

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – ПЛЕВЕН

Факултет „Медицина“

Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология“

Данаил Ивайлов Мартинов

Оксидативен стрес в диагностиката на мъжкия инфертилитет

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен „доктор“ по научната специалност „Медицинска биология“ (4.3)

Научен ръководител:

Доц. Милена Атанасова, д.и.

Официални рецензенти:

Проф. Албена Владимирова Александрова д.м.н.

Проф. Радостина Ивайлова Александрова, д.б.

Плевен, 2021 год.

Дисертационният труд съдържа 167 страници и е структуриран в следните раздели: Въведение, Литературен обзор, Цел и задачи, Материали и методи, Резултати от собствени проучвания и дискусия, Обобщени изводи, Заключение и Приноси. Илюстриран е с 47 таблици и 33 фигури. Библиографската справка включва 162 източника на латиница.

Включените в дисертационния труд изследвания са извършени в:

Медицински център „Клиничен институт по репродуктивна медицина” – Плевен

Лаборатория “Свободно радикални процеси“ към института по невробиология – БАН - София

Сектор „Биология” на Медицински университет – Плевен

Работата по дисертационния труд е финансирана частично от научно-изследователски проекти на Медицински университет - Плевен:

Проект №D1/2016 год.: Оксидативен стрес в диагностиката на мъжкия инфертилитет

Проект №D3/2017 год.: Биомаркери в семенния анализ – оксидативен стрес и микро-РНК в диагностиката на мъжкия инфертилитет

Дисертационният труд е обсъден и насочен за защита от разширен катедрен съвет на катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология” Медицински университет – Плевен, проведен на 11.02.2021 год. Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 08.06.2021 год. от 11:00 в зала „Амброаз Паре” на Медицински университет – Плевен.

Материалите по защитата на дисертационния труд са публикувани на страницата на Медицински университет – Плевен (<http://www.mu-pleven.bg>)

СЪДЪРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| I. ВЪВЕДЕНИЕ | 4 |
| II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ | 5 |
| III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ | 6 |
| IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ..... | 6 |
| 1. Обединени резултати от спермален анализ и SDI-тест за фертилни мъже и такива с идиопатичен и неизяснен инфертилитет | 6 |
| 1.1. Статистически разлики за пациентите, разделени в 2 групи – фертилни и инфертилни | 7 |
| 1.2. Статистически анализ на пациентите, разделени в три групи – фертилни с данни за нормозооспермия, мъже с неизяснен инфертилитет с данни за нормозооспермия и мъже с идиопатичен инфертилитет с данни за тератозооспермия | 12 |
| 1.3. Дискусия на обединените резултати от спермален анализ и SDI- тест за фертилни мъже и инфертилни (идиопатичен и неизяснен инфертилитет)..... | 21 |
| 2. Резултати от измерване на тотален антиоксидантен капацитет (TAC)..... | 24 |
| 2.1. Статистически анализ за пациентите разделени в две групи – фертилни и инфертилни..... | 25 |
| 2.2. Дискусия на резултатите от измерване на тотален антиоксидантен капацитет (TAC)..... | 33 |
| 3. Резултати от измерване на интрацелуларните нива на водороден пероксид (H_2O_2) и супероксиден анион ($O_2^{\bullet-}$)..... | 34 |
| 3.1. Дискусия на резултатите от измерването на интрацелуларните нива на водороден пероксид (H_2O_2) и супероксиден анион ($O_2^{\bullet-}$) чрез флоуцитометричен анализ..... | 43 |
| 4. Резултати от влиянието на криоконсервацията и обработката на сперматозиди върху DFI при мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилите. Нива на малондиалдехид. Нива на екстра и интрацелуларни антиоксиданти – каталаза, глутатион и глутатион пероксидаза. | 45 |
| 4.1. Резултати от SDI тест и концентрация на сперматозоидите преди и след обработка | 50 |
| 4.2. Дискусия на резултатите от влияние на криоконсервацията и обработката на сперматозиди върху DFI. Екстра и интрацелуларни нива на антиоксиданти. | 55 |
| V. ОБОБЩЕНИ ИЗВОДИ | 57 |
| VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 58 |
| VII. ПРИНОСИ..... | 59 |
| VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ | 60 |

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Инфертилитетът е състояние, при което една сексуално активна двойка не може да постигне бременност при редовни и непротектирани полови контакти в рамките на 12 месеца – при жени под 35 год. и след 6 месеца – при жени над 35 год. Според Световната здравна организация (СЗО) средно 1 от 6 двойки е пряко засегната, като тази честота се увеличава с напредване на възрастта (*Boivin et al., 2009*).

Състоянието на инфертилитет при човека през последните години се превърна в световен медицински и социален проблем. Механизмите, чрез които различни физиологични, генетични и епигенетични фактори влияят върху оплодителната способност на мъжа, все още не са напълно разгадани. Очаква се напредъкът в научните изследвания по отношение на мъжкия репродуктивен потенциал да дадат яснота за някои от най-често спряганите причини.

Според American Society for Reproductive Medicine (ASRM, 2012), обезпокоителен е фактът, че след обстойна медицинска анамнеза и лабораторна диагностика, причината за инфертилитет в петдесет процента от случаите може да не бъде установена.

Последните проучвания сочат, че мъжкят инфертилитет е допринасящ фактор в повече от половината случаи на инфертилни двойки по света (*Kumar & Singh, 2018*), като той се подразделя на идиопатичен и неизяснен, въз основа на анаместични данни, обективно състояние, спермален анализ и изследвания.

Една от най-често асоциираните причини за патологични изменения на сперматогенезата, е нарушеният баланс между генерирането на реактивни форми на кислород (РФК) и антиоксидантния капацитет (*Halliwell, 2012*). Нарушаването на баланса между прооксидантните и антиоксидантните процеси в полза на прооксидантните, води до потенциални клетъчни нарушения и се означава като оксидативен стрес (ОС).

Нарушеният баланс между нивата на РФК и антиоксидантния капацитет водят до нарушаване на клетъчния редокс-потенциал, което оказва неблагоприятен ефект върху микро- и макромолекулите, включително въглехидратни компоненти, липиди, протеини и нуклеинови киселини (*Ashok Agarwal et al., 2003*), като проучванията показват, че повишени нива на РФК се откриват при 25%-40% от инфертилните мъже (*Deepinder et al., 2008*).

Лечението на инфертилни мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилитет се осъществява чрез приемането на антиоксиданти за минимум три месеца, а липсата на подобрене след проведена терапия налага включването им в процедури по асистирана репродукция.

Въпреки напредъка в репродуктивната биология и медицина, ефективността на асистираните репродуктивни техники (АРТ), остава сравнително ниска.

Съществуват редица доказателства в подкрепа на негативното влияние на ОС върху ДНК-фрагментацията на сперматозоидите, намалената прогресивна подвижност, влошената морфология и ембрионалното развитие, но тези доказателства все още остават противоречиви за клиничната практика.

Настоящото проучване е провокирано от липсата на консенсус по отношение на ролята на ОС върху мъжкия фертилитет. За тази цел изследваме някои екстарцелуларни и интрацелуларни маркери на оксидативния стрес и влиянието на фактори като центрофугиране, размразяване и замразяване на сперматозоиди върху качеството на спермалния хроматин и спермалните показатели при мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилитет. Получените резултати биха послужили за основа при изготвянето на стратегии и алгоритми на работа в диагностиката, лечението и методите на обработка на сперматозоидите за целите на асистираната репродукция при мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилитет.

Ефективното противопоставяне на ОС с подходящите антиоксиданти и правилната му оценка, може би ще повиши шансът за постигане на бременност по естествен път или чрез ин витро процедура.

II. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата работа е да изследваме екстарцелуларни и интрацелуларни маркери на оксидативния стрес и влиянието на факторите – центрофугиране, размразяване и замразяване на сперматозоиди, които се асоциират с повишен оксидативен стрес, във връзка с качеството на спермалния хроматин и спермалните показатели, при мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилитет. Получените резултати биха послужили за основа при изготвянето на стратегии и алгоритми на работа в диагностиката и лечението на инфертилитетните мъже, както и при методите на обработка на сперматозоидите за целите на асистираната репродукция.

Задачи:

1. Да се подбере представителна извадка на фертилни мъже и мъже с неизяснен и идиопатичен инфертилитет чрез снемане на репродуктивна анамнеза и извършване на конвенционален семенен анализ.
2. Да се определи DFI на сперматозоидите чрез SDI-тест.
3. Да измерим нивата на тоталния антиоксидантен капацитет (ТАС) в семинални плазми от фертилни мъже и мъже с неизяснен и идиопатичен инфертилитет в търсене на връзки между нивата на ТАС, спермалните параметри и DFI.
4. Да измерим концентрацията на малондиалдехид (МДА) в сперматозоиди и в семинална плазма като маркер за оксидативен стрес, както и евентуалната му асоциация с показателите от рутинния семенен анализ и SDI теста при мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилитет.
5. Да измерим концентрацията на антиоксиданта глутатион в сперматозоиди и в семинална плазма, както и евентуалната му асоциация с показателите от рутинния семенен анализ и SDI теста при мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилитет.
6. Да оценим активността на антиоксидантните ензими глутатионпероксидаза и каталаза в сперматозоиди и в семинална плазма, както и евентуалната им асоциация с показателите от рутинния семенен анализ и SDI теста при мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилитет.

7. Да измерим вътреклетъчните нива на водороден пероксид и супероксиден анион в свежи сперматозоиди, обработени чрез swim up при фертилни и мъже с идиопатичен инфертилитет.
8. Да изследваме влиянието на обработката на сперматозоиди (центрифугиране, замразяване и размразяване) върху DFI в проби от фертилни мъже и мъже с неизяснен и идиопатичен инфертилитет.

III. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Събиране на семенни проби и подготовка за анализ

Оценка интегритета на спермалната ДНК чрез SDI-тест.

Обработка на сперматозоиди чрез Direct Swim up техника.

Замразяване и размразяване на сперматозоиди.

Измерване на глутатион (GSH) и глутатион пероксидаза (GPx) в сперматозоиди и семенна плазма с ензимни методи.

Измерване на малондиалдеhid по метода с тиобарбитурова киселина.

Измерване на каталазна активност с ензимен метод.

Флуоцитометрично определяна на вътреклетъчните нива на H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$.

Оценка на тоталния антиоксидантен капацитет (TAC) или обща антиоксидантна активност по метода на инхибиране на реакция с тиобарбитурова киселина.

IV. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

1. Обединени резултати от спермален анализ и SDI-тест за фертилни мъже и такива с идиопатичен и неизяснен инфертилитет

Статистически анализ на получените резултати за нормалност на разпределението Според теста на Shapiro-Wilk равномерно разпределени са само данните за възраст и тератозооспермален индекс (TZI), т.е тези с $p > 0,05$ (таблица 1).

Таблица 1. Тест на Shapiro-Wilk за разпределение на данните от изследваните показатели. В червено са отбелязани показателите с $p < 0,05$, т.е тези с неравномерно разпределение.

| | Statistic (W) | Df (степени на свобода) | Sig. (P) |
|-------------------------------|---------------|-------------------------|----------|
| Възраст (години) | ,986 | 128 | ,192 |
| Въздържание (дни) | ,841 | 128 | ,000 |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | ,979 | 128 | ,041 |
| Концентрация (mill/mL) | ,829 | 128 | ,000 |

| | | | |
|-------------------------|------|-----|------|
| Нормална морфология (%) | ,923 | 128 | ,000 |
| TZI | ,992 | 128 | ,663 |
| DFI (%) | ,870 | 128 | ,000 |
| HDFI (%) | ,899 | 128 | ,000 |
| HDS (%) | ,947 | 128 | ,000 |

1.1. Статистически разлики за пациентите, разделени в 2 групи – фертилни и инфертилни

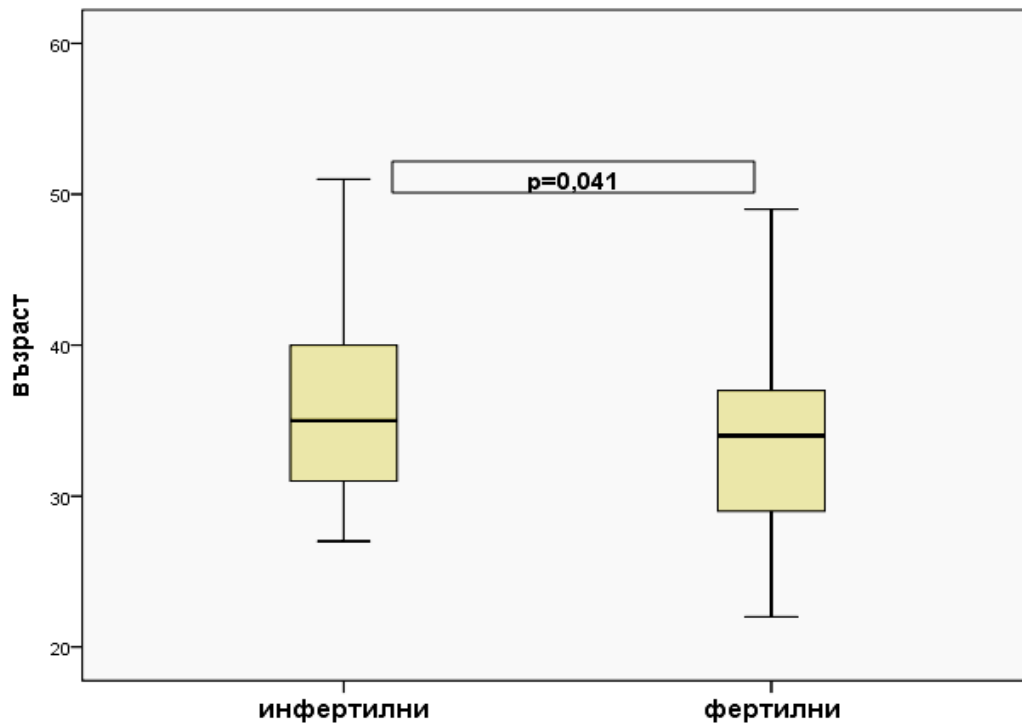
Таблица 2. Групова статистика на показателите с равномерно разпределени данни

| | | Брой изследвани проби | Средна стойност | Стандартно отклонение | Стандартна грешка |
|------------------|------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|
| Възраст (години) | Инфертилни | 81 | 35,9 | 5,6 | ,625 |
| | Фертилни | 49 | 33,7 | 6,3 | ,894 |
| TZI | Инфертилни | 81 | 1,4 | ,11 | ,01238 |
| | Фертилни | 49 | 1,3 | ,12 | ,01799 |

Таблица 3. Сравняване на равномерно разпределените данни и отчетени разлики с t-критерия на Стюдънт

| Levene's Test for Equality of Variances | | | t-test for Equality of Means | | | | | | |
|---|-------|------|------------------------------|-----|-----------------|-----------------|-----------------------|---|--------|
| | F | Sig. | t | df | Sig. (2-tailed) | Mean Difference | Std. Error Difference | 95% Confidence Interval of the Difference | |
| | | | | | | | | Lower | Upper |
| Възраст (години) | ,644 | ,424 | 2,066 | 128 | ,041 | 2,195 | 1,063 | ,093 | 4,298 |
| TZI | 1,537 | ,217 | 3,254 | 128 | ,001 | ,06893 | ,02118 | ,02702 | ,11085 |

От теста на Levene става ясно, че вариантите за възраст и TZI в изследваните групи са еквивалентни. Двете изследвани групи се различават по възраст ($t(130)=2,066$ $p=0,041$) и по TZI ($t(130)=3,254$ $p=0,001$) като инфертилните са с по-висока средна възраст ($35,9 \pm 5,6$) спрямо фертилните ($33,7 \pm 6,3$) и с по-висок TZI ($1,4 \pm 0,11$ спрямо $1,3 \pm 0,12$).



Фигура 1. Бокс-плот диаграма за възрастта на изследваните групи.

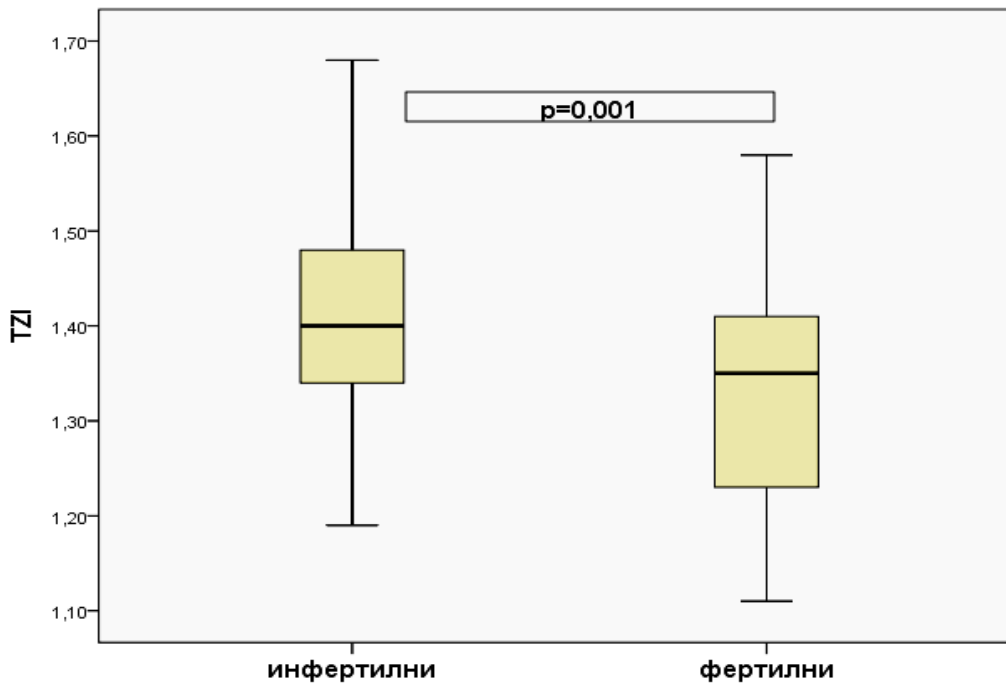
За да се оцени силата на асоциация между инфертилитета и възрастта, т.е. дали възрастта е причина за безплодието в групата на инфертилните, беше изчислен показател ета (η) за размер на ефекта. Както се вижда от **таблица 4**, влиянието на възрастта върху инфертилитета в конкретната извадка е в границите на незначителното ($\eta=0,476$). Следователно статистически значимата разлика между възрастта на изследваните мъже не би трябвало да е причина за инфертилитет.

Таблица 4. Размер на ефекта на възрастта върху фертилността

| Directional Measures | | | Value |
|----------------------|-----|---------------------|-------|
| Nominal by Interval | Eta | Age Dependent | ,180 |
| | | Fertility Dependent | ,476 |

Таблица 5. Размер на ефекта на TZI върху фертилността

| Directional Measures | | | Value |
|----------------------|-----|------------------------|-------|
| Nominal by Interval | Eta | TZI зависимост | ,276 |
| | | Фертилноост зависимост | ,686 |



Фигура 2. Бокс-плот диаграми за TZI на изследваните групи

За да се оцени силата на асоциация между TZI и инфертилитета беше изчислен отново показателят ета (η) за размер на ефекта. Влиянието на TZI върху инфертилитета в конкретната извадка е средно ($\eta=0,686$) (**Таблица 5**). Следователно статистически значимата разлика при TZI на изследваните мъже е причина (или една от причините) за инфертилитета.

Статистика на неравномерно разпределените данни

От нашите резултати е видно, че значими разлики се откриват за:

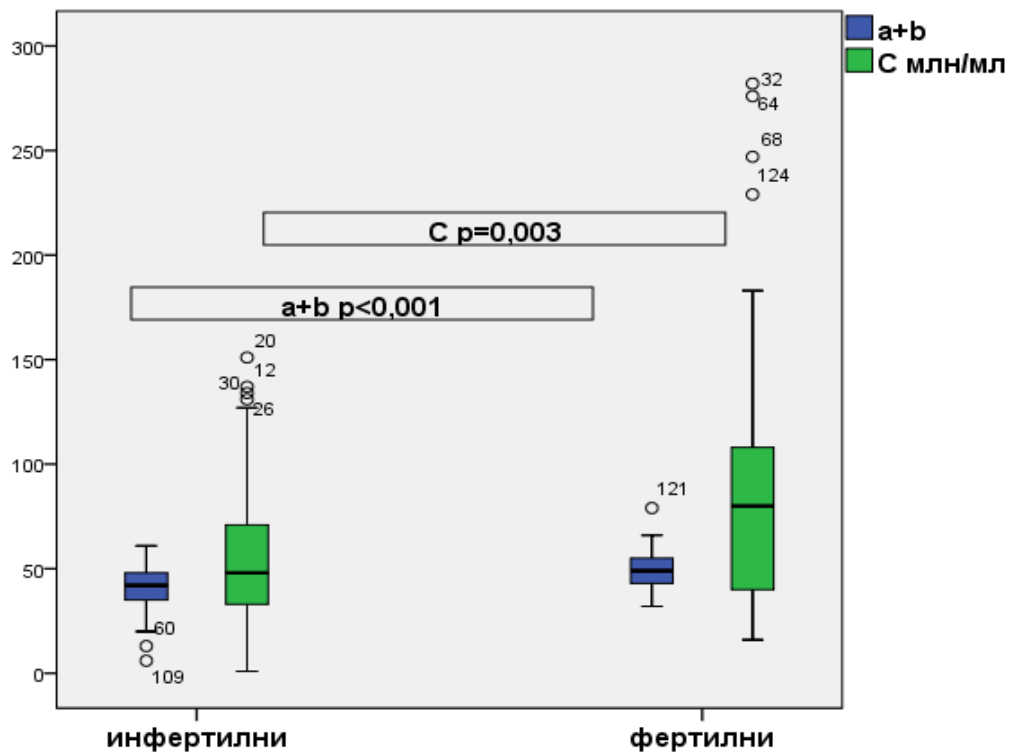
- 1) прогресивно подвижните сперматозоиди ($a+b\%$), като подвижността е по-висока (медиана 49%) при фертилните отколкото при инфертилните (42%), $U=1118$, $p=0,000$ (**табл. 6 и 7, фиг.3**).
- 2) концентрацията на сперматозоидите е по-висока (мед. 80 млн. мл) при фертилните отколкото при инфертилните (мед. 48 млн. /мл) $U=1369,5$; $p=0,003$ (**табл. 6 и 7, фиг.3**).
- 3) процентът на сперматозоидите с нормална морфологията е по-висок (мед. 5%) при фертилните отколкото при инфертилните (2%), $U=680$, $p=0,000$ (**табл. 6 и 7, фиг.4**)
- 4) DFI е по-висок (мед. 12,7%) при инфертилните отколкото при фертилните (7,94%), $U=1017$, $p=0,000$ (**табл. 6 и 7, фиг. 5**).
- 5) HDS е по-висок (мед. 6,62%) при инфертилните отколкото при фертилните (4,23%), $U=1416$, $p=0,006$ (**табл. 6 и 7, фиг. 5**).

Таблица 6. Тест на Mann-Whitney за данни, отклоняващи се от нормалното разпределение

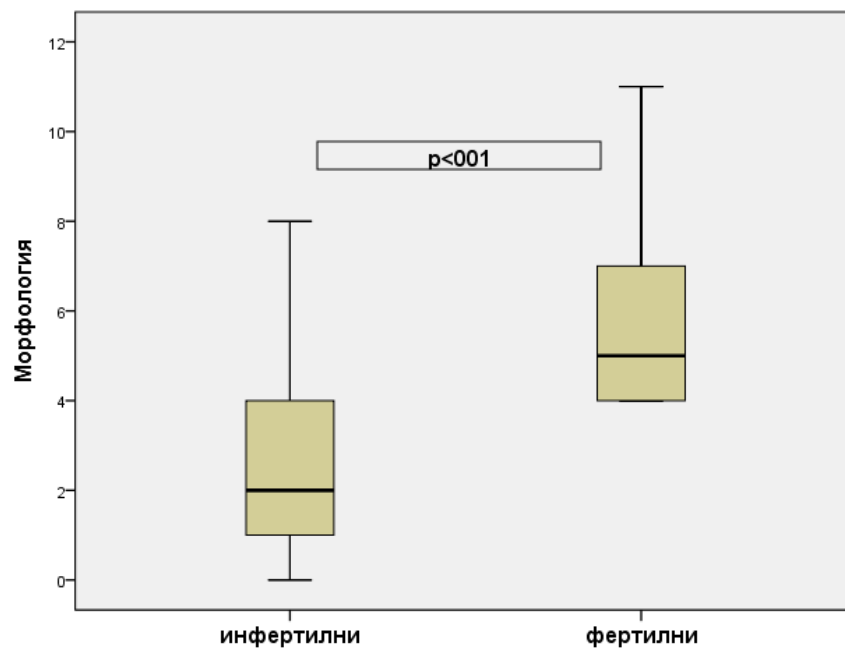
| | | N | Median | Mean Rank | Sum of Ranks |
|-------------------------------|------------|----|----------|-----------|--------------|
| Въздържание (дни) | инфертилни | 81 | 4 | 65,48 | 5303,50 |
| | фертилни | 49 | 4 | 65,54 | 3211,50 |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | инфертилни | 81 | 42 | 54,80 | 4439,00 |
| | фертилни | 49 | 49 | 83,18 | 4076,00 |
| Концентрация (mill/mL) | инфертилни | 81 | 48000000 | 57,91 | 4690,50 |
| | фертилни | 49 | 80000000 | 78,05 | 3824,50 |
| Нормална морфология (%) | инфертилни | 81 | 2 | 49,40 | 4001,50 |
| | фертилни | 49 | 5 | 92,11 | 4513,50 |
| DFI (%) | инфертилни | 81 | 12,7 | 77,44 | 6273,00 |
| | фертилни | 49 | 7,94 | 45,76 | 2242,00 |
| HDS (%) | инфертилни | 81 | 6,62 | 72,51 | 5873,50 |
| | фертилни | 49 | 4,23 | 53,91 | 2641,50 |
| HDFI (%) | инфертилни | 81 | 5,5 | 66,04 | 5283,00 |
| | фертилни | 49 | 5,6 | 61,94 | 2973,00 |

Таблица 7. Статистически значими разлики

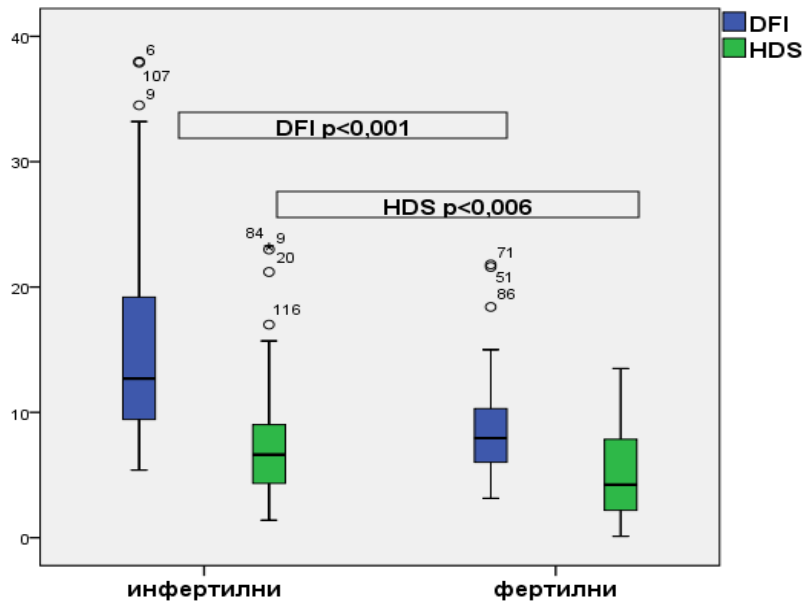
| | Въздържание (дни) | Прогресивна подвижност (a+b%) | Концентрация (mill/mL) | Нормална морфология (%) | DFI (%) | HDS (%) | HDFI (%) |
|------------------------|-------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------|---------|---------|----------|
| Mann-Whitney U | 1982,500 | 1118 | 1369,500 | 680,500 | 1017 | 1416,5 | 1797 |
| Z | -,010 | -4,166 | -2,955 | -6,338 | -4,65 | -2,729 | -,605 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,992 | ,000 | ,003 | ,000 | ,000 | ,006 | ,545 |



Фигура 3. Бокс-плот диаграми за подвижност и концентрация на сперматозоидите



Фигура 4. Бокс-плот диаграма за процент нормална морфология на сперматозоидите



Фигура 5. Бокс-плот диаграми за DFI и HDS

1.2. Статистически анализ на пациентите, разделени в три групи – фертилни с данни за нормозооспермия, мъже с неизяснен инфертилитет с данни за нормозооспермия и мъже с идиопатичен инфертилитет с данни за тератозооспермия

Таблица 8. Дескриптивна статистика за нормално разпределените показатели възраст и TZI

| | | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|------------------|--------------------------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Възраст (години) | идиопатичен инфертилитет | 48 | 35,56 | 5,705 | ,823 | 33,91 | 37,22 | 27 | 51 |
| | неизяснен инфертилитет | 28 | 36,18 | 5,334 | 1,008 | 34,11 | 38,25 | 27 | 46 |
| | фертилни | 50 | 33,70 | 6,192 | ,876 | 31,94 | 35,46 | 22 | 49 |
| TZI | идиопатичен инфертилитет | 48 | 1,3927 | ,12414 | ,01792 | 1,3567 | 1,4288 | 1,19 | 1,68 |
| | неизяснен инфертилитет | 28 | 1,4150 | ,08544 | ,01615 | 1,3819 | 1,4481 | 1,26 | 1,66 |
| | фертилни | 50 | 1,3362 | ,12470 | ,01764 | 1,3008 | 1,3716 | 1,11 | 1,58 |

Тестът на **Levene** за хомогенност на варианса показва $p = 0,043$ за TZI, следователно групите не са хомогенни. Затова отчитаме данните от реда „Equal variances not assumed”, в който t статистиката се базира на коригирани степени на свобода, вземащи предвид разликата във вариациите на двете групи.

Таблица 9. Тест на **Levene** за хомогенност на варианса

| | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|------------------|-----|-----|-------------|
| Възраст (години) | ,323 | 2 | 123 | ,725 |
| TZI | 3,230 | 2 | 123 | ,043 |

Таблица 10. Еднофакторен анализ на варианса (ANOVA) за нормално разпределените показатели

| | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|------------------|----------------|----------------|-----|-------------|-------|------|
| Възраст (години) | Between Groups | 138,382 | 2 | 69,191 | 2,038 | ,135 |
| | Within Groups | 4176,420 | 123 | 33,955 | | |
| | Total | 4314,802 | 125 | | | |
| TZI | Between Groups | ,135 | 2 | ,068 | 4,936 | ,009 |
| | Within Groups | 1,683 | 123 | ,014 | | |
| | Total | 1,819 | 125 | | | |

Не се наблюдаваха разлики във възрастта на трите изследвани групи. ANOVA-анализът показва сигнификантни разлики за TZI – $F(2,123)=4,936$; $p=0,009$.

С Post-hoc анализ бяха изследвани разликите между отделните групи. Отчетени бяха разлики за:

- 1) TZI при мъжете с идиопатичен инфертилите и фертилните контроли $p=0,018$ (LSD) и $p=0,055$ (Bonferoni)
- 2) TZI при мъжете с неизяснен инфертилите и фертилните контроли $p=0,000$ (LSD) и $p=0,015$ (Bonferoni)

Пациентите с идиопатичен инфертилитет и пациентите с неизяснен инфертилитет не се различават по нито един показател (освен по морфологията, която служи за групиращ критерий, **табл. 10**).

Таблица 11. Дескриптивна статистика на неравномерно разпределените показатели.

| | | Въздържани е (дни) | Прогресивна подвижност (a+b%) | Концентрация (mil/mL) | DFI (%) | HDS (%) | HDFI (%) |
|-------------------------------------|-----------|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------|------------|------------|-------------|
| идиопатич ен инфертили тет | Median | 4 | 41 | 525 | 13,5 | 6,62 | 6,06 |
| | Minimum | 2 | 6 | 1 | 5,52 | 1,60 | 2,14 |
| | Maximum | 7 | 61 | 151 | 38,00 | 23,21 | 17,10 |
| | Mean Rank | 58,89 | 48,73 | 59,66 | 82,51 | 71,61 | 73,36 |
| неизяснен инфертили тет | Median | 4 | 43,5 | 45,5 | 11,05 | 5,39 | 4,67 |
| | Minimum | 3 | 32 | 16 | 5,40 | 1,40 | ,26 |
| | Maximum | 5 | 58 | 137 | 30,90 | 15,70 | 13,00 |
| | Mean Rank | 71,18 | 61,07 | 52,45 | 63,66 | 65,89 | 49,16 |
| Фертилни | Median | 4 | 49 | 77,5 | 7,9 | 4,28 | 5,55 |
| | Minimum | 2 | 32 | 16 | 3,14 | ,12 | ,26 |
| | Maximum | 7 | 79 | 282 | 21,80 | 13,50 | 13,70 |
| | Mean Rank | 63,63 | 79,04 | 73,38 | 45,16 | 54,37 | 59,70 |

Таблица 12. Kruskal-Wallis тест за неравномерно разпределените показатели.

| | Въздържание (дни) | Прогресивна подвижност (a+b%) | Концентрация (mill/mL) | DFI (%) | HDS (%) | HDFI (%) |
|----------------|----------------------|-------------------------------------|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Chi-Square | 2,292 | 17,062 | 6,759 | 25,624 | 5,616 | 8,447 |
| Df | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Asymp. Sig. | ,318 | ,000 | ,034 | ,000 | ,060 | ,015 |

Според теста на Kruskal-Wallis значими разлики се наблюдават за:

- 1) Прогресивно подвижните сперматозоиди (a+b%) χ^2 (2, N=126) = 17,062; p=0,000 с mean rank 48,73% за групата на мъжете с идиопатичен инфертилитет; 61,07% за групата на мъжете с неизяснен инфертилитет и 79,04% за групата на фертилните мъже. От представените резултати ясно се вижда, че най-висока е подвижността при фертилните мъже, следвана от мъжете с неизяснен инфертилитет и най-ниска е при мъжете с идиопатичен инфертилитет, въпреки, че и трите групи са с нормална прогресивна подвижност (N \geq 32%)
- 2) Концентрацията на сперматозоидите χ^2 (2, N=126) =6,759; p=0,034 с mean rank 59,66 млн./мл за групата на мъжете с идиопатичен инфертилитет, следвана от мъжете с

неизяснен инфертилитет с mean rank 61,07 и най-висока е при фертилните мъже с mean rank 73,38. Концентрацията на сперматозоидите и при трите изследвани групи е нормална ($N \geq 15$ млн/мл.)

- 3) DFI % χ^2 (2, N=126) = 25,624; p=0,000 с 82,51% за групата с идиопатичен инфертилитет, mean rank DFI 63,66 за неизяснения инфертилитет и mean rank 45,16 при фертилните мъже. DFI отново е в рамките на нормата ($N \leq 15\%$)
- 4) HDFI % χ^2 (2, N=124) = 5,616; p=0,015 с mean rank HDFI% 73,36 за идиопатичния инфертилитет, mean rank 49,16 за неизяснения инфертилитет и mean rank 59,70 за фертилната група.

За да видим дали има значими разлики между всеки две групи, приложихме тестът на Mann-Whitney за двойките групи. Първо сравнихме показателите (значимо различаващи се според теста на Kruskal-Wallis) на мъжете от групата на идиопатичния инфертилитет с данните на мъжете с неизяснен инфертилитет.

Таблица 13. Тест на Mann-Whitney за сравняване на групите пациенти с идиопатичен и неизяснен инфертилитет

| | Прогресивна подвижност (a+b%) | Концентрация (mill/mL) | DFI (%) | HDFI (%) |
|------------------------|----------------------------------|------------------------|-------------|-------------|
| Mann-Whitney U | 511,500 | 570,5 | 457 | 396,5 |
| Wilcoxon W | 1687,500 | 976,5 | 863 | 802,5 |
| Z | -1,730 | -1,093 | -2,315 | -2,865 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,084 | ,274 | ,021 | ,004 |

Групата на мъжете с идиопатичен инфертилитет показаха значимо по-висок процент DFI (p=0,021) и HDFI (p=0,004) спрямо групата на инфертилните мъже с неизяснен инфертилитет. (Таблица 14).

При сравняване между групите на мъжете с неизяснен инфертилитет спрямо фертилните групи наблюдаваме закономерни значими разлики за DFI (p=0,022), но двете групи се различават и по концентрация и подвижност. Концентрацията и подвижността на фертилните са значимо по-високи (p=0,03; p=0,017), сравнени с групата на инфертилните с неизяснен инфертилитет, въпреки, че всички са в границите на нормата, според критериите на СЗО (**табл. 14**).

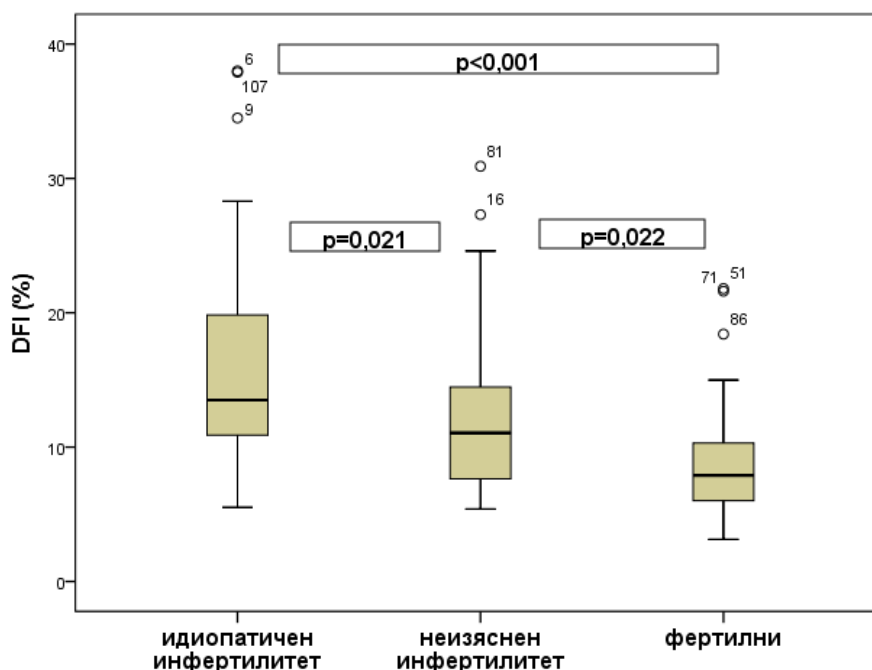
При сравняване на групата с идиопатичен инфертилитет и фертилната група също наблюдаваме закономерни значими разлики за DFI (p=0,000), и отново двете групи се различават и по концентрация и подвижност (p=0,042; p=0,000). Концентрацията и подвижността на фертилните са значимо по-високи, сравнени с групата на идиопатичния инфертилитет (**табл. 15**).

Таблица 14. Тест на Mann-Whitney за сравняване на групите пациенти с неизяснен инфертилитет и фертилните контроли

| | Прогресивна подвижност (a+b%) | Концентрация (mill/mL) | DFI (%) | HDFI (%) |
|------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------|----------|
| Mann-Whitney U | 471,5 | 492 | 480,5 | 574 |
| Wilcoxon W | 877,5 | 898 | 1755,5 | 980 |
| Z | -2,383 | -2,167 | -2,287 | -1,186 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,017 | ,03 | ,022 | ,236 |

Таблица 15. Тест на Mann-Whitney за сравняване на групите пациенти с идиопатичен инфертилитет и фертилните контроли

| | Прогресивна подвижност (a+b%) | Концентрация (mill/mL) | DFI (%) | HDFI (%) |
|------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------|----------|
| Mann-Whitney U | 651,5 | 914 | 502,5 | 902,5 |
| Wilcoxon W | 1827,5 | 2090 | 1777,5 | 2127,5 |
| Z | -3,901 | -2,033 | -4,957 | -1,825 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,000 | ,042 | ,000 | ,068 |



Фигура 6. Бокс-плот диаграма на DFI

Таблица 16. Корелации по Pearson за равномерно разпределените данни – възраст и TZI

| | Възраст (години) | Въздръжание (дни) | Прогресивна подвижност (a+b%) | Концентрация (mill/mL) | Нормална морфология (%) | TZI | DFI (%) | HDS (%) |
|-------------------------------------|---------------------|----------------------|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|---------|------------|------------|
| Въздръжание (дни) | R | ,086 | | | | | | |
| | P | ,332 | | | | | | |
| | N | 130 | | | | | | |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | R | -,118 | -,106 | | | | | |
| | P | ,181 | ,230 | | | | | |
| | N | 130 | 130 | | | | | |
| Концентрация (mill/mL) | R | ,138 | ,056 | ,200* | | | | |
| | P | ,118 | ,525 | ,022 | | | | |
| | N | 130 | 130 | 130 | | | | |
| Нормална морфология (%) | R | -,161 | ,078 | ,434** | ,150 | | | |
| | P | ,067 | ,380 | ,000 | ,089 | | | |
| | N | 130 | 130 | 130 | 130 | | | |
| TZI | R | ,163 | ,135 | -,283** | ,072 | -,156 | | |
| | P | ,063 | ,127 | ,001 | ,415 | ,077 | | |
| | N | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | | |
| DFI (%) | R | ,372** | ,206* | -,421** | -,252** | -,381** | ,239** | |
| | P | ,000 | ,019 | ,000 | ,004 | ,000 | ,006 | |
| | N | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | |
| HDS (%) | R | ,068 | ,059 | -,287** | -,189* | -,174* | ,249** | ,372** |
| | P | ,444 | ,506 | ,001 | ,032 | ,047 | ,004 | ,000 |
| | N | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 |
| HDFI (%) | R | -,042 | -,019 | -,254** | ,004 | -,254** | ,032 | ,223* |
| | P | ,640 | ,830 | ,004 | ,964 | ,004 | ,716 | ,011 |
| | N | 128 | 128 | 128 | 128 | 128 | 128 | 128 |

** . Корелацията е значима при $p < 0.01$ level (2-tailed).

* . Корелацията е значима при $p < 0.05$ level (2-tailed).

R – корелационен коефициент, P – значимост

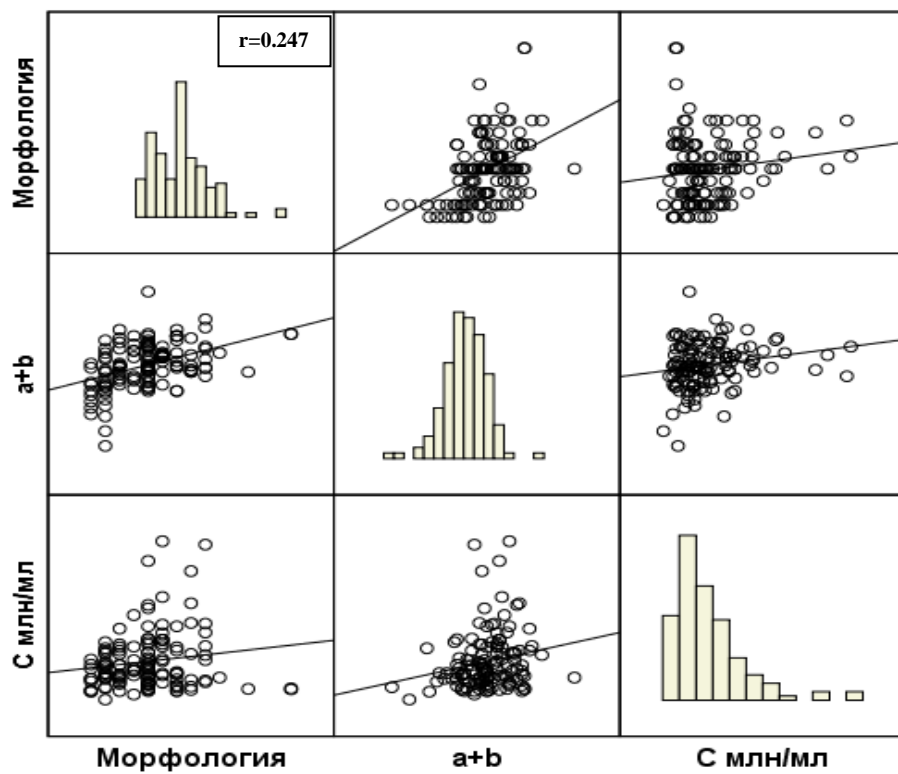
От корелационния анализ по Pearson се откриват три силно положителни корелационни зависимости между:

- 1) възрастта и DFI ($r=0.372$; $p<0.01$)
- 2) DFI и TZI ($r=0.239$; $p<0.01$)
- 3) HDS и TZI ($r=0.249$; $p<0.01$)

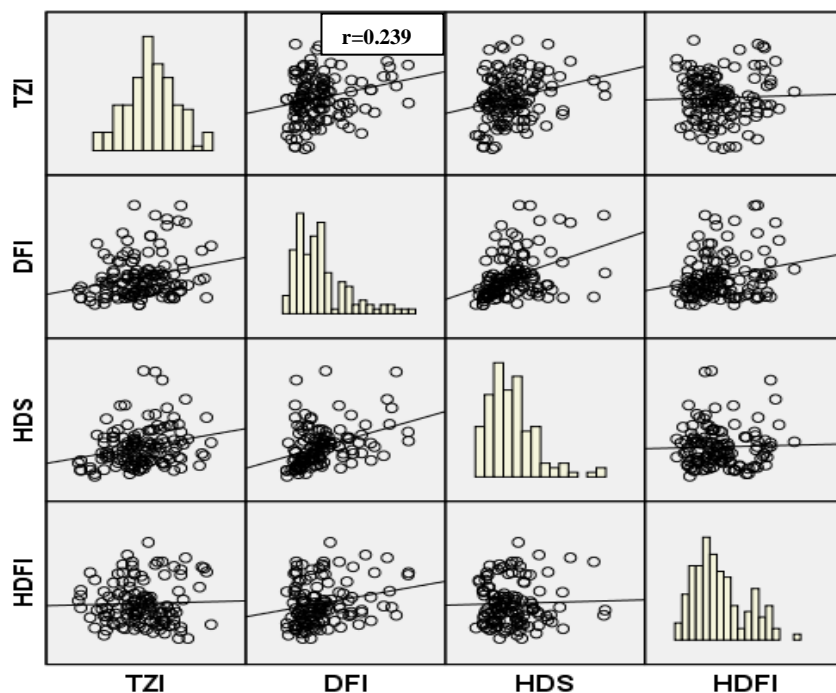
Таблица 17. Корелации по Spearman за неравномерно разпределените данни - въздържание, подвижност, концентрация, морфология, DFI, HDS, HDFI

| | | Възраст (години) | Въздържание (дни) | Прогресивна подвижност (a+b%) | Концентрация (mill/mL) | Нормална морфология (%) | TZI | DFI (%) | HDS (%) |
|-------------------------------------|---|---------------------|----------------------|-------------------------------------|---------------------------|-------------------------------|--------|--------------|------------|
| Въздържание (дни) | R | -,006 | | | | | | | |
| | P | ,948 | | | | | | | |
| | N | 130 | | | | | | | |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | R | -,085 | -,100 | | | | | | |
| | P | ,337 | ,258 | | | | | | |
| | N | 130 | 130 | | | | | | |
| Концентраци я (mill/mL) | R | ,126 | ,037 | ,218* | | | | | |
| | P | ,152 | ,674 | ,013 | | | | | |
| | N | 130 | 130 | 130 | | | | | |
| Нормална морфология (%) | R | -,070 | ,132 | ,427** | ,136 | | | | |
| | P | ,430 | ,135 | ,000 | ,124 | | | | |
| | N | 130 | 130 | 130 | 130 | | | | |
| TZI | R | ,114 | ,190* | -,271** | ,031 | -,103 | | | |
| | P | ,195 | ,030 | ,002 | ,729 | ,242 | | | |
| | N | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | | | |
| DFI (%) | R | ,248* | ,199* | -,386** | -,303** | -,388** | ,216* | | |
| | P | ,004 | ,023 | ,000 | ,000 | ,000 | ,013 | | |
| | N | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | | |
| HDS (%) | R | ,077 | ,051 | -,284** | -,281** | -,222* | ,250** | ,426* | |

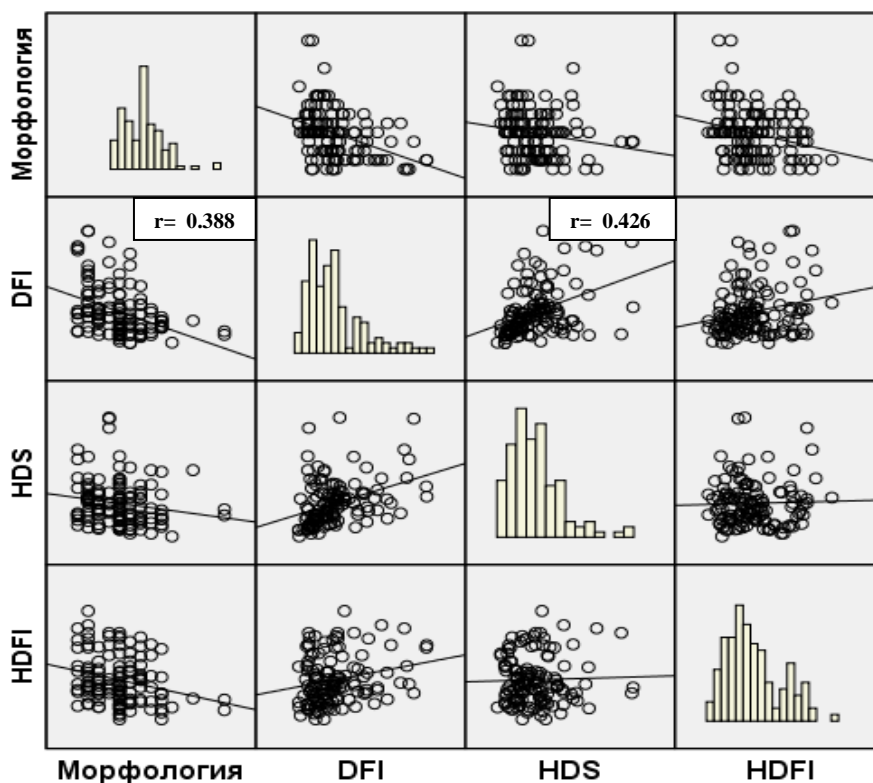
| | | | | | | | | | |
|----------|---|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|
| | P | ,382 | ,562 | ,001 | ,001 | ,011 | ,004 | ,000 | |
| | N | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 | 130 |
| HDFI (%) | R | -,063 | -,020 | -,164 | -,012 | -,226* | -,052 | ,193* | -,023 |
| | P | ,480 | ,825 | ,065 | ,892 | ,010 | ,561 | ,029 | ,795 |
| | N | 128 | 128 | 128 | 128 | 128 | 128 | 128 | 128 |



Фигура 7. Корелационни зависимости между концентрация, процент прогресивна подвижност (a+b%) и морфология



Фигура 8. Корелации между показателите от SDI теста



Фигура 9. Корелации между показателите от SDI теста и морфология

От извършения корелационен анализ установяваме, че въздържанието корелира положително с TZI ($r=0.190$; $p<0.05$) и DFI ($r=0.199$; $p<0.05$).

Прогресивната подвижност на сперматозоидите корелира положително с концентрацията на сперматозоидите млн./мл ($r=0,218$; $p<0.05$) и с морфологията на

сперматозоидите ($r=0.427$; $p<0.01$). От представените в таблицата корелационни зависимости се вижда още, че прогресивната подвижност корелира силно негативно с TZI ($r=-0.271$; $p<0.01$), DFI ($r=-0.386$; $p<0.01$) и с HDS ($r=-0.284$; $p<0.01$).

Концентрацията на сперматозоидите млн./мл корелира силно негативно с DFI ($r=-0.303$; $p<0.01$) и с HDS ($r=-0.281$; $p<0.01$).

Морфологията корелира силно негативно с DFI ($r=-0.388$; $p<0.01$) и е в слаба корелационна зависимост с HDS ($r=-0.222$; $p<0.05$) и с HDFI ($r=-0.226$; $p<0.01$)

DFI на сперматозоидите е в силна положителна корелационна зависимост с HDS ($r=0.426$; $p<0.01$) и с HDFI ($r=0.193$; $p<0.05$).

1.3. Дискусия на обединените резултати от спермален анализ и SDI- тест за фертилни мъже и инфертилни (идиопатичен и неизяснен инфертилитет)

Спермален анализ – фертилни и инфертилни

В нашето проучване мъжете определени като фертилни, показват нормална подвижност (медиана 49%), нормална концентрация на сперматозоидите (медиана 80 млн./мл) и нормална морфология (медиана 5%), спрямо всички мъже определени като инфертилни на база репродуктивна анамнеза. Спермограмите, направени при всички инфертилни мъже показват нормална прогресивна подвижност (медиана 42%) и концентрация (медиана 48 млн./мл), но средният процент нормална морфология е под 4% (медиана 2%).

По отношение на прогресивната подвижност, определяща един мъж като фертилен или инфертилен на база спермален анализ съществуват множество противоречиви данни в научната литература. Макар да има приети норми от СЗО за подвижността на сперматозоидите, значението на този показател като предиктор за мъжки фертилитет, остава дискутабилно (*Zinaman MJ et al., 2000; Guzick DS et al., 2001; Sripada S et al., 2010; Jedrzejczak P et al., 2008; Zaini A et al., 1985*).

Според *Guzick DS et al., (2001)* които изследват 765 инфертилни двойки, основен дискриминационен показател, определящ един мъж като фертилен или инфертилен се явява морфологията на сперматозоидите под 9%. Проучването показва също, че концентрацията на сперматозоидите при фертилните мъже е над 48×10^6 млн/мл. Подобна зависимост по отношение на концентрацията установихме и в нашето проучване. Мъжете във фертилната група са с концентрация над 48×10^6 в сравнение с инфертилната група.

Milardi D et al., (2012) изследвайки 2935 инфертилни двойки установяват, че мъжете с нормална морфология под 5% не постигат бременност по естествен път, същата зависимост установяваме и в нашето проучване. При оценката на морфологията често наблюдавани са леките морфологични дефекти, като по-информативен показател в комплекс с морфологията се явява TZI. Когато TZI е над 2.00 съществува сериозен риск от настъпили вече тестикуларни увреди. В нашето проучване всички мъже имат TZI под 2.00, но установяваме статистически значима разлика за TZI. Групата на инфертилните мъже показва по-висок TZI (1.4 ± 0.11) спрямо фертилната група (1.3 ± 0.12).

Изчисленият показател (η) за размер на ефекта върху инфертилните мъже, показва още, че TZI се явява причина или е една от причините за инфертилитет. По отношение на

статистически значимата разлика за възрастта, изчисленият показател отхвърля възрастта като причина за инфертилитет сред мъжете, включени в нашето проучване.

Спермален анализ при инфертилните мъже с неизяснен и идиопатичен инфертилитет

Установихме, че подвижността и концентрацията при мъжете с неизяснен инфертилитет са по-високи спрямо мъжете с идиопатичен инфертилитет. Концентрацията и подвижността на фертилните са значимо по-високи ($p=0,03$; $p=0,017$), сравнени с групата на инфертилните с неизяснен инфертилитет. При сравняване на групата с идиопатичен инфертилитет и фертилната група, също наблюдавахме закономерно значими разлики за концентрация и подвижност ($p=0,042$; $p=0,000$). Концентрацията и подвижността на фертилните са значимо по-високи, сравнени с групата на идиопатичния инфертилитет.

От изложените по-горе факти може да заключим, че фертилните мъже показват значително по-висока концентрация и подвижност спрямо инфертилните с неизяснен и идиопатичен инфертилитет.

Основният подход в диагностиката на мъжкия фактор си остава конвенционалният семенен анализ, следван от обтоен физикален преглед и снемане на щателна анамнеза. Въпреки това информацията, която дава конвенционалният семенен анализ е ограничена, поради припокриването на показателите при фертилни и инфертилни мъже спрямо последното издание на СЗО от 2010 г. Все повече доказателства поставят под съмнение клиничната стойност на критериите, обявени от СЗО през 2010 г., като прогнозиращи критерии за инфертилитет. Всички мъже в нашето проучване показват нормална прогресивна подвижност и концентрация на сперматозоидите и въпреки противоречивите данни в литературата за прогностичната стойност на горните два показателя, мъжете в нашето проучване, определени като фертилни показват по-високи стойности.

Всичко това ни навежда на мисълта, че подвижността, концентрацията и морфологията на сперматозоидите могат да бъдат използвани като прогностични маркери за оценка на мъжкия фертилитет на базата, на които да се класифицират мъжете като фертилни, инфертилни с неизяснен и идиопатичен инфертилитет, но нито един от показателите няма сто процентна диагностична стойност по отношение на фертилизационния потенциал на мъжа.

От епидемиологична гледна точка липсата на златен стандарт при спермалния анализ в най-добрия случай ни прави несигурни в оценката на разпространение на мъжкия инфертилитет, което поражда въпроса как да бъдат съветвани инфертилните мъже, чиито спермални показатели надвишават референтните стойности, обявени в последните препоръки на СЗО и необходима ли е допълнителна оценка и лечение.

Поради тази причина въвеждането на допълнителни маркери за оценка на инфертилитета извън рутинния семенен анализ е наложително, тъй като неизясненият инфертилитет (*Hamada A et al., 2011*) се среща при около 15% от мъжете, а според някои популационни проучвания – до 27% (*Hamada A et al., 2012*). Това налага прилагането на по-широки диагностични тестове (като ДНК-фрагментация на сперматозоидите и оценка на оксидативен стрес в случаите на неизяснен и идиопатичен инфертилитет).

ДНК-фрагментация – фертилни и инфертилни мъже

В нашето проучване DFI е по-висок при инфертилните (мед. 12,7%) в сравнение с фертилните (7,94%), $U=1017$, $p=0,000$, въпреки че е в границата на нормата. Доказаната силна положителна корелационна зависимост между DFI и TZI показва, че с влошаване на морфологията расте и DFI, което отново е доказателство за значимостта на морфологията като прогностичен показател при мъже с инфертилитет и, че влошената морфология би следвало да насочи клинициста към допълнителна диагностика, извън рутинния семенен анализ. Силно отрицателната корелационна зависимост между DFI и прогресивната подвижност и концентрацията на сперматозоидите показват връзката на DFI и спермалните параметри.

ДНК-фрагментация на инфертилните мъже с неизяснен и идиопатичен инфертилитет.

Оказа се, че мъжете с неизяснен инфертилитет в нашето проучване имат по-нисък процент на ДНК-фрагментация, спрямо мъжете с идиопатичен инфертилитет. При сравняване между групите на мъжете с неизяснен инфертилитет и фертилната група наблюдавахме закономерно значими разлики за DFI ($p=0,022$). DFI е по-висок в групата на мъжете с неизяснения инфертилитет и идиопатичен инфертилитет спрямо фертилната група. Значимостта на разликата между групата на фертилните и групата на мъжете с идиопатичен инфертилитет е $p=0,000$.

В проучване, в което DFI е оценен чрез Sperm Chromatin Dispersion (SCD) test, проведено сред 196 мъже (*García-Ferreira et al., 2012*) се установява, че високите нива на ДНК-фрагментация се асоциират с аномална морфология както и, че с напредване на възрастта ДНК-фрагментационният индекс се повишава. В нашето проучване установяваме положителна корелационна зависимост между DFI на пациентите и тяхната възраст, както и отрицателна корелация с морфологията.

В същото проучване когато разделят пациентите на нормозооспермични мъже и мъже с поне един нарушен спермален показател, се установява, че двете групи се различават по DFI. В групата на инфертилните DFI е по-висок спрямо фертилните.

Проучване на *Oleszczuk et al., (2013)*., включващо мъже с неизяснен инфертилитет чрез конвенционалните методи на диагностика, установява значително по-висок процент на ДНК-фрагментация спрямо групата на фертилните. По-отношение на ДНК-фрагментацията на сперматозоидите учените са на едно мнение, стойности на DFI над 20% прогнозира намалена вероятност за настъпване на бременност по естествен път или чрез интраутеринна инсеминация или IVF, а стойности над 30% фрагментация на спермалната ДНК прогнозира силно намалена вероятност за настъпване на бременност по естествен път или IVF и крият сериозен риск от настъпване на спонтанни аборти в ранните гестационни седмици.

Няма как да дадем точен отговор дали наблюдаваното повишаване на DFI е тенденциозно или моментно, но може би при инфертилните мъже, въпреки нормалния DFI клиницистът трябва да извърши по-щателна оценка и проследяване на тези мъже с цел запазване и подобряване на репродуктивните им функции.

2. Резултати от измерване на тотален антиоксидантен капацитет (ТАС)

За периода от 30 януари 2014 г. до декември 2014 г. бяха изследвани 48 мъже, които разделихме на следните групи:

- фертилни мъже (n=17)
- мъже с данни за идиопатичен инфертилитет (n=14)
- мъже с данни за неизяснен инфертилитет (n=17)

След извършен конвенционален семенен анализ и оценка интегритета на спермалната ДНК, всички проби бяха центрофугирани на 3000 g и получената семенна плазма беше замразена при -70°C.

Статистически анализ на получените резултати Нормалност на разпределението

Тестирахме данните с теста на Shapiro-Wilk. Тези с $p < 0,05$ са с разпределение, различно от нормалното (неравномерно разпределение).

Таблица 18. Тест на Shapiro-Wilk за разпределение на данните от изследваните показатели.

| | Statistic (W) | Df (степенни на свобода) | Sig.(p) |
|-------------------------------|---------------|--------------------------|---------|
| Възраст (години) | ,969 | 48 | ,234 |
| Въздръжание (дни) | ,857 | 48 | ,000 |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | ,976 | 48 | ,423 |
| Концентрация (mill/mL) | ,841 | 48 | ,000 |
| Нормална Морфология (%) | ,908 | 48 | ,001 |
| TZI | ,984 | 48 | ,737 |
| DFI (%) | ,858 | 48 | ,000 |
| HDS (%) | ,768 | 48 | ,000 |
| HDFI (%) | ,909 | 48 | ,001 |
| ТАС (mmol/l) | ,975 | 48 | ,389 |

2.1. Статистически анализ за пациентите разделени в две групи – фертилни и инфертилни

Таблица 19. Групова статистика на показателите с равномерно разпределени данни, представени със средна стойност, стандартно отклонение и стандартна грешка

| | | Брой изследвани проби | Средна стойност | Стандартно отклонение | Стандартна грешка |
|-------------------------------|------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-------------------|
| Възраст (години) | инфертилни | 31 | 36,42 | 5,881 | 1,056 |
| | фертилни | 17 | 34,35 | 6,855 | 1,663 |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | инфертилни | 31 | 45,61 | 7,779 | 1,397 |
| | фертилни | 17 | 50,82 | 9,342 | 2,266 |
| TZI | инфертилни | 31 | 1,45 | ,097 | ,017 |
| | фертилни | 17 | 1,4 | ,117 | ,028 |
| ТАС (mmol/l) | инфертилни | 31 | ,33 | ,193 | ,035 |
| | фертилни | 17 | ,66 | ,194 | ,047 |

Таблица 20. Сравняване на равномерно разпределените данни и отчетени разлики с t-критерия на Стюдънт

| df = 46 | Levene's Test for Equality of Variances | | t-test for Equality of Means | | | | | |
|-------------------|---|------|------------------------------|----------------|-----------------|-----------------------|---|-------|
| | F | Sig. | t | Sig.(2-tailed) | Mean Difference | Std. Error Difference | 95% Confidence Interval of the Difference | |
| | | | | | | | Lower | Upper |
| Възраст (години) | ,008 | ,927 | 1,098 | ,278 | 2,066 | 1,882 | -1,723 | 5,855 |
| Подвижност (a+b%) | ,351 | ,557 | -2,066 | ,044 | -5,211 | 2,522 | -10,287 | -,134 |
| TZI | ,621 | ,435 | 1,818 | ,076 | ,057 | ,0314 | -,006 | ,12 |
| ТАС (mmol/l) | ,122 | ,729 | -5,604 | ,000 | -,327 | ,0583 | -,444 | -,21 |

От таблицата се вижда, че пациентите не се различават по възраст и по TZI. Различават се значимо по подвижност ($t(46) = 1,098$ $p = 0,044$) и ТАС ($t(46) = 5,604$ $p = 0,000$).

Статистика на неравномерно разпределените данни

Таблица 21. Групова статистика на показателите с неравномерно разпределени данни

| | | N | Mediana | Mean Rank | Sum of Ranks |
|------------------------|------------|----|---------|-----------|--------------|
| Въздържание (дни) | инфертилни | 31 | 4 | 23,97 | 743,00 |
| | фертилни | 17 | 4 | 25,47 | 433,00 |
| Концентрация (mill/mL) | инфертилни | 31 | 47 мил. | 23,79 | 737,50 |
| | фертилни | 17 | 46 мил | 25,79 | 438,50 |
| Нормална морфология(%) | инфертилни | 31 | 4 | 19,50 | 604,50 |
| | фертилни | 17 | 6 | 33,62 | 571,50 |
| DFI (%) | инфертилни | 31 | 11,80 | 27,94 | 866,00 |
| | фертилни | 17 | 7,94 | 18,24 | 310,00 |
| HDS (%) | инфертилни | 31 | 5,14 | 24,89 | 771,50 |
| | фертилни | 17 | 4,23 | 23,79 | 404,50 |
| HDFI (%) | инфертилни | 31 | 4,86 | 25,39 | 787,00 |
| | фертилни | 17 | 4,32 | 22,88 | 389,00 |

Таблица 22. Тест на Mann-Whitney за данни с различно от нормалното разпределение

| | Въздържание (дни) | Концентрация (mill/mL) | Нормална морфология (%) | DFI (%) | HDS (%) | HDFI (%) |
|---------------------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|-------------|---------|----------|
| Mann-Whitney U | 247 | 241,5 | 108,5 | 157 | 251,5 | 236 |
| Z | -,386 | -,474 | -3,370 | -2,296 | -,259 | -,593 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,700 | ,635 | ,001 | ,022 | ,796 | ,553 |
| a. Grouping Variable: Fertility | | | | | | |

Статистическият анализ показва значима разлика по отношение на нормалната морфологията в двете изследвани групи ($p=0,001$) и DFI ($p=0,022$).

За да проверим каква е зависимостта и връзката на качеството на сперматозоидите и ТАС разделихме пробите на инфертилните пациенти на нормозооспермични и тератозооспермични.

Таблица 23. Дескриптивна статистика за нормално разпределените показатели

| | | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Minimum | Maximum |
|-------------------------------|-------------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | |
| Възраст (години) | идиопатичен | 14 | 37,14 | 6,689 | 1,788 | 33,28 | 41,01 | 29 | 51 |
| | неизяснен | 17 | 35,82 | 5,259 | 1,275 | 33,12 | 38,53 | 27 | 45 |
| | фертилни | 17 | 34,35 | 6,855 | 1,663 | 30,83 | 37,88 | 24 | 49 |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | идиопатичен | 14 | 45,29 | 8,062 | 2,155 | 40,63 | 49,94 | 31 | 58 |
| | неизяснен | 17 | 45,88 | 7,777 | 1,886 | 41,88 | 49,88 | 32 | 58 |
| | фертилни | 17 | 50,82 | 9,342 | 2,266 | 46,02 | 55,63 | 34 | 66 |
| TZI | идиопатичен | 14 | 1,4686 | ,1044 | ,02791 | 1,4083 | 1,5289 | 1,35 | 1,68 |
| | неизяснен | 17 | 1,4347 | ,0897 | ,02176 | 1,3886 | 1,4808 | 1,29 | 1,66 |
| | фертилни | 17 | 1,3929 | ,1167 | ,02831 | 1,3329 | 1,4529 | 1,18 | 1,58 |
| ТАС (mmol/l) | идиопатичен | 14 | ,293 | ,2042 | ,05457 | ,17536 | ,41115 | ,023 | ,617 |
| | неизяснен | 17 | ,360 | ,183 | ,04438 | ,26629 | ,45447 | ,006 | ,655 |
| | фертилни | 17 | ,657 | ,194 | ,04707 | ,55686 | ,75642 | ,246 | ,967 |

Таблица 24. Тест на **Levene** за хомогенност на варианса

| | Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|-------------------------------|------------------|-----|-----|------|
| Възраст (години) | ,639 | 2 | 45 | ,533 |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | ,184 | 2 | 45 | ,832 |
| TZI | ,502 | 2 | 45 | ,609 |
| ТАС (mmol/l) | ,287 | 2 | 45 | ,752 |

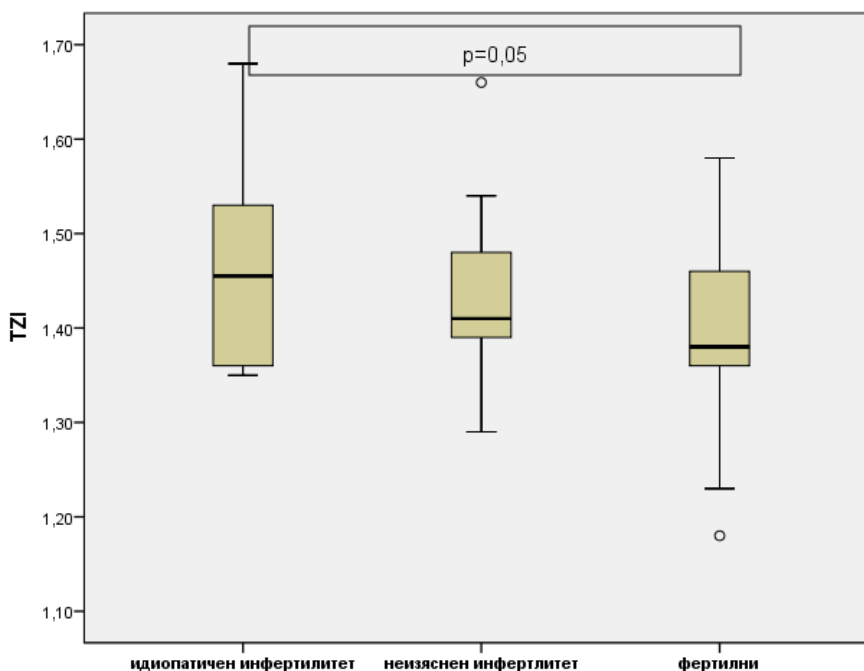
Таблица 25. Еднофакторен анализ на варианса (ANOVA) за нормално разпределените показатели.

| | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-------------------------------|----------------|----------------|----|-------------|--------|-------------|
| Възраст (години) | Between Groups | 60,245 | 2 | 30,123 | ,763 | ,472 |
| | Within Groups | 1776,067 | 45 | 39,468 | | |
| | Total | 1836,313 | 47 | | | |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | Between Groups | 300,824 | 2 | 150,412 | 2,109 | ,133 |
| | Within Groups | 3209,092 | 45 | 71,313 | | |
| | Total | 3509,917 | 47 | | | |
| TZI | Between Groups | ,045 | 2 | ,022 | 2,052 | ,140 |
| | Within Groups | ,489 | 45 | ,011 | | |
| | Total | ,533 | 47 | | | |
| ТАС (mmol/l) | Between Groups | 1,206 | 2 | ,603 | 16,142 | ,000 |
| | Within Groups | 1,680 | 45 | ,037 | | |
| | Total | 2,886 | 47 | | | |

Еднофакторният анализ на варианса за нормално разпределените показатели не отчете разлики между групите по възраст и подвижност. Значимо се различаваха групите по ТАС, $F(2,45) = 1,206$, $p < 0,001$.

За да отчетем разликите между отделните групи данните бяха подложени на Post Hoc анализ (LSD и Bonferroni). Бяха установени следните значими разлики:

TZI е значимо по-висок при тератозооспермичните проби (1,47) в сравнение с пробите от фертилни нормозооспермични контроли (1,39); $p = 0,05$ (LSD) (**фиг.10**).



Фигура 10. Бокс-плот диаграма за TZI.

TAC е значимо по-висок в групата на фертилните мъже (0,657) в сравнение с пробите на мъжете с данни за тератозооспермия (0,293); $p < 0,001$ (LSD и Bonferoni) и в сравнение с пробите от нормозооспермични инфертилни пациенти (0,360); $p < 0,001$ (LSD и Bonferoni). Не се наблюдаваха разлики между пациентите с идиопатичен и неизяснен инфертилитет. Мъжете с неизяснен инфертилитет и фертилните мъже не се различаваха по DFI.

Таблица 26. Рангове и медиани за отклоняващите се от нормално разпределение показатели.

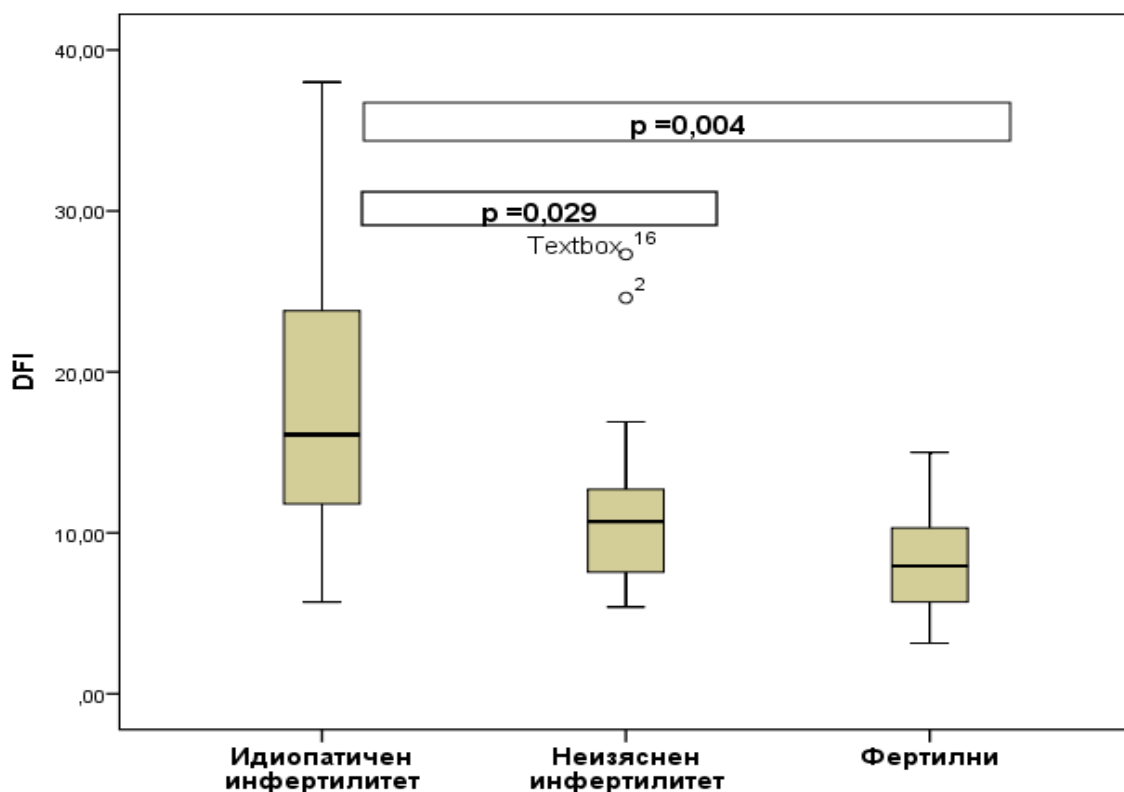
| | Групи | N | Mean Rank | Median |
|-------------------------|-------------|----|-----------|--------|
| Въздържание (дни) | идиопатичен | 14 | 25,39 | 4 |
| | неизяснен | 17 | 22,79 | 4 |
| | фертилни | 17 | 25,47 | 4 |
| Концентрация (mill/mL) | идиопатичен | 14 | 24,07 | 48,5 |
| | неизяснен | 17 | 23,56 | 47 |
| | фертилни | 17 | 25,79 | 46 |
| Нормална морфология (%) | идиопатичен | 14 | 7,50 | 16,1 |
| | неизяснен | 17 | 29,38 | 10,7 |
| | фертилни | 17 | 33,62 | 7,94 |
| DFI (%) | идиопатичен | 14 | 33,64 | 16,1 |
| | неизяснен | 17 | 23,24 | 10,7 |
| | фертилни | 17 | 18,24 | 7,94 |
| HDS (%) | идиопатичен | 14 | 30,43 | 6,55 |
| | неизяснен | 17 | 20,32 | 3,9 |
| | фертилни | 17 | 23,79 | 4,23 |
| HDFI (%) | идиопатичен | 14 | 29,21 | 5,17 |
| | неизяснен | 17 | 22,24 | 3,38 |
| | фертилни | 17 | 22,88 | 4,32 |

Таблица 27. Kruskal-Wallis тест за разлики между трите групи по отношение на неравномерно разпределените данни.

| | Въздържание (дни) | Концентрация (mill/mL) | DFI (%) | HDS (%) | HDFI (%) |
|--|-------------------|------------------------|-------------|---------|----------|
| Chi-Square | ,460 | ,235 | 9,517 | 4,068 | 2,260 |
| df | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Asymp. Sig. | ,795 | ,889 | ,009 | ,131 | ,323 |
| a. Kruskal Wallis Test | | | | | |
| b. Grouping Variable: FertilityMorfology | | | | | |

Според теста на Kruskal-Wallis значими разлики се наблюдават за DFI $\chi^2(2, N=48) = 9,517$; $p=0,009$. За да установим значимостта на различията между всеки две от трите изследвани групи, беше приложен теста на Mann-Whitney. Според него DFI е значимо по-

висок за проби от лица с идиопатичен инфертилитет, сравнени с фертилни контроли ($p=0,004$) както и с DFI на проби от лица с неизяснен инфертилитет ($p=0,029$) (фиг.11)



Фигура 11. Бокс-плот диаграма за DFI

Таблица 28. Корелации между равномерно разпределените данни (възраст, подвижност, TZI, TAC)

| | Възраст (години) | Въздържане (дни) | Прогресивна подвижност (a+b%) | Концентрация (mill/mL) | Нормална морфология (%) | TZI | DFI (%) | HD S (%) | HDF I (%) |
|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------|-----|---------|----------|-----------|
| Въздържане (дни) | R | ,138 | | | | | | | |
| | P | ,349 | | | | | | | |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | R | -,357* | -,144 | | | | | | |
| | P | ,013 | ,328 | | | | | | |
| Концентрация (mill/mL) | R | ,309* | ,281 | ,001 | | | | | |
| | P | ,032 | ,053 | ,993 | | | | | |
| Нормална | R | -,308* | -,020 | ,364* | ,015 | | | | |

| | | | | | | | | | | |
|----------------|---|--------|-------|---------|-------|---------|--------|--------|-------|-------|
| морфология (%) | P | ,033 | ,894 | ,011 | ,920 | | | | | |
| TZI | R | ,290* | ,260 | -,171 | ,290* | -,498** | | | | |
| | P | ,046 | ,074 | ,247 | ,045 | ,000 | | | | |
| DFI (%) | R | ,491** | ,156 | -,389** | -,154 | -,471** | ,104 | | | |
| | P | ,000 | ,291 | ,006 | ,297 | ,001 | ,481 | | | |
| HDS (%) | R | ,062 | ,004 | -,180 | -,013 | -,238 | ,221 | ,327* | | |
| | P | ,676 | ,981 | ,221 | ,930 | ,104 | ,131 | ,023 | | |
| HDFI (%) | R | ,088 | -,115 | -,124 | -,018 | -,282 | ,066 | ,076 | ,292* | |
| | P | ,553 | ,436 | ,402 | ,905 | ,052 | ,654 | ,608 | ,044 | |
| TAC (mmol/l) | R | -,278 | ,020 | ,260 | ,048 | ,464** | -,481* | -,347* | -,196 | -,100 |
| | P | ,056 | ,891 | ,074 | ,744 | ,001 | ,001 | ,016 | ,182 | ,497 |

Възрастта на изследваните мъже от двете групи корелира отрицателно с прогресивната подвижност ($r=-0.357$; $p<0.05$), положителна корелационна зависимост се откривае също и между възрастта и TZI ($r=0.290$; $p<0.05$). Силно положителна корелационна зависимост се установява между възрастта и DFI на сперматозоидите ($r=0.491$; $p<0.01$).

Прогресивната подвижност на сперматозоидите корелира положително с морфологията на сперматозоидите ($r=0.364$; $p<0.05$). Силно отрицателна корелационна зависимост се наблюдава между прогресивната подвижност и DFI на сперматозоидите ($r=-0.389$; $p<0.01$).

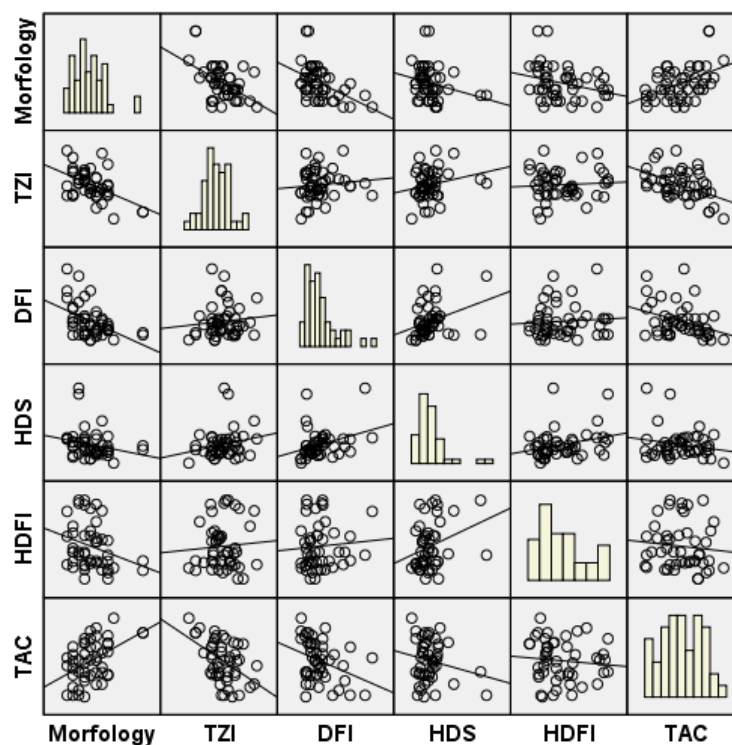
TZI корелира силно негативно с морфологията на сперматозоидите и тоталния антиоксидантен капацитет ($r=-0.498$; -0.481 ; $p<0.01$).

Измерените нива на TAC са в силна негативна корелационна зависимост с TZI ($r=-0.481$; $p<0.01$) и в положителна корелационна зависимост с морфологията на сперматозоидите ($r=0.464$; $p<0.01$). Откривае също и отрицателна корелационна зависимост между TAC и DFI ($r=-0.347$; $p<0.05$)

Таблица 29. Корелации по Spearman за неравномерно разпределените данни (въздържание, концентрация, морфология, DFI, HDS, HDFI).

| | | Възраст (години) | Въздържание (дни) | Прогресивна подвижност (a+b%) | Концентрация (mill/mL) | Нормална морфология (%) | TZI | DFI (%) | HDS (%) | HDFI (%) |
|-------------------------------|---|------------------|-------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------|-----|---------|---------|----------|
| Въздържание (дни) | R | ,059 | | | | | | | | |
| | P | ,692 | | | | | | | | |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | R | -,349* | -,128 | | | | | | | |
| | P | ,015 | ,385 | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|--------|-------|-------|-------|---------|-------|--------|------|-------|
| Концентрация (mill/mL) | R | ,296* | ,294* | ,026 | | | | | | |
| | P | ,041 | ,043 | ,863 | | | | | | |
| Нормална морфология (%) | R | -,087 | ,063 | ,297* | -,021 | | | | | |
| | P | ,557 | ,670 | ,040 | ,885 | | | | | |
| TZI | R | ,184 | ,162 | -,111 | ,296* | -,391** | | | | |
| | P | ,211 | ,271 | ,453 | ,041 | ,006 | | | | |
| DFI (%) | R | ,425** | ,166 | -,266 | -,209 | -,454** | ,106 | | | |
| | P | ,003 | ,260 | ,068 | ,154 | ,001 | ,472 | | | |
| HDS (%) | R | ,053 | -,037 | -,168 | -,173 | -,305* | ,213 | ,376** | | |
| | P | ,723 | ,804 | ,255 | ,241 | ,035 | ,146 | ,008 | | |
| HDFI (%) | R | ,040 | -,143 | -,121 | -,003 | -,304* | -,027 | ,111 | ,268 | |
| | P | ,787 | ,333 | ,414 | ,986 | ,035 | ,857 | ,454 | ,066 | |
| TAC (mmol/l) | R | -,223 | ,054 | ,282 | -,013 | ,414** | - | -,316* | - | -,128 |
| | P | ,128 | ,714 | ,053 | ,932 | ,003 | ,003 | ,029 | ,909 | ,385 |



Фигура 12. Корелации между морфология, TAC и показателите на SDI.

Въздържанието положително корелира с концентрацията на сперматозоидите млн./мл ($r=0.296$; $p<0.05$).

Морфологията на сперматозоидите е в значителна отрицателна корелационна зависимост с TZI ($r=-0.391$; $p<0.01$), DFI ($r=-0.454$; $p<0.01$) и TAC ($r=-0.414$; $p<0.01$). Отрицателна корелационна зависимост се открива за морфологията на сперматозоидите HDS ($r=-0.305$; $p<0.05$) и HDFI ($r=-0.414$; $p<0.05$) фиг. (12).

DFI корелира положително с HDS ($r=0.376$; $p<0.01$) и отрицателно с TAC ($r=-0.316$; $p<0.05$).

2.2. Дискусия на резултатите от измерване на тотален антиоксидантен капацитет (TAC)

При групиране на пациентите по репродуктивна анамнеза установихме, че двете групи статистически се различават по процента на прогресивно подвижните сперматозоиди ($p=0.044$), процентът нормална морфология ($p=0,001$), DFI ($p=0,022$) и нивата на тотален антиоксидантен капацитет ($p=0,000$). В групата на фертилните мъже процентът на сперматозоидите с прогресивна подвижност и нормална морфология е значително по-висок, а процентът на DFI е по-нисък, спрямо инфертилната група. Измереният TAC отново беше по-висок в групата на фертилните. Тези наши наблюдения са в съгласие с редица проучвания. (*Badade G et al., 2011; Yousefniapasha Y et al., 2015; Hosen MB et al., 2015; Fazeli F et al., 2016, Roychoudhury S et al., 2016*), показващи по-ниски нива на TAC при инфертилни мъже и негативната връзка между оксидативния стрес, спермалните показатели и DFI. В подкрепа на тези проучвания са и установените от нас отрицателни корелационни зависимости за TZI и фрагментацията на спермалната ДНК с нивата на TAC, както и положителната корелация между процентът нормална морфология и TAC.

Bayejid H et al., (2015), изследвайки мъже с доказан фертилитет и инфертилни мъже, установяват, че процентът на прогресивно подвижните сперматозоиди и нормалната морфология са по-ниски при инфертилни мъже, а нивата на МДА и 8-OHdG са по-високи.

Категорично е доказано, че увреждането на ДНК на мъжките герминативни клетки се асоциира с лоши резултати при оплождане *in vitro*, преимплантационни ембрионални дефекти и висока честота на аборти. Увреждането на спермалната ДНК много по-често се свързва с оксидативен стрес, отколкото с процеса на апоптоза (*Barroso, G et al., 2000*).

При групиране на инфертилните мъже на такива с идиопатичен и с неизяснен инфертилитет, установихме по-нисък процент прогресивна подвижност, нормална морфология и по-висок процент на DFI при двете инфертилни групи спрямо фертилните контроли. Същата закономерност следват и нивата на TAC, които негативно корелират със спермалните показатели. Нивата на TAC в нашето проучване са най-ниски в групата на мъжете с идиопатичен инфертилитет.

Fazeli F et al., (2016); Gholinezhad M et al., (2020) в своите проучвания еднозначно показват по-ниски нива на TAC при мъже с идиопатичен инфертилитет и установяват силно положителна корелация между подвижността, концентрацията и морфологията на сперматозоидите и семиналните нива на TAC при инфертилни мъже. Тези закономерности не бяха потвърдени от нашите резултати, но те са в съгласие с проучване проведено в Cleveland Clinic, Ohio 2001, което установява, че мъже с неизяснен инфертилитет и данни за

нормозооспермия имат по-ниски нива на ТАС спрямо доказано фертилни мъже (*Pasqualotto F et al., 2001*).

Отчетените разлики за TZI между мъжете с неизяснен и идиопатичен инфертилитет и липсващата разлика по отношение на процента нормална морфология, също повдига редица въпроси. Тъй като сперматозоидната морфология позитивно корелира с други аспекти на спермалното качество (концентрация, подвижност и виталитет), на базата на популационни изследвания изолираното влошаване на сперматозоидната морфология може да даде отражение върху оплодителната способност, дори когато се наблюдава очевидно нормално качество на спермата.

От важно значение е ситуацията, когато се наблюдава очевидно разминаване между „нормална” морфология и TZI. В тези случаи строго трябва да се следва препоръката резултатите винаги да се интерпретират във връзка с оценката на TZI, защото този параметър предоставя допълнителна информация за процеса на образуване на годни за оплождане сперматозоиди по време на спермиогенезата (*Mortimer D et al., 2001*). Повишените стойности на TZI показват повишен риск за нарушение на сперматогенезата и съпътстващо наличие на сперматозоидна дисфункция, макар по време на наблюдението сперматозоидите да изглеждат нормални. TZI >1.80 е индикатор, че сперматозоидната морфология е вероятен допринасящ фактор за инфертилитета в двойката и за понижения оплодителен потенциал при мъжа; при стойности ≤1.60 няма повишен риск по отношение на мъжкия фактор и на процеса на оплождане *in vivo*. TZI >1.80 е индикатор, че сперматозоидната морфология е вероятен допринасящ фактор за непостигане на успех при оплождане *in vitro* (IVF) и, че трябва да се пристъпи към интрацитоплазмено инжектиране на сперматозоид в яйцеклетката (ICSI). При стойности 1.60 - 1.80 също има вероятност да не се постигне оплождане чрез, а към ICSI процедура трябва да се подходи внимателно. При TZI <1.60 се смята, че *in vivo* оплождането е възможно и TZI има по-голяма прогностична стойност, отколкото процента на нормалните форми при *in vitro* оплождане (*Kruger F et al., 2004*).

В заключение може да кажем, че нормалните спермални показатели не са гаранция за плодовитостта на един мъж, но оценката на ОС чрез измерване на ТАС може да разграничи фертилните мъже с данни за нормозооспермия от мъжете с неизяснен инфертилитет. В случаите на неизяснен инфертилитет възможно лечение е антиоксидантната терапия.

3. Резултати от измерване на интрацелуларните нива на водороден пероксид (H₂O₂) и супероксиден анион (O₂^{•-}).

Семенните проби бяха събрани в периода от септември, 2018г. до септември, 2019 г. от 40 доброволци, разделени на две групи – фертилни (n=14) на средна възраст 33.14±5,736 и инфертилни мъже с данни за идиопатичен инфертилитет (n=26) на средна възраст 36.5±5,9.

Пробите бяха подложени на “swim up” техника за селекция на сперматозоиди. Селектираните сперматозоиди бяха белязани за оценка на вътреклетъчните нива на водороден пероксид и супероксиден анион. Вътреклетъчните нива на H₂O₂ се определихме с дихлорофлуоресцин диацетат (DCFH-DA), а O₂^{•-} с дихидроетиридиум (DHE). За всяка проба

бяха анализирани минимум 10 000 белязани сперматозоиди при скорост на потока <100 клетки/секунда.

Статистически анализ на получените резултати

Всички параметри бяха тествани за нормалност на разпределението чрез Shapiro-Wilk W test. Според този тест нормално разпределени са само показателите „възраст”, „подвижност” и „жизненоспособни сперматозоиди в III квадрант, белязани с DCF”.

Таблица 30. Тест на Shapiro-Wilk за разпределение на данните от изследваните показатели. Равномерно разпределени са тези с $p > 0,05$. В червено са отбелязани показателите с $p < 0,05$, т.е тези с неравномерно разпределение.

| Df = 40 | Statistic (W) | Sig. (p) |
|--|----------------------|-----------------|
| Възраст (години) | ,971 | ,394 |
| Въздържание (дни) | ,828 | ,000 |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | ,979 | ,637 |
| Концентрация (mill/mL) | ,850 | ,000 |
| Нормална Морфология (%) | ,890 | ,001 |
| TZI | ,945 | ,049 |
| DFI (%) | ,826 | ,000 |
| HDFI (%) | ,875 | ,000 |
| HDS (%) | ,930 | ,016 |
| I кв. DCF (H ₂ O ₂) (%) | ,846 | ,000 |
| II кв. DCF (H ₂ O ₂) (%) | ,906 | ,003 |
| III кв. DCF (H ₂ O ₂) (%) | ,953 | ,095 |
| IV кв. DCF (H ₂ O ₂) (%) | ,792 | ,000 |
| I кв. DHE (O ₂ ⁻) (%) | ,770 | ,000 |
| II кв. DHE (O ₂ ⁻) (%) | ,831 | ,000 |
| III кв. DHE (O ₂ ⁻) (%) | ,909 | ,004 |
| IV кв. DHE (O ₂ ⁻) (%) | ,629 | ,000 |

Легенда:

I кв. DCF (H₂O₂) – апоптотични сперматозоиди

II кв. DCF (H₂O₂) – апоптотични сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на H₂O₂

III кв. DCF (H₂O₂) – жизненоспособни сперматозоиди

IV кв. DCF (H₂O₂) – жизненоспособни сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на H₂O₂

I кв. DHE (O₂^{•-}) – жизненоспособни сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на O₂^{•-}

II кв. DHE ($O_2^{\bullet-}$) – апоптотични сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на $O_2^{\bullet-}$

III кв. DHE ($O_2^{\bullet-}$) – жизнеспособни сперматозоиди

IV кв. DHE ($O_2^{\bullet-}$) – апоптотични сперматозоиди

Таблица 31. Групова статистика на показателите с равномерно разпределени данни, представени със средна стойност, стандартно отклонение и стандартна грешка.

| | | Брой проби | Средна стойност | Стандартно отклонение | Стандартна грешка |
|-------------------------------|------------|------------|-----------------|-----------------------|-------------------|
| Възраст (години) | Инфертилни | 26 | 36,54 | 5,894 | 1,156 |
| | Фертилни | 14 | 33,14 | 5,736 | 1,533 |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | Инфертилни | 26 | 37,46 | 13,155 | 2,580 |
| | Фертилни | 14 | 51,71 | 9,786 | 2,615 |
| III кв. DCF (H_2O_2) (%) | Инфертилни | 26 | 57,49 | 17,274 | 3,387 |
| | Фертилни | 14 | 73,54 | 17,106 | 4,571 |

Таблица 32. Сравняване на равномерно разпределените данни с t-критерия на Стюдънт.

| Equal variances assumed | Levene's Test for Equality of Variances | | t-test for Equality of Means | | | | | | |
|-------------------------------|---|------|------------------------------|----|-----------------|-----------------|-----------------------|---|--------|
| | F | Sig. | t | df | Sig. (2-tailed) | Mean Difference | Std. Error Difference | 95% Confidence Interval of the Difference | |
| | | | | | | | | Lower | Upper |
| Възраст (години) | ,066 | ,799 | -1,754 | 38 | ,088 | -3,396 | 1,936 | -7,315 | ,524 |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | 2,390 | ,130 | 3,551 | 38 | ,001 | 14,253 | 4,014 | 6,127 | 22,378 |
| III кв. DCF (H_2O_2) (%) | ,004 | ,948 | 2,812 | 38 | ,008 | 16,048 | 5,707 | 4,494 | 27,602 |

Двете групи не се различават по възраст - $t(38)=1,754$; $p=0,088$. Двете групи статистически се различават по прогресивна подвижност (a+b%) - $t(38)=3,55$; $p=0,001$. – фертилните са с по-висока подвижност. Жизнено способните сперматозоиди белязани по DCF се различават статистически - $t(38)=2,812$; $p=0,008$, като процентът на жизнеспособните сперматозоиди, белязани с DCF е по-висок в групата на фертилните.

Неравномерно разпределени показатели

Таблица 33. Статистически данни за неравномерно разпределените показатели. Представени са средните стойности и медианите с минималните и максималните стойности.

| Изследвани групи | | TZI | DFI % | HDS % | HDFI % | I кв. DCF (H ₂ O ₂) % | II кв. DCF (H ₂ O ₂) % | IV кв. DCF (H ₂ O ₂) % | I кв. DHE (O ₂ ⁻) % | II кв. DHE (O ₂ ⁻) % | III кв. DHE (O ₂ ⁻) % | IV кв. DHE (O ₂ ⁻) % |
|------------------|--------|------|-------|-------|--------|--|---|---|--|---|--|---|
| Фертилни | Median | 1,2 | 6,32 | 1,89 | 8,58 | 5,725 | 10,405 | 2,6 | 4,22 | 1,2 | 6,32 | 1,89 |
| | Min | 1,11 | 4,42 | 0,68 | 3,92 | 1,28 | 1,2 | 0,64 | 1,2 | 1,3 | 49,28 | 0,08 |
| | Max | 1,39 | 29,8 | 5,88 | 11,8 | 28,96 | 15,64 | 17,64 | 17,69 | 17,58 | 97,94 | 20,55 |
| Инфертилни | Median | 1,45 | 13,05 | 5,15 | 7,32 | 8,03 | 23,735 | 2,78 | 4,375 | 1,45 | 13,05 | 5,15 |
| | Min | 1,21 | 6,6 | 1,6 | 4,24 | 1,51 | 8,9 | 0,6 | 1,02 | 1,44 | 36,12 | 0,08 |
| | Max | 1,64 | 37,9 | 17 | 17,1 | 32,72 | 61,9 | 16,76 | 36,57 | 59,89 | 93,06 | 5,16 |

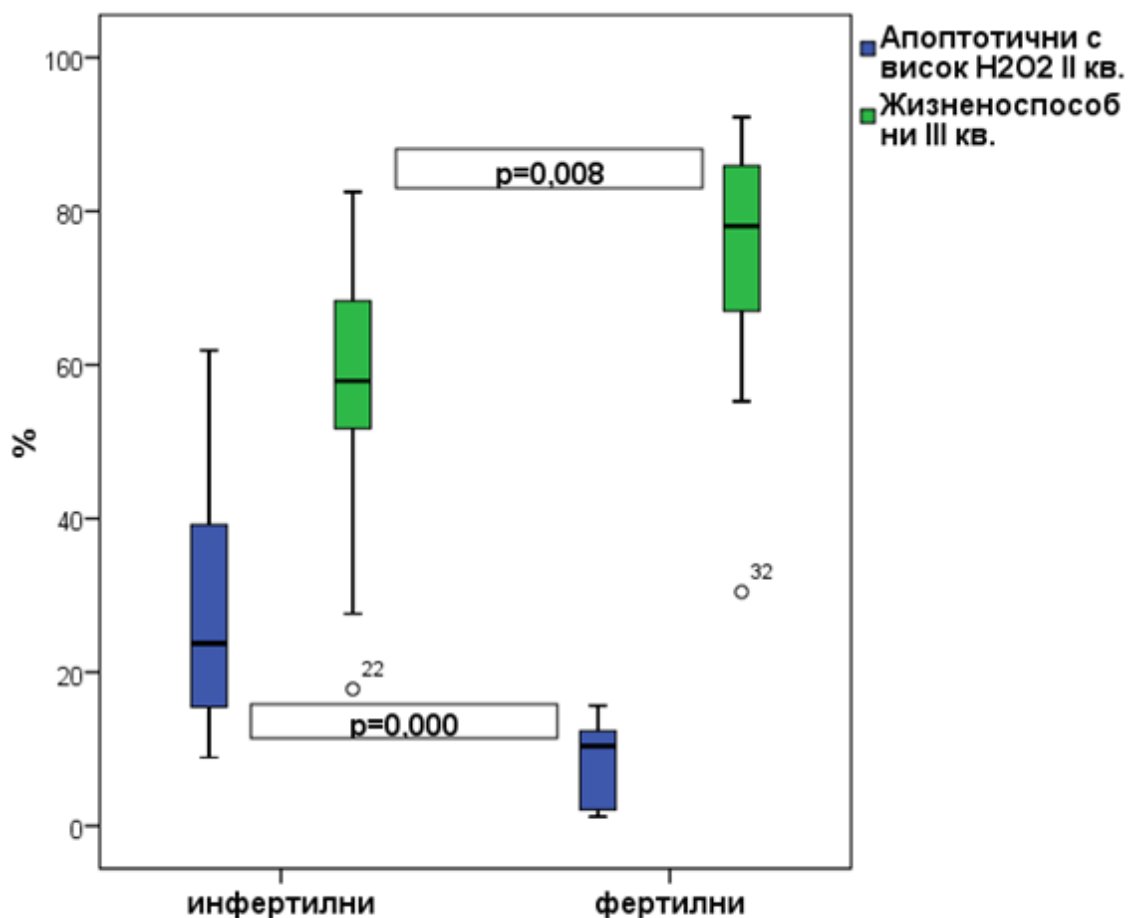
Таблица 34. Статистически данни за неравномерно разпределените показатели, сравнени с Mann - Whitney U тест.

| | | |
|---|----------|----------|
| Въздържание (дни) | U=180.5 | P=0.967 |
| Концентрация (mill/mL) | U= 59.5 | P= 0.000 |
| Нормална морфология (%) | U= 0.000 | P= 0.000 |
| TZI | U= 70.5 | P= 0.001 |
| DFI (%) | U= 20 | P= 0.000 |
| HDFI (%) | U= 31.5 | P= 0.000 |
| HDS (%) | U= 178 | P= 0.922 |
| I кв. DCF (H ₂ O ₂) (%) | U= 181 | P= 0.989 |
| II кв. DCF (H ₂ O ₂) (%) | U= 20 | P= 0.000 |
| IV кв. DCF (H ₂ O ₂) (%) | U= 145 | P= 0.305 |
| I кв. DHE (O ₂ ⁻) (%) | U= 170 | P= 0.747 |
| II кв. DHE (O ₂ ⁻) (%) | U= 122.5 | P= 0.92 |
| III кв. DHE (O ₂ ⁻) (%) | U= 154 | P= 0.440 |
| IV кв. DHE (O ₂ ⁻) (%) | U= 164 | P= 0.624 |

Двете групи не се различават по дни на въздържание - U=180,5; p=0,967; Концентрацията е значимо по-висока при фертилните (средно 103 млн./мл) спрямо инфертилните (53 млн./мл) p=0,000, както и морфологията (средно 5 % към 1%) p=0,000.

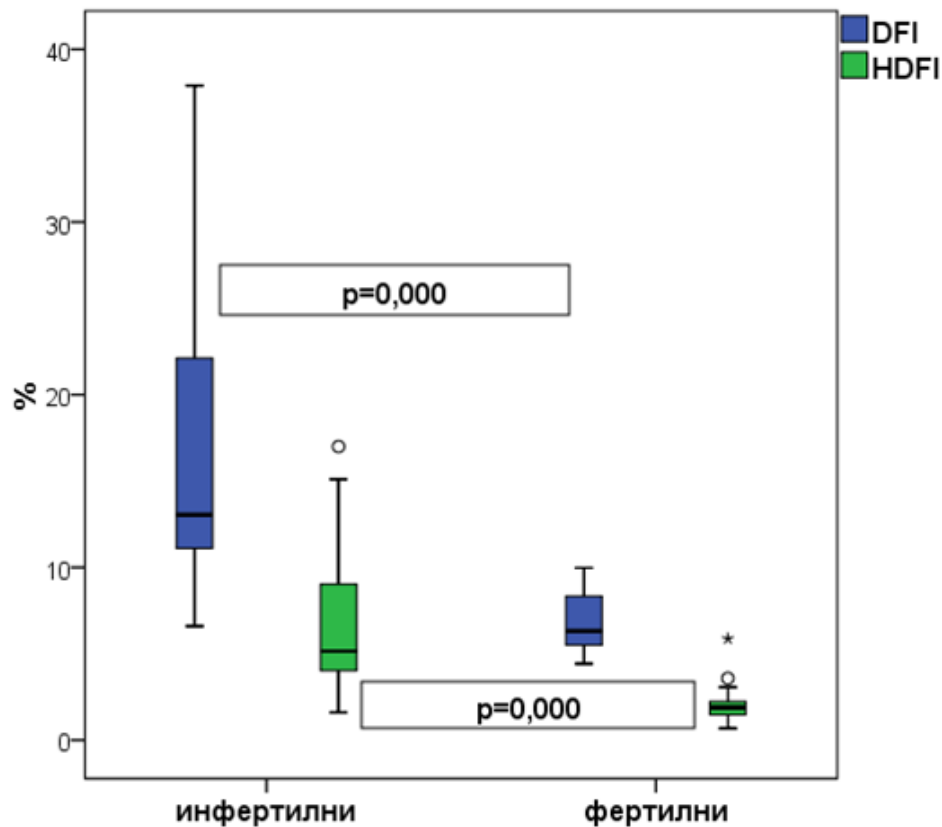
От флоуцитометрично измерените интрацелуларни нива на H₂O₂ и O₂⁻ двете групи значимо се различават по H₂O₂ измерен в II квадрант (II кв. DCF (апоптотични сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на H₂O₂), съответно (10.4%) спрямо инфертилните (23.7%) p=0.000 и по III квадрант (жизненоспособни сперматозоиди), съответно (73,54±17,11) спрямо (57,49±3,38) p=0.008. Измереният O₂⁻ не се различава в нито

един от квадрантите. Най-близко до статистическа значимост е II квадрант (апоптотични с високо интрацелуларно съдържание на $O_2\bullet^-$) ($p=0,092$), (фиг.13).



Фигура 13. Бокс-плот диаграми на апоптотични сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на H_2O_2 и жизнеспособни сперматозоиди

При показателите от рутинния семенен анализ и SDI-теста изследваните групи се различават статистически по TZI, DFI, HDFI, но не и по HDS (брой сперматозоиди с незрял хроматин). TZI се различава статистически (1.2 при фертилните и 1.45 при инфертилните, $p=0.001$). ДНК фрагментационният индекс и HDFI също се различават статистически между двете изследвани групи, съответно DFI 6.32% при фертилните спрямо инфертилните 13.05%, $p=0.000$ и HDFI при фертилни - 8.58% спрямо инфертилните (7.32%) $p=0.000$, (фиг.14).



Фигура 14. Бокс-плот диаграми за DFI и HDFI

Таблица 35. Корелации между стойностите на всички изследвани показатели по Spearman's.

| Spearman's rho | Възраст (години) | (a+b%) | Концтр. (mill/mL) | Норм. морф. (%) | TZI | DFI (%) | HDFI (%) | HDS (%) | I кв. DCF (H ₂ O ₂) (%) | II кв. DCF (H ₂ O ₂) (%) | III кв. DCF | IV кв. DCF | I кв. DHE (O ₂ ⁻) (%) | II кв. DHE (O ₂ ⁻) (%) | III кв. DHE (O ₂ ⁻) (%) | IV кв. DHE (O ₂ ⁻) (%) |
|---|------------------|--------|-------------------|-----------------|--------------|---------|----------|---------|--|---|-------------|------------|--|---|--|---|
| Възраст (години) | r | | | | | | | | | | | | | | | |
| | p | | | | | | | | | | | | | | | |
| Прогреси вна подвижност (a+b%) | r | ,011 | | | | | | | | | | | | | | |
| | p | ,945 | | | | | | | | | | | | | | |
| Концентрация (mill/mL) | r | ,010 | ,471** | | | | | | | | | | | | | |
| | p | ,950 | ,002 | | | | | | | | | | | | | |
| Нормална морфология (%) | r | -,105 | ,605** | ,644** | | | | | | | | | | | | |
| | p | ,519 | ,000 | ,000 | | | | | | | | | | | | |
| TZI | r | -,082 | -,658 | -,377 | -,576 | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|---|------|------|------|------|------|-----|-----|------|------|------|-----|------|------|--|--|--|--|--|
| | | | ** | * | ** | | | | | | | | | | | | | | |
| | p | ,617 | ,000 | ,016 | ,000 | | | | | | | | | | | | | | |
| DFI (%) | r | ,190 | - | - | - | ,555 | | | | | | | | | | | | | |
| | | | ,560 | ,670 | ,671 | ** | | | | | | | | | | | | | |
| | p | ,241 | ,000 | ,000 | ,000 | ,000 | | | | | | | | | | | | | |
| HDFI (%) | r | ,274 | - | - | - | ,433 | ,84 | | | | | | | | | | | | |
| | | | ,389 | ,631 | 608 | ** | 8** | | | | | | | | | | | | |
| | p | ,087 | ,013 | ,000 | ,000 | ,005 | ,00 | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | 0 | | | | | | | | | | | | | |
| HDS (%) | r | - | - | - | - | ,370 | ,21 | ,21 | | | | | | | | | | | |
| | | ,182 | ,403 | ,173 | ,023 | * | 8 | 2 | | | | | | | | | | | |
| | p | ,260 | ,010 | ,285 | ,886 | ,019 | ,17 | ,19 | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | 6 | 0 | | | | | | | | | | | | |
| I KB. DCF (H ₂ O ₂) (%) | r | ,208 | ,206 | ,095 | ,061 | ,081 | - | ,02 | - | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | ,08 | 3 | ,098 | | | | | | | | | | |
| | p | ,197 | ,202 | ,560 | ,709 | ,618 | ,61 | ,88 | ,548 | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | 2 | 6 | | | | | | | | | | | |
| II KB. DCF (H ₂ O ₂) (%) | r | ,250 | - | - | - | ,347 | ,52 | ,49 | ,023 | ,073 | | | | | | | | | |
| | | | ,350 | ,446 | ,702 | * | 9** | 1** | | | | | | | | | | | |
| | p | ,119 | ,027 | ,004 | ,000 | ,028 | ,00 | ,00 | ,886 | ,655 | | | | | | | | | |
| | | | | | | | 0 | 1 | | | | | | | | | | | |
| III KB. DCF (H ₂ O ₂) (%) | r | - | ,081 | ,231 | ,334 | - | - | - | - | - | | | | | | | | | |
| | | ,438 | | | * | ,244 | ,20 | ,39 | ,050 | ,508 | ,591 | | | | | | | | |
| | p | ,005 | ,621 | ,151 | ,035 | ,129 | ,21 | ,01 | ,759 | ,001 | ,000 | | | | | | | | |
| | | | | | | | 6 | 1 | | | | | | | | | | | |
| IV KB. DCF (H ₂ O ₂) (%) | r | ,233 | ,174 | ,286 | - | - | - | - | - | ,110 | ,077 | - | | | | | | | |
| | | | | | ,031 | ,002 | ,13 | ,20 | ,140 | | | ,17 | | | | | | | |
| | p | ,148 | ,282 | ,073 | ,851 | ,989 | ,40 | ,20 | ,387 | ,499 | ,639 | ,27 | | | | | | | |
| | | | | | | | 0 | 5 | | | | 4 | | | | | | | |
| I KB. DHE (O ₂ ⁻) (%) | r | ,294 | - | - | - | ,018 | ,17 | ,00 | ,230 | - | ,203 | - | - | | | | | | |
| | | | ,416 | ,115 | ,137 | | 7 | 1 | | ,401 | | ,04 | ,033 | | | | | | |
| | p | ,065 | ,008 | ,478 | ,401 | ,914 | ,27 | ,99 | ,153 | ,010 | ,209 | ,80 | ,839 | | | | | | |
| | | | | | | | 4 | 5 | | | | 1 | | | | | | | |
| II KB. DHE (O ₂ ⁻) (%) | r | - | - | - | - | ,448 | ,42 | ,31 | ,441 | - | ,223 | ,00 | - | ,246 | | | | | |
| | | ,106 | ,622 | ,324 | ,505 | ** | 0** | 4* | ** | ,259 | | 5 | ,308 | | | | | | |
| | p | ,517 | ,000 | ,041 | ,001 | ,004 | ,00 | ,04 | ,004 | ,107 | ,166 | ,97 | ,053 | ,126 | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|---------------|---------------|-----------------|--------------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|---------------|---------------|----------|
| | | | | | | 7 | 8 | | | | 6 | | | | | | |
| III кв. DHE (O ₂ ^{•-}) (%) | r | - ,065 | ,538 ** | ,245 | ,353 * | - ,223 | - ,23 9 | - ,24 4 | - ,457 ** | ,254 ,123 | - ,10 1 | ,199 | - ,471 * | - ,796 ** | | | |
| | p | ,688 | ,000 | ,128 | ,026 | ,167 | ,13 8 | ,13 0 | ,003 | ,113 | ,450 | ,53 4 | ,219 | ,002 | ,000 | | |
| IV кв. DHE (O ₂ ^{•-}) (%) | r | - ,047 | - ,048 | - ,132 | - ,123 | ,032 | - ,01 2 | ,01 5 | - ,133 | ,177 ,067 | - ,04 2 | - ,181 | - ,209 | ,135 | - ,16 2 | | |
| | p | ,775 | ,769 | ,418 | ,451 | ,843 | ,94 3 | ,92 7 | ,412 | ,276 | ,682 | ,79 6 | ,263 | ,19 5 | ,406 | ,31 7 | |
| Въздърж ание (дни) | r | - ,156 | - ,257 | - ,162 | - ,134 | ,205 | ,19 5 | ,13 0 | ,090 | ,007 | ,032 | - ,03 3 | - ,458 ** | - ,045 | ,284 | - ,16 2 | ,1 04 |
| | p | ,336 | ,110 | ,318 | ,409 | ,206 | ,22 7 | ,42 3 | ,581 | ,966 | ,846 | ,84 1 | ,003 | ,782 | ,075 | ,31 7 | ,5 22 |

Легенда:

I кв. DCF (H₂O₂) – апоптотични сперматозоиди

II кв. DCF (H₂O₂) – апоптотични сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на H₂O₂

III кв. DCF (H₂O₂) – жизнеспособни сперматозоиди

IV кв. DCF (H₂O₂) – жизнеспособни сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на H₂O₂

I кв. DHE (O₂^{•-}) – жизнеспособни сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на O₂^{•-}

II кв. DHE (O₂^{•-}) – апоптотични сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на O₂^{•-}

III кв. DHE (O₂^{•-}) – жизнеспособни сперматозоиди

IV кв. DHE (O₂^{•-}) – апоптотични сперматозоиди

Прогресивната подвижност е в силна положителна корелация с концентрацията на сперматозоидите ($r=0.471$; $p<0.01$). Силно отрицателна корелационна зависимост установяваме между прогресивната подвижност и TZI ($r=-0.658$; $p<0.01$), DFI ($r=-0.560$; $p<0.01$), HDS ($r=-0.403$; $p<0.01$). Корелационната зависимост между HDFI и прогресивната подвижност също е отрицателна ($r=-0.389$; $p<0.05$).

От флоуцитометричния анализ за детекция на вътреклетъчния водороден пероксид откриваме отрицателна корелационна зависимост между апоптотичните сперматозоиди с високо вътреклетъчно съдържание на H₂O₂ и прогресивната подвижност ($r=-0.350$; $p<0.05$). Силна отрицателна корелация наблюдавахме и между прогресивната подвижност и жизнеспособните сперматозоиди с високи интрацелуларни нива на супероксиден анион ($r=-0.416$; $p<0.01$), както и между апоптотичните с високо интрацелуларно съдържание на супероксиден анион ($r=-0.622$; $P<0.01$).

Силна положителна корелация беше установена между прогресивната подвижност и жизненоспособните сперматозоиди, белязани за вътреклетъчни нива на супероксиден анион ($r=0.538$; $P<0.01$).

По отношение на концентрацията на сперматозоидите установихме значителни отрицателни корелационни зависимости с DFI и HDFI ($r=-0.670$; -0.631 ; $P<0.01$). Слаба отрицателна корелация установихме между TZI и концентрацията ($r=-0.377$; $P<0.05$). Силна положителна корелация установихме между концентрацията и морфологията ($r=0.644$; $P<0.05$) на сперматозоидите.

Установихме силно отрицателна корелационна зависимост между концентрацията на сперматозоидите и апоптотичните сперматозоиди с високи интрацелуларни нива на водороден пероксид ($r=-0.446$; $P<0.01$) и слаба отрицателна корелационна зависимост между концентрацията и апоптотичните сперматозоиди с високи интрацелуларни нива на супероксиден анион ($r=-0.324$; $P<0.05$).

Морфологията корелира отрицателно освен с TZI, DFI, HDFI ($r=-0.576$; -0.671 ; -0.608 ; $P<0.01$), така и с апоптотичните сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на водороден пероксид и супероксиден анион ($r=-0.702$; -0.505 $P<0.01$). Положителна корелационна зависимост беше установена между морфологията и жизненоспособните сперматозоиди ($r=0.334$; 0.353 ; $P<0.05$).

TZI корелира силно положително с DFI, HDFI ($r=0.555$; 0.433 ; $P<0.01$), а в слаба положителна корелационна зависимост е с HDS ($r=0.370$; $P<0.05$) и апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на водороден пероксид ($r=0.347$; $P<0.05$). TZI корелира също и с апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на супероксиден анион ($r=0.448$; $P<0.01$).

DFI силно положително корелира с HDFI ($r=0.848$; $P<0.01$), апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на водороден пероксид ($r=0.529$; $P<0.01$) и с апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на супероксиден анион ($r=0.420$; $P<0.01$).

HDFI силно положително корелира с апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на водороден пероксид ($r=0.491$; $P<0.01$) и слабо положително корелира с апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на супероксиден анион ($r=0.314$; $P<0.05$) и отрицателно корелира с живите сперматозоиди, белязани с DCF ($r=0.398$; $P<0.05$).

HDS силно положително корелира с апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на супероксиден анион ($r=0.441$; $P<0.01$) и силно негативно корелира с витално живите сперматозоиди белязани с DHE ($r=-0.547$; $P<0.01$) (табл. 34).

Корелации за флоуцитометричния анализ

Корелации за водороден пероксид

Значителни отрицателни корелационни зависимости се установяват между процента на жизненоспособните и апоптотичните сперматозоиди ($r=-0.508$; $P<0.01$). Наблюдава се и силно отрицателна корелация между жизненоспособните сперматозоиди и апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на водороден пероксид ($r=-0.591$; $P<0.01$)

Корелации за супероксиден анион

Жизненоспособните сперматозоиди корелират силно негативно с жизненоспособните сперматозоиди, които са високо съдържание на супероксиден анион ($r=-0.471$; $P<0.01$) и апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на супероксиден анион ($r=-0.796$; $P<0.01$) Въздържанието корелира силно негативно с жизненоспособните сперматозоиди с високо съдържание на водороден пероксид ($r=-0.458$; $P<0.01$), (фиг. 34).

3.1. Дискусия на резултатите от измерването на интрацелуларните нива на водороден пероксид (H_2O_2) и супероксиден анион ($O_2^{\bullet-}$) чрез флоуцитометричен анализ.

Целта на това проучване беше да измерим интрацелуларните нива на H_2O_2 и $O_2^{\bullet-}$ и да потърсим връзка между измерените нива, спермалните показатели и DFI в свежи проби на фертилни и инфертилни мъже с данни за идиопатичен инфертилитет, обработени чрез „swim up“ техника.

В този експеримент установихме статистически значими разлики по отношение на прогресивната подвижност ($51,71\pm 2,61$ спрямо $37,46\pm 2,58$ $p=0,001$), концентрацията на сперматозоидите на мл. (средно 103 млн./мл спрямо 53 млн./мл $p=0,000$), процентът сперматозоиди с нормална морфологията (средно 5% спрямо 1% $p=0,000$) и TZI (1.2 спрямо 1.45 $p=0.001$) при фертилни спрямо инфертилни.

Въпреки нормалната прогресивна подвижност и концентрация на сперматозоидите в двете изследвани групи, мъжете във фертилната група показват значително по-добри показатели спрямо долните граници, упоменати в препоръките на СЗО от 2010 година.

По отношение на ДНК-фрагментацията, не установяваме патологични отклонения в стойностите на DFI, но откриваме статистически значима разлика между двете изследвани групи, съответно (6,32%) при фертилните спрямо инфертилните (13,05%) $p=0.000$. Установяваме още и статистически значима разлика между HDFI при фертилните (8.58%) спрямо инфертилните (7.32%) $p=0.000$.

Наблюдаваните от нас статистически значими разлики при показателите от семенният анализ и SDI-теста, показаха еднозначно, че фертилните мъже имат по-добри показатели.

Като причина за влошената морфология може да отбележим липидната пероксидация и апоптозата, за които съдим по значително по-ниския процент жизненоспособни сперматозоиди и по-високия процент апоптотични сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на H_2O_2 в групата на инфертилните.

Логични следствия на липидната пероксидация е повишения DFI и апоптоза. Негативният ефект на задействаната апоптоза след настъпила липидна пероксидация върху спермалното качество е наблюдавана от *Alpana Singh et al., (2019)*. Проучването докладва по-висока активност на каспаза 3 в спермални проби от мъже с тератозооспермия, сравнени с фертилни контроли. Проучването е в съгласие с нашите резултати, показващи значима разлика за двете изследвани групи по отношение на процентът на апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на интрацелуларен H_2O_2 , фертилни (10.405%) спрямо инфертилни (23.735%) ($p=0.000$).

Молекулните механизми на увреда на спермалната клетка от РФК са добре проучени. РФК атакуват фосфолипидната мембрана на спермалната клетка, тъй като в състава ѝ влизат

основно полиненаситени мастни киселини, което ги прави силно податливи на липидна пероксидация. Липидната пероксидация води до нарушен мембранен потенциал и повишена мембранна пропускливост за АТФ, което намалява прогресивната подвижност на сперматозоидите и повишава ДНК-фрагментацията (*Alvarez JG et al., 1984; Cheeseman K et al., 1993*).

Прогресивната подвижност при всички изследвани мъже в нашето проучване е в негативна връзка с процента на апоптотичните сперматозоиди и жизненоспособните сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на H_2O_2 и $O_2^{\bullet-}$. Това може да се обясни с факта, че процентът на прогресивно подвижни сперматозоиди намалява при патологично високи нива на РФК, тъй като се увеличава процентът на мъртвите сперматозоиди, които се явяват генератори на РФК (*Reda Z et al., 2010*).

Силно отрицателната корелационна зависимост между DFI и апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на водороден пероксид ($r=0.529$ $P<0.01$) и апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на супероксиден анион ($r=0.420$; $P<0.01$), потвърждава тезата за токсичния ефект на РФК върху компактността на спермалната ДНК.

В литературата съществуват сериозен брой проучвания показващи негативния ефект от повишения DFI при постигането и завършването на една клинична бременност. Фертилните мъже в това проучване са с $DFI < 10\%$, но и инфертилните не надвишават 15% DFI. В подкрепа на нашите наблюдения (*Giwerzman A et al., 2010*), установяват, че мъжете с DFI между 10% и 20% имат повишен риск от непостигане на клинична бременност в сравнение с мъже с $DFI < 10\%$, но мъжкия инфертилитет се среща с най-висока честота при $DFI > 20\%$.

По-високите нива на апоптотични сперматозоиди с високо съдържание на H_2O_2 може да се дължи още и на конвенционалните методи на обработка на сперматозоидите за целите на АРТ. Центрофугирането на сперматозоидите при обработка може да увеличи активността на ензима СОД, който да преобразува $O_2^{\bullet-}$ в H_2O_2 , като последният от своя страна може да се окаже фатален за сперматозоидите (*Burnaugh L et al., 2007*). Това преобразуване може да намали нивата на СОД както при зрели, така и при незрели сперматозоиди, въпреки това зрелите сперматозоиди може да имат по-високи нива на каталазна активност в сравнение с незрелите, което да и осигури по-ефективно очистване на генерирания H_2O_2 .

Не откриваме значима корелационна зависимост между апоптотичните сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на $O_2^{\bullet-}$, но наблюдаваме близка до статистическа значимост разлика $p=0.092$.

Все по-голям брой проучвания показват благоприятния ефект от употребата на антиоксиданти в лечението на мъжкия инфертилитет (*Ashok Agarwal et al., 2021*). Въпреки това поради високата хетерогенност на използваните методи за анализ, проучванията не могат с точност да покажат ефекта от приема на антиоксиданти.

В заключение можем да кажем, че прогресивната подвижност и нормалната морфологията на сперматозоидите в групата на инфертилните са значително по-ниски спрямо фертилната група. ДНК-фрагментацията е по-висока в групата на инфертилните. Освен това установената значителна корелационна зависимост между DFI и апоптотичните сперматозоиди с високо съдържание на H_2O_2 , показва, че високите нива на интрацелуларни

РФК генерирани от апоптотични сперматозоиди повишават ДНК-фрагментацията и понижават прогресивната подвижност.

По-високите вътреклетъчни нива на H_2O_2 и $O_2^{\bullet-}$, както и повишеният процент на ДНК-фрагментация при инфертилни мъже с данни за тератозооспермия, спрямо фертилни, могат да се считат като показания за инфертилитет, настъпил вследствие на оксидативен стрес. Противопоставянето с антиоксиданти е надежден метод на лечение при тези мъже, тъй като оксидативния стрес намалява репродуктивния потенциал на сперматозоидите им, но са необходими допълнителни контролирани палцебо проучвания с използването на универсални методи за оценка на DFI и ОС.

4. Резултати от влиянието на криоконсервацията и обработката на сперматозоиди върху DFI при мъже с идиопатичен и неизяснен инфертилитет. Нива на малондиалдехид. Нива на екстра и интрацелуларни антиоксиданти – каталаза, глутатион и глутатион пероксидаза.

Затова проучване бяха събрани семенни проби от 42 доброволци, разделени първоначално на две основни групи – фертилни (n=18) и инфертилни (n =24).

В инфертилната група мъжете бяха разделени на две подгрупи:

мъже с идиопатичен инфертилитет (n=12)

мъже с неизяснен инфертилитет (n=12)

Всяка проба беше разделена на две равни части и подложена на допълнителна обработка, която включваше отделянето на семенна плазма и на сперматозоиди през двоен плътностен градиент. Семенната плазма беше замразена при $-70^{\circ}C$, а сепарираниите сперматозоиди обработени с криопротектант SpermFreeze на FertiPro и замразени при $-196^{\circ}C$. След събиране на пробите, замразените сперматозоиди бяха размразени и подложени на SDI тест за оценка на интегритета на спермалната ДНК и бяха измерени следните екстра- и интрацелуларни показатели:

Малондиалдехид (МДА) ($\mu mol/mL$)

Каталаза ($nmol/ml/min$)

Глутатион (GSH) ($\mu mol/mL$)

Глутатион пероксидаза (GPx) ($nmol/ml/min$)

Статистически анализ на получените резултати

Нормалност на разпределението

Всички параметри бяха тествани за нормалност на разпределението чрез ShapiroWilk W тест. (табл. 35).

Таблица 36. Тест на Shapiro-Wilk за разпределение на данните от изследваните показатели. Равномерно разпределени са тези с $p > 0,05$ (в червено).

| | Statistic (W) | Df (степени на свобода) | Sig. (p) |
|---|----------------------|--------------------------------|-----------------|
| Възраст (години) | ,984 | 42 | ,829 |
| Въздържание (дни) | ,782 | 42 | ,000 |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | ,938 | 42 | ,024 |
| Концентрация (<i>mill/mL</i>) | ,853 | 42 | ,000 |
| Нормална морфология (%) | ,923 | 42 | ,007 |
| TZI | ,975 | 42 | ,492 |
| DFI преди замразяване (%) | ,928 | 42 | ,012 |
| HDS преди замразяване (%) | ,929 | 42 | ,012 |
| HDFI преди замразяване (%) | ,932 | 40 | ,018 |
| Концентрация след размразяване (<i>mill/mL</i>) | ,639 | 39 | ,000 |
| DFI след размразяване (%) | ,955 | 40 | ,111 |
| HDS след размразяване (%) | ,985 | 40 | ,870 |
| HDFI след размразяване (%) | ,910 | 40 | ,004 |
| МДА в сперматозоиди ($\mu\text{mol/mL}$) | ,765 | 18 | ,001 |
| МДА в семенна плазма ($\mu\text{mol/mL}$) | ,704 | 32 | ,000 |
| Каталаза в сперматозоиди (<i>nmol/ml/min</i>) | ,638 | 8 | ,000 |
| Каталаза в семенна плазма (<i>nmol/ml/min</i>) | ,922 | 37 | ,013 |
| GSH в сперматозоиди ($\mu\text{mol/mL}$) | ,942 | 14 | ,442 |
| GSH в семенна плазма ($\mu\text{mol/mL}$) | ,884 | 15 | ,054 |
| GPx в семенна плазма (<i>nmol/ml/min</i>) | ,774 | 22 | ,000 |
| GPx в сперматозоиди (<i>nmol/ml/min</i>) | ,855 | 22 | ,004 |

Равномерно разпределени показатели

Таблица 37. Групова статистика на показателите с равномерно разпределени данни, представени със средна стойност, стандартно отклонение и стандартна грешка.

| | | Брой изследвани проби | Средна стойност | Стандартно отклонение | Стандартна грешка |
|---|------------|-----------------------------|--------------------|--------------------------|----------------------|
| GSH в сперматозоиди ($\mu\text{mol/mL}$) | инфертилни | 6 | ,7000 | ,20000 | ,08165 |
| | фертилни | 8 | ,5375 | ,33780 | ,11943 |
| GSH в семенна плазма ($\mu\text{mol/mL}$) | инфертилни | 7 | 1,800 | ,1414 | ,0535 |
| | фертилни | 8 | 1,950 | ,4598 | ,1626 |
| Възраст (години) | инфертилни | 24 | 34,50 | 4,943 | 1,009 |
| | фертилни | 18 | 33,50 | 6,355 | 1,498 |
| TZI | инфертилни | 24 | 1,3738 | ,07488 | ,01528 |
| | фертилни | 18 | 1,3667 | ,09923 | ,02339 |
| DFI след размразяване (%) | инфертилни | 23 | 19,1343 | 12,21803 | 2,54764 |
| | фертилни | 17 | 19,5541 | 13,35390 | 3,23880 |
| HDS след замразяване (%) | инфертилни | 23 | 8,5739 | 4,11291 | ,85760 |
| | фертилни | 17 | 8,4124 | 3,56820 | ,86541 |

Показателите с равномерно разпределение на данните бяха сравнени с t-критерия на Стюдънт (Independent Samples Test).

Таблица 38. Сравняване на равномерно разпределените данни с t-критерия на Стюдънт.

| | Levene's Test for Equality of Variances | | t-test for Equality of Means | | | | | | |
|---|---|------|------------------------------|----|-----------------|-----------------|-----------------------|-------------------------|---------|
| | F | Sig. | t | df | Sig. (2-tailed) | Mean Difference | Std. Error Difference | 95% Confidence Interval | |
| | | | | | | | | Lower | Upper |
| Възраст (години) | 1,359 | ,251 | ,574 | 40 | ,569 | 1,000 | 1,742 | -2,521 | 4,521 |
| TZI | 2,097 | ,155 | ,264 | 40 | ,793 | ,00708 | ,02684 | -,04716 | ,06133 |
| DFI след размразяване (%) | ,031 | ,860 | -,103 | 38 | ,918 | -,41977 | 4,06482 | -8,64858 | 7,80904 |
| HDS след замразяване (%) | ,551 | ,462 | ,130 | 38 | ,897 | ,16156 | 1,24512 | -2,35905 | 2,68217 |
| GSH в сперматозоиди ($\mu\text{mol/mL}$) | 1,345 | ,269 | 1,043 | 12 | ,318 | ,16250 | ,15580 | -,17697 | ,50197 |
| GSH в семенна плазма ($\mu\text{mol/mL}$) | 3,247 | ,095 | -,826 | 13 | ,424 | -,1500 | ,1816 | -,5423 | ,2423 |

От таблицата се вижда, че двете групи не се различават по възраст. Няма и значими разлики при изследваните показатели.

Неравномерно разпределени показатели

Таблица 39. Дескриптивна статистика на показателите с неравномерно разпределение (средни стойности, медиани, минимални и максимални стойности)

| N = 42 | Mean | Std. Deviation | Minimum | Maximum | Percentiles | | |
|---|-------|----------------|---------|---------|-------------|---------------|--------|
| | | | | | 25th | 50th (Median) | 75th |
| Концентрация (<i>mill/mL</i>) | 8,05 | 5,9 | 1,6 | 28,2 | 37,8 | 70 | 107,3 |
| Нормална морфология (%) | 3,98 | 2,136 | 0 | 11 | 2,75 | 4,00 | 5,00 |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | 42,31 | 8,026 | 13 | 59 | 38,00 | 42,00 | 48,00 |
| DFI преди замразяване (%) | 12,9 | 6,08 | 3,62 | 30,90 | 8,02 | 12,22 | 15,94 |
| HDS преди замразяване (%) | 8,91 | 3,91 | 2,24 | 23,21 | 6,51 | 8,27 | 10,52 |
| HDFI преди замразяване (%) | 5,0 | 2,78 | ,85 | 13,21 | 2,76 | 4,73 | 6,24 |
| Концентрация след размразяване (<i>mill/mL</i>) | 9,6 | 10,4 | 2 | 60 | 3 | 7 | 12 |
| HDFI след размразяване (%) | 6,6 | 4,9 | ,24 | 16,70 | 1,96 | 5,53 | 11,4 |
| Каталаза в сперматозоиди (<i>nmol/ml/min</i>) | 53,82 | 74,43 | 6,98 | 232,54 | 9,48 | 35,26 | 51,09 |
| Каталаза в семенна плазма (<i>nmol/ml/min</i>) | 897,8 | 674,24 | -57,98 | 2577,15 | 379,96 | 886,91 | 1148,7 |
| GPx в семенна плазма (<i>nmol/ml/min</i>) | 53,35 | 73,13 | ,00 | 305,60 | ,0000 | 38,20 | 79,57 |
| GPx в сперматозоиди (<i>nmol/ml/min</i>) | 151,6 | 225,43 | ,00 | 1018,80 | ,0000 | 50,9 | 286,55 |

За да видим в коя от групите изследваният параметър има по-високи стойности изчислихме Mean Rank на показателите с неравномерно разпределение.

Таблица 40. Mean Rank на показателите с неравномерно разпределение

| | | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|---------------------------------|------------|----|-----------|--------------|
| Концентрация (<i>mill/mL</i>) | инфертилни | 24 | 21,50 | 516,00 |
| | фертилни | 18 | 21,50 | 387,00 |
| Нормална Морфология (%) | инфертилни | 24 | 16,44 | 394,50 |
| | фертилни | 18 | 28,25 | 508,50 |
| Прогресивна подвижност (a+b%) | инфертилни | 24 | 17,48 | 419,50 |
| | фертилни | 18 | 26,86 | 483,50 |
| DFI преди замразяване (%) | инфертилни | 24 | 23,50 | 564,00 |
| | фертилни | 18 | 18,83 | 339,00 |
| HDS преди замразяване (%) | инфертилни | 24 | 23,50 | 564,00 |
| | фертилни | 18 | 18,83 | 339,00 |

| | | | | |
|---|------------|----|-------|--------|
| HDFI преди замразяване (%) | инфертилни | 23 | 21,24 | 488,50 |
| | фертилни | 17 | 19,50 | 331,50 |
| Концентрация след размразяване (mill/mL) | инфертилни | 22 | 19,84 | 436,50 |
| | фертилни | 17 | 20,21 | 343,50 |
| HDFI след размразяване (%) | инфертилни | 23 | 18,98 | 436,50 |
| | фертилни | 17 | 22,56 | 383,50 |
| МДА в семенна плазма ($\mu\text{mol/mL}$) | инфертилни | 20 | 16,98 | 339,50 |
| | фертилни | 12 | 15,71 | 188,50 |
| МДА в сперматозоиди ($\mu\text{mol/mL}$) | инфертилни | 10 | 10,10 | 101,00 |
| | фертилни | 8 | 8,75 | 70,00 |
| Каталаза в сперматозоиди (nmol/ml/min) | инфертилни | 5 | 4,60 | 23,00 |
| | фертилни | 3 | 4,33 | 13,00 |
| Каталаза в семенна плазма (nmol/ml/min) | инфертилни | 21 | 18,29 | 384,00 |
| | фертилни | 16 | 19,94 | 319,00 |
| GPx в сперматозоиди (nmol/ml/min) | инфертилни | 24 | 22,33 | 536,00 |
| | фертилни | 18 | 20,39 | 367,00 |
| GPx в семенна плазма (nmol/ml/min) | инфертилни | 24 | 21,15 | 507,50 |
| | фертилни | 18 | 21,97 | 395,50 |

За да установим наличието на значими разлики между изследваните групи, приложихме теста на Mann-Whitney.

Таблица 41. Mann-Whitney U test за сравняване на показателите с неравномерно разпределени данни.

| | a+b% | Конц. млн./мл | Нормална морфология (%) | DFI преди замразяване | HDS преди замразяване | HDFI преди замразяване | HDFI след размразяване | Концентрация млн./мл след | Каталаза в сперматозоиди | GPx семенна | GPx в сперматозоиди | MDA семенна плазма | MDA в сперматозоиди | Каталаза в семенна плазма |
|---------------|-------|---------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------------|
| Mann- | 119,5 | 216, | 94,5 | 168,0 | 168,0 | 178,5 | 160,5 | 183,5 | 7,0 | 196, | 207,5 | 110,5 | 34,0 | 153,0 |
| Asymp. | ,014 | 1,0 | ,002 | ,222 | ,222 | ,642 | ,338 | ,921 | ,881 | ,589 | ,819 | ,711 | ,594 | ,646 |

От таблицата се вижда, че пробите се различават значимо единствено по морфологията. Групата инфертилни са с по-лоша морфология (Mean Rank = 16.44 спрямо 28,25 при фертилните).

Извършихме статистически анализ на инфертилните пациенти, като ги разделихме на 2 подгрупи по показател морфология. I група с тератозооспермия (n=12) и II група с нормозооспермия (n=12). При сравняване на данните в трите групи за всички показатели се потвърди нулевата хипотеза – нямаше значими различия между трите изследвани групи и затова статистическите таблици не са публикувани.

4.1. Резултати от SDI тест и концентрация на сперматозоидите преди и след обработка

За да проверим дали има значима разлика при флоуцитометричните данни (SDI теста) преди и след обработката на пробите приложихме теста Wilcoxon Signed Ranks за сравняване на повторени измервания на една и съща проба.

Таблица 42. Промяна на показателите от SDI теста на спермалните проби и тяхната концентрация след обработка и криоконсервация

| | | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|--|----------------|-----------------|-----------|--------------|
| DFI преди замразяване и след размразяване (%) | Negative Ranks | 12 ^a | 16,08 | 193,00 |
| | Positive Ranks | 28 ^b | 22,39 | 627,00 |
| | Ties | 0 ^c | | |
| HDS преди замразяване и след размразяване (%) | Negative Ranks | 24 ^d | 19,85 | 476,50 |
| | Positive Ranks | 16 ^e | 21,47 | 343,50 |
| | Ties | 0 ^f | | |
| HDFI преди замразяване и след размразяване (%) | Negative Ranks | 17 ^g | 18,00 | 306,00 |
| | Positive Ranks | 23 ^h | 22,35 | 514,00 |
| | Ties | 0 ⁱ | | |
| Концентрация на сперматозоидите преди замразяване и след размразяване (mill/mL) | Negative Ranks | 39 ^j | 20,00 | 780,00 |
| | Positive Ranks | 0 ^k | ,00 | ,00 |
| | Ties | 0 ^l | | |
| a. DFI след замразяване < DFI преди размразяване | | | | |
| b. DFI след замразяване > DFI преди размразяване | | | | |
| c. DFI след замразяване = DFI_ преди размразяване | | | | |
| d. HDS след замразяване < HDS преди размразяване | | | | |
| e. HDS след замразяване > HDS преди размразяване | | | | |
| f. HDS_ след замразяване = HDS_ преди размразяване | | | | |
| g. HDFI след замразяване < HDFI преди размразяване | | | | |
| h. HDFI след замразяване > HDFI преди размразяване | | | | |
| i. HDFI_ след замразяване = HDFI преди размразяване | | | | |
| j. концентрация млн./мл след замразяване < концентрация млн./мл след замразяване | | | | |
| k. концентрация млн./мл след замразяване > концентрация млн./мл след замразяване | | | | |
| l. концентрация млн./мл след замразяване = концентрация млн./мл след замразяване | | | | |

От таблицата се вижда, че повечето от пробите (28 от 40) имат по-високи DFI и HDFI след обработка и замразяване. HDS е по-висок след обработка и замразяване при 16 от 40 изследвани проби, а концентрацията намалява при всички изследвани проби след обработка и замразяване, което е логично следствие от промиването.

Таблица 43. Различия на изследваните параметри преди и след обработка и криоконсервация

| | DFI след обработка DFI преди обработка (%) | HDS след обработка HDS преди Обработка (%) | HDFI след обработка HDFI преди обработка | Концентра ция преди и след обработка |
|---|--|--|--|---|
| Z | -2,917 ^b | -,894 ^c | -1,398 ^b | -5,443 ^c |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | ,004 | ,371 | ,162 | ,000 |
| a. Wilcoxon Signed Ranks Test | | | | |
| b. Based on negative ranks - първото измерване на пробата е с по-ниска стойност от второто измерване | | | | |
| c. Based on positive ranks - първото измерване на пробата е с по-висока стойност от второто измерване | | | | |

От таблицата се вижда, че значими различия се наблюдават за DFI и концентрацията на пробите. DFI след обработка значимо се увеличава, а концентрацията след обработка значимо намалява.

Беше приложен теста на Spearman, за да проверим дали стойностите на показателите преди и след криоконсервация имат връзка.

Таблица 44. Корелация на изследваните показатели преди и след обработка и замразяване (по Spearman).

| | N | Correlation | Sig. |
|---|----|-------------|-------------|
| DFI преди замразяване и след размразяване (%) | 40 | ,352 | ,026 |
| HDS преди замразяване и след размразяване (%) | 40 | ,380 | ,016 |
| HDFI преди замразяване и след размразяване (%) | 40 | ,066 | ,684 |
| Концентрация на сперматозоидите преди замразяване и след размразяване (mill/mL) | 39 | ,565 | ,000 |

Всички изследвани показатели освен HDFI показаха сигнификантна зависимост, като DFI и HDS нарастват, а концентрацията намалява.

Таблица 45. Корелации между стойностите на всички изследвани показатели по Spearman's. В червено са отбелязани сигнификантно корелиращите променливи

| | GSN в сем. плазма | Каталаза в сперматозоиди | Каталаза в сем. плазма | а+b% | Концентрация млн./мл преди замразяване | Морфология | TZI | DFI преди обработка | HDS преди обработка | HDFI преди обработка | DFI след размразяване | HDS след размразяване | HDFI след размразяване | Концентрация млн./мл след размразяване | GPx в сем.плазма | GPx в сперматозоиди |
|---------------------------|-------------------|--------------------------|------------------------|--------|--|------------|-------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|--|------------------|---------------------|
| Каталаза в семенна плазма | -,611* | -,857* | | | | | | | | | | | | | | |
| | ,020 | ,007 | | | | | | | | | | | | | | |
| | 14 | 8 | | | | | | | | | | | | | | |
| а+b% | -,182 | -,359 | ,078 | ,051 | | | | | | | | | | | | |
| | ,516 | ,382 | ,647 | ,751 | | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 8 | 37 | 42 | | | | | | | | | | | | |
| Концентрация млн./мл | -,311 | -,263 | ,148 | ,084 | ,135 | | | | | | | | | | | |
| | ,259 | ,528 | ,381 | ,598 | ,392 | | | | | | | | | | | |
| | 15 | 8 | 37 | 42 | 42 | | | | | | | | | | | |
| Морфология (%) | -,253 | ,217 | ,071 | *,372* | *,442* | ,244 | | | | | | | | | | |
| | ,363 | ,606 | ,677 | ,015 | ,003 | ,120 | | | | | | | | | | |
| | 15 | 8 | 37 | 42 | 42 | 42 | | | | | | | | | | |
| TZI | ,408 | -,168 | -,098 | -,053 | -,168 | ,168 | ,091 | | | | | | | | | |
| | ,132 | ,691 | ,564 | ,739 | ,287 | ,288 | ,565 | | | | | | | | | |
| | 15 | 8 | 37 | 42 | 42 | 42 | 42 | | | | | | | | | |
| DFI преди обработка | ,124 | ,190 | -,141 | *,335* | -,190 | -,192 | -,007 | -,117 | | | | | | | | |
| | ,659 | ,651 | ,406 | ,030 | ,228 | ,224 | ,966 | ,459 | | | | | | | | |
| | 15 | 8 | 37 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | | | | | | | | |
| HDS преди | -,532* | ,262 | ,240 | ,107 | -,079 | -,048 | -,003 | ,171 | -,120 | | | | | | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------------|------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|------|--|
| | ,041 | ,531 | ,153 | ,500 | ,621 | ,762 | ,985 | ,279 | ,450 | | | | | | | | |
| | 15 | 8 | 37 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | | | | | | | | |
| HDFI преди обработка | ,283 | -,024 | -,146 | ,157 | -,058 | -,237 | ,019 | -,192 | ,595* | - | ,187 | | | | | | |
| | ,306 | ,955 | ,389 | ,332 | ,722 | ,141 | ,906 | ,235 | ,000 | ,247 | | | | | | | |
| | 15 | 8 | 37 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | | | | | | |
| DFI след размразяване | - | ,262 | -,062 | ,280 | -,199 | -,022 | -,067 | -,026 | ,336* | ,214 | ,194 | | | | | | |
| | ,162 | ,531 | ,714 | ,080 | ,218 | ,895 | ,681 | ,874 | ,034 | ,185 | ,229 | | | | | | |
| | 15 | 8 | 37 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | | | | | | |
| HDS след размразяване | - | ,214 | ,066 | ,187 | -,310 | ,012 | ,144 | ,222 | -,435* | ,323* | -,207 | ,028 | | | | | |
| | ,472 | ,610 | ,697 | ,248 | ,052 | ,942 | ,376 | ,168 | ,005 | ,042 | ,200 | ,864 | | | | | |
| | 15 | 8 | 37 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | | | | | |
| HDFI след размразяване | - | ,333 | -,119 | ,271 | -,041 | -,080 | ,024 | ,024 | ,137 | ,221 | ,114 | ,773* | ,044 | | | | |
| | ,887 | ,420 | ,482 | ,091 | ,804 | ,626 | ,885 | ,885 | ,400 | ,170 | ,484 | ,000 | ,786 | | | | |
| | 15 | 8 | 37 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | | | | |
| Концентрация мЛН./мл след | ,118 | ,024 | ,078 | -,031 | -,324* | ,441* | -,134 | ,200 | -,184 | ,104 | -,258 | -,044 | ,314 | ,010 | | | |
| | ,676 | ,955 | ,653 | ,850 | ,044 | ,005 | ,415 | ,223 | ,261 | ,528 | ,113 | ,790 | ,052 | ,953 | | | |
| | 15 | 8 | 36 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | 39 | | | |
| GPx в сем.плазма | ,009 | -,327 | ,102 | -,178 | ,225 | ,215 | -,135 | -,026 | ,112 | -,093 | -,140 | -,027 | -,398* | -,148 | ,176 | | |
| | ,974 | ,429 | ,549 | ,260 | ,152 | ,172 | ,396 | ,872 | ,482 | ,557 | ,388 | ,869 | ,011 | ,363 | ,283 | | |
| | 15 | 8 | 37 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 40 | 40 | 40 | 40 | 39 | | |
| GPx в сперматозоиди | ,112 | -,064 | -,306 | -,085 | -,108 | ,030 | -,190 | ,290 | -,073 | -,128 | -,145 | ,068 | ,171 | ,110 | -,073 | ,216 | |
| | ,691 | ,881 | ,065 | ,592 | ,498 | ,848 | ,228 | ,063 | ,644 | ,419 | ,372 | ,677 | ,292 | ,500 | ,658 | ,169 | |
| | 15 | 8 | 37 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 42 | 40 | 40 | 40 | 40 | 39 | 42 | |

** . Корелацията е значима при $p < 0.01$ level (2-tailed).

* . Корелацията е значима при $p < 0.05$ level (2-tailed).

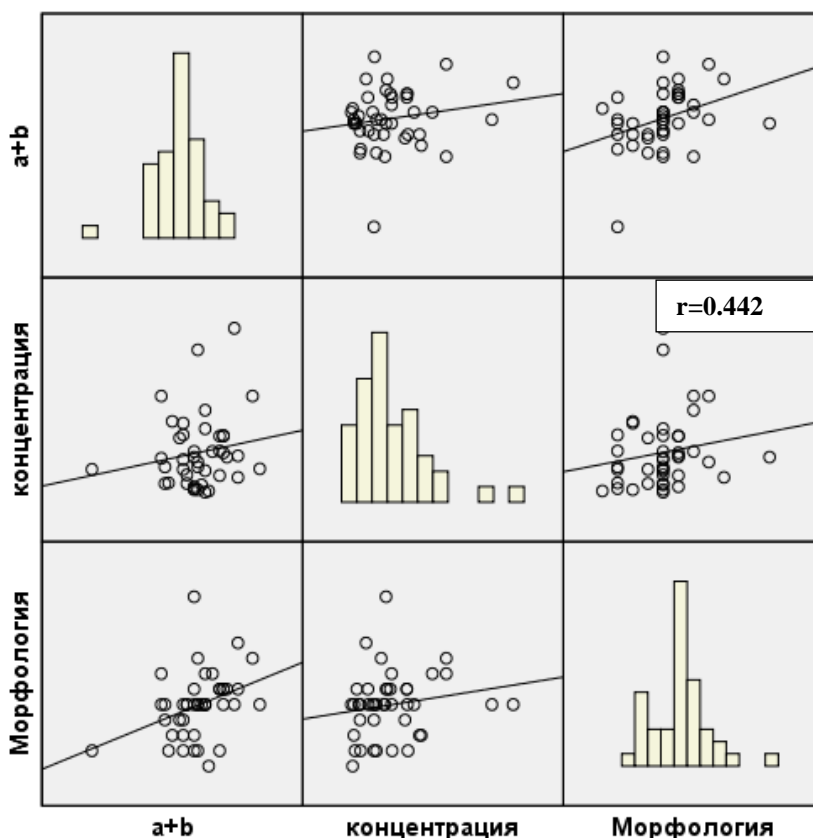
R – корелационен коефициент

P – значимост

N – брой изследвани лица

От корелационния статистически анализ установяваме отрицателна корелационна зависимост между активността на каталазата и нивата на глутатиона в семенна плазма ($r = -0.611$; $p < 0.05$). Наблюдаваме и силно отрицателна корелационна зависимост между активността на каталазата в семенна плазма и нейната активност в сперматозоиди ($r = -0.857$; $p < 0.01$).

Морфологията на сперматозоидите корелира положително с прогресивната подвижност преди обработка ($r = 0.372$; $p < 0.05$). По отношение на морфологията и концентрацията на сперматозоидите преди обработка, установяваме силно положителна корелационна зависимост ($r = 0.442$; $p < 0.01$) (Фиг. 15).



Фигура 15. Корелационни зависимости между морфологията, концентрацията и подвижността на сперматозоидите преди замразяване.

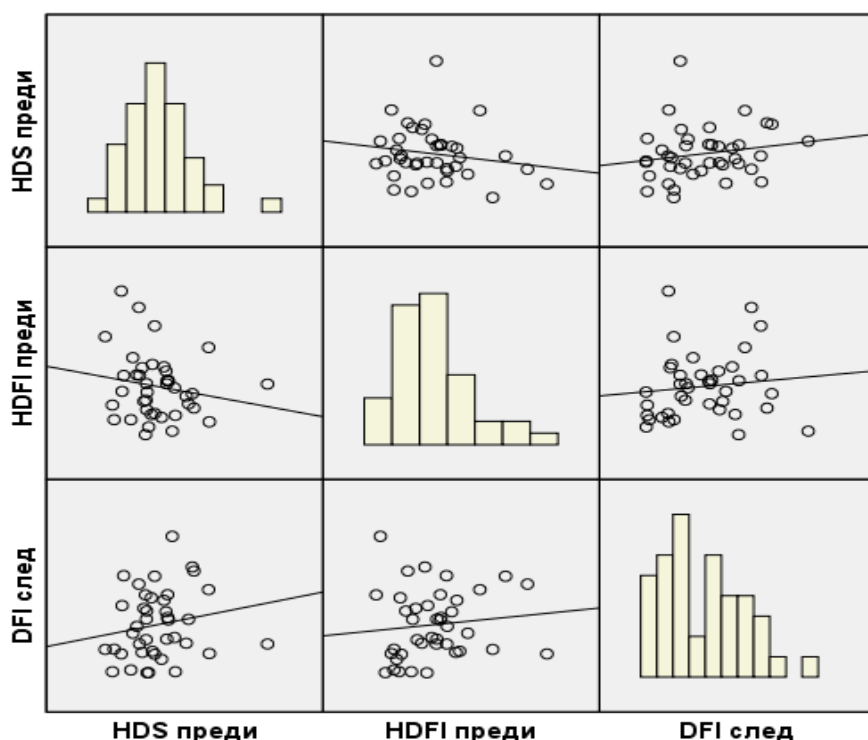
Положителна корелационна зависимост се установява между DFI преди обработка и прогресивната подвижност ($r = 0.035$ $p < 0.05$).

HDS преди обработка и глутатиона в семенна плазма корелират отрицателно ($r = -0.532$; $p < 0.05$).

Положителна корелационна зависимост се наблюдава между DFI след обработка и размразяване и HDS преди обработка и замразяване ($r=0.336$; $p<0.05$), също положителна корелационна зависимост се наблюдава HDS след обработка и HDFI преди обработка ($r=0.323$; $p<0.05$) (Фиг. 16).

Проведеният непараметричен корелационен анализ по Spearman показва силна положителна корелация между DFI и HDFI след обработка и замразяване ($r=0.773$; $p<0.01$), както и за концентрацията след обработка и морфологията на сперматозоидите ($r=0.441$; $p<0.01$).

Открива се също и отрицателна корелация между GPx в семинална плазма и HDS след обработка ($r=-0.398$; $p<0.05$).



Фигура 16. Корелационни зависимости между показателите от SDI теста преди и след криоконсервация.

4.2. Дискусия на резултатите от влияние на криоконсервацията и обработката на сперматозиди върху DFI. Екстра и интрацелуларни нива на антиоксиданти.

Статистическият анализ на изследваните показатели преди обработка и криоконсервиране показва, че двете групи не се различават статистически по отношение на прогресивна подвижност ($a+b\%$), концентрацията на сперматозоидите, процента фрагментирана ДНК и процента на сперматозоиди с незрял хроматин, както и по отношение на TZI индекс. Установихме сигнификантна разлика между двете изследвани групи за процента нормална морфология ($p=0.002$). Групата на инфертилните са с по-лоша

морфология (mean rank=16.44 спрямо 28,25 при фертилните). Наблюдаваната положителна корелационна зависимост между процента прогресивна подвижност и процента сперматозоиди с нормална морфология ($r=0.372$; $p<0.05$), както и между концентрацията на мл. и процентът сперматозоиди с нормална морфология ($r=0.442$; $p<0.01$) преди обработка е потвърждение на наблюденията и на други автори (*Franken, 2015*).

Част от мъжете в инфертилната група също показват нормална спермална морфология, но въпреки нормалните спермални показатели те нямат реализирана бременност в рамките на една календарна година, което поставя въпроса достатъчно надеждна ли е оценката на спермалната морфология при изследване на репродуктивния потенциал на инфертилните мъже.

Повече от 30 години определянето на морфологията на сперматозоидите е един от най-често срещаните тестове в диагностиката на мъжкия инфертилитет. *Gatimel et al., (2017)* описват необходимостта от стандартизиране на методите за оцветяване и описване на спермалната морфология, тъй като и мъже с тератозооспермия постигат бременност по естествен път. Част от изследванията в това ревю показват връзка между нормалната морфология и правилното функциониране на спермалната клетка, както и корелационни зависимости по отношение на изхода от IUI и IVF процедури (*Gatimel et al., 2017*)

Други автори смятат, че спермалният анализ сам по себе си не може да даде пълен отговор по отношение на репродуктивния потенциал, тъй като сперматозоидите претърпяват редица молекулни промени в женския репродуктивен тракт, свързани с тяхната капацитация, хиперактивация и акрозомна реакция (*C. Cho, 2012*), което налага по задълбочен анализ, включващ редица биохимични показатели в помощ на диагностиката, както и изследвания извън рутинния семенен анализ – SDI и оценка на оксидативния стрес.

Тенденцията към повишаване на ДНК фрагментационния индекс след обработка и размразяване, показва негативния ефект от криоконсервацията върху сперматозоидите на изследваните от нас мъже. В научната литература съществуват данни за негативното влияние на многократните центрофугирания и нуждата от добавяне на антиоксиданти при обработката на сперматозоиди. *R. John Aitken et al., (2010)* установяват повишено генериране на 8-OHdG в обработени спермални проби през двоен плътностен градиент на мъже участващи в АРТ процедури, спрямо здрави донори.

D. Ramesh et al., (2013) също съобщават за негативен ефект върху целостта на спермалната ДНК след замразяване и размразяване, като наблюдават по-висока степен на увреждане при мъже с астено-олиго и тератозооспермия спрямо нормозооспермични мъже. Възможна причина за настъпващите увреди в спермалната клетка е свръхгенерирането на РФК, следствие на центрофугирането. В нашето проучване не установяваме значими разлики по отношение на ензимните и неензимните антиоксиданти и на маркера на липидна пероксидация (МДА) екстра- и интрацелуларно. Други проучвания установяват благоприятния ефект от действието на антиоксидантите, които упражняват протективно действие върху сперматозоидите при замразяване и размразяване. Техниките за криоконсервиране и вида на криопротектанта се оказват важни за сперматозоидите след размразяване (*Nallella KP et al., 2004*).

Наличието в еякулата на сперматозоиди с незрял хроматин са допълнителен източник на увреди при обработката на сперматозоиди. Нашето проучване показва негативна корелация

между плазмените нива на GSH и HDS преди обработка на сперматозоидите ($r = -0.532$; $p < 0.05$) и между GPx в семинална плазма и HDS след обработка ($r = -0.398$; $p < 0.05$). Наличието на сперматозоиди с висока степен на незрялост в якаулата се явяват сериозен генератор на РФК, което може да наруши баланса между оксиданти и антиоксиданти в семенната плазма.

Центрофугирането е основен метод при селекцията на сперматозоидите за целите на асистираната репродукция. При мъже с неизяснен инфертилитет крайният етап от лечението се осъществява чрез включването им в АРТ процедура. Вероятно понижените плазмени нива на антиоксиданти при мъже с неизяснен и идиопатичен инфертилитет крият по-висок риск при обработка през двоен плътностен градиент и последващо замразяване и размразяване.

Данните представени в нашето проучване, разбира се, не са категорични, но поставят въпроса – какъв тип обработка на сперматозоидите трябва да се прилага при тези мъже и отново показват нуждата от оценка на оксидативния стрес при мъже с инфертилитет.

V. ОБОБЩЕНИ ИЗВОДИ

1. Подвижността, концентрацията и морфологията на сперматозоидите (взети заедно) могат да бъдат използвани като прогностични маркери за оценка на мъжкия фертилитет на базата, на които да се класифицират мъжете като фертилни, инфертилни с неизяснен и идиопатичен инфертилитет, но нито един от показателите няма сто процентна диагностична стойност по отношение на фертилизационния потенциал на мъжа.
2. Фертилните мъже имат значително по-висока концентрация и подвижност на сперматозоидите и по-нисък процент на ДНК-фрагментация спрямо мъжете с неизяснен и идиопатичен инфертилитет.
3. ТАС е най-висок в групата на фертилните мъже, следван от мъжете с неизяснен инфертилитет и е с най-ниски нива в групата на мъжете с идиопатичен инфертилитет.
4. При мъже с идиопатичен инфертилитет процентът апоптотични сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на H_2O_2 е значимо по-висок в сравнение с фертилни мъже.
5. Процентът жизнеспособни сперматозоиди е понижен в групата на мъжете с идиопатична тератозооспермия в сравнение с фертилните нормозооспермични мъже.
6. Прогресивната подвижност е обратно пропорционално асоциирана с процента на апоптотичните сперматозоиди и жизнеспособните сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на H_2O_2 и $O_2^{\bullet-}$.
7. Комплексното използване на спермалните параметри и ДНК фрагментационният индекс в комбинация с изследването на интра- и екстрацелуларни маркери на ОС дават по-точна оценка на мъжкия фертилитет.
8. Концентрацията на малондиалдехид в сперматозоиди и семинална плазма няма диагностична стойност по отношение на фертилизационния потенциал на мъжа в случаите на неизяснен и идиопатичен инфертилитет.

9. Получените от нас резултати не потвърдиха наличието на зависимост между понижените нива на глутатион в семенна течност и мъжкия инфертилитет. Концентрацията на антиоксиданта глутатион няма диагностична стойност по отношение на фертилизационния потенциал на мъжа в случаите на неизяснен и идиопатичен инфертилитет.
10. Активността на антиоксидантните ензими глутатионпероксидаза и каталаза нямат диагностична стойност по отношение на фертилизационния потенциал на мъжа в случаите на неизяснен и идиопатичен инфертилитет. Това внася съмнение по отношение на широко приетото мнение, че тези ензими са с понижена активност в сперма на инфертилни мъже.
11. Повишеният процент на ДНК-фрагментация на сперматозоидите след обработка и размразяване, показва негативният ефект от криоконсервацията върху сперматозоидите на изследваните от нас мъже и повдига въпроса за приложението на антиоксиданти в процесите на центрофугиране и криоконсервиране при мъжете с неизяснен и идиопатичен инфертилитет.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въпреки, че неизясненият и идиопатичен инфертилитет при мъжете са обект на интензивни проучвания, на дневен ред стоят множество въпросителни за ролята на оксидативния стрес при тези състояния. Проучванията, извършени в областта показват, че фертилните мъже имат значително по-ниски нива на РФК и по-висок антиоксидантен капацитет в сравнение с инфертилните. Нашите данни потвърждават това, а също и мнението за нуждата от въвеждане на метод за измерване на оксидативния стрес в андрологичната практика, като допълнение към алгоритъма за оценка на инфертилитета.

Нашите резултати показват, че мъжете с идиопатичен инфертилитет имат по-високи интрацелуларни нива на H_2O_2 и $O_2^{\bullet-}$ и понижен ТАС. Потвърждаваме схващането за негативния ефект на ОС върху репродуктивния потенциал, но не можем да въведем категорични норми за оценка на степента му, тъй като липсва консенсус по отношение на използваните референтни стойности и методи за анализ.

Според нашите наблюдения мъжете с идиопатичен инфертилитет и неизяснен инфертилитет, без клинични данни за патологични находки трябва да се насочват към изследване нивата на ОС, за по-пълна диагностика и последващо антиоксидантно лечение.

Мъжете с неизяснен инфертилитет следва да бъдат подложени на допълнителни генетични и имунологични изследвания и да се оценят нивата на ОС, въпреки нормалния процент морфология и DFI. Навременната диагностика, извън рутинния семенен анализ би подпомогнала тяхното лечение и постигане на бременност по естествен път.

Голяма част от мъжете с неизяснен и идиопатичен инфертилитет постигат бременност след IUI, IVF или ICSI. При тези пациенти е важен индивидуалния подход и избора на техника за селекция на сперматозоиди, които включват минимални процедури по центрофугиране, тъй като възможна причина за покачването на DFI след размразяване е по-ниският им антиоксидантен капацитет вследствие на премахването на семиналната плазма. Добавянето на подходящите антиоксиданти при обработка на семенни проби от мъже с

понижени семинални нива на антиоксиданти, биха повишили шансовете им за реализиране на бременност, а проследяването на DFI след обработка на сперматозоидите за целите на АРТ при мъжете с инфертилитет ще насочат ембриолозите към прилагането на допълнителни техники за селекция на сперматозоидите.

На базата на получените резултати, както и на данните от световната литература, изследователският екип препоръчва оценката на оксидативния стрес в диагностиката на мъже с неизяснен и идиопатичен инфертилитет, както и въвеждането на термина – “мъжки инфертилитет, свързан с оксидативен стрес“.

VII. ПРИНОСИ

В резултат на проведените от нас изследвания могат да се формулират следните приноси:

Приноси с оригинален характер

1. За първи път в България се установяват значими разлики за прогресивната подвижност и концентрацията на сперматозоидите между доказано фертилни мъже и мъже с неизяснен инфертилитет, въпреки данните за нормозооспермия според последните критериите на СЗО от 2010 година.
2. За първи път в България се установява, че доказано фертилни мъже са с DFI под 10% , концентрация на сперматозоидите над 48 млн. /мл и морфология на сперматозоидите над 5 %.
3. За първи път в България е извършен флоуцитометричен анализ за оценка на интрацелуларните нива на H_2O_2 и $O_2^{\bullet-}$ в помощ на диагностиката на мъже с неизяснен и идиопатичен инфертилитет.

Приноси с потвърдителен характер:

1. Потвърдихме негативната асоциация между прогресивната подвижност на сперматозоидите и процента на апоптотичните сперматозоиди и жизнеспособните сперматозоиди с високо интрацелуларно съдържание на H_2O_2 и $O_2^{\bullet-}$
2. Потвърдихме, че мъже с идиопатичен инфертилитет имат понижени нива на тотален антиоксидантен капацитет и по-високо съдържание на интрацелуларен H_2O_2 и $O_2^{\bullet-}$, спрямо фертилни мъже.
3. Потвърдихме, че мъже с неизяснен инфертилитет и данни за нормозооспермия имат пониски нива на ТАС спрямо доказани фертилни мъже.
4. Потвърдихме негативното влияние на H_2O_2 и $O_2^{\bullet-}$ върху спермалната ДНК при мъже идиопатичен инфертилитет.
5. Потвърдихме негативния ефект от обработката на сперматозоидите и процесът на криоконсервиране при отстраняване на семиналната плазма върху фрагментацията на спермалната ДНК.

VIII. ПРИЛОЖЕНИЯ

Списък на научните публикации във връзка с дисертацията:

1. Violeta S. Rilcheva, Nina P. Ayvazova, **Danail I. Martinov**, Cvetomir I. Ivanov, Emiliana I. Konova. Assessment of the impact of oxidative stress on frozen seminal plasma in fertile and infertile men by examining the total antioxidant capacity. *J Biomed Clin Res* Volume 7 Number 1, 2014. DOI: 10.1515/jbcr-2015-0121
2. **Danail I. Martinov**, Nina P. Ayvazova, Emiliana I. Konova¹, Milena A. Atanasova. Glutathione content and glutathione peroxidase activity of sperm in males with unexplained infertility. Подадена в *J Biomed Clin* в печат
3. Dinkova A, **Martinov D**, Konova E. Efficacy of myo-inositol in the clinical management of patients with asthenozoospermia. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2017; 21(2): 62-65. Online ISSN: 2284-0729, Print ISSN: 1128-3602. IF 2.141

Цитирания (14):

1. Ylenia Duca, Aldo E. Calogero, Rossella Cannarella, Rosita A. Condorelli Sandro La Vignera (2018): Current and emerging medical therapeutic agents for idiopathic male infertility, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, DOI: 10.1080/14656566.2018.1543405
2. Michell, R. (2018). Do inositol supplements enhance phosphatidylinositol supply and thus support endoplasmic reticulum function? *British Journal of Nutrition*, 120(3), 301-316. doi:10.1017/S0007114518000946
3. Canepa P, A. Dal Lago, C. de leo, M. Gallo, C. Rizzo, E. licata, P. Anserini, R. Rago, P. scaruffi (2018): Combined treatment with myo-inositol, alpha-lipoic acid, folic acid and vitamins significantly improves sperm parameters of sub-fertile men: a multi-centric study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2018; 22 (20): 7078-7085. Online ISSN: 2284-0729, Print ISSN: 1128-3602. IF 2.721
4. Ylenia Duca, Aldo E. Calogero, Rossella Cannarella, Rosita A. Condorelli and Sandro La Vignera. Current and emerging medical therapeutic agents for idiopathic male infertility. *Expert opinion on pharmacotherapy* 2019, vol. 20, no. 1, 55–67 <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1543405>
5. Abdolsamadi, M., Mohammadi, F., Nashtaei, M. S., Teimouri, M., Sardar, R., Dayani, M., Haghghi, M., Ghasemi, S., Vatannejad, A., & Zandieh, Z. (2020). Does myoinositol supplement improve sperm parameters and DNA integrity in patients with oligoasthenoteratozoospermia after the freezing–thawing process? *Cell and Tissue Banking*, 21(1), 99–106. <https://doi.org/10.1007/s10561-019-09801-7>
6. Cannarella, R., Lanzafame, F., Condorelli, R., Calogero, A. E., & La Vignera, S. (2020). Antioxidants in the Medical and Surgical Management of Male Infertility. *Male Infertility*, January, 805–816. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32300-4_64
7. Condorelli, R. A., Barbagallo, F., Calogero, A. E., Cannarella, R., Crafa, A., & La Vignera, S. (2020). D-Chiro-Inositol Improves Sperm Mitochondrial Membrane Potential: In Vitro Evidence. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5), 1373. <https://doi.org/10.3390/jcm9051373>
8. Facchinetti, F., Appetecchia, M., Aragona, C., Bevilacqua, A., Bezerra Espinola, M. S., Bizzarri, M., D'Anna, R., Dewailly, D., Diamanti-Kandarakis, E., Hernández Marín, I., Kamenov, Z. A., Kandaraki, E., Laganà, A. S., Monastra, G., Montanino Oliva, M., Nestler, J. E., Orio, F., Ozay, A. C., Papalou, O., Unfer, V.

(2020). Experts' opinion on inositols in treating polycystic ovary syndrome and non-insulin dependent diabetes mellitus: a further help for human reproduction and beyond. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 16(3), 255–274. <https://doi.org/10.1080/17425255.2020.1737675>

9. Facchinetti, F., Espinola, M. S. B., Dewailly, D., Ozay, A. C., Prapas, N., Vazquez-Levin, M., Wdowiak, A., Unfer, V., Appetecchia, M., Aragona, C., Bertelli, M., Bevilacqua, A., Bizzarri, M., Cavalli, P., Copp, A., D'Anna, R., Greene, N., Marín, I. H., Kamenov, Z. A., Stringaro, A. (2020). Breakthroughs in the Use of Inositols for Assisted Reproductive Treatment (ART). *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 31(8), 570–579. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.04.003>

10. Zhang Guo-zhong, Zheng Jie, HU Yan-mei, WU Xue-yi, XIE Ping, YANG Zong-fu Effect of Supplementary Inositol on Sperm Quality in Infertile Men. *Journal of International Reproductive Health/Family Planning* » 2020, Vol. 39 » Issue (6): 524-528.

11. Stephanie, L., Laura, L., Kathena, D., Melissa, V., & Ashlee, N. (2021). Inositol : Summary Report

12. Vazquez-Levin, M. H., & Verón, G. L. (2020). Myo-inositol in health and disease: its impact on semen parameters and male fertility. *Andrology*, 8(2), 277–298. <https://doi.org/10.1111/andr.12718>

13. O. M. Nosenko, O. V. Novikova. Inositols in reproductive medicine. DOI: <https://doi.org/10.18370/2309-4117.2020.56.23-34>

14. Éric Lameignère, Sinda Mahbouli, Charlotte Dupont , Rachel Levy. Clinical relevance of dietary supplementation in the management of infertile men. Volume 22, issue 1, Janvier-Février-Mars 2020. Page(s) : 28-39. DOI 10.1684/mte.2020.0779

Списък на участията в научни конференции във връзка с дисертацията:

Участия в научни форуми в България (5)

1. **Martinov D**, Ayvazova N, Konova E, Atanasova M. Glutathione peroxidase activity and glutathione content of sperm in males with unexplained infertility [poster]: Jubilee Scientific Conference “45 years Medical University – Pleven”; 31 October – 2 November; 2019; Pleven. *JBCR* 2019,12(1),suppl.2. p.26. ISSN 1313-6917
2. **Martinov D**, Ayvazova N, Ilieva L, Dikova A, Ivanova I, Atanasova M, Konova E. Biomarkers outside routine semen analysis [poster]. XII National Conference of Medical Biology; 2017, September 8-10, 2017; *Folia med.* 2017; 59(suppl. 1): p.26. ISSN 0204-8043 (print), ISSN 1314-2143 (online).
3. **Мартинов Д**, Айвазова Н, Илиева Л, Дикова А. Иванова И, Атанасова М, Конова Е. Оксидативен стрес в диагностиката на мъжкия инфертилитет. СЕДМА РАБОТНА СРЕЩА „Репродуктивна медицина 2017 – противоречия и консенсус“, Плевен, 28-30 април, 2017
4. **Martinov D**, Ayvazova N, Ilieva L, Dikova A, Alexandrova A, Radeva M, Konova E. Relationship between age, sperm parameters and levels of total antioxidant capacity in clinically healthy men. XVIII National Congress of infertility and reproductive health with international participation, Borovets, Bulgaria, 09-12 March, 2017
5. **Мартинов Д**, Айвазова Н, Илиева Л, Динкова А, Радева М, Конова Е. Корелационна зависимост между възрастта, спермалните показатели и ДНК-фрагментацията на сперматозоидите. 2016 Юбилейна научна конференция "10 години Българска Асоциация по Клинична Иммунология", София, Хотел Балкан 28- 29, октомври, 2016 P(65) ISSN1313-47-52

Участия в научни форуми в чужбина (5)

1. Tsanev D, Petrov S, Ayvazova N, **Martinov D**, Dikova A, Pavlova G, Konova E. Low levels of neutral alpha-glucosidase in men with infections caused by Chlamydia trachomatis [poster]. 10th European congress of andrology; 2018, October 11-13; Budapest, Hungary. Andrology 2018, 6 (suppl. 2): p. 109. ISSN 2047 2919
2. Petrov S, Tsanev D, **Martinov D**, Ayvazova N, Konova E. Imipramine treatment of retrograde ejaculation - case report. [Poster]. 10th European congress of andrology; 2018, October 11-13; Budapest, Hungary. Andrology 2018, 6 (suppl. 2): p. 110. ISSN 2047 2919
3. **Martinov D**, Ayvazova N, Petrov S, Atanasova M, Konova E. Flow cytometric analysis of the integrity of sperm DNA and intracellular levels of hydrogen peroxide and superoxide anion in human spermatozoa of infertile and potentially fertile men. Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine. 2018; 2(2): 58-58. Print ISSN 2570-5911, Online ISSN 2570-5903
4. **Martinov D**, Alexandrova A, Ayvazova N, Ilieva L, Alexandrova R, Petrov S, Konova E. Relationship between oxidative stress and sperm DNA fragmentation in male infertility [poster]. 9th Congress of the European Academy of Andrology; 2016, September 21-23; Rotterdam, Netherlands. Andrology 2016, 4 (suppl. 2): p. 39. ISSN 2047 2919
5. Rilcheva V., Ayvazova N., **Martinov D.**, Ivanov P., Konova E. Assessment of the impact of oxidative stress on frozen seminal plasma in fertile and infertile men by examining the total antioxidant capacity. 31st Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Lisabon, Portugal, vol. 30, supp 1, 14-17 June, 2015
6. Petrov S., Konova E., **Martinov D.**, Uzunov R. Clinical Cases of Azoospermia. 21st European Testis Workshop, 30 May to June 3, 2021. Online.

Участие в проекти:

1. №D1/2016/2016 – „Оксидативен стрес в диагностиката на мъжкия инфертилитет“
2. №D3/2016/2017 – “Биомаркери в семенния анализ – оксидативен стрес и микро-РНК в диагностиката на мъжкия инфертилитет”
3. №10/2017 – “Проучване честотата на носителство на HSV-1,2, CMV и EBV/херпесвируси в ендометриум при жени с неуспешни асистиранни репродуктивни техники”
4. №16/2018 „Оксидативен стрес и възпаление при мъже с инфертилитет и метаболитен синдром“