния статус на някои от анализиранияте сперматозоиди, както и информация за видовете структурни дефекти, установени при част от гаметите с аномална морфология.



Сперма тозид №	Заклучение морфологичен анализ	Морфологични аномалии
1	нормален	няма
2	нормален	няма
3	анормален	аморфна главичка, пречупена опашка
4	анормален	аморфна главичка, цитоплазмен остатък, недоразвита опашка
5	анормален	малка акрозомата
6	нормален	няма
7	нормален	няма
8	нормален	няма
9	нормален	няма
10	анормален	цитоплазмен остатък, по-голям от 1/3 от размера на главата
11	анормален	малка акрозомата, вакуола в акрозомалната област
12	анормален	аморфна глава, множество вакуоли
13	анормален	извита опашка
14	анормален	малка аморфна вакуолизирана глава
15	анормален	конична форма на главата
16	анормален	вакуолизиран акрозомален регион
17	анормален	вакуолизиран акрозомален регион, конична форма на главата
18	анормален	недоразвита глава с аморфна форма, цитоплазмен остатък
19	анормален	аморфна форма на главата, вакуоли
20	анормален	уголемена глава, аморфна форма
21	анормален	малка кръгла глава, двойна опашка
22	анормален	уголемена аморфна глава, няма акрозомата, асиметрично свързана шийка
23	анормален	аморфна вакуолизирана глава
24	анормален	аморфна вакуолизирана глава
25	анормален	малка аморфна вакуолизирана глава, извита опашка
26	анормален	аморфна глава, малка акрозомата, дебела шийка

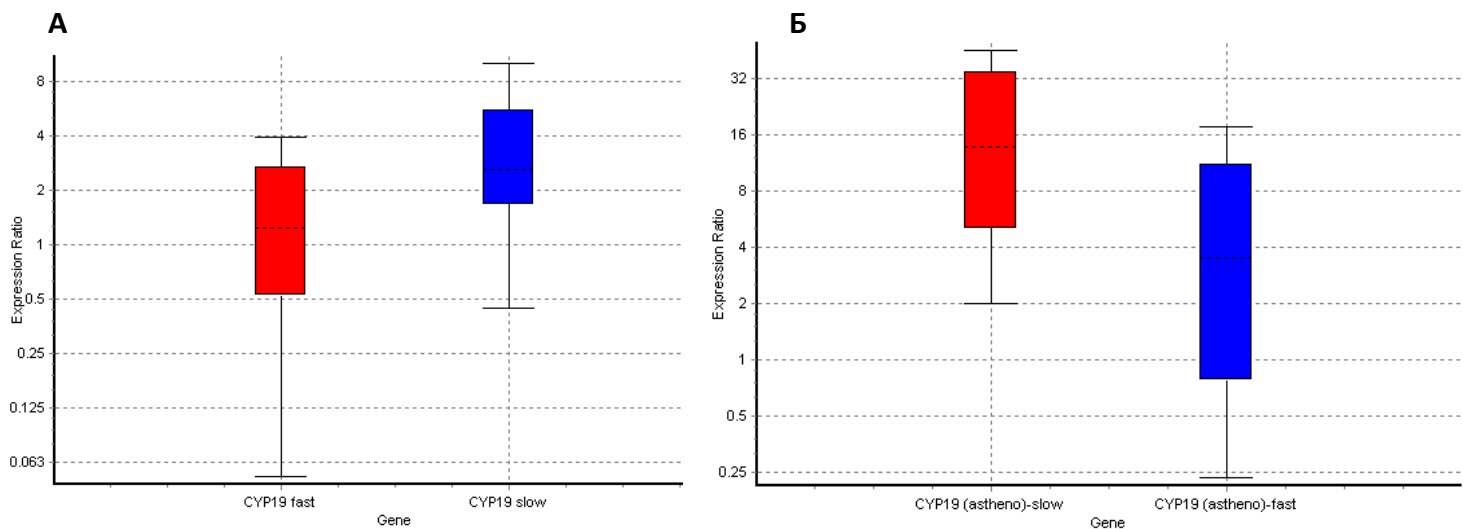


Фигура 10:Микроскопски препарат за изследване морфология на сперматозоиди, получен чрез оцветяване с Нетасолор кит (Мерк).Акрозомалният регион е оцветен в бледо розово,ядрото-в лилаво,а шийката и опашката-в бледо лилаво.

4. Сравнителен анализ на експресията на ароматаза в човешки сперматозоиди при инфертилни мъже

Една от задачите в настоящия дисертационен труд беше насочена към проучване ролята на ензима ароматаза по отношение мотилитета на сперматозоиди в норма и при нарушения в подвижността. За тази цел беше използвана методична постановка с пречистване на семенна течност в четиристепенен плътностен градиент и изолиране на тотална РНК от сперматозоиди от получените две фракции – „бърза“ и „бавна“ фракции. Беше проведен сравнителен експресионен анализ на нивата на гена за ароматаза *CYP19* в получените и характеризирани бързи и бавно подвижни сперматозоиди. В резултат на статистическата обработка на получените данни от real-time qPCR анализа се откриоиха следните по-важни резултати.

На Фиг. 11 е представено сравнение в генната експресия на ароматазния ген в пробите с бързи сперматозоиди спрямо пробите с бавни такива.



Фигура 11: Относително сравнение на генната експресия на ароматаза. А - сравнение на генната експресия на ароматаза във фракции от бързо подвижни и бавно подвижни сперматозоиди от пациентската група, независимо от диагнозата; Б - генната експресия на ароматаза в обогатени проби с бързи и бавни сперматозоиди от пациенти с астенозооспермия.

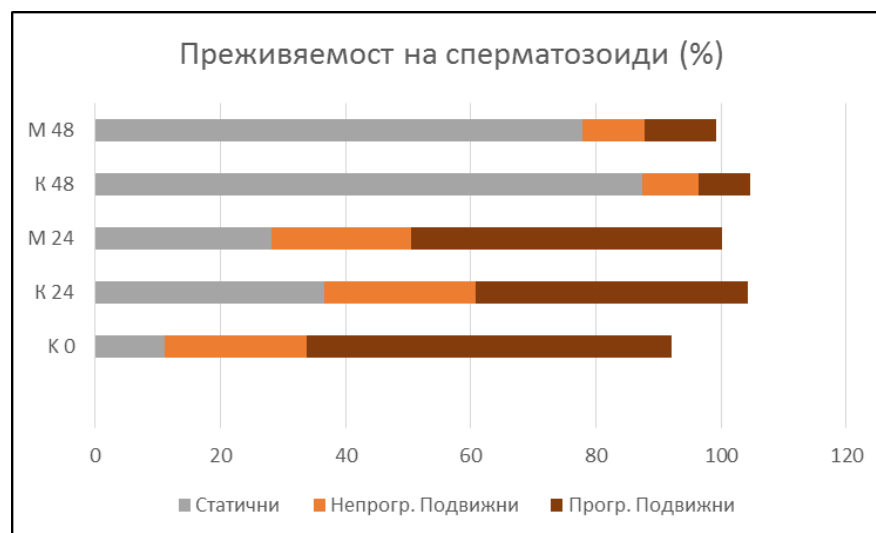
Наблюдавахме сигнификантно повишена експресия ($p < 0,05$) на гена за ароматаза в бавно подвижни сперматозоиди в сравнение с бързо подвижни гамети при всички изследвани инфертилни пациенти (Фиг. 11А). Същите резултати получихме и за астенозооспермичните мъже (Фиг. 11Б). Беше установено статистически достоверно по-високо ниво ($p < 0,01$) на експресия на *CYP19* в групата проби с бавни сперматозоиди, изолирани от инфертилни пациенти, спрямо контролната група. При сравнение на нивата на генната експресия на ароматазния ген в обогатени проби с бързи, съответно бавни сперматозоиди, изолирани от пациенти с астенозооспермия

спрямо контролната група бе установено, че в пробите с бавни сперматозоиди има статистически достоверно повишение ($p < 0,01$) на експресията на ароматазния ген спрямо тази, установена в пробите от контролната група.

5. Изследване влиянието на мелатонин ин-витро върху функционалните характеристики на сперматозоиди при мъже с нарушена подвижност и/или морфология на гаметите.

5.1. Ефект върху преживяемостта на сперматозоиди

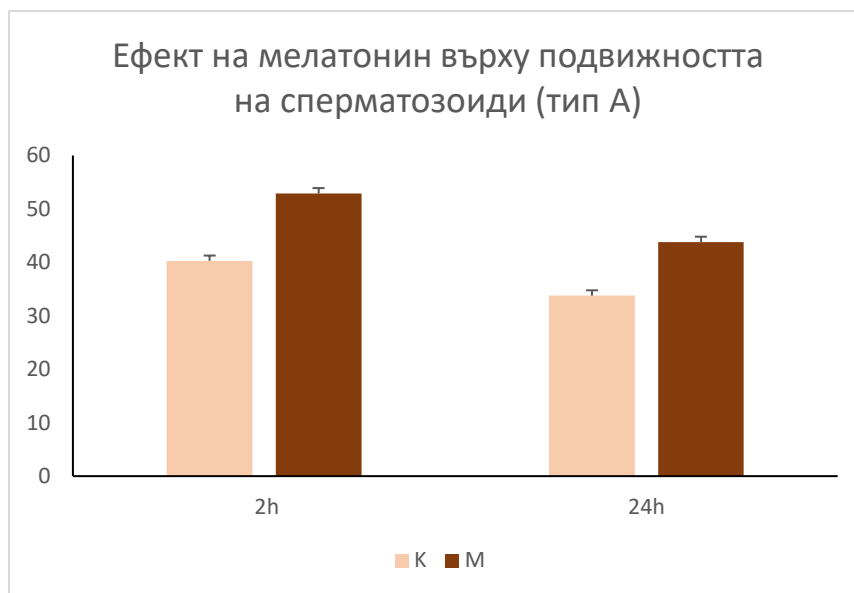
Провеждането на ин-витро анализи с повишаващи се дози мелатонин не позволиха да бъдат открити статистически значими разлики и дозо-зависим ефект по отношение на отделните характеристики. Концентрацията от 10 nM предизвикваше достоверно понижаване на фракцията на статични сперматозоиди при инкубация за 24 и 48 часа ($p < 0,05$), докато при прогресивно подвижните сперматозоиди се отчиташе достоверно повишение ($p < 0,05$) на относителното им съдържание само в пробите на 24 час от инкубацията (Фиг.12).



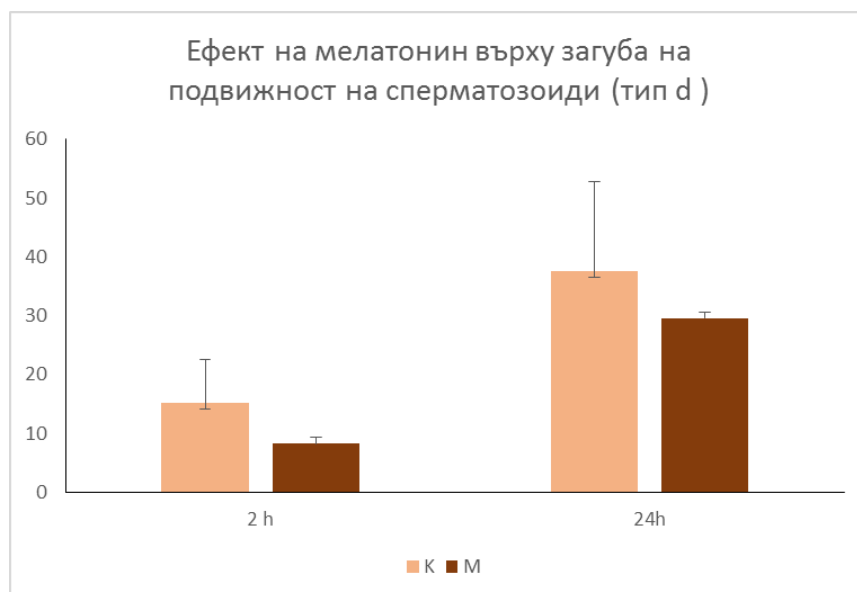
Фигура 12: Преживяемост на сперматозоиди в присъствие (М) или отсъствие (К) на мелатонин добавен ин-витро в концентрация 10 nM (неподвижни, прогресивно подвижни, непрогресивно подвижни за 24h, 48h).

5.2. Ефект на мелатонин ин-витро върху типа подвижност и скорост

След инкубация от 2ч. и 24ч. в присъствие на 10 nM мелатонин беше отчетен по-висок брой бързи прогресивно подвижни сперматозоиди (тип А) (Фиг.13), за сметка на достоверно намаляване броя на статичните сперматозоиди тип D (Фиг. 14). Ефектът е достоверно проявен и на 24 час от третирането с мелатонин, като разликата спрямо контролите е по-малка и в двата случая.



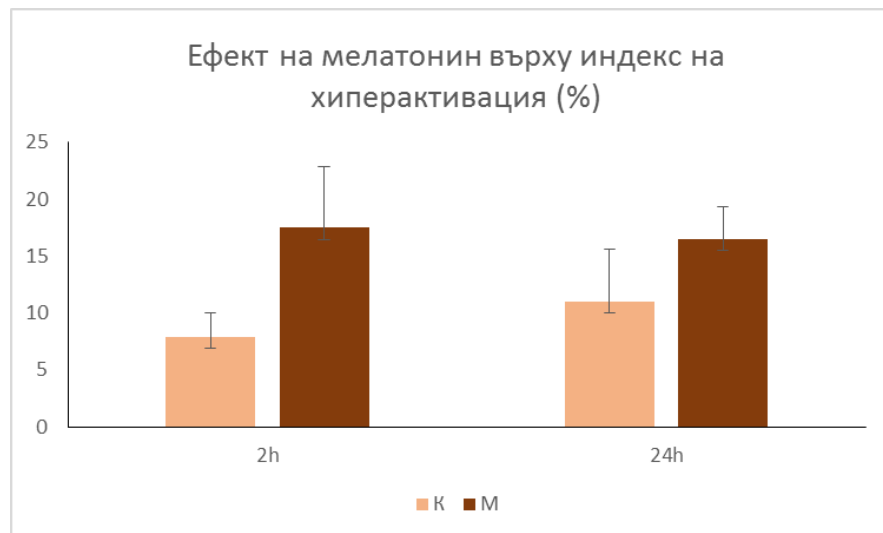
Фигура 13: Ефект на мелатонин върху бърза подвижност (тип А сперматозоиди) $p < 0,05$ за 2 и 24 ч. инкубация с мелатонин спрямо съответната контрола.



Фигура 14: Ефект на мелатонин върху загуба на подвижност на сперматозоиди (неподвижни, тип D).

5.3. Ефект върху хиперактивацията на сперматозоиди

Получените резултати посредством компютърен анализ на спермоанализатора ISAS демонстрираха ефект на 10 nM мелатонин добавен ин-витро върху общото ниво на капцитирани човешки сперматозоиди (Фиг. 15).

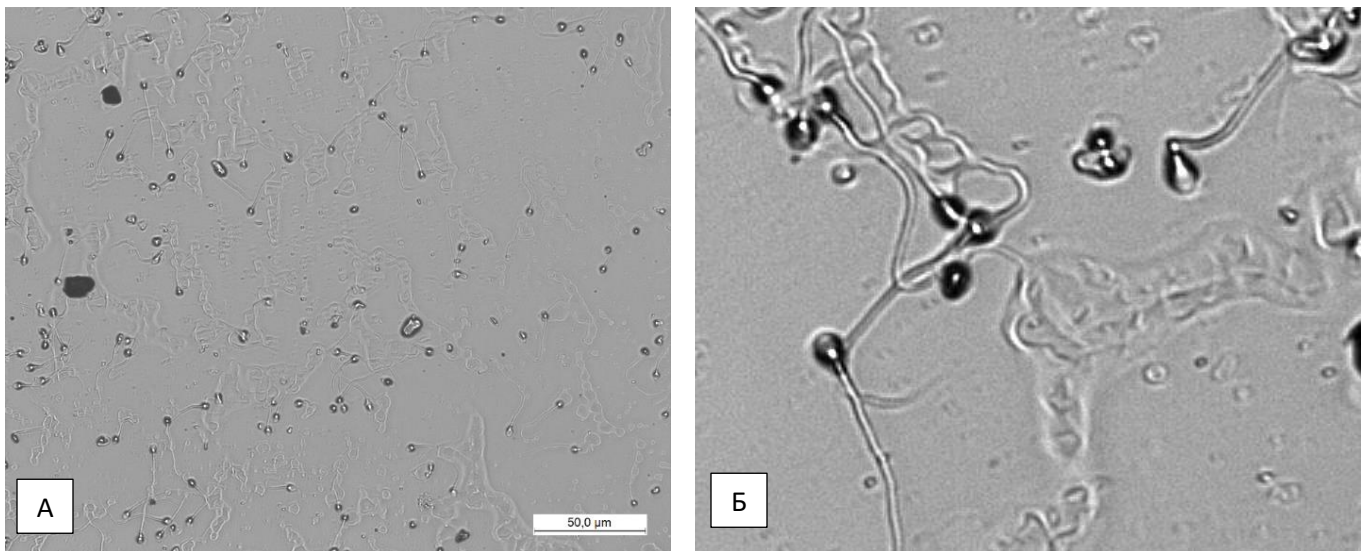


Фигура 15: Ефект на мелатонин върху хиперактивацията на сперматозоиди (Туре А, ALH > 2.5mm, STR > 85%; тип а, амплитуда на отместване на главичката > 2.5µm, насочено постъпателно движение)

Ефектът на мелатонин по отношение повишаването на индекса на хиперактивност спрямо контролите е достоверен за 2ч. инкубация ($p < 0,01$). При по-продължително третиране ефектът не е сигнификантен, независимо че е изразен при някои от пробите ($p > 0,05$). Индивидуалните различия в индекса също са с големи отклонения, на което се дължи липсата на статистическа достоверност.

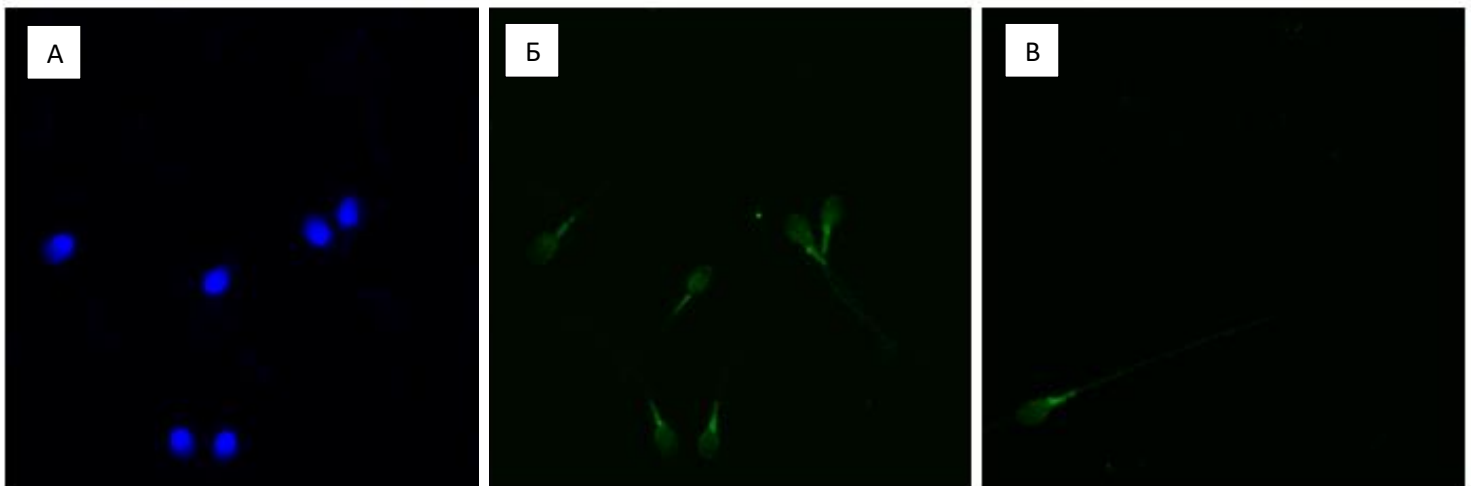
6. Експресия на рецептор за мелатонин в капацитирани сперматозоиди

Резултатите от имуноцитохимичните изследвания показаха специфична експресия на двата типа високо-афинитетен мембранен рецептор за мелатонин (MT1 и MT2) в човешки капацитирани сперматозоиди. Оцветяването, както индиректно с пероксидаза (Фиг.16), така и чрез имунофлуоресценция (Фиг.17) потвърди локализация на MT1 рецептора за мелатонин по повърхността на главичката и по дължината на опашката до терминалия сегмент, като експресията на рецептора MT1 е съсредоточена предимно в основата на опашката и свързващия сегмент на сперматозоидите – зони, изградени от микротубулен апарат и богати на митохондрии, ангажирани в дишането и двигателната функция на клетките.



Фигура 16: Имуноцитохимия чрез индиректно оцветяване с пероксидаза срещу рецептор за мелатонин (MT1) в капацитирани сперматозоиди: А-увеличение 10х, Б-увеличение 40х.

Чрез специфична имунофлуоресценция беше установена експресия на MT2 мембранен рецептор за мелатонин в капацитирани сперматозоиди. Наблюдението доказва разположение на рецептора по главичката и опашката на гаметите.

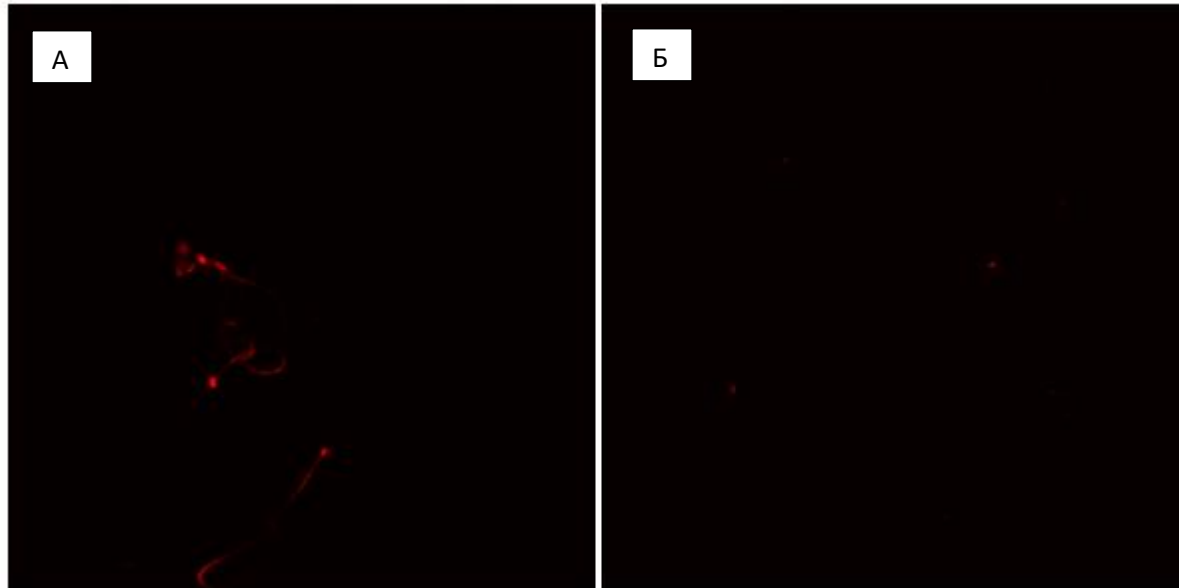


Фигура 17: Имунофлуоресцентно оцветяване на рецептори за мелатонин в капацитирани сперматозоиди: А – ядра на сперматозоиди, оцветени с DAPI; Б – сперматозоиди, инкубирани с анти-Mel 1A-R (за MT1 рецептор); В – сперматозоиди, инкубирани с анти-Mel 1B-R (увел. 63х) (за MT2 рецептор).

7. Оценка на ефекта на мелатонин върху експресията на α -тубулин в човешки капацитирани сперматозоиди

Характерна експресия на α -тубулин беше установена в изследваните препарати както от третирани, така и в нетретирани с мелатонин сперматозоиди (Фиг.18). Непосредствено след

изолиране от градиент тубулинът се наблюдава в областта на шийката, субекваториалната област, както и в опашката. 24 часа по-късно в присъствие на мелатонин сигналът намалява значително и остава съвсем дискретен само в основата на шийката, очевидно поради дегенерация на дисталната центриола и активното модифициране на микротубулния апарат по време на капацитацията.



Фигура 18: Имунофлуоресцентно оцветяване на алфа - тубулин в капацитирани човешки сперматозоиди: А – непосредствено след градиент; Б – 24 ч след обработка (увел. 63х).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Средно 15% от двойките в световен мащаб страдат от безплодие. Не са малко състоянията, за които все още липсва подходяща терапия. Тъй като обект на настоящата дисертационна работа са случаите на мъжки фактор, бе разгледана ролята на ароматаза и мелатонин в репродукцията при мъжа и влиянието им върху фертилизационния потенциал на сперматозоидите. Основно направление в съвременната асистирана репродукция при мъжа представлява изучаването на дисбаланса на ендокринни и паракринни регулатори, растежни фактори и ензими, влияещи на хомеостатичната среда, в която се развиват сперматозоидите. Необходимостта от задълбочени клинични изследвания върху причините за стерилитет при очевидно здрави мъже мотивира това изследване, което е насочено към установяването на конкретни зависимости между мелатонин, ароматазата и естрогените и ролята им за сперматогенезата и функциите на сперматозоидите.

Във връзка с това в настоящия дисертационен труд нашите изследвания бяха насочени към определяне влиянието на мелатонин върху функционални характеристики на човешки сперматозоиди в ин-витро условия, както и установяване на взаимовръзка между експресията на гена за ароматаза *CYP19* в мъжки полови клетки и техния мотилитет. В резултат на проведените изследвания установихме, че мелатонин в концентрация 10 nM, близка до установената в периферно кръвообращение при човека, повлиява положително преживяемостта, подвижността и хиперактивацията при сперматозоидите. Нашите резултати показват достоверно по-висок брой прогресивно подвижни сперматозоиди след инкубация за 24ч. с 10 nM мелатонин отколкото в нетретираните проби. В допълнение концентрацията на най-бързо подвижните сперматозоиди (тип А) е повишена в инкубираните за 2ч. и 24ч. с 10 nM мелатонин проби в сравнение с контролите. Установихме също, че инкубация за 2ч. с мелатонин в цитираната концентрация стимулира хиперактивацията на тип А гаметите.

Въз основа на тези резултати и базирайки се на факта, че основната си биологична роля мелатонинът изпълнява посредством взаимодействие със специфичните мембранни мелатонинови рецептори MT1 и MT2, то фокусирахме част от нашите изследвания и върху установяване локализацията на тези рецептори при сперматозоидите. В предишни изследвания на колектива е документирана експресия на високоафинитетен мембранен рецептор за мелатонин MT1 върху човешки сперматозоиди. Получените резултати от анализа на проби семенна течност установяват по-високи нива на естрадиол при пациенти с идиопатичен инфертилитет, както и достоверно по-нисък индекс тестостерон/естрадиол, корелиращи с експресията на цитохром P450 ароматаза. Установена е обратна корелация между експресията на цитохром P450 ароматаза и рецептора за мелатонин в двете изследвани групи мъже.

В настоящата експериментална работа ние потвърдихме наличието на мембранен мелатонинов рецептор MT1 при човешки сперматозоиди, който се разполага предимно върху шийката и по цялата дължина на опашката. В допълнение определихме и присъствието на MT2 мембранный рецептор за мелатонин, който се локализира по повърхността на спермалната главичка и опашката.

Изследвахме и влиянието на мелатонин върху експресията на α - тубулин при сперматозоиди – основен компонент, изграждащ цитоскелета, както и микротубулите на аксонемата на спермалната опашка. Наблюдавахме непосредствено след обработка на семенната течност чрез плътностно градиентно центрофугиране, добре изразен сигнал, показващ присъствието на α – тубулин по цялата дължина на опашката. След 24 ч. в присъствие на мелатонин установихме сигнал само в областта на шийката.

Друг обект на нашите изследвания бе и експресията на гена за ароматаза *CYP19* в зрели човешки сперматозоиди. За целта анализирахме ароматазни транскрипти в бързи и бавно подвижни сперматозоиди, изолирани от астенозооспермични мъже и контроли с доказана фертилност. Резултатите от представеното изследване установяват различия в експресията на гена за ароматаза между бавно и бързо подвижни сперматозоиди от астенозооспермични мъже, като експресията на *CYP19* в бавно подвижни сперматозоиди е по-висока в сравнение с бързо подвижните гамети. Също така експресията на гена за ароматаза в бавни сперматозоиди, изолирани от астенозооспермични пациенти е в по-високи нива в сравнение с контролни семенни проби от пациенти с доказан фертилитет.

В заключение считаме, че така представените данни в настоящия дисертационен труд са добра основа за последващи изследвания на ролята на мелатонина и естрогенния метаболизъм в осъществяване функцията на сперматозоидите, а именно трансфер на мъжкия геном, оплождане и развитие на ембриона. Получените резултати за експресията и отношението на мелатонин и ензима ароматаза за функцията на сперматозоидите са оригинални и предоставят молекулна основа за разработване на допълнителни клинични тестове при диагностициране на мъжкия идиопатичен стерилитет.

ИЗВОДИ

1. Установена е висока положителна корелация между процентното съотношение на бързо подвижни сперматозоиди и кинетичните параметри VCL, VSL и VAP;
2. Мелатонин в концентрация 10 nM добавен ин-витро по време на капацицията на сперматозоиди в IVF хранителна среда достоверно повишава редица функционални параметри – преживяемост, скорост и прогресивна подвижност, хиперактивация. Ефектите са с по-висока статистическа достоверност при инкубация за два часа;
3. Високо афинитетни мембранни рецептори за мелатонин тип MT1 и тип MT2 се експресират върху пречистени фракции от човешки сперматозоиди в процеса на капацицията с различно разпределение;
4. Специфичната експресия на рецептор MT1 се локализира предимно в основата на шийката и междинната област до терминалния сегмент при човешките сперматозоиди. Експресията на MT2 се наблюдава както в зоната на главичката така и по протежение на цялата опашка;
5. Алфа – тубулин се визуализира с характерна локализация при капацитирани човешки сперматозоиди. 24 часа след инкубация в присъствие на мелатонин сигналът се наблюдава само в основата на шийката на мястото на проксималната центриола;
6. Фракциите от бавни сперматозоиди изолирани от пациенти с астенозооспермия съдържат достоверно по-високо ниво на експресия на *CYP19* гена за ароматаза спрямо контролни от пациенти с доказан фертилитет. Нивата на експресия в бавно подвижни сперматозоиди са по-високи в сравнение с бързо подвижните гамети при мъже с астенозооспермия.

ПРИНОСИ

Оригинални приноси:

- Мелатонин добавен ин-витро по време на капацитацията на сперматозоиди в IVF хранителна среда повлиява положително функционални параметри – преживяемост, скорост, прогресивна подвижност и хиперактивация на човешки сперматозоиди;
- Мембранен рецептор за мелатонин тип MT2 е установен чрез имунофлуоресценция в човешки сперматозоиди в зоната на главичката и по протежение на цялата опашка;
- Генната експресия на *CYP19* ген за P450 ароматаза е достоверно по-висока във фракцията на бавно подвижни сперматозоиди при астенозооспермични мъже;

Приноси с потвърдителен характер:

- Генът за ароматаза *CYP19* се експресира в човешки сперматозоиди;
- Мембранен рецептор тип MT1 се експресира с характерна локализация в капацитирани сперматозоиди.

Публикации, свързани с темата на дисертационния труд:

- **М.Попова**, Г.Георгиев, Г.Николов, Р.Конакчиева, Сравнително изследване на експресия на CYP19 гена за ароматаза в бързо и бавно подвижни човешки сперматозоиди, *сп.Science and technologies* (2017), Volume VII, (2): 162-169;
- **М. Попова**, Р. Конакчиева, Спермален транскриптом и приложението му като биомаркер за определяне на репродуктивния потенциал при мъжа, *сп.Репродуктивно здраве* (2017), 25: 3-8.

Други публикации:

- **М.Стоянова**, Д.Гуленова, Г.Николов, Компютърно-асистиран спермален анализ (CASA) – предимства и недостатъци, *сп. Ембриология*, 2008,3(1):4-9.
- Д.Гуленова, Д.Дачева, В.Пенчев, **М.Попова**, Г. Николов, Ключови постижения и перспективи на технологиите със стволови клетки в контекста на регенеративната медицина, *сп. Ембриология*, 2011, 6(1):26-35.

Представяне на резултати по темата на дисертационния труд на научни конференции:

- **Попова, М.**, Конакчиева, Р.,Сравнително изследване на експресия на CYP19 гена за ароматаза в бързо и бавно подвижни човешки сперматозоиди“, XXVII МЕЖДУНАРОДНА НАУЧНА КОНФЕРЕНЦИЯ, посветена на 65 ГОДИНИ "МИНИ МАРИЦА ИЗТОК" 1-2 юни 2017 год, Съюз на учените Стара Загора – постер и доклад

Участия в научни семинари и конгреси в периода на докторантурата:

- Rizov M.1, Gulenova D.2, Penchev V.2, **Popova M.2**, Antonova I.2, Necheva V.1, Nikolov G.2, Mutations in FV and FII genes as a prerequisite for miscarriages and assisted reproduction cycle failures, Конгрес по цитология, хистология и анатомия, Медицинска Академия, гр. София , 01-02 юни 2013: – постер;
- Penchev VM, **Popova MN**, Rizov MC, Antonova IA, Gulenova DM, Nikolov GI: Does the concentration of mtDNA in a single blastomere affect the cleavage rate of the human embryo? 13th International Conference on Preimplantation Genetics. April 29th-May 2nd 2014, Canterbury, UK: – oral presentation;
- Penchev VM, **Popova MN**, Rizov MC, Antonova IA, Gulenova DM, Nikolov GI “ Application of microarray preimplantation genetic screening in donor oocyte program: a case report” 14th International Conference on Preimplantation Genetics. May 11-13, 2015, Chicago, USA – poster;
- 16th International Conference on Preimplantation Genetics. March 26-29 2017, Valencia, Spain: Marinova EM , Rizov MC , **Popova MN**, Tsaneva DA, Antonova IA, Nikolov Gi , Penchev VM: Implementation of the next generation sequencing based preimplantation genetic screening in the clinical practice: challenge and benefit - poster.

БЛАГОДАРНОСТИ

Бих искала да изразя своята искрена благодарност и признателност на проф. Росица Конакчиева за това, че сподели своя професионален опит с мен, за нейните ценни напътствия и съдействие при провеждане на настоящите изследвания и изготвянето на дисертационния труд, и огромната морална подкрепа, която ми оказа.

Благодаря на д-р Георги Николов, управител на МЦ“РепроБиоМед“ и екипът от ембриолози на Медицинския център, без чиято помощ и всеотдайност този труд нямаше да е реалност. Благодаря на всички научни работници в ИБИР-БАН, които без колебание ми оказваха съдействие в процеса на експерименталната ми работа и ми показаха, че в тяхно лице всеки отдаден изследовател ще намери съвет и подкрепа.

Не на последно място бих искала да изкажа безкрайната си благодарност на моето семейство за тяхното търпение, вярата им в мен и за това, че бяха и продължават да бъдат неотменна моя опора.