



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ «ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ»

БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ

КАТЕДРА «БИОЛОГИЯ НА РАЗВИТИЕТО»



Владимир Тодоров Стайков

**ИЗПОЛЗВАНЕ НА МИТОХОНДРИАЛНИ МАРКЕРИ
ЗА ОЦЕНКА НА ЧОВЕШКИ СПЕРМАТОЗОИДИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен «доктор»

Област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика,**
Професионално направление: **4.3 Биологически науки**
Научна специалност: **Клетъчна биология**



Научен ръководител:
проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов

Пловдив, 2017 г.



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ «ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ»
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА «БИОЛОГИЯ НА РАЗВИТИЕТО»



Владимир Тодоров Стайков

**ИЗПОЛЗВАНЕ НА МИТОХОНДРИАЛНИ МАРКЕРИ
ЗА ОЦЕНКА НА ЧОВЕШКИ СПЕРМАТОЗОИДИ**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертационен труд
за присъждане на образователна и научна степен «**доктор**»

Област на висше образование: **4. Природни науки, математика и информатика,**
Професионално направление: **4.3 Биологически науки**
Научна специалност: **Клетъчна биология**

Научен ръководител:
проф. д-р Балик Маломиров Джамбазов

Пловдив, 2017 г.

Дисертацията съдържа 115 страници, 29 таблици, 64 фигури, 127 литературни източника.

Анализите и експериментите, включени в настоящия дисертационен труд са осъществени в Андрологична лаборатория, Ембриологична лаборатория и Изследователско звено на Център за репродуктивно здраве «Надежда» към МБАЛ «Надежда» – болница за женско здраве, гр. София.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на заседание на катедра «Биология на развитието» към Биологически факултет на ПУ «Паисий Хилендарски», проведено на 17.02.2017 г.

Заседанието на Научното жури за публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 25.04.2017 г. от 11:00 ч., в 15^{-та} аудитория на Биологически факултет (гр. Пловдив, ул. «Тодор Самодумов» № 2, Старият град).

Материалите по защитата са на разположение на интересувашите се в деканата на Биологически факултет на ПУ «Паисий Хилендарски», гр. Пловдив, ул. «Тодор Самодумов» № 2, каб. 165 (Старият град).

Научно жури:

проф. д-р Василий Ишев (рецензия)
проф. д-р Иван Пищийски (становище)
доц. д-р Анелия Биволарска, дм (становище)
доц. д-р Еленка Георгиева (рецензия)
проф. д-р Балик Джамбазов (становище)

Автор:

Владимир Тодоров Стайков

Заглавие:

Използване на митохондриални маркери за оценка на човешки сперматозоиди

Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, 2017

ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

АДФ – Аденозиндифосфат
АМФ – Аденозинмонофосфат
АРТ – Асистираны репродуктивни технологии
АТФ – Аденозинтрифосфат
ВММ – вътрешна митохондриална мембрана
ЕТВ – Електрон-транспортна верига
ММ – Митохондриална маса
ММП – Митохондриален мембранен потенциал
СОР – Супероксидни радикали
СССР – Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone / Карбонил цианид m-хлорфенил хидразон
СОI – Subunit I of cytochrome c oxidase / Субединица I на цитохром с оксидаза
ICSI – Intracytoplasmic sperm injection / Вътрецитоплазмено инжектиране на сперматозоид
MitoSOX Red – Mitochondrial superoxide indicator / Митохондриален супероксиден индикатор
MTG – MitoTracker Green / Митотракер грийн (MTG) багрило
PBS – Phosphate buffered saline / Фосфатен буферен разтвор
Rh123 – Rhodamine 123 / Родамин 123 багрило
POLG – DNA polymerase gamma / ДНК-полимераза гама
ROS – Reactive oxygen species / Реактивни кислородни видове
TFAM – Mitochondrial transcription factor A / Митохондриален транскрипционен фактор А
VAP – Average path velocity / Средна скорост на движение
VCL – Curvilinear velocity / Скорост по крива линия
VSL – Straight line velocity / Скорост по права линия
%HA – % hyperactivated sperm / % хиперактивирани сперматозоиди
%MOT – % progressive motile spermatozoa / % прогресивно подвижни сперматозоиди

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Съгласно изследвания на Световната здравна организация (СЗО) около 50-80 милиона двойки по света са засегнати от безплодие. В България, повече от 270 000 семейства са с нарушения в репродуктивното си здраве. Тази негативна статистика в съчетание с отрицателния естествен прираст на населението превръща борбата с безплодието в един от най-важните за разрешаване проблеми на съвременното ни общество.

При близо 40% от бездетните двойки стерилитетът се дължи на проблеми при мъжа – т. нар. „мъжки фактор“. Аномалиите в анатомията на репродуктивните органи, претърпените травми, удари или усуквания на тестисите, обструкцията на еякулаторните пътища, хормоналният дисбаланс, инфекциозните заболявания или сексуалната дисфункция може да са причини за постоянно или временно увреждане на репродуктивните функции на съвременния мъж. Всички тези фактори провокират и будят интереса на голям брой учени и изследователи от научни центрове, както и на лекари от различни клиники по света за разработване на нови, модерни и още по-надеждни методи за селекция и оценка на мъжките репродуктивни клетки (сперматозоиди), чрез които да се постигне още по-висок процент успеваемост в асистираната репродукция.

Диагнозата „мъжки стерилитет“ се основава предимно на конвенционалния анализ на еякулата, както е посочено в ръководството на СЗО, със силен акцент върху оценката на обема сперма, концентрацията, подвижността и морфологията на сперматозоидите. Около 75% от мъжете с намален фертилитет са с олигозооспермия (много нисък брой сперматозоиди) или с астенозооспермия (понижена подвижност на сперматозоидите). И двете състояния са трудно лечими, а етиологията невинаги е изяснена. През последното десетилетие вниманието на учените се насочва към друг предполагаем фактор за мъжкото безплодие, а именно биоенергетичния статус на митохондриите в сперматозоидите. Основните параметри, описващи функциите на митохондриите в човешките сперматозоиди, определящи оплодителния им потенциал, способността им да дават ембриони с добър имплантационен потенциал и добро качество са: **митохондриален мембранен потенциал (ММП)**, **митохондриална маса (ММ)**, **продукция на аденозинтрифосфат (АТФ)** и генериране на **супероксидни радикали (СОР)**. Задълбоченото изучаване на тези митохондриални показатели е важна стъпка за по-доброто разбиране на причините, водещи до мъжки инфертилитет.

2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Литературният обзор включва следните основни раздели:

- 2.1. Характеристика и образуване на мъжките гамети
- 2.2. Човешки митохондрии
- 2.3. Митохондриален мембранен потенциал
- 2.4. Флуоресцентни багрила за изучаване на митохондрии

3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящата дисертация е да се разработят и въведат нови методи за оценка и селекция на сперматозоиди, които в съчетание с досега използваните, да доведат до увеличаване на процента успеваемост от ин витро процедурите.

За изпълнение на така определената цел бяха поставени следните експериментални **задачи**:

1. Да се изследват, опишат и анализират показателите за оценка на митохондриалния статус.

2. Да се анализират взаимовръзките между избраните показатели на митохондриален статус и стандартните показатели, описвани в спермограмата (въздържание, обем, вискозитет, рН, концентрация, подвижност и морфология).

3. Да се анализират и сравнят стойностите на изследваните митохондриални показатели (АТФ, митохондриален мембранен потенциал, митохондриална маса, супероксидни радикали) в групите на: зиготите с добро и лошо качество, ембрионите с добра спрямо тези с лоша морфологична оценка, успешно имплантирани спрямо неимплантирани ембриони.

4. Да се подберат най-подходящите показатели за оценка на потенциалната възможност на сперматозоидите, които да доведат до успешно имплантиране на производните им ембриони.

5. Да се разработи прогностичен модел за оценка на сперматозоидите.

Идеята на дисертационния труд е да се проследи ролята на избраните митохондриални показатели върху целия процес – от оплождане до имплантирането на ембрионите, т.е. първо – анализиране на връзките с оплождане и качество на човешките зиготи, второ – с качеството на получените човешки ембриони и трето – с имплантиране на получените човешки ембриони.

4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Изследванията в настоящата дисертация са съобразени с всички етични правила, кодекси и международни конвенции, а получените резултати се основават на данни от проведен стандартен спермален анализ и определяне на митохондриален статус при 97 пациенти на възраст между 24 и 54 години, участващи в ин витро (ICSI) процедури за лечение на безплодие. При постъпване в болницата пациентите попълват формуляр за информирано съгласие, необходим за извършване на рутинни изследвания. Пробите са събрани, съхранявани и анализирани съгласно всички изискванията и разпоредби за лична безопасност през периода от ноември 2013 г. до септември 2014 г. в Център за репродуктивно здраве „Надежда“, намиращ се в МБАЛ „Надежда“ – болница за женско здраве, гр. София. Използвани са следните методи:

4.1. Овариална стимулация

Овариалната стимулация е проведена по различни стимулационни протоколи:

- 1) спонтанен (естествен) цикъл,
- 2) минимална стимулация,
- 3) контролирана овариална хиперстимулация (КОХ) – по дълъг протокол и по къс протокол.

4.2. Овариална пункция под ултразвуков контрол

Пункцията на фоликули за добиването на яйцеклетки се извърши чрез пункционна игла Kitazato 18G (32 cm) с помощта на биопсичен водач под ултразвуков контрол с трансвагинална ултразвукова сонда, модел EC4-9/10ED, честота 4.0-9.0 MHz на ултразвуков апарат Medison SonoAce X4.

4.3. Спермален анализ

Анализът на еякулата от пациентите е осъществен с помощта на автоматичен анализатор, спазвайки стриктно изискванията на Световната здравна организация (СЗО). Семенният материал е събран и анализиран след мастурбация на пациентите при 3-5 дни полово (сексуално) въздържане. Стандартният спермален анализ включва измерване на обема със стерилна спринцовка, като се оценяват вискозитета и цвета на

еякулата. Определя се рН с помощта на лакмусови ленти (с обхват 4.5-10). Основните спермални параметри са представени в Таблица 1.

Таблица 1. Изследвани стандартни показатели при спермограмата.

Параметър	Референтни стойности
Обем, ml	≥ 1.5
Концентрация, million/ml	≥ 15 , или ≥ 39 в целия обем еякулат
Подвижност: a (активно подвижни сперматозоиди) b (подвижни сперматозоиди) c (бавно подвижни сперматозоиди) d (неподвижни сперматозоиди)	$a \geq 25\%$ $a + b \geq 32\%$ $a + b + c \geq 40\%$ $d \leq 60\%$
Морфология: според стриктните критерии на Крюгер:	$\geq 4\%$ с нормална морфология

За определяне на концентрацията и подвижността на сперматозоидите се използва както ръчно, така и автоматично отчитане (чрез софтуер за спермален анализ) с помощта на броителна камера MAKLER.

4.4. Изолиране на човешки сперматозоидите за ICSI оплождане

При всички изследвани пациенти за изолиране на сперматозоидите от еякулатите им е използвана обработка swim-up след центрофугиране през плътностен градиент.

4.5. Обработка на човешки яйцеклетки

След изолирането яйцеклетките са инкубирани за 3-5 часа в културална среда (Global for fertilization, LifeGlobal) под минерално масло (LifeGuard Oil, LifeGlobal) и в контролирани условия (37°C, 5% CO₂). Оронването на яйцеклетките се извършва с помощта на пипета в буферирана среда с HEPES след предварително излагане за 30 s на 80 IU/ml хиалуронидаза (Hyaluronidase, Sage in vitro fertilization, USA). След оронването яйцеклетките се наблюдават за наличието на първо полярно телце (зрели, МII) и те са използвани за класическо ин витро и ICSI оплождане.

4.6. Инсеминиране на човешки ооцити

Работната среда се еквилибрира (една нощ в CO₂ инкубатор на 37°C и 5% CO₂). От 4 до 6 часа след изваждане на ооцитите се пристъпва към инсеминирането им чрез интрацитоплазмена инжекция на сперматозоид (ICSI). Интрацитоплазмената спермална инжекция (ICSI) представлява вмъкване на един сперматозоид в цитоплазмата на яйцеклетката, като по този начин се преодоляват zona pellucida и оолемата. При ICSI се инсеминират ооцити в метафаза II, оронени от заобикалящите ги кумулусни клетки. Използвана е специална микроманипулаторна система Integra TI, Research-Instruments, England – инсталирана на инвертен микроскоп Olympus CX-71, при увеличение 100x, 200x, и 400x.

4.7. Оценка на човешки зиготи

Наличието на оплождане при инсеминираните яйцеклетки се оценява след период от 16-18 часа. На инвертен микроскоп с увеличение 400x се наблюдава морфологията на пронуклеусите в зиготата. Зиготите се разделят на 4 категории според броя, разпределението и синхронността на нуклеоларните прекурсорни телца (NPB). При част от анализите 4-те групи са обединени и разпределени в две основни групи: 1 група – 1-ва и 2-ра категория зиготи, 2 група – 3-та и 4-та категория зиготи.

4.8. Морфологичен анализ на човешки ембриони

Морфологията на ембрионите е наблюдавана с помощта на инвертен микроскоп (Olympus CX-71, Olympus, Japan). За нормално оплодени се считат яйцеклетките с два пронуклеуса (2PN). Качеството на ембрионите се определя по няколко критерии: пронуклеарна оценка, скорост на делене, брой бластомери, симетрия на бластомерите, наличие на фрагментация, многоядреност.

4.9. Култивиране, асистиран хетчинг и трансфер на човешки ембриони

След ICSI процедурата (оплождането) яйцеклетките се прехвърлят в капки от 30 μ l културална среда (Global medium, LifeGlobal), поставени в петри (6 cm, NUNC) със специално обработено дъно. Капките културална среда са покрити с нетоксично минерално масло (LifeGuard Oil, LifeGlobal) и преди прехвърлянето на яйцеклетките са еквилибрирани и темперирани в инкубатор (37°C, 5% CO₂) за минимум 3-4 часа. На втори ден след оплождането ембрионите, които се предвиждат за трансфер на 3-ти ден, се прехвърлят в нова среда. Прехвърлянето се осъществява чрез пипетор, снабден с еднократни стерилни стъклени пипети с диаметър на отвора малко по-голям от диаметъра на ембрионите (200-250 μ m).

Непосредствено преди ембриотрансфера при ембрионите с твърде дебела зона pellucida (>15 μ m) се прилага т. нар. асистиран хетчинг. Чрез тази техника се подпомага разкъсването на зона pellucida от бластоциста преди имплантирането в матката.

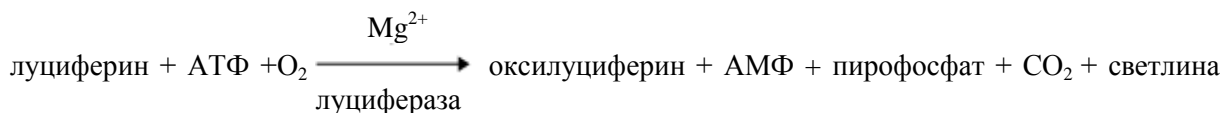
Ембриотрансферът е последния етап от ин витро оплождането. Представлява процедура по връщане (поставяне) на развиващи се ембриони в маточната кухина, като в случая е осъществен на 5-ти ден от ембрионалното развитие.

Преди трансфер ембрионите се прехвърлят в петри с 3 cm в диаметър (NUNC) с 2 ml среда за култивиране (Global medium, LifeGlobal). Аспирират се в катетър CCD (France) или Kitazato (Japan) и се подават на лекаря гинеколог. Трансферът се извършва под ултразвуков контрол. За извършване на трансвагинално ултразвуково изследване са използвани ултразвуков апарат SonoAce X8 с трансвагинална сонда, съответно модел EV4-9/10ED с честота 4.0 - 9.0 MHz.

4.10. Луцинометрично количествено измерване на АТФ в човешки сперматозоиди

За количествено определяне на АТФ в човешки сперматозоиди е използван ATP Determination Kit A22066 (Invitrogen) на фирмата Life Technologies. ATP Determination Kit A22066 е биолуминисцентен тест за количествено определяне на АТФ с рекомбинантна луцифераза и нейния субстрат D-луциферин.

Анализът се основава на зависимостта на луциферазата от наличието на АТФ за продуцирането на светлина (максимална емисия \approx 560 nm при рН 7.8), съгласно посочената химична реакция:



От нативния еякулат на всеки пациент, включен в това проучване, се отделят 1×10^6 сперматозоиди и се смесват с 1 ml фосфатен буфер с Ca²⁺ и Mg²⁺ йони (PBS), като се центрофугират на 2000 rpm за 5 min. Премахва се супернатантата и към утайката се добавят 90 μ l Тритон X-100 (0.1%, разтворен в PBS с Ca²⁺ и Mg²⁺). Пробите престояват за 10 min на стайна температура, като през този период клетъчните мембрани на сперматозоидите се разкъсват и АТФ се освобождава във форма, подходяща за анализ,

след което се замразяват и съхраняват на -20°C . Когато се достигне необходимия брой проби за анализ, те се размразяват и центрофугират на 2100 rpm за 5 min. За анализа се използва 96-ямкова плака Lumitrac 200, в която се накапват стандартите и пробите от супернатантите. Когато са сложени всички стандарти и проби във всяка ямка, се добавя по 90 μl реакционна смес, която съдържа dH_2O , реакционен буфер (20x), 0.1M DTT, 10mM D-луциферин, 5 mg/ml сток-разтвор на луцифераза. Следва инкубиране на пробите на тъмно за 10 min на стайна температура. Луминисценцията е измерена на мултиплейт рийдър модел DTX 880 (Beckman Coulter) (зелено – 514 nm/526 nm, червено – 585 nm/590 nm).

4.11. Флоуцитометрично измерване на митохондриален мембранен потенциал в човешки сперматозоиди с катионно багрило JC-1

За определяне на митохондриалния мембранен потенциал (ММП) е използвано катионното багрило JC-1. (JC-1, T3168, Molecular Probes™, Eugene, USA). За анализа са използвани нативни сперматозоиди, събрани по време на ин витро процедурата и анализирани в рамките на два часа след еякулация. От еякулата на всеки пациент се отделят по 1×10^6 млн сперматозоиди и се промиват с фосфатен буфер (PBS) с Ca^{2+} и Mg^{2+} йони, след което се центрофугират на 600 g за 5 min. Получената супернатанта се премахва и към утайката от сперматозоиди се добавят 1 ml PBS, като се разпределя в две проби. Към пробите се добавят 5 μl от затопления 0.2 mM сток-разтвор на JC-1, вортексират се и инкубират за 15 min на 37°C на тъмно. Едната от двете проби се означава като отрицателна контрола и към нея се добавят 2.5 μl карбонил цианид m-хлорофенил хидразон (СССР). След изтичане на инкубационния период, пробите се центрофугират на 600 g за 5 min. Супернатантата се изхвърля. Към утайката се добавя 0.5 ml PBS и се вортексират. За определяне на ММП с JC-1 в анализираната популация сперматозоиди, измерването се извършва в рамките на 15 min на флоуцитометър (BD FACSCalibur, Becton Dickinson 530 nm/585 nm).

4.12. Флоуцитометрично измерване на митохондриална маса в човешки сперматозоиди с катионно багрило MitoTracker Green

За определяне на митохондриалната маса (ММ) е използвано катионното багрило MitoTracker (MT) (MitoTracker™ Green FM, M7514, Molecular Probes™, Eugene, USA). За анализа са използвани нативни сперматозоиди, събрани по време на ин витро процедурата и анализирани в рамките на два часа след еякулация. От еякулата на всеки пациент се отделят по 1×10^6 млн сперматозоиди и се промиват с фосфатен буфер (PBS) с Ca^{2+} и Mg^{2+} йони, след което се центрофугират на 600 g за 5 min. Получената супернатанта се премахва и към утайката от сперматозоиди се добавят 1 ml PBS, като се разпределя в две проби. Към пробите се добавя от затопления MT сток-разтвор в крайна концентрация 0.1 μM , след което те се вортексират и инкубират за 15 min на 37°C на тъмно. Едната от двете проби се означава като отрицателна контрола и към нея се добавят 2.5 μl карбонил цианид m-хлорофенил хидразон (СССР). След изтичане на инкубационния период пробите се центрофугират на 600 g за 5 min. Супернатантата се изхвърля. Към утайката се добавя 0.5 ml PBS и се вортексират. За определяне на ММ с MT в анализираната популация сперматозоиди, измерването се извършва в рамките на 15 min на флоуцитометър (BD FACSCalibur, Becton Dickinson, 490 nm/516 nm).

4.13. Флоуцитометрично измерване на кислородни радикали в човешки сперматозоиди с катионно багрило MitoSOX Red

За определяне на кислородните радикали (ROS) е използвано катионното багрило MitoSOX (MSOX) (MitoSOX Red, M36008, Molecular Probes™, Eugene, USA).

За анализа са използвани нативни сперматозоиди, събрани по време на ин витро процедурата и анализирани в рамките на два часа след еякулация. От еякулата на всеки пациент се отделят по 1×10^6 млн сперматозоиди и се промиват с фосфатен буфер (PBS) с Ca^{2+} и Mg^{2+} йони, след което се центрофугират на 600 g за 5 min. Получената супернатантата се премахва и към утайката от сперматозоиди се добавят 1 ml PBS, като се разпределя в две проби. Към пробите се добавят 5 μl от затопления 0.5 mM сток-разтвор на MitoSOX Red, вортексират се и инкубират за 15 min на 37°C на тъмно. Едната от двете проби се означава като отрицателна контрола и към нея се добавят 2.5 μl карбонил цианид m-хлорофенил хидразон (CCCP). След изтичане на инкубационния период пробите се центрофугират на 600 g за 5 min. Супернатантата се изхвърля. Към утайката се добавя 0.5 ml PBS и се вортексират. За определяне на супероксидните радикали (COP) с MitoSOX Red в анализиранията популация сперматозоиди, измерването се извършва в рамките на 15 min на флуоцитометър (BD FACSCalibur, Becton Dickinson, 510 nm/580 nm).

4.14. Статистически анализ

Резултатите са представени като средно-аритметична стойност \pm стандартно отклонение за количествените показатели и като честоти на срещане (%) за отделните категории.

За изследване на взаимовръзките между отделните показатели са използвани Pearson и рангов Spearman корелационен анализ. За установяване на значими различия между отделните показатели са приложени t-тест на Student и еднофакторен дисперсионен анализ (ANOVA), а в случаите на ненормално разпределение и/или липса на равенство на дисперсиите – съответно U-тест на Mann-Whitney и Kruskal-Wallis еднофакторен рангов дисперсионен анализ (ANOVA on Ranks). За сравнение на дялове и процентни отношения е използван тест Chi-square. За статистически значими са приети резултати с ниво на значимост 0.05.

Отдиференцирането на стойностите на показателите за оценка на сперматозоидите при анализиранияте групи пациенти е комбинирано с приложението на дескриптивен статистически анализ. Процентилите са изчислени по стандартния метод.

При подбора на прогностични показатели е приложен стъпков регресионен анализ – “Backward elimination”.

За разработване на прогностичния модел е приложен логистичен регресионен анализ. Логистичната регресия предполага наличието на зависимост между прогностичните показатели и крайния резултат (биохимичен тест за бременност /успешна имплантация), която се изразява чрез следното уравнение:

$$P(y = 1) = \frac{1}{1 + e^{(b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_kx_k)}}$$

където P – вероятност за положителен тест за бременност, b_k – регресионен коефициент на “k”-ия прогностичен показател, x – стойности на “k”-ия прогностичен показател.

За оценка ефективността на разработения модел са използвани следните показатели за точност – (1) Точност на оценяване на положителен резултат (Recall). (2) Точност на оценяване на отрицателен резултат (Specificity). (3) Обща точност (ACC):

- (1) Recall (p) % = $tp \cdot 100 / (tp + fn)$,
- (2) Specificity (p) % = $tn \cdot 100 / (fp + tn)$,
- (3) Accuracy (ACC) % = $(tp+tn) / (tp+tn+fp+fn)$,

където tp са случаите с вярно предсказан положителен резултат, fp – случаите с грешно предсказан положителен резултат (реално отчетения резултат е отрицателен), tn – случаите с вярно предсказан отрицателен резултат, fn – случаите с грешно предсказан отрицателен резултат (реално отчетения резултат е положителен).

Проведените тестове за различие, дескриптивен, корелационен и регресионен статистически анализ са извършени със софтуер SigmaStat (v. 3.5). За графично представяне на резултатите чрез бокс-плотове е използван софтуер SPSS (v.16.0).

4.15. Изготвяне на прогностичен модел – алгоритъм на действие

Процесът на разработване на прогностичния модел за предсказване на имплантационния потенциал на човешки ембриони на базата на специфични показатели на сперматозоидите включва определени етапи, които са свързани с избор на показатели, дефиниране на крайния резултат, избор и разработка на подходящ математически модел, както и оценка на неговата точност (Heymans et al., 2011; Harrell, 2001). Тяхното спазване позволява разработеният модел да бъде валидиран и надграждан чрез натрупване и въвеждане на нови данни, отнасящи се за изследваните енергийни показатели на сперматозоидите.

За конкретния модел са изследвани 16 показатели (Таблица 2).

Таблица 2. Изследвани потенциални прогностични показатели.

	Показател	Описание
1	Обем	Обем на отделения еякулат в мл
2	Концентрация	Брой сперматозоиди, млн/мл
3	Въздържание	Период на полово въздържание
4	pH	Киселинност на еякулата
5	A	Процент активно подвижни перматозоиди
6	B	Процент подвижни сперматозоиди
7	C	Процент трептящи сперматозоиди
8	D	Процент неподвижни сперматозоиди
9	Морфология	Нестриктна морфологична оценка на сперматозоидите
10	Кръгли клетки	Наличие на клетки в еякулата, различни от сперматозоидите
11	JC1	Митохондриален мембранен потенциал
12	MT	Митохондриална маса
13	MSOX	Супероксиден радикал
14	dJC1	Изменение на митохондриалния мембранен потенциал
15	dMT	Изменение на митохондриалната маса
16	dMSOX	Изменение на супероксидния радикал

За краен резултат, който да бъде обект на прогнозиране от разработения прогностичен модел, е избран показателят „наличие/отсъствие на положителен биохимичен тест за бременност”.

Резултатът е дихотомен. Тази особеност определя и прилагането на логистичен регресионен анализ при разработването на прогностичния модел.

Броят на извършените независими изследвания при избраните единици на изследване (сперматозоиди и ембриони) е съобразен с това да могат да бъдат проведени подходящи статистически тестове с достатъчно голяма мощност. Извадката ни включва 97 пациенти (популации от сперматозоиди) и 165 ембриони.

За да се извърши подбор на най-подходящите показатели, които да се включат в модела, след като са извършени анализите и обработени резултатите, е приложена следната стратегия:

1. Избор на показатели, които притежават достоверни статистически различия в стойностите си в зависимост от конкретния краен резултат ($P < 0.05$) („наличие / отсъствие на положителен биохимичен тест за бременност”) при проведения t-test.

2. Провеждане на стъпков регресионен анализ (Backward elimination), при който поетапно се отстраняват показатели с по-слаба прогностична сила ($P < 0.2$). Този анализ е с приоритетно значение при избора на показатели.

3. Включване на избраните показатели в различни комбинации и провеждане на логистичен регресионен анализ.

За оценка точността на модела са изследвани обща точност, точност на оценяване на положителните и на отрицателните стойности (Steierberg et al., 2010).

5. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

5.1. Описание на стандартните показатели и показателите за оценка на митохондриалния статус

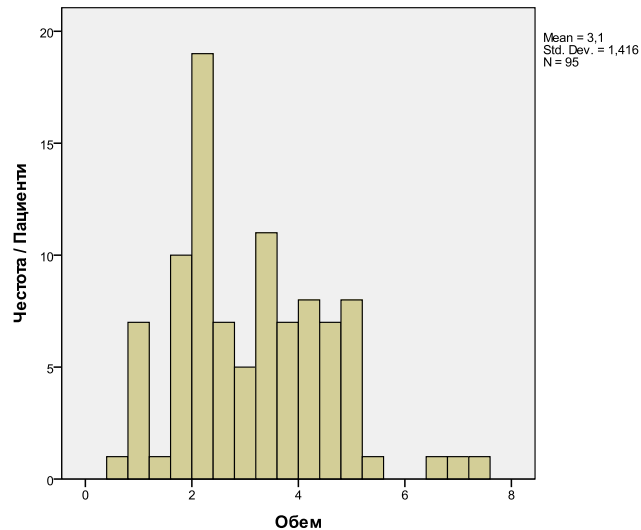
Избраните от нас класически и митохондриални показатели на сперматозоидите са изследвани в свеж еякулат на 97 пациенти, участващи в ин витро (ICSI) процедура (Таблица 3). Анализът на параметрите е осъществен с помощта на три основни метода: стандартен спермален анализ, флоуцитометричен анализ на пречистени и оцветени с катионно багрило сперматозоиди и биолуминисцентен тест за количествено определяне на АТФ.

За анализиране на еякулата, ММП, ММ и СОР са използвани свежи проби. Част от еякулата (за количествено определяне на АТФ) е отделен, надписан и замразен на -20°C до деня на анализа.

Таблица 3. Основни елементи на описателната статистика при стандартните показатели и параметрите за оценка на митохондриалния статус.

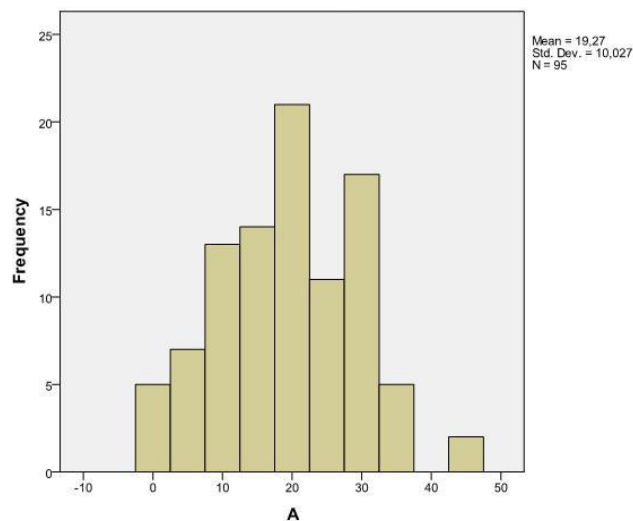
Описателна статистика						
Показател	Брой пациенти	Обхват	Минимална стойност	Максимална стойност	Средно аритметично	Стандартно отклонение
Обем	95	7	1	7	3.10	1.416
Вискозитет	89	3	1	4	1.64	0.968
Концентрация	95	350	1	351	79.11	66.971
Дни въздържание	93	7	1	8	3.75	1.308
pH	95	2	7	9	7.97	0.269
A	95	46	0	46	19.27	10.027
B	95	40	0	40	20.17	7.039
C	95	21	0	21	9.28	3.752
D	95	78	22	100	51.27	15.982
Морфология	78	20	1	12	4.25	3.05
Кръгли клетки	94	10	0	10	1.29	1.723
АТФ	87	0.199	0	0.199	0.033	0.032
JS1 (ММП)	88	87	3	90	44.45	22.45
MT (MM)	88	93	0	93	35.08	24.77
dJS	87	79	0	79	32.83	20.971
dMT	87	45	7	52	35.69	11.562
dMSOX	87	81	0	81	29.56	16.373
Качество на яйцеклетките	91	2	1	3	2.05	0.661
Качество на ембрионите	91	3	1	4	1.71	0.739

По отношение на обема на еякулата се наблюдава нормално разпределение на изследваната от нас извадка от пациенти. Най-голям брой от тях имат обем на еякулата 2 ml. Пациентите с обем между 2.5 ml и 5 ml имат равномерно разпределение. Малка е частта на пациенти с обем под 1 ml и над 5 ml (Фигура 1).



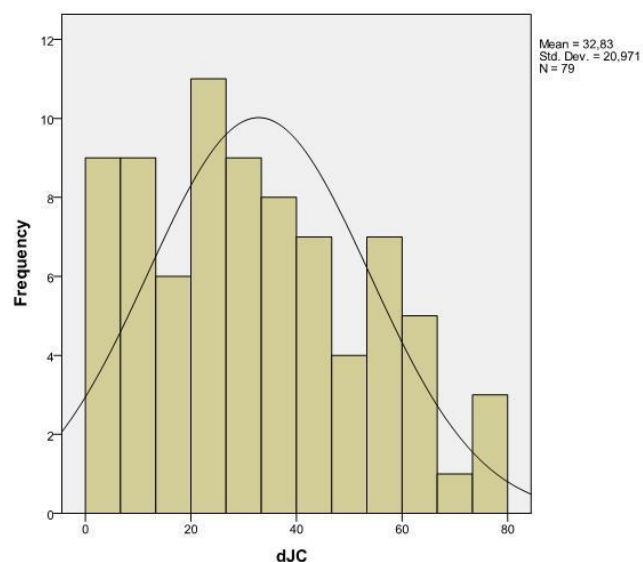
Фигура 1. *Хистограма на обема на еякулата при изследваните пациенти.*

Наблюдават се два пика в разпределението на мъжете по отношение на процента активно подвижни (клас А) сперматозоиди – с 20% и с 30%. Основната част от пациентите имат между 10% и 30% активно подвижни сперматозоиди (Фигура 2). По-малък брой пациенти имат стойности по-ниски от 10% и по-високи от 35%.



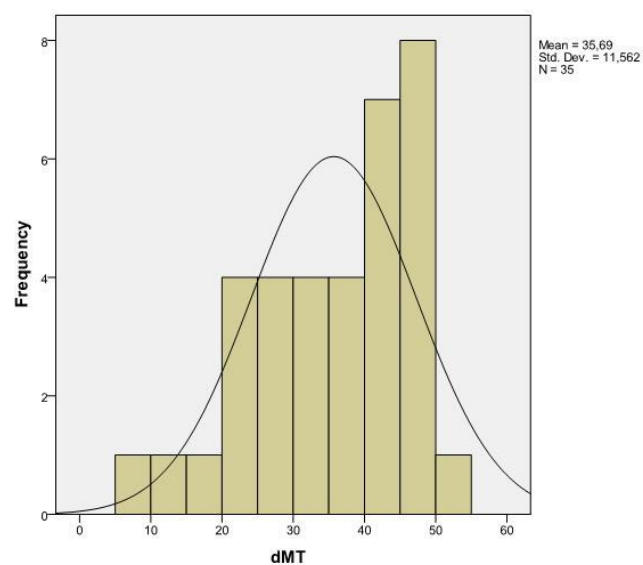
Фигура 2. *Хистограма на активно подвижните сперматозоиди (клас А) при изследваните пациенти.*

Най-голям брой пациенти имат стойности за ММП между 20% и 40%. Наблюдават се отрицателни стойности за ММП при двама от пациентите. Най-високи стойности за ММП (75% до 80%) се наблюдават в малък брой пациенти – 3 (Фигура 3).



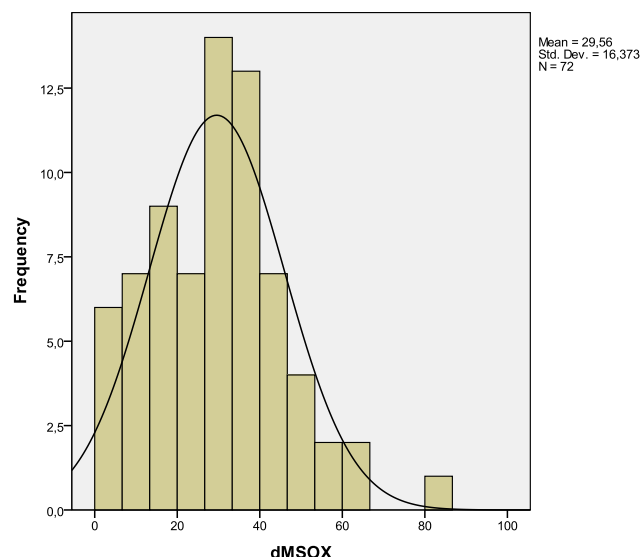
Фигура 3. Хистограма на разпределението по изменение на митохондриален мембранен потенциал (*dJC*) при изследваните пациенти.

Основната част от пациентите имат стойности за ММ в диапазона от 10% до 30%. Най-високи стойности (над 60%) показват осем пациенти (Фигура 4).



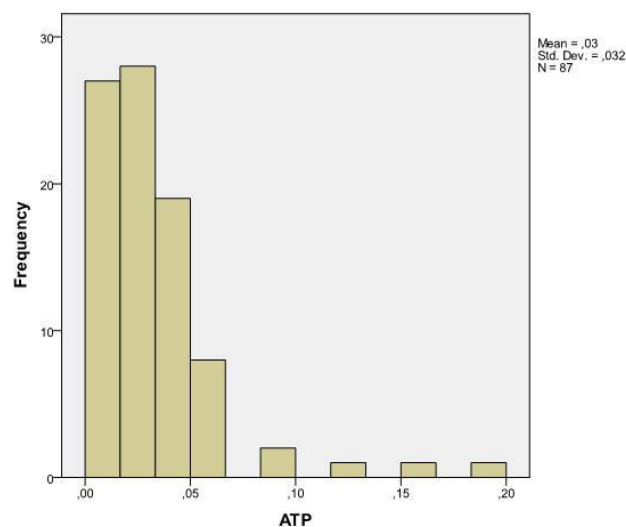
Фигура 4. Хистограма на разпределението на промяната в ММ (*dMT*) в изследваната група пациенти.

В изследваната от нас извадка пациенти се наблюдава нормално разпределение на *dMSOX*. Най-често срещаните стойности на показателя са между 20% и 40%. Много малка част от пациентите – 9, притежават сперматозоиди с високи стойности на супероксидните радикали – над 50% (Фигура 5).



Фигура 5. *Хистограма на разпределението на промяната в супероксидните радикали (dMSOX) в изследваната група пациенти.*

Най-често срещаните стойности за концентрацията на АТФ в сперматозоидите са между 0.001 и 0.05 $\mu\text{M}/\text{ml}$ АТФ/ 10^5 сперматозоиди. Като изключение, при малка част от пациентите се наблюдават по-високи стойности – до 0.2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ АТФ/ 10^5 сперматозоиди (Фигура 6).



Фигура 6. *Хистограма на разпределението на вътреклетъчната концентрация на АТФ в сперматозоидите на изследваната група пациенти.*

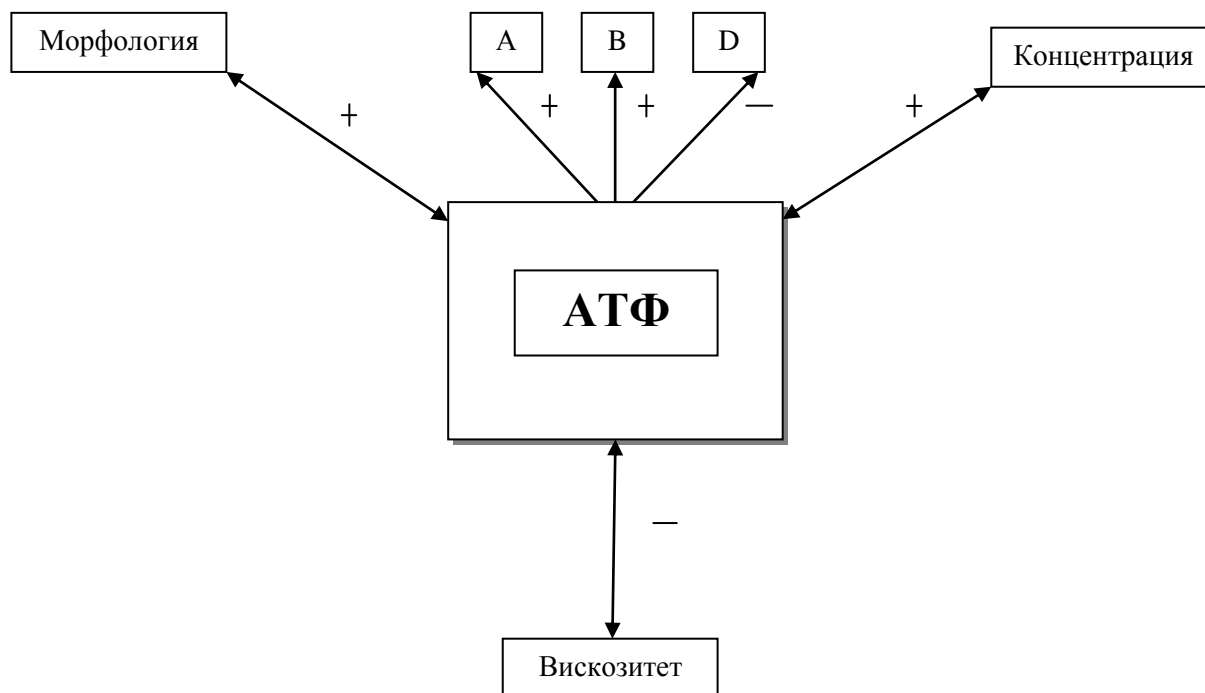
5.2. Взаимовръзки между показателите за оценка на митохондриален статус и стандартните показатели от спермограмата

5.2.1. Взаимовръзки на АТФ с класическите показатели от спермограмата

Взаимовръзките на АТФ с класическите показатели на спермограмата са анализирани с помощта на непараметричен корелационен анализ (Spearman).

Анализът на резултатите за взаимовръзките между стандартните показатели на спермограмата и АТФ показва статистически достоверна корелация на АТФ-нивата в сперматозоидите със следните параметри: концентрация, подвижност, вискозитет и

морфология (Фигура 7 и Таблица 4). Връзката с активно подвижните сперматозоиди (клас А и В), концентрацията и морфологичната оценка, е правопрпорционална, докато с вискозитета връзката е обратнопропорционална.



Фигура 7. Значими корелации между класическите показатели на спермограмата и нивата на АТФ, измерен в сперматозоидите ($P < 0.05$).

Таблица 4. Таблично представяне на стойностите, описващи корелационни връзки между класическите показатели на спермограмата и АТФ.

	Корелация с:	Корелационен коефициент / Р коефициент
АТФ	А (активно подвижни сперматозоиди)	0.456** 0.001
	В (подвижни сперматозоиди)	0.393** 0.004
	Д (неподвижни сперматозоиди)	-0.432** 0.009
	Концентрация, млн/мл	0.396** 0.033
	Вискозитет	-0.321** 0.007
	Стриктна морфологична оценка по Kruger	0.245* 0.048

През 1987 г. Megory и колеги изследват отношението на този енергиен параметър с някои от показателите на базисния семенен анализ (концентрация, подвижност, морфология и вискозитет). Използвайки множествен регресионен анализ, авторите установяват значима връзка на АТФ само с концентрацията на еякулата, но не откриват връзка на този параметър с подвижността и морфологичната оценка. Според авторите АТФ-нивата в сперматозоидите нямат отношение и към крайния резултат от ин витро процедурите – наличието или липсата на имплантация. В крайна сметка авторите правят заключение, че АТФ няма необходимата статистическа подкрепа да бъде включен в рутинния анализ на човешки еякулат (Megory et al., 1987). Значима връзка с концентрацията на еякулата установяваме и в нашето изследване ($R=0.396$), но

за разлика от тези автори, при нас статистически значима връзка се установява и за подвижността на сперматозоидите (клас А: $R=0.456$, $P=0.001$; клас В: $R=0.393$, $P=0.004$), и за морфологичната оценка ($R=0.245$, $P=0.048$).

Charles Vigue и колеги установяват АТФ в човешки сперматозоиди, като нивата са съпоставими с нивата в нашия експеримент – между $0.005 \mu\text{M}$ и $0.02 \mu\text{M}$ за 10^5 сперматозоиди. Авторите откриват разлика в концентрацията на АТФ при анализиране на проби от пациенти с нормозооспермия и олигозооспермия (АТФ 123.1 ± 21.6 към $90.0 \pm 24.5 \text{ pmol}/10^6$ сперматозоиди, респективно), но за разлика от Megory и колеги, и от нашите резултати, тя не е статистически достоверна. Още повече, те установяват, че сперматозоидите с по-голям потенциал за оплождане не показват по-високи нива на АТФ в сравнение със сперматозоидите с по-малък потенциал за оплождане. Заключение им е, че нивата на АТФ не са предиктивни по отношение на мъжкия инфертилитет (Vigue et al., 1992). Данните, публикувани от Megory, обаче, се потвърждават в нашето изследване – по-високи стойности на АТФ се наблюдават при пациенти с по-висок брой сперматозоиди. Подобни резултати са получени от Irvine и Aitken, които откриват позитивна корелация на концентрацията на сперматозоидите с нивата на измерения АТФ в тях (Irvine & Aitken, 1985).

Получените от нас резултати демонстрират позитивна връзка на АТФ с процента сперматозоиди клас А ($R=0.456$, $P=0.001$) и клас В ($R=0.393$, $P=0.004$), и негативна корелация с процента сперматозоиди клас D ($R=-0.432$, $P=0.009$) (Таблица 4). Връзката е статистически значима. Директна корелация между подвижността на сперматозоидите и АТФ е докладвана и от други автори. (Chan & Wang, 1987; Irvine & Aitken, 1985). Въпреки отчитането на позитивна връзка между концентрацията на сперматозоидите в еякулата и нивата на АТФ в сперматозоидите, Levin и колеги не откриват такава между подвижността и продукцията на АТФ (Levin et al., 1981). Подобен резултат получават Pousette и колеги, но за необработен еякулат. Повтарянето на експеримента с пречистени през плътностен градиент сперматозоиди показва наличие на силна позитивна корелация ($R=0.88$) между подвижност и АТФ (Pousette et al., 1986).

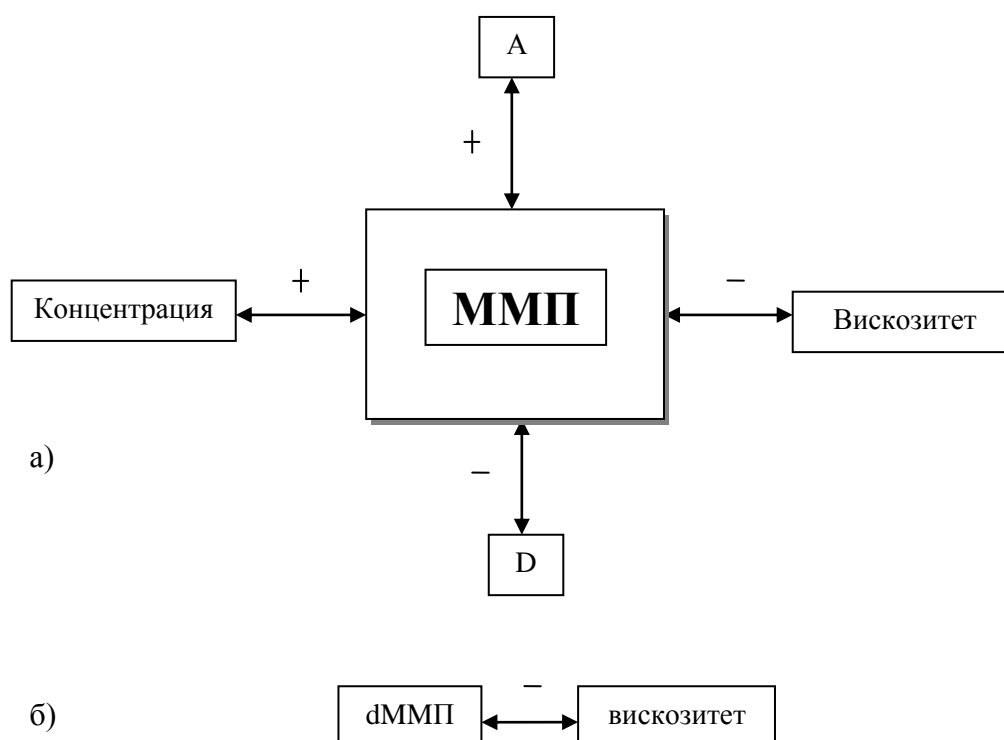
В литературата няма достатъчно данни по отношение на морфологичната оценка на сперматозоидите и връзката ѝ с АТФ-продукцията. Ние откриваме слаба позитивна корелация между тези два параметъра ($R=0.245$, $P=0.048$), докато изследванията на Megory не откриват такава (Megory et al., 1987).

Относно вискозитета на еякулата, нашите данни демонстрират силна негативна корелация на вискозитета с нивата на АТФ в сперматозоидите (Таблица 4). В литературата не се откриват публикувани данни, описващи такъв тип взаимовръзка. Необходими са допълнителни изследвания, които да потвърдят или отхвърлят корелацията между тези два спермални показателя.

В заключение може да се отчете, че АТФ нивата имат значими позитивни и негативни корелации с няколко важни семинални параметъра – концентрация, подвижност, морфологична оценка и вискозитет на еякулата, което го прави подходящ кандидат за оценка и селекция на сперматозоиди в контекста на асистирани репродуктивни технологии (АРТ).

5.2.2. Взаимовръзки на митохондриалния мембранен потенциал с класическите показатели от спермограмата

Получените резултати демонстрират положителна връзка на митохондриалния мембранен потенциал (ММП) с процента активно подвижни сперматозоиди (клас А) и концентрацията, и негативна корелация с процента неподвижни сперматозоиди (клас D) и вискозитета (Фигура 8 и Таблица 5).



Фигура 8. Значими корелации между класическите показатели на спермограмата и митохондриалния мембранен потенциал (ММП) – а), и изменението на ММП (dММП), измерен в сперматозоидите ($P < 0.05$) – б).

Таблица 5. Таблично представяне на стойностите, описващи корелационни връзки между класическите показатели на спермограмата и митохондриалния мембранен потенциал (ММП), и изменението му (dММП).

	Корелация с:	Корелационен коефициент / Р коефициент
ММП	А (активно подвижни сперматозоиди)	0.221* 0.039
	Концентрация, млн/мл	0.208 0.05
	Вискозитет	-0.340** 0.002
	Д (неподвижни сперматозоиди)	-0.288* 0.030
dММП	Вискозитет	-0.312 0.008

При използването на същото багрило за определяне на ММП, което сме използвали в настоящия експеримент – JC-1, през 1998 г. Troiano и колеги отчитат позитивна корелация ($P < 0.01$) с подвижността на сперматозоидите (Troiano et al., 1998). Подобни резултати с JC-1 са получени по-късно и от Donnelly в изследване от 2000 г. Той установява негативна корелация между процента увредени митохондрии и подвижността на сперматозоидите, което по същество се потвърждава и от настоящия анализ (Donnelly et al., 2000). Въпреки използването на различно багрило за отчитане на ММП – DiOC₆(3), резултатите публикувани през 2002 г. от Marchetti и колеги, са в съгласие с описаната от нас връзка на ММП с подвижността и концентрацията на сперматозоидите. Резултатите по отношение на подвижността са изключително близки до нашите ($R = 0.23$, $P = 0.04$), докато връзката с концентрацията е с по-голяма сила в

изследването на Marchetti и колеги (Marchetti et al., 2002). Описаната от нас и Marchetti връзка на ММП с подвижността на сперматозоидите, е в съгласие с проучванията и на други автори, изследвали този проблем по-рано и с различно багрило – Auger и колеги. Те отчитат през 1989 г., например, позитивна корелация на подвижността с митохондриалната активност, отчетена с трети вид багрило – Rh123 (Auger et al., 1989). През 2002 г. Kasai и колеги откриват статистически значими различия, сравнявайки група сперматозоиди с висок и нисък мембранен потенциал по отношение на параметъра процент подвижност (обща подвижност, A+B+C) (91.1 ± 8.5 срещу 63.0 ± 32.7 , респективно) (Kasai et al., 2002). Всички тези резултати потвърждават наличието на позитивна връзка между функционалното състояние на митохондриите и подвижността на сперматозоидите (Troiano et al., 1998; Marchetti et al., 2002; Auger et al., 1989; Kasai et al., 2002).

Освен с подвижността позитивна корелация е отбелязана и за концентрацията на сперматозоиди в еякулата (бр/мл). Връзката не се характеризира с голяма тежест ($R=0.208$, $P=0.05$), но потвърждава резултатите получени от Wang и Marchetti. В изследването на Marchetti от 2002 г. е отчетена позитивна връзка на ММП с концентрацията ($R=0.49$; $P=0.0001$). Подобен резултат е получен и от Wang ($P=0.62$). Различията в силата на връзката между ММП и концентрацията могат да се обяснят с различните багрила, използвани за отчитане на митохондриалната активност в двете изследвания – JC-1, и съответно DiOC₆(3), (Marchetti et al., 2002; Wang et al., 2003).

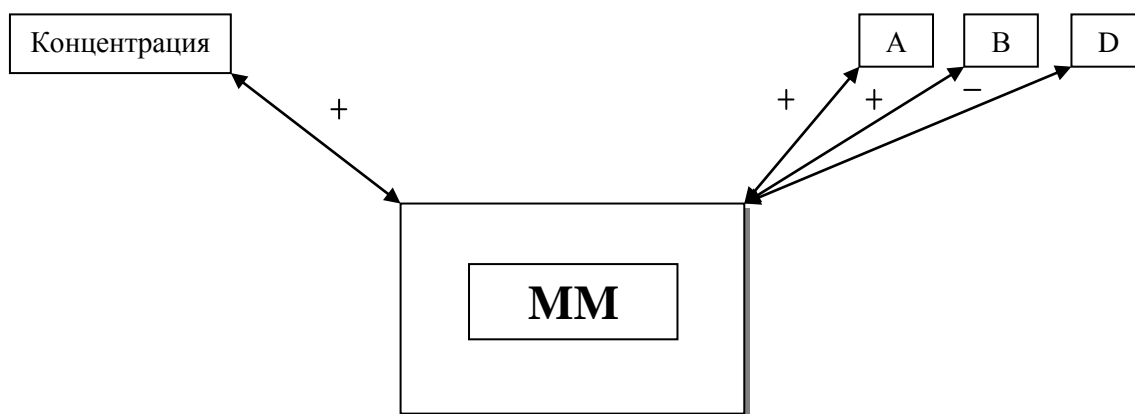
При отчитане на връзката на промяната в ММП (dММП) с класическите показатели се забелязва значима негативна връзка само с вискозитета на еякулата. Тя е и най-силна в сравнение с останалите (Таблица 5). Останалите корелации се губят най-вероятно поради усложняване на зависимостта на този показател с допълнителни процеси и събития. Както ще се отчете по-надолу, промяната на стойностите на изследваните показатели след добавяне на СССР (всички “делти” – d) има повече значими връзки от параметрите, от които произлизат.

Една от причините за такава отрицателна корелация може да бъде обяснена с негативното влияние на някой от факторите, определящи вискозитета на еякулата върху митохондриалната активност. Друга причина може да е свързана с увеличения разход на енергия необходима за придвижване на сперматозоидите в среда с повишен вискозитет. В литературата не съществуват данни, описващи връзката на вискозитета на еякулата с митохондриалната активност в сперматозоидите. Необходими са допълнителни изследвания за определяне на причините за тази зависимост.

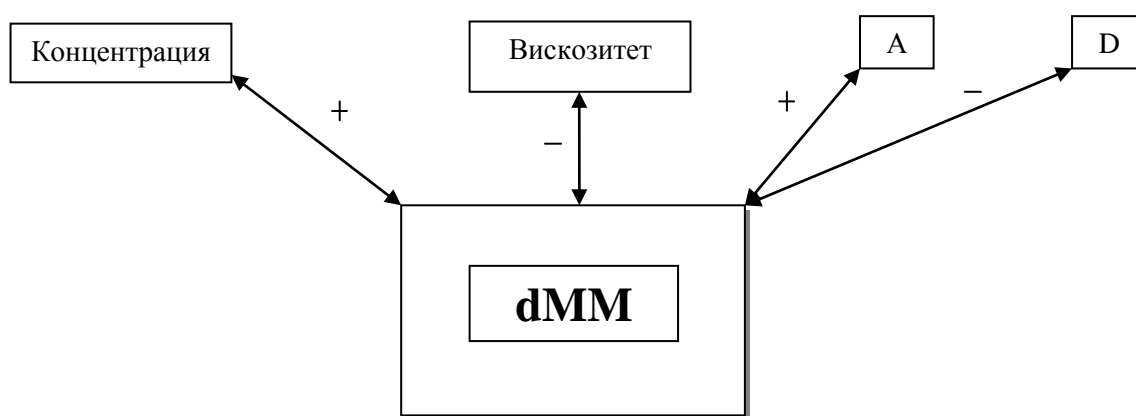
Нивата на ММП показват връзка и с други показатели от стандартния спермален анализ. След споменатите концентрация и подвижност, най-често такава връзка се търси с морфологичните показатели и ДНК-фрагментацията на сперматозоидите (Espinoza et al., 2009; Marchetti et al., 2002). В настоящото изследване тази връзка не е анализирана, но е заложена в бъдещи изследвания.

5.2.3. Взаимовръзки на митохондриалната маса с класическите показатели от спермограмата

Взаимовръзките на този показател с класическите показатели не се различава много от поведението на ММП, отчетен с JC-1 (Фигури 9 и 10, Таблица 6).



Фигура 9. Значими корелации между класическите показатели на спермограмата и митохондриалната маса (MM) ($P < 0.05$).



Фигура 10. Значими корелации между класическите показатели на спермограмата и изменението на митохондриалната маса (dMM) ($P < 0.05$).

Митохондриалната маса (MM) показва значима позитивна корелация с подвижността (клас A: $R=0.244$, $P=0.023$; клас B: $R=0.271$, $P=0.011$) и концентрацията ($R=0.341$, $P=0.001$) на сперматозоидите. Промяната на MM (dMM) негативно корелира с вискозитета на семиналната плазма ($R=-0.257$, $P=0.020$). Позитивна връзка между сперматозоидите, оцветени с MitoTracker Green (MTG), и подвижността ($R=0.811$, $P < 0.001$) е установена от Ana Sousa и колеги (Sousa et al., 2011). Те показват силна позитивна връзка и с още няколко специфични функционални спермални параметъра (интактна мембрана, COX1 експресия, интактна акрозома, капацитация и интегритет на хроматина). Връзката, обаче, се приписва на митохондриалния мембранен потенциал, измерен чрез MTG. На базата на изследвания на други автори (Poot et al., 1996; Krohn et al., 1999; Buckman et al., 2001; Scorrano et al., 1999) е установено, че MitoTracker Green е багрило, описващо показателя митохондриална маса и не е подходящо за отчитане на ММП. При големи разлики в мембрания потенциал на митохондриите в изследваните клетки, MTG показва малки изменения в стойностите. Това го прави неподходящ за използване относно ММП спрямо други багрила, които показват далеч по-силна връзка с ММП (Rh123, JC-1, DiOC₆(3)).

Таблица 6 Таблично представяне на стойностите, описващи корелационни връзки между класическите показатели на спермограмата и митохондриалната маса (ММ), и изменението ѝ (dММ).

	Корелация с:	Корелационен коефициент / Р коефициент
ММ	А (активно подвижни сперматозоиди)	0.244 0.023
	В (подвижни сперматозоиди)	0.271 0.011
	Д (неподвижни сперматозоиди)	-0.281 0.008
	Концентрация, млн/мл	0.341 0.001
dММ	Вискозитет	-0.257 0.020
	А (активно подвижни сперматозоиди)	0.382 0.026
	Д (неподвижни сперматозоиди)	-0.374 0.029
	Концентрация млн/мл	0.401 0.19

Все още не е напълно изяснено какво отразява МТГ при оценка на митохондриите. Някои автори, като Forero-Gonzalez и колеги, го използват за отчитане на митохондриална активност, докато други – за определяне на митохондриална маса (Forero-Gonzalez et al., 2012; Pendergrass et al., 2004). Няколко години по-рано подобно изследване е правено от Meseguer и колеги, които отново използват МТГ за оценка на ММП при човешки сперматозоиди. Подобно на Sousa, те наблюдават позитивна корелация с подвижните сперматозоиди от клас А и В ($R=0.785$; $P=0.001$) (Meseguer et al., 2004). Не се откриват литературни данни, описващи връзката на ММ с концентрацията на сперматозоиди в еякулата. Резултатите от текущия анализ показват позитивна връзка с концентрацията на сперматозоидите, млн/мл ($R=0.341$). Подобно на ММП, ММ също показва значима негативна връзка с вискозитета на еякулата ($R=-0.257$, $P=0.20$). Повишен вискозитет се наблюдава по-често при мъже с редуциран фертилитет (Du Plessis et al., 2013), което е още една заявка за използването на тези показатели за оценката и селекцията на сперматозоиди в АРТ.

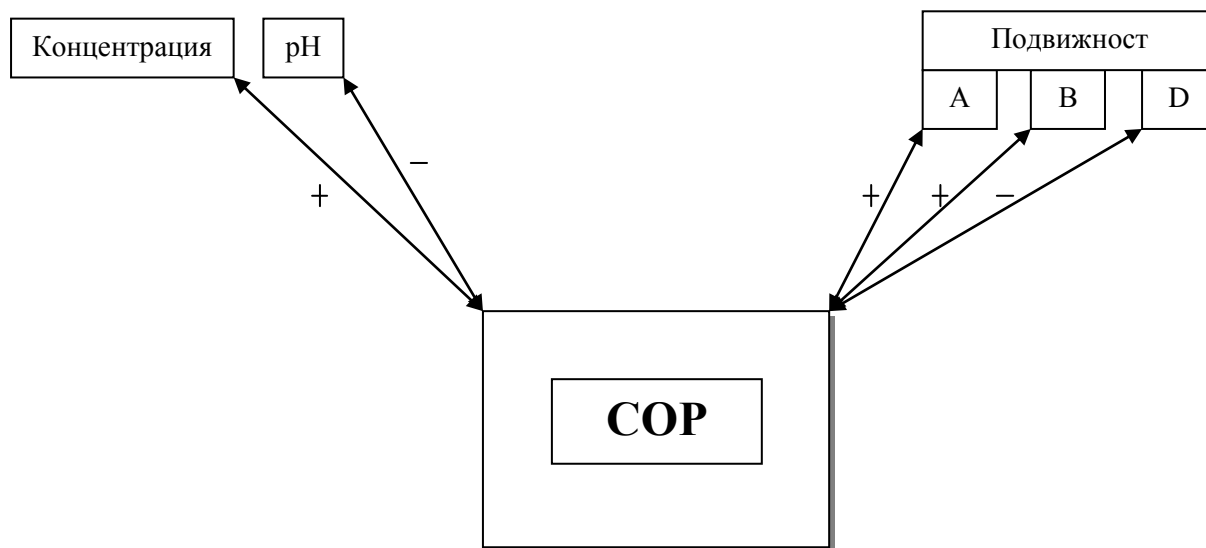
Промяната на ММ (dММ), за разлика от dММП, е по-стабилна по отношение на корелациите си с другите митохондриални показатели. Докато dММП губи всички връзки, освен най-силната – тази с вискозитета, dММ запазва броят връзки – 4. Появява се нова отрицателна зависимост на dММ с вискозитета, докато позитивната му връзка с клас В сперматозоиди отпада (Фигура 10). Това като че ли прави ММ и dММ по-стабилни показатели за окачествяване на сперматозоиди и по-подходящи от ММП и dММП за изграждане на предиктивен модел за късните събития – предположение, потвърдено по-късно и от получените резултати.

5.2.4. Взаимовръзки на супероксидните (кислородните) радикали с класическите показатели от спермограмата

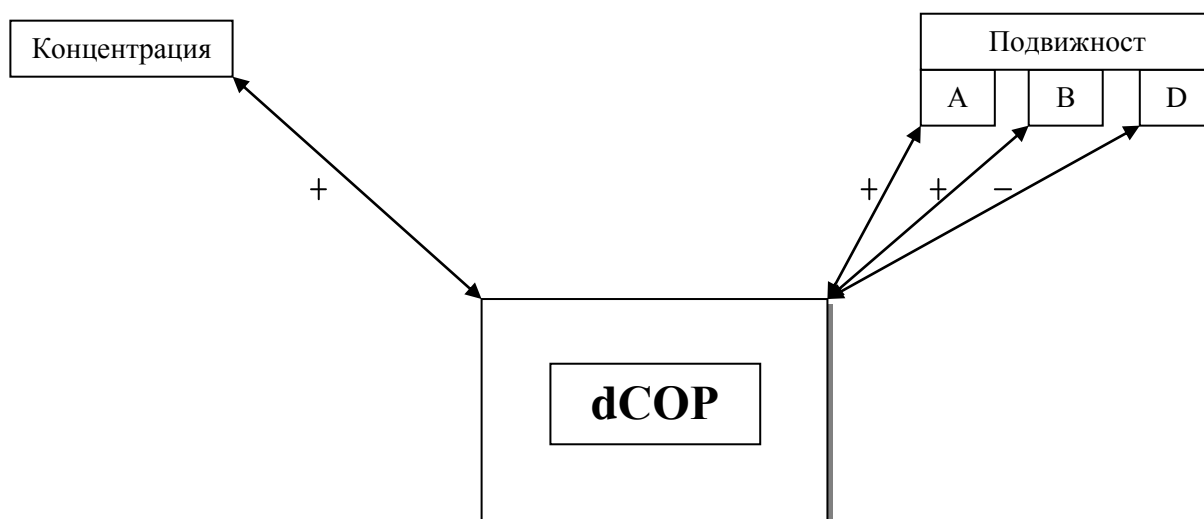
Подобно на предните два митохондриални показателя, супероксидните радикали (СОР) показват позитивна корелация с подвижността (Фигури 11 и 12).

Корелационните коефициенти между количеството на супероксидните радикали с концентрацията и подвижността на сперматозоидите, са значително по-високи в сравнение с тези при останалите показатели за митохондриалния статус (Таблица 7).

Това предполага по-силна взаимовръзка на стандартните параметри на спермограмата от натрупването на свободни радикали. При пациентите с висока концентрация и голям процент подвижни сперматозоиди (клас А и В) са отчетени високи стойности на супероксидните радикали (клас А: $R=0.435$, $P=0.009$), (клас В: $R=0.482$, $P=0.007$). В литературата връзката на кислородните радикали, продуцирани в сперматозоидите с класическите показатели, не е изследвана активно. През 2002 г. Marchetti и колеги изследват ММП, COP, ДНК-фрагментацията и виталността при човешки сперматозоиди с помощта на флоуцитометрични методи (Marchetti et al., 2002). Авторите не съобщават за значима корелация на COP, отчетени с HE (Hydroethidine), с подвижността и концентрацията, за разлика от ММП, който корелира и с двата класически параметъра ($R=0.23$, $P=0.04$; $R=0.49$; $P=0.0001$, респективно).



Фигура 11. Значими корелации между класическите показатели на спермограмата и супероксидните радикали (COP), измерени в сперматозоидите ($P<0.05$).



Фигура 12. Значими корелации между класическите показатели на спермограмата и промяната на супероксидните радикали (dCOP), измерени в сперматозоидите ($P<0.05$).

Таблица 7. Таблично представяне на стойностите, описващи корелационни връзки между класическите показатели на спермограмата и супероксидните радикали (COP).

	Корелация с:	Корелационен коефициент / Р коефициент
Супероксидни радикали (COP)	A (активно подвижни сперматозоиди)	0.435 0.009
	B (подвижни сперматозоиди)	0.482 0.007
	D (неподвижни сперматозоиди)	-0.466 0.005
	Концентрация, млн/мл	0.446 0.003
	pH	-0.270 0.011
Изменение на супероксидните радикали (dCOP)	A (активно подвижни сперматозоиди)	0.389 0.001
	D (неподвижни сперматозоиди)	-0.268 0.024
	Концентрация, млн/мл	0.260 0.028

Срещат се повече данни относно влиянието на кислородните радикали от обкръжението на сперматозоидите (семинална плазма, среда за култивиране) върху подвижността и концентрацията. Според някои автори повишените нива на ROS се асоциират с понижена подвижност на сперматозоидите (Lenzi et al., 1993; Agarwal et al., 1994; Armstrong et al., 1999; Griveau & Le Lannou, 1997). Връзката на COP с концентрацията на сперматозоиди в еякулата също е негативна (Aitken & Baker, 2013). Agarwal и колеги предполагат, че повишеното производство на ROS засилва процесите на апоптоза в герминативната линия и това води до понижаване в концентрацията на сперматозоидите, отделяни в еякулата (Agarwal et al., 2006).

Високите нива на супероксидните радикали при активно подвижните сперматозоиди, изследвани от нас, могат да бъдат обяснени с наличието на активни процеси на окислително фосфорилиране, водещи до отделянето на големи количества ROS. Наличието на добре функциониращи ензимни системи и на достатъчно количество антиоскиданти вероятно неутрализира негативния им ефект върху подвижността.

Aydemir и Tremellen асоциират хипервискозитета на семиналната плазма с повишени нива ROS в еякулата и предлагат повишения вискозитет на еякулата като маркер за оксидативен стрес (Aydemir et al., 2008; Tremellen et al., 2008). В случая ние анализираме кислородните радикали произведени в сперматозоидите, което е различно. Оксидативният стрес се свързва с повишен вискозитет на кръвта (Vaya et al., 1993; Késmárky et al., 2006). Някои автори намират директна връзка между концентрацията на определени радикали и вискозитета (Jain et al., 1990; Chung & Ho, 1999). Според Pfafferott и колеги радикалите (малонил диалдехид – МДА, например) участват в определяне на вискозитета чрез създаване на междумолекулни връзки с големи молекули – водещо до повишаване в плътността на средата (Pfafferott et al., 1982).

Промяната на COP след добавяне на йонофор запазва поведението си спрямо класическите показатели на спермограмата. Връзка се губи единствено с pH. В сравнение с dMMP, който губи почти всичките си връзки с изключение на тази с вискозитета (тя е и по-силна от останалите), dCOP остава стабилен във връзките си

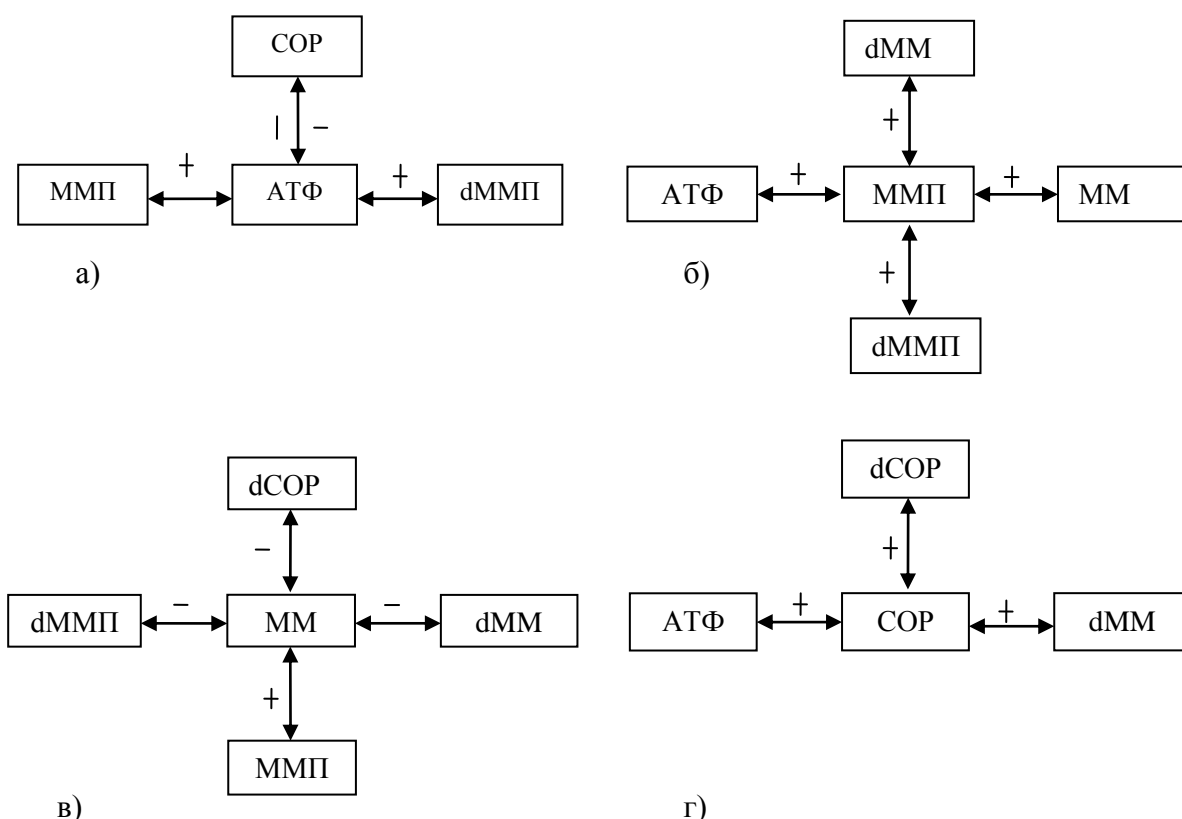
подобно на dMM. Това се вижда и по-надолу при изграждане на предиктивен модел, където регресионният анализ показва най-добра прогноза за dMM и dCOP, докато dMMП отпадна много по-рано в процеса на селекция на показатели.

5.3. Взаимовръзка на изследваните митохондриални показатели един спрямо друг

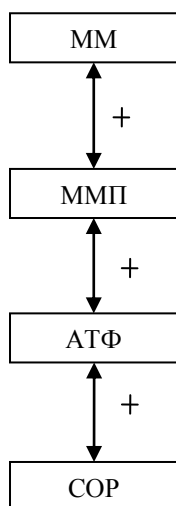
Взаимовръзките между митохондриалните параметри на човешки сперматозоиди не са изследвани в специализираната литература досега. Както се вижда от схемите представени на Фигура 13 и от Таблица 8, взаимовръзките са много и разнообразни.

Анализиран са отношенията на абсолютните стойности на митохондриалните параметри един спрямо друг (ММ, ММП, COP, АТФ) и спрямо отклоненията в абсолютните стойности след добавяне на протонофора СССР (dMM, dMMП, dCOP) (Фигури 13 – а, б, в, и г, 14 и 15 – а, б и в) и АТФ. СССР действа като йонофор и разрушава H^+ -градиент, необходим за нормалното функциониране на ЕТВ и АТФ синтазния комплекс.

При проведения от нас анализ установяваме различна реакция на митохондриалните параметри към третиране с СССР в различните анализирани проби. При част от изследваните сперматозоиди СССР намалява драстично абсолютните стойности за ММ, ММП и COP (високи стойности за dMM, dMMП, dCOP), докато в друга група пациенти СССР не променя значимо споменатите енергийни параметри (ниски стойности за dMM, dMMП, dCOP).



Фигура 13. Взаимовръзка на изследваните митохондриални показатели и измененията им един спрямо друг.



Фигура 14. Взаимовръзка на абсолютните стойности на изследваните митохондриални показатели един спрямо друг.

Таблица 8. Взаимовръзка на изследваните митохондриалните показатели.

	Корелация с:	Корелационен коефициент / Р коефициент
АТФ	ММП	0.289 0.009
	СОР	0.355** 0.001
	dММП	0.301 0.001
ММП	АТФ	0.289 0.009
	ММ	0.265* 0.013
	dММ	0.248 0.19
	dММП	0.888 0.001
ММ	ММП	0.265 0.013
	dСОР	-0.528 0.005
	dММП	-0.422 0.05
	dММ	-0.301 0.05
СОР	АТФ	0.355 0.001
	dММ	0.498 0.002
	dСОР	0.319 0.006

Може да се спекулира, че митохондриалният статус (най-вече митохондриалната маса, както ще се види по-долу) на сперматозоидите във втората група пациенти не позволява на СССР да увреди напълно митохондриалната функция и поради това стойностите за митохондриалните параметри не се изменят драстично, както се

наблюдава за сперматозоидите на първата група. Вероятно, в добре функциониращите митохондрии при сперматозоидите с добър потенциал на оплождане, капацитетът на митохондриите да превъзмогнат негативния ефект на СССР, върху изследваните митохондриални показатели, е по-голям и съответно това не се отразява фатално на митохондриалната функция. Така, промяната на митохондриалните показатели след добавяне на СССР, се явява като допълнителен функционален маркер за определяне на митохондриалната функция.

От представеното на Фигура 13в се вижда, че митохондриалната маса (ММ) корелира пряко само с един от другите показатели – митохондриалния мембранен потенциал (ММП) ($P=0.013$). СОР също корелират пряко само с един митохондриален показател – АТФ ($P=0.001$) (Фигура 13г). Митохондриалният потенциал (ММП) и АТФ показват позитивна корелация с по два от другите показатели: ММ и АТФ – за ММП (Фигура 13б); ММП и СОР – за АТФ (Фигура 13а).

Явно митохондриалната маса е параметър, определящ директно ММП, без да има пряко отношение към другите два параметъра – СОР и АТФ. ММП от своя страна има пряка връзка с митохондриалната маса (ММ) и с АТФ. Това вероятно е така заради логиката на генериране на АТФ във вътрешната митохондриална мембрана. По-високите стойности за ММП водят до по-високи нива на синтез на АТФ през АТФ синтазния комплекс. Връзката е пряка и правопрпорционална ($R=0.289$). Пряка връзка се намира и между измерения АТФ и нивата на генерирани вътреклетъчни СОР ($R=0.355$). Това отношение може да се обясни с логиката на образуване на по-голямата част от СОР в хода на ЕТВ. Знае се, че основното място за образуване на СОР в хода на ЕТВ, е комплекс I. При активна работа на ЕТВ се генерира по-висок ММП, по-голям брой електрони преминават през комплексите, разположени във вътрешната митохондриална мембрана и съответно вероятността за изтичане на електрони и прихващането им от кислородни атоми се увеличава, а така нивата на СОР също се повишават.

При анализ на връзките на абсолютните стойности за ММ, ММП, СОР и АТФ с отместванията след добавяне на СССР (Фигура 13) се установяват позитивни връзки на АТФ с dММП, на СОР с dСОР и dММ, на ММП с dММП и dММ. Всички корелации на митохондриалната маса (ММ) с промените на същата (dММ) след добавяне на СССР и на останалите показатели (dММП и dСОР) са с негативен знак. Голямата промяна в dММП се свързва с високи нива АТФ – логична връзка, тъй като високите стойности на dММП предполагат високи абсолютни стойности за ММП преди добавянето на СССР. Високите нива на ММП, както се видя по-рано, корелират позитивно с АТФ (Фигура 13б). По същия начин голямата промяна в СОР предполага високи начални стойности за този показател преди добавянето на йонофора. СОР корелират позитивно и с промяната в митохондриалната маса – по-високи стойности за dММ предполагат по-високи начални стойности и за ММ, съответно, повече активна повърхност на ВММ и повече СОР. Митохондриалният потенциал се свързва също позитивно, както със своята промяна dММП, така и с промяната на ММ (dММ).

Най-интересни са корелациите, получени за абсолютните стойности на митохондриалната маса (ММ) с dММ, dММП и dСОР (Фигура 13в). Всички те са с обратен (отрицателен) знак и могат да се обяснят по следния начин. Високите стойности за митохондриалния потенциал предполагат по-добра „съпротива” на нормалната функционалност срещу негативното влияние, което оказва йонофора (СССР) върху мембрания потенциал и митохондриалната функция като цяло. Затова и при по-високи начални стойности за митохондриалната маса негативният ефект на йонофора се минимализира. Ето защо, промените в стойностите на ММ и на другите два параметъра (ММП и СОР) след добавяне на СССР са слаби (имаме ниска стойност) при високи начални стойности на ММ. Никой друг показател няма подобно поведение спрямо другите. Това ни кара да обърнем особено внимание на този параметър по

отношение на оценката на функционалния статус на митохондриите, а оттам и при определяне на крайните събития от АРТ процедурите. Както ще обърнем внимание по-долу, този показател се оказва наистина „важен“ за оценка на качеството на човешките сперматозоиди. Той е и един от основните кандидати в опитите ни да изградим предиктивен модел за оценка на късните събития определени от бащината гаметата.

При анализирането на данните за връзките на dMM, dMMП, dCOP и АТФ помежду им, както и с абсолютните стойности на показателите преди добавянето на СССР, се установяват значими корелации (позитивни и негативни) (Фигура 15).

Както се вижда от схемите (Фигура 15), разликите в абсолютните стойности за ММП, ММ и COP корелират с най-голям брой други параметри (с по 4 други параметъра). Това е нормално е да се очаква, тъй като използваните показатели, въпреки че отразяват различни аспекти от функционалния статус на митохондриите, все пак зависят един от друг и/или произлизат един от друг (Фигура 14). Навсякъде присъства негативната корелация с митохондриалната маса (абсолютната стойност), позитивна връзка с ММП (за dMMП и dMM) и с dMMП (за dCOP), позитивна връзка с dCOP (за dMMП и dMM) и с dMMП (за dCOP), позитивни връзки със COP (за dMM и dCOP) и АТФ (само за dMMП). Стойностите и знакът на всички взаимоотношения са описани в Таблица 9.

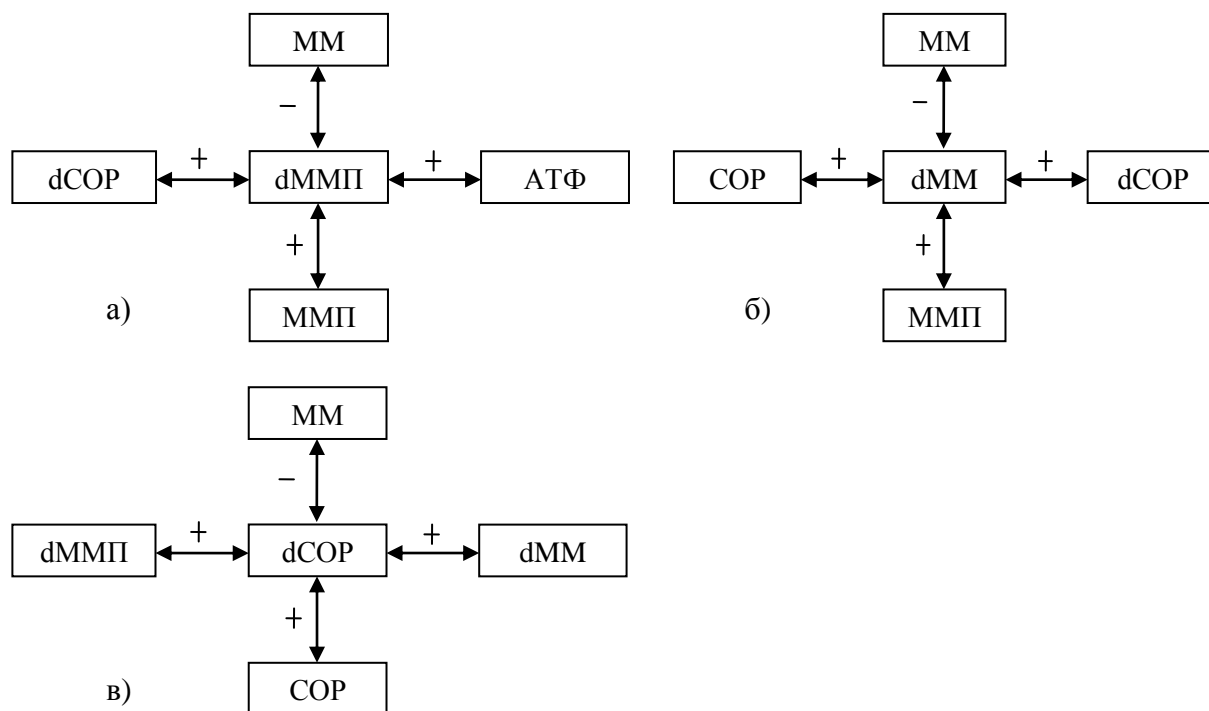
Таблица 9. Взаимовръзка на изменението (*d*) на митохондриалните показатели един спрямо друг.

	Корелация с:	Корелационен коефициент / Р коефициент
dMM	ММП	0.248 / 0.019
	dCOP	0.390 / 0.045
	COP	0.498 / 0.002
	ММ	-0.301 / 0.05
dCOP	COP	0.319 / 0.006
	dMMП	0.245 / 0.005
	ММ	-0.528 / 0.005
	dMM	0.390 / 0.045
dMM	dCOP	0.390 / 0.045
	ММП	0.248 / 0.019
	COP	0.498 / 0.002
	ММ	-0.301 / 0.005
dMMП	dCOP	0.245 / 0.005
	ММ	-0.422 / 0.05
	АТФ	0.301 / 0.001
	ММП	0.888 / 0.001

Корелационният анализ в тази глава засили интереса ни към митохондриалната маса като показател за описване функционирането на митохондриите в човешки сперматозоиди. Както е описано в литературния обзор, оценената посредством MitoTracker Green митохондриална маса, е параметър с неясна характеристика. И досега не е ясно кои са партньорите за взаимодействие с МТГ.

Според някои автори митохондриалната маса е потенциал-зависим показател (Buckman et al., 2001; Keij et al., 2000), според други – тя не се определя от електрохимичния градиент от двете страни на ВММ (Pendergrass et al., 2004). Още по-интересен е въпросът дали, ако съществува връзка с ММП, тя зависи от клетъчния тип и функционалния ѝ статус. Оказва се, например, че оцветяването с МТГ е зависимо от мембранный потенциал при астроцитите и намалява при неговата редукция, докато при невроните тази промяна е минимална (Buckman et al., 2001). При изследваните от нас сперматозоиди също има разлика по отношение на оцветяването с МТГ и на

редукцията на оцветяване, вследствие на разрушаване на ММП. Част от пациентите са със сперматозоиди, които не променят енергийните си характеристики значително след добавяне на СССР, и такива, при които промяната е драстична. Явно е, че в еякулата на пациентите съществуват популации сперматозоиди с различни митохондриални характеристики. Това важи и за тези оцветени с MTG.



Фигура 15. Взаимовръзка на промяната (d) в изследваните митохондриални показатели

Вече има изследване, в което се откриват две субпопулации сперматозоиди по отношение на оцветяването им с MTG (Sousa et al., 2011). MTG оцветява предимно митохондрии, но се среща и в други структури. Публикувани са данни (Sorice et al., 2004), предполагащи един от вероятните кандидати за свързване с MTG – това е фосфолипидът кардиолипин. Тези данни са косвени и произлизат от експеримент, при който в човешката моноцитна клетъчна линия U937 се предизвиква апоптоза и се следи локализацията на кардиолипин с антитяло срещу него, като имаме оцветяване и с MTG. Авторите на изследването отчитат оцветяване по мембраната на клетките, което се припокрива със сигнала, идващ от MTG – налице е ко-локализация. Това предполага или директна връзка между кардиолипина и MTG молекулата, или наличие на посредник на това взаимодействие (друга молекула/и). При индуциране на апоптотичен процес кардиолипинът, който нормално е натрупан основно в митохондриите, мигрира от митохондриалната мембрана към други клетъчни структури, включително до клетъчната мембрана. Това е и причината тези две молекули да се ко-локализират на повърхността на U937 човешки клетки.

Кардиолипинът е основен компонент от вътрешната митохондриална мембрана на митохондриите. Той има основна роля за структурното и функционално поддържане на ензимните комплекси, представляващи ЕТВ, а също и комплексът, генериращ АТФ. Синтезира се в митохондриите и основната му функция е да поддържа този органел функционално адекватен. Недостигът или липсата на кардиолипин се свързва с дисфункция на митохондриите и с метаболитни нарушения. Може да се предположи, че добре функциониращите митохондрии имат богати на кардиолипин мембрани и съответно биха се оцветили по-интензивно с MTG. Митохондриите с оптимални количества кардиолипин биха генерирали ММП с по-високи стойности и това прави

връзката между тези два параметъра позитивна. Стойността в нашия експеримент не е голяма ($R=0.265$, $P=0.013$). Вероятно това е така, защото партньорите, свързващи се с MTG (кардиолипин и/или др.) в контекста на ВММ не определят 100% от ММП и съответно стеричното пречене при взаимодействие с MTG не би сринало потенциала до нула, а само тази част от него, която е свързана с митохондриалната маса. Не е задължително митохондрии с висока ММ да генерират висок ММП. Може да има дефекти, които да компроментират ММП при наличие на достатъчно MTG-свързващи молекули по вътрешната митохондриална мембрана.

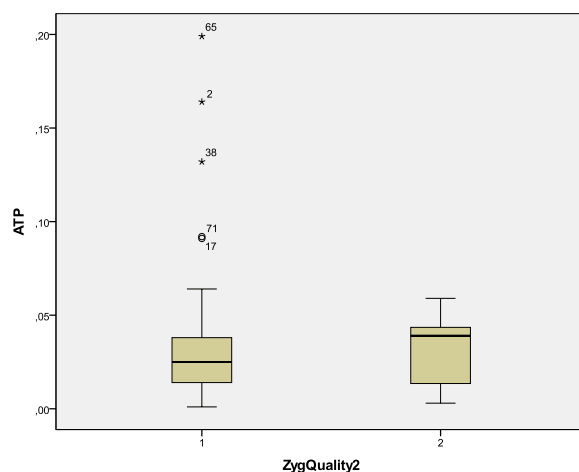
Наличието на такава връзка е в съгласие с качеството и функционалността на митохондриите. Добре функциониращите митохондрии се характеризират с висок ММП (Bagkos et al., 2014), което е съществено за синтеза на АТФ (Griffiths, 2000). Процесът на синтез на АТФ, от своя страна, е свързан с отделяне на реактивни кислородни видове, главно от комплекс I на ЕТВ (Liu et al., 2002). За това и високите нива на АТФ корелират положително, както с ММП (който всъщност е основната причина да се генерира АТФ), така и с кислородните радикали (продукти от действието на ЕТВ). Колкото повече електрони преминават през ЕТВ, толкова по-висок потенциал се генерира и толкова повече АТФ се синтезира.

И така, от получените резултати се вижда, че показателите корелират помежду си позитивно с близък интензитет. Оцветяването с MTG и JC-1 описва различни аспекти от митохондриалната функция. Докато JC-1 предоминантно описва ММП, MTG описва друго свойство на митохондриите, което обаче, се оказва важно за определяне на качеството на сперматозоидите и по-специално за прогнозиране на потенциала на сперматозоидите да осъществят правилно оплождане, нормално ембрионално развитие и в крайна сметка живо раждане. Така, без да разбираме какво отразява, MTG има потенциала да бъде използван в рутинната практика на ин витро клиниките за определяне на качеството и селекцията на сперматозоиди в АРТ.

5.4. Връзка на митохондриалните показатели с качеството на човешките зиготи

5.4.1. Връзка на АТФ с оплождането и качеството на човешките зиготи

В настоящото изследване се открива статистически значима негативна корелация между нивата на измерения АТФ и честотата на случаи с неуспешно оплодени яйцеклетки - 0PN ($R=-0.34$; $P=0.013$). Въпреки липсата на достоверност ($P=0.389$), нивата на измерения АТФ в сперматозоидите, дали начало на нормално оплодени яйцеклетки (2PN), са по-високи от нивата на АТФ, измерени в сперматозоидите, неуспели да оплодят яйцеклетките ($0.0409 \mu\text{M/ml}$ срещу $0.0174 \mu\text{M/ml}$, съответно) (Таблица 10). На Таблица 10 са показани средните стойности на АТФ в случаите с нормално оплождане (2PN), с поне 50% нормално оплождане ($2PN>50\%$) и случаите без оплождане (0PN) (Фигура 16).



Фигура 16. Графично разпределение на стойностите на АТФ по групи (група 1 – „добро качество на зиготите“; група 2 – „лошо качество на зиготите“).

Таблица 10. Средни стойности на измерения АТФ по отношение на параметъра оплождане и качество на зиготите.

Параметри	Средноаритметични стойности на АТФ
0PN	0.0174 $\mu\text{M/ml}$
2PN	0.0409 $\mu\text{M/ml}$
2PN>50%	0.0289 $\mu\text{M/ml}$
P коефициент	0.389
Добро качество на зиготите	0.035 $\mu\text{M/ml}$
Лошо качество на зиготите	0.030 $\mu\text{M/ml}$
P коефициент	0.652

Подобна позитивна корелация с оплодителния потенциал на сперматозоидите не се показва от други автори, изследващи отношението на АТФ, измерен в сперматозоидите с късните събития от АРТ. В изследване от 1985 г. на Irvine и Aitken се установява позитивна корелация между нивата АТФ в еякулата и способността на сперматозоидите да фузират с освободени зони от яйцеклетки на хамстери (zona-free hamster oocytes) в ин витро условия. Измерването на АТФ, обаче, в размразени проби, използвани след това за интраутеринна инсеминация, не показва значими разлики в групата на пациентите постигнали бременност спрямо тези с неуспешни опити (Irvine & Aitken, 1985). Авторите изказват съмнение относно предиктивната сила на АТФ в тази насока. Още повече, АТФ в този експеримент е измерен в цял еякулат за разлика от настоящия експеримент, където е отчетен АТФ в сперматозоидите. Подобен анализ е направен 3 години по-късно и от Chan и колеги. Измервайки нивата на АТФ в цял еякулат, авторите откриват достоверна корелация (както и ние) с концентрацията и подвижността, но такава липсва при анализа на този показател спрямо оплодителната способност, отчетена отново с помощта на zona free NEPA тест (Chan & Wang, 1987). Същата година Megory и колеги откриват връзка на измерения в цял еякулат АТФ единствено с концентрацията на сперматозоидите. За подвижността, морфологията и оплодителния потенциал авторите не откриват такава и затова дават на АТФ ограничена възможност за оценка на качеството на еякулата (Megory et al., 1987).

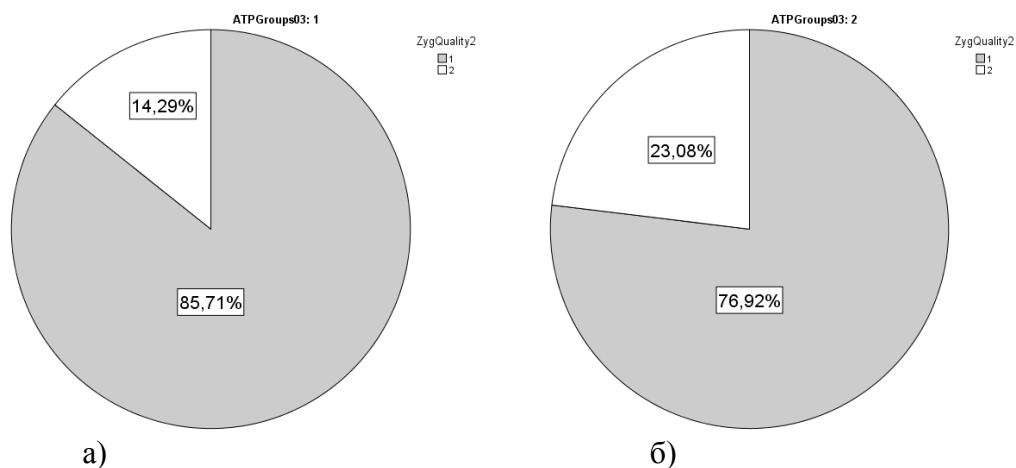
През 1990 г. Chan и колеги отново се опитват да свържат нивата на АТФ с оплодителния потенциал на сперматозоидите, но резултатите са негативни отново (Chan et al., 1990). Изследване, проведено в десет центъра за ин витро оплождане, също не показва връзка между АТФ нивата и оплодителния потенциал на сперматозоидите (World Health Organization, 2010).

Трябва да се отбележи, че всички по-горе цитирани анализи изследват нивата на АТФ в необработен еякулат, т. е. сперматозоидите са заедно със семиналната плазма, клетки на сперматогенезата и левкоцити, докато в проведените от нас изследвания АТФ е измерен само в сперматозоидите – това е принципно различен подход. Нивата на АТФ в семиналната плазма се определят не само от активността на сперматозоидите, а и от много други фактори: нивата на левкоцити в еякулата, концентрацията на клетки на сперматогенезата, клетъчен детрит, наличие на инфекции, дейността на епитела на редица жлези – семинални везикули, простатна, жлеза булбоуретрална жлеза и други. Затова и нивата на АТФ в тази многокомпонентна биологична течност не се свързват със събития, определени в същността си от сперматозоидите. Единствено Vigue и колеги изследват нивата на АТФ, както и АТФ/АДФ отношението в сперматозоиди на пациенти с нормозооспермия спрямо пациенти с олигозооспермия, като също не отчитат разлика между двете групи и така стигат до извода, че АТФ няма предиктивна стойност по отношение на оплодителния потенциал (Vigue et al., 1992). Направеното заключение не е коректно, защото се опитва да съотнесе резултата за нивата на АТФ към събитие, което не е проследено, а за което се съди косвено (авторите не са отчитали късните събития от АРТ като оплождане имплантация, живо раждане).

За да проверим какво е разпределението на зиготите с по-добра и с по-лоша морфологична оценка в две групи, създадени на базата на разделянето на анализиранияте сперматозоиди, на такива с висок и нисък АТФ, ние проведехме съответния Chi-square тест (Фигура 17). Добавянето на разделителна стойност по отношение на АТФ (0.03) и сравняването на процента добри зиготи към процента зиготи с лошо качество в групите с нисък АТФ (<0.03) и висок АТФ (>0.03) са представени на Фигура 17. Зиготите с по-добра морфологична оценка са повече (85.71%) в групата с по-ниски средни стойност за АТФ (<0.03) (Фигура 17).

Резултатите поставят под въпрос използването на този показател за оценка на оплодителния потенциал на сперматозоидите или на по-късните събития след АРТ. Необходими са още изследвания, които да потвърдят или отхвърлят използването му като предиктивен маркер.

P=0.023



Фигура 17. Графично разпределение на стойностите на АТФ по групи (а – АТФ<0.03; б – АТФ>0.03, група 1 (сиво) – „добро качество на зиготите“; група 2 (бяло) – „лошо качество на зиготите“).

5.4.2. Връзка на митохондриалния мембранен потенциал с оплождането и качеството на човешките зиготи

В настоящия експеримент митохондриалният мембранен потенциал (ММП) е анализиран в контекста на оплодителния потенциал на сперматозоидите, отразен като брой пронуклеуси след оплождане. Резултатите за ММП са усреднени в три групи в

зависимост от броя на пронуклеусите, наблюдавани 16-18 часа след оплождане с ICSI процедура. Както се вижда в Таблица 11, по-високи средни стойности за ММП откриваме в групата на правилно оплодените яйцеклетки – тези с 2PN в сравнение с неуспешно оплодените – тези с 0PN.

Таблица 11. Средни стойности на измерения ММП по отношение на параметъра оплождане.

	ММП	dММП
0PN	15.23	26.17
2PN	26.71	35.59
2PN > 50%	23.83	30.16
P коефициент	0.674	0.889

В изследване на Kasai от 2002 г. авторите откриват статистически достоверна позитивна корелация на стойността на ММП с процента оплодени яйцеклетки. В това изследване сперматозоидите са разделени на 3 групи в зависимост от стойностите, получени за ММП – висок, среден и нисък потенциал, като най-висок процент оплождане се наблюдават в първата и втората групи (80.5 и 78.9, съответно), докато в групата с най-нисък митохондриален потенциал (трета група) процентът на оплождане е най-нисък – 50.4 (Kasai et al., 2002).

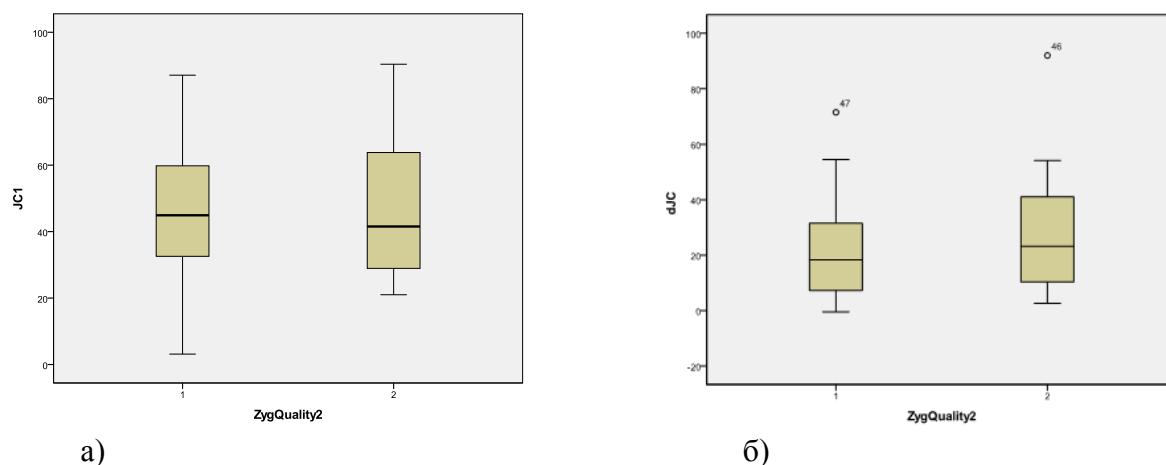
Marchetti също асоциира високия ММП на сперматозоидите с процента на оплождане след ин витро процедура (Marchetti et al., 2002). В изследването си от 2002 г. Marchetti установява позитивна и статистически достоверна корелация на ММП, измерен в необработен и обработен през градиент еякулат с процента на оплождане ($R=0.45$, $P=0.001$ и $R=0.30$, $P=0.04$, съответно). Няколко години по-късно същият екип потвърждава заключението си от изследването направено през 2002 г. Резултатите показват слаба положителна връзка на процента $\Delta\Psi^{\text{high}}$ сперматозоиди с оплодителния потенциал на сперматозоидите ($R=0.24$, $P=0.01$) (Marchetti et al., 2012).

Необходими са допълнителни изследвания върху по-голяма група пациенти, за да се определи тежестта на това изследване върху определяне на късни събития в ин витро практиката. Позитивната права корелация с концентрацията, подвижността и морфологията от базисните спермални показатели допълнително придава тежест на този показател. Наистина факторът концентрация на подвижните сперматозоиди е един от параметрите с най-голяма предиктивна сила по отношение на забременяване в естествени условия и корелира позитивно със способността за оплождане в ин витро условия.

Резултатите ни са в синхрон с резултатите на Kasai и колеги, които докладват значително по-голям процент оплождания в групата на сперматозоидите с висок ММП в сравнение с групата с нисък ММП (80.5 ± 10.2 срещу 50.4 ± 31.4). Отчетените в нашия експеримент стойности са по-ниски. (26.71 към 15.23).

Качеството на зиготите е следващият параметър от ин витро практиката, който бе анализиран спрямо ММП. Резултатите са представени на Фигура 18 и в Таблица 12.

Подобно на резултатите, получени за връзката на ММП с оплождането на яйцеклетките, анализът за резултатите, описващи връзката на ММП с качеството на получените зиготи, не показват статистическа значимост ($P=0.367$). Но по-високи стойности получаваме в групата на зиготите с лошо качество.



Фигура 18. Графично разпределение на стойностите на ММП/dММП по групи (група 1 – „добро качество на зиготите”; група 2 – „лошо качество на зиготите”).

Таблица 12. Качество на зиготите спрямо параметъра ММП и изменението му (dММП).

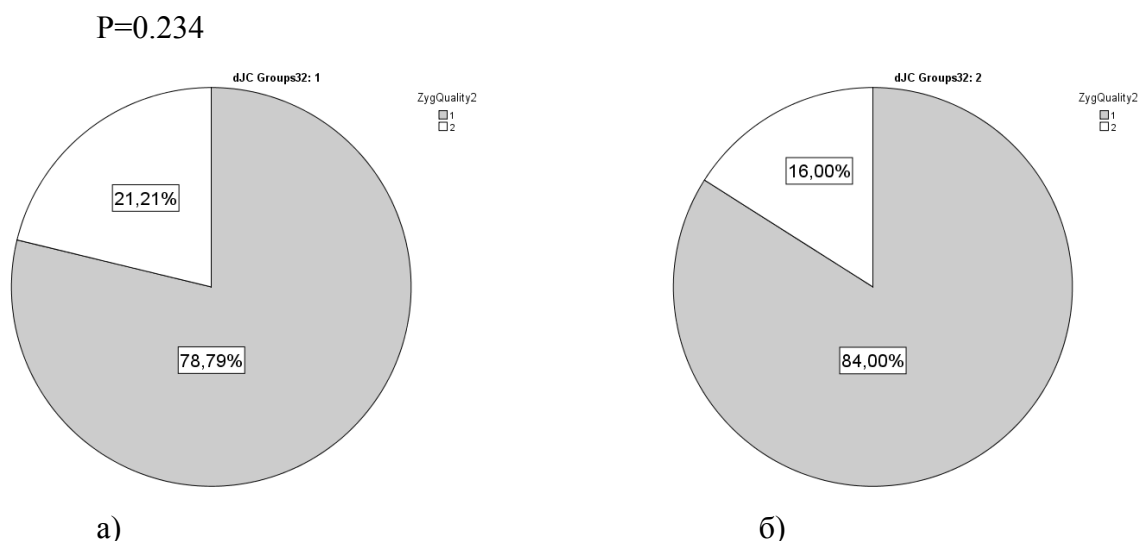
	ММП	dММП
Добро качество - 1	25.16	20.87
Лошо качество - 2	31.80	29.14
P коефициент	0.367	0.179

Връзката, получена за ММП и промяната му след добавяне на СССР (ММП/dММП) с оплождането на яйцеклетките и качеството на зиготите, не показва статистически достоверни различия в групите на зиготите с добро качество спрямо групата с лошо качество зиготи. Резултатите са представени на Фигура 18 и Таблица 12. Сравнявайки, обаче, промените в мембрания потенциал след добавяне на СССР (dММП), по-малки отмествания се отчитат в групата на зиготите с добро качество (група 1 – 20.87) в сравнение с групата с лошо качество (група 2 – 29.14). Може да се спекулира, че мембраният потенциал в митохондриите на сперматозоидите, дали начало на по-добри зиготи (с повече потенциал за развитие), е по-стабилен и след третиране с протонофора СССР мембраните на митохондриите не губят своята функционалност напълно.

За да проверим какво е разпределението на зиготите с по-добра и с по-лоша морфологична оценка в две групи, създадени на базата на разделянето на анализиранияте сперматозоиди, на такива с голямо и малко отклонение на митохондриалния потенциал, ние проведохме съответния Chi-square анализ.

Добавянето на разграничителна стойност по отношение на dММП (32.83) и сравняването на процента добри към процента зиготи с лошо качество в групите с малко отместване на dММП (<32.83) и голямо отместване на dММП (>32.83), са представени на Фигура 19.

В групата на сперматозоидите с по-голямо dММП (>32.83) (Фигура 19б) се забелязва по-висок процент зиготи с добро качество – 84% в сравнение с групата с малък dММП (<32.83) (Фигура 19а). Разликата не е голяма, нито е статистически достоверна и това прави този показател неподходящ за оценка на качеството на зиготите (P=0.234).



Фигура 19. Графично разпределение на стойностите на dMMPI по групи (а – dMMPI < 32.83; б – dMMPI > 32.83; група 1 (сиво) – „добро качество на зиготите”; група 2 (бяло) – „лошо качество на зиготите”).

Липсата на статистически достоверни различия за ММП и dMMPI по отношение на оплодителния потенциал (формиране на 2PN) и качеството на зиготите го прави неподходящ предиктор на тези събития.

5.4.3. Връзка на митохондриалната маса с оплождането и качеството на зиготите

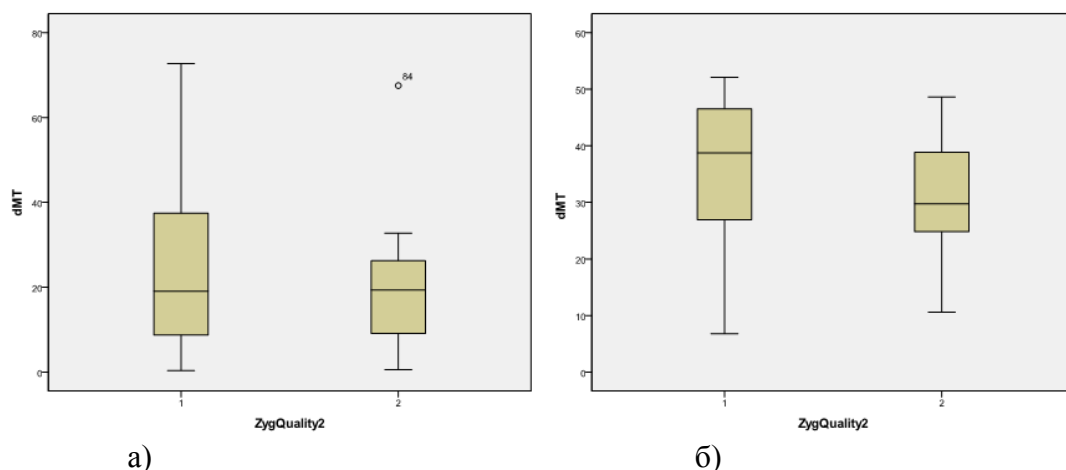
В настоящия експеримент митохондриалната маса е анализирана в контекста на оплодителния потенциал на сперматозоидите, отразен като брой пронуклеуси след оплождане. Резултатите за ММ са усреднени в три групи в зависимост от броя на пронуклеусите, наблюдавани 16-18 часа след оплождане с ICSI процедура. Както се вижда в Таблица 13, по-високи средни стойности откриваме в групата на правилно оплодените яйцеклетки – тези с 2PN в сравнение с неуспешно оплодените – тези с 0PN.

Таблица 13. Средни стойности на измерената ММ по отношение на параметъра оплождане.

	ММ	dMM
0PN	33.69	22.13
2PN	50.47	31.44
2PN > 50%	50.32	27.10
Р коефициент	0.387	0.736

Досега никой не е използвал митохондриалната маса, отчетена чрез MTG багрило, за оценка на оплодителния потенциал на сперматозоидите. Липсата на достоверност в настоящия експеримент я прави неподходяща за предсказване на изхода от оплождането, въпреки сравнително голямата разлика между стойностите за групите с 2PN срещу 0PN. Все пак, в изследването си от 2011 г. Sousa и колеги предполагат по-голям шанс за образуване на 2 пронуклеуса при сперматозоиди по-интензивно оцветени с MTG (Sousa et al., 2011). Необходими са повече изследвания, за да се прецени тежестта на този показател.

Анализът на резултатите, описващи връзката на ММ с качеството на получените зиготи (Фигура 20), не показват нито разлика (Таблица 14), нито статистическа значимост (P=0.580).



Фигура 20. Графично разпределение на стойностите на ММ/dMM по групи (група 1 – „добро качество на зиготите“; група 2 – „лошо качество на зиготите“)

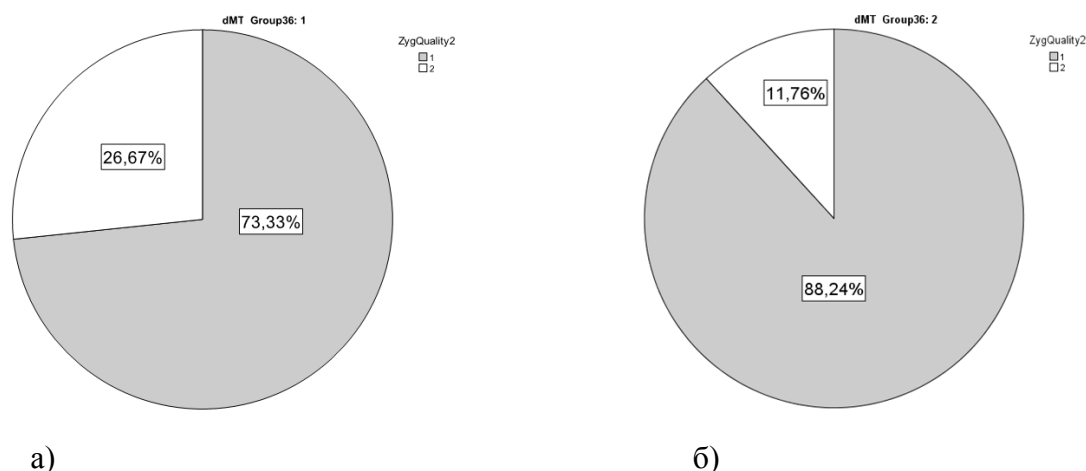
Таблица 14. Качество на зиготите спрямо параметъра ММ и изменението му (dMM).

	ММ	dMM
Добро качество - 1	50.24	36.11
Лошо качество - 2	50.61	30.41
Р коефициент	0.580	0.297

Промяната в показателите след добавяне на СССР са по-големи в групата на зиготите с по-добро качество (36.11) в сравнение с тези с лошо качество (30.41) (Таблица 14). Въпреки наличието на разлики те не са затвърдени от проверката за статистическа достоверност – полученият Р коефициент е 0.297.

За да проверим какво е разпределението на зиготите с по-добра и с по-лоша морфологична оценка в две групи, създадени на базата на разделянето на анализиранияте сперматозоиди, на такива с голямо и малко отклонение на митохондриалната маса, ние проведохме съответния Chi-square анализ (Фигура 21).

P=0.067



Фигура 21. Графично разпределение на стойностите dMM при: а) dMM<36 и б) dMM>36; група 1 (сиво) – „добро качество на зиготите“; група 2 (бяло) – „лошо качество на зиготите“.

Добавянето на разделителна стойност по отношение на dMM (36) и сравняването на процента добри към процента зиготи с лошо качество в групите с малка dMM (<36) и голяма dMM (>36), са представени на Фигура 21.

Анализът показва по-висок процент зиготи с добра морфологична оценка (88.24%) в групата на сперматозоидите с висока dMM (>36) в сравнение с получената стойност за групата на сперматозоидите с ниска dMM (<36) – 73.33%. Разликата не е статистически значима (P=0.067).

Липсата на статистически достоверни различия за MM и dMM по отношение на оплодителния потенциал (формиране на 2PN) и качеството на зиготите го прави неподходящ предиктор на тези събития.

5.4.4. Връзка на супероксидните (кислородните) радикали с оплождането и качеството на зиготите

Предположението, че COP могат да окажат влияние върху инфертилитета при мъжа, среща подкрепа сред редица научни публикации през последните години (de Lamirande & Gagnon, 1995; Aitken et al., 1989, 1998). Оплодителният потенциал на човешките сперматозоиди зависи от различни фактори като подвижност, нормална морфология, способност да капацитират и акрозомна реакция, а също и способност за свързване със zona pellucida. Изследователите използват нивата на COP, генерирани от сперматозоидите в ин витро условия или измерени директно в еякулата (Krausz et al., 1994; Zorn et al., 2003). Така или иначе, част от публикуваните досега данни показват връзка между нивата на COP и нивата на оплождане (Sukcharoen, 1995, 1996; Zorn et al., 2003), докато друга част не откриват такава връзка (Yeung et al., 1996).

Всички тези данни идват от експерименти, при които се отчитат COP, генерирани *in situ* от сперматозоидите в средата, в която са поставени след обработка или в цял еякулат. Докато при нас се отчита нивото на генериране на супероксидните радикали в самите сперматозоиди, без да се следят нивата на отделените от сперматозоидите в средата COP. Тази разлика в постановката пречи на сравняването на резултатите поради принципно различната концепция на двата типа измерване.

Анализирайки и обобщавайки резултатите от гореспоменатите публикации в мета-анализ от 2005 г. (Agarwal et al., 2005), се потвърждава измерването на COP преди ин витро оплождане като предиктивен способ за оценка на изхода от ин витро процедурата и като способ за селекция на сперматозоиди за ART.

Тъй като използваме принципно различен подход за анализ на COP, ние не можем да припознаем тези изводи като валидни за нашия експеримент. Резултатите, които сме представили по-долу доказват и разликите в направените изводи. Докато Agarwal и колеги намират негативна връзка между нивата на произведени от спермата COP в средата и оплодителния потенциал, нашите резултати застават по-скоро зад обратната теза. По-високи стойности за вътреклетъчните COP в случаите с нормално оплождане и морфологично качествени зиготи.

Средната стойност на COP в групата на успешно оплодените яйцеклетки (2PN) е по-висока (68.94) спрямо средната стойност на групата на неоплодилите се яйцеклетки – 0PN (63.33) (Таблица 15).

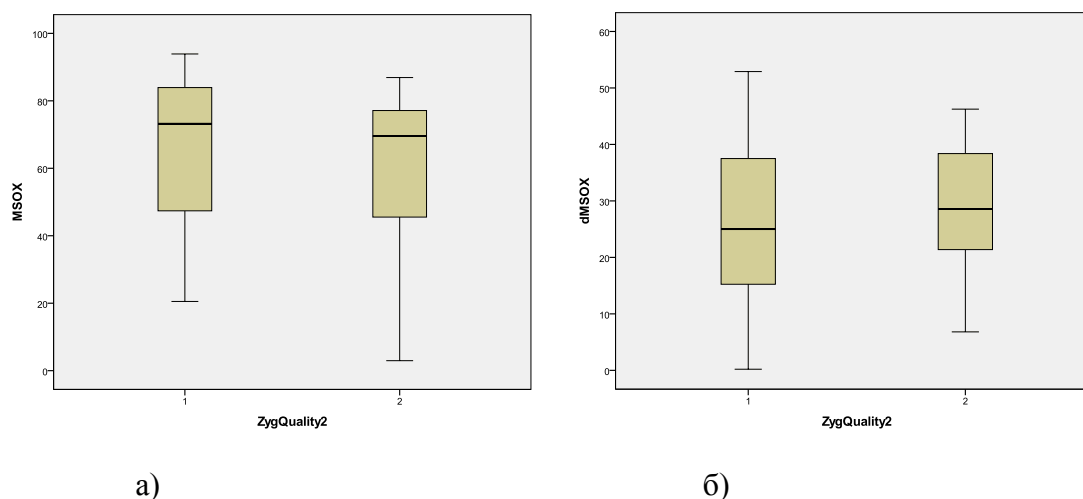
Резултатите, получени за връзката на COP с качеството на зиготите, са представени на Таблица 16 и Фигура 22. По-високи стойности се отчитат за COP в групата на морфологично по-добрите зиготи.

Таблица 15. Средни стойности на измерените COP/dCOP, по отношение на параметъра оплождане

	COP	dCOP
0PN	63.33	26.03
2PN	68.94	28.83
2PN>50%	58.63	32.11
P коефициент	0.204	0.765

Таблица 16. Качество на зиготите спрямо параметъра COP и изменението му (dCOP).

	COP	dCOP
Добро качество - 1	66.53	25.60
Лошо качество - 2	59.89	27.77
P коефициент	0.353	0.685



Фигура 22. Графично разпределение на стойностите на COP/dCOP по групи (група 1 – „добро качество на зиготите“; група 2 – „лошо качество на зиготите“).

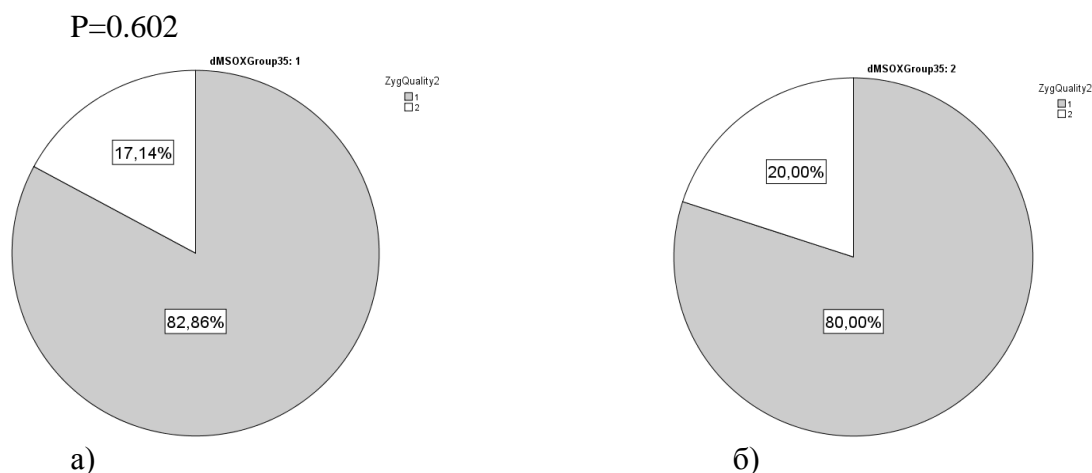
След анализи на резултата от оплождането, ние откриваме статистически значима негативна корелация на вътреклетъчните COP и промяната им (dCOP), измерени в сперматозоидите с липсата на оплождане (0PN) (Таблица 17), т. е. сперматозоидите с по-малки стойности за COP не стигат до нормално оплождане и обратното – по-високите нива COP корелират право пропорционално с успешното оплождане (2PN). Този резултат е в разрез с резултатите на Ghaleno, един от малкото изследователи, анализиращи вътреклетъчните COP на сперматозоидите с оплодителния потенциал и качеството на зиготите (Ghaleno et al., 2014). Авторите откриват негативна статистически достоверна корелация между нивата на COP, измерени в сперматозоидите и оплодителния им потенциал, т. е. по-високите нива на COP се свързват с редуциране в успеха от оплождането. Същите автори, обаче, не откриват връзка между измерените нива нито на COP, нито на H_2O_2 с качеството на получените зиготи. Относно качеството на зиготите нашите изследвания показват по-висока стойност за COP в групата на окачествените като по-добри зиготи (66.53) към групата на определените като лоши зиготи (59.89) – резултатът не е достоверен (P=0.353). Подобно на dMMP, dCOP също е по-нисък в групата на морфологично добрите зиготи (25.60). Резултатът не е статистически достоверен (P=0.685).

Таблица 17. Корелация на вътреклетъчни COP и изменението им (dCOP) с резултата от оплождање (OPN).

	COP	dCOP
OPN	-0.256	-0.240
P коефициент	0.032	0.045

За да проверим какво е разпределението на зиготите с по-добра и с по-лоша морфологична оценка в две групи, създадени на базата на разделянето на анализираниите сперматозоиди, на такива с голямо и малко отклонение на анализирания аналит (в случая това е супероксидните радикали), ние проведохме съответния Chi-square анализ (Фигура 23).

Добавянето на разграничителна стойност по отношение на dCOP (35) и сравняването на процента добри зиготи към процента зиготи с лошо качество в групите с малка dCOP (<35) и голяма dCOP (>35), са представени на Фигура 23. Почти не се открива разлика (82.86% спрямо 80%) за стойностите на dCOP в двете групи.



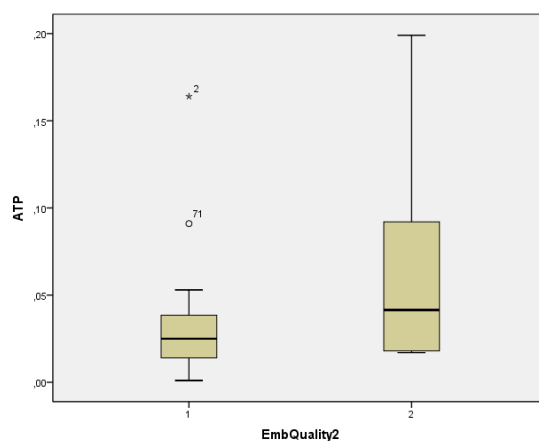
Фигура 23. Графично разпределение на стойностите на dCOP при: а) dCOP<35 и б) dCOP>35 по групи (група 1 – „добро качество на зиготите“; група 2 – „лошо качество на зиготите“)

И така, по отношение на оплодителния потенциал нивата на измерени COP корелират негативно с оплодителния потенциал и могат да се използват като предиктивен маркер за това събитие. Оценката на качеството на зиготата не е възможно на този етап с този маркер. Необходими са допълнителни изследвания на по-голяма група от пациенти.

5.5. Връзка на митохондриалните показатели с качеството на човешките ембриони

5.5.1. Връзка на АТФ с качеството на човешките ембриони

Вътреклетъчният АТФ в сперматозоидите не е изследван досега във връзка с морфологичното качество на ембрионите от други изследователи. Статиите, коментиращи тази връзка, използват АТФ в целия еякулат или АТФ, продуциран от сперматозоидите в ин витро условия след стимулация (Irvine & Aitken, 1985). Получените от нас данни са противоречиви и показват по-големи количества АТФ в групата на ембрионите с лоша оценка на качеството (Фигура 24).



Фигура 24. Графично разпределение на стойностите на АТФ по групи (група 1 – „добро качество на ембрионите”; група 2 – „лошо качество на ембрионите”).

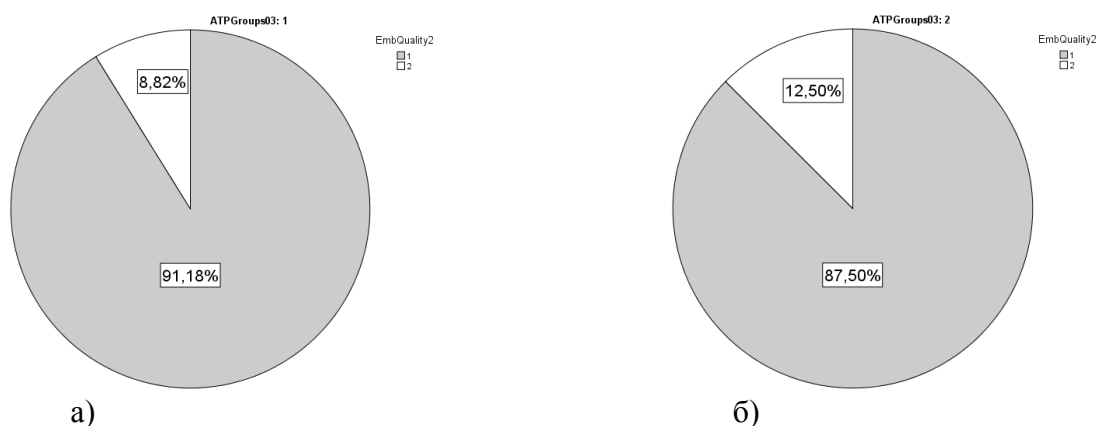
Както се вижда от Таблица 18, разликите в средните стойности са незначителни: 0.02863 $\mu\text{M/ml}$ към 0.02900 $\mu\text{M/ml}$ за групите на ембрионите с добра спрямо тези с лоша морфологична оценка. Въпреки това разликата е значима ($P=0.0063$). Тези резултати са изведени на база на много малко случаи във втората група (групата на ембрионите с лоша морфологична оценка). Въпреки статистическата достоверност, практически няма разлика в средните стойности за АТФ, така че и използването на този показател за оценка качеството на сперматозоидите е невъзможно.

Таблица 18. Корелация на АТФ с качеството на ембрионите.

	АТФ
Добро качество	0.02863 $\mu\text{M/ml}$
Лошо качество	0.02900 $\mu\text{M/ml}$
P коефициент	0.00630

За да проверим какво е разпределението на ембрионите с по-добра и с по-лоша морфологична оценка в две групи, създадени на базата на разделянето на анализиранияте сперматозоиди, на такива с нисък и висок АТФ, ние проведохме съответния Chi-square тест (Фигура 25).

$P=0.082$



Фигура 25. Графично разпределение на стойностите на АТФ по групи (а – АТФ < 0.03; б – АТФ > 0.03, група 1 (сиво) – „добро качество на ембрионите”; група 2 (бяло) – „лошо качество на ембрионите”).

Добавянето на разграничителна стойност по отношение на АТФ (0.03) и сравняването на процента добри към процента ембриони с лошо качество, в групите с нисък (<0.03) и висок (>0.03) АТФ, са представени на Фигура 25.

Ембрионите с по-добра морфологична оценка са повече (91.18%) в групата с по-ниски средни стойност за АТФ (<0.03). Резултатът не е достоверен (P=0.082) (Фигура 25).

Необходимо е тази връзка да се направи след набирането на по-голяма група за ембрионите с лошо качество. В това изследване не се открива прогностична сила на този показател спрямо качеството на ембрионите.

5.5.2. Връзка на митохондриалния мембранен потенциал с качеството на човешките ембриони

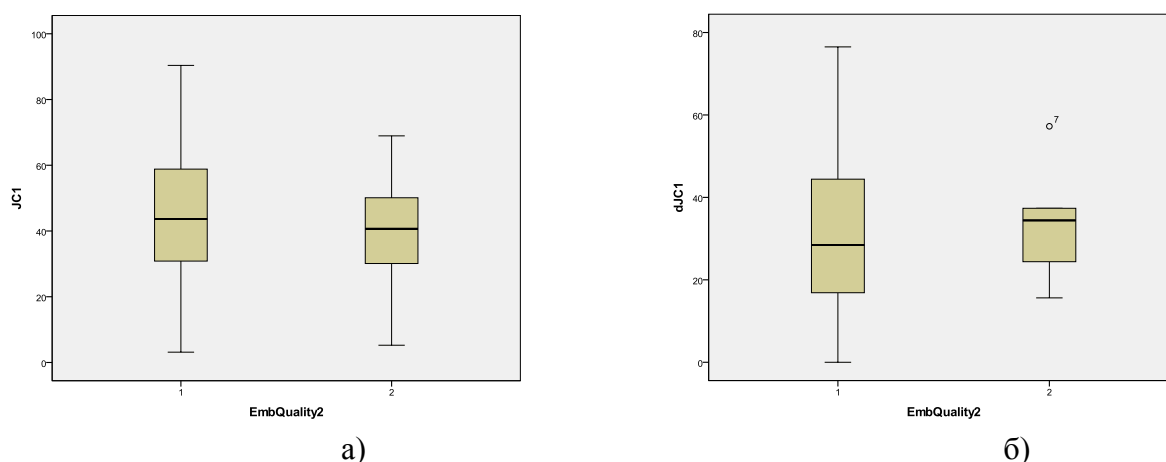
Митохондриалният мембранен потенциал (ММП) е с по-висока средна стойност в групата на ембрионите с по-добра морфологична оценка (44.51) в сравнение с групата на ембрионите с ниска морфологична оценка (39.93) (Таблица 19 и Фигура 26).

Таблица 19. Корелация на ММП/dММП с качеството на ембрионите.

	ММП	dММП
Добро качество	44.51	31.33
Лошо качество	39.33	33.81
Р коефициент	0.530	0.777

Получената разлика не е статистически достоверна (P=0.530) и в този смисъл е повторение на резултатите, отчетени от Marchetti и колеги през 2012 г., а именно – не се открива каквато и да е връзка между процента сперматозоиди с висок ММП и морфологичното качество на ембрионите (Фигура 26а) (Marchetti et al., 2012).

Разликата на тези показатели след добавяне на СССР (dММП) също е минимална (31.33 – за ембриони с добра морфологична спрямо 33.81 – за ембриони с лоша морфологична оценка) и статистически незначима (P=0.777) (Таблица 19).



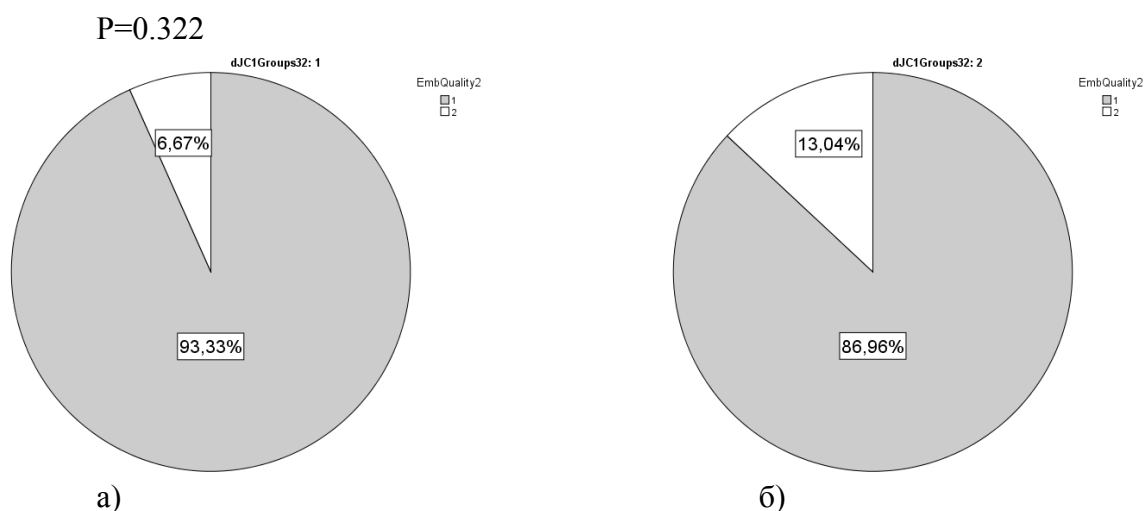
Фигура 26. Графично разпределение на стойностите на ММП/dММП по групи (група 1 – „добро качество на ембрионите”; група 2 – „лошо качество на ембрионите”).

Въпреки това, по-високи средни стойности откриваме за отклонението в групата на морфологично по-лошите ембриони (33.81). По-слабата промяна (31.33) в групата на морфологично добрите ембриони вероятно се дължи на по-добрия митохондриален статус (високи нива за ММ и ММП) и съответно по-добра регенеративна дейност на морфологично добрите ембриони. Необходими са повече анализирани случаи, за да се

потвърди или отхвърли ролята на тези показатели за определяне на качеството на ембрионите.

За да проверим какво е разпределението на ембрионите с по-добра и с по-лоша морфологична оценка в две групи, създадени на базата на разделянето на анализирания сперматозоиди, на такива с малко и голямо отклонение на анализирания анализ (в случая това е митохондриалният потенциал), ние проведехме съответния Chi-square анализ (Фигура 27).

Добавянето на разделителна стойност по отношение на dMMP (32.83) и сравняването на процента добри ембриони към процента ембриони с лошо качество в групите с малка dMMP (<32.83) и голяма dMMP (>32.83) са представени на Фигура 27. Открива се разлика (93.33% спрямо 86.96%) за стойностите на dMMP в двете групи. Или по-добри ембриони в групата с малки разлики на dMMP (<32.83) (Фигура 27a). Разликата е видима, но не е статистически достоверна (P=0.322).



Фигура 27. Графично разпределение на стойностите на dMMP при: а) dMMP<32.83 и б) dMMP>32.83 по групи (група 1 (сиво) – „добро качество на ембрионите“; група 2 (бяло) – „лошо качество на ембрионите“).

За съжаление в литературата липсват други данни за връзката на митохондриалния потенциал с морфологичната оценка на ембрионите. Изследванията са проведени при ограничен брой случаи на ембриони с лоша морфология (<10). Това компроментира допълнително направените изводи за този параметър. Ето защо, са необходими допълнителни изследвания върху по-голяма извадка, за да се изведат категорични изводи относно предиктивната сила на тези параметри за оценка на морфологичното качество.

5.5.3. Връзка на митохондриалната маса с качеството на човешките ембриони

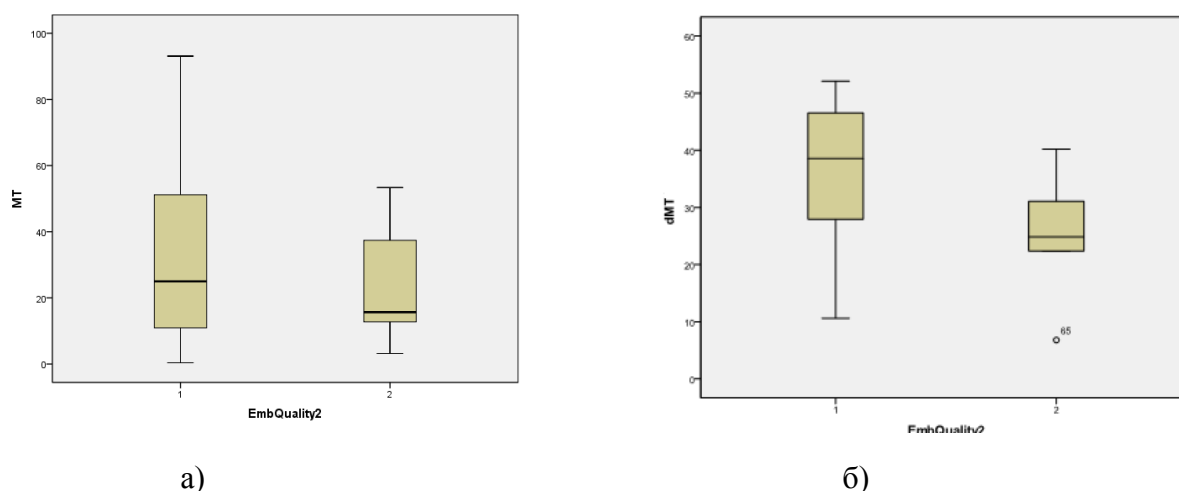
Отношението на митохондриалната маса (ММ), отразена като процент оцветени с MTG сперматозоиди над 10^1 към морфологичното качество на ембрионите, е представено на Таблица 20.

По-високи стойности за митохондриалната маса (ММ) са отчетени в групата на ембрионите с добра морфологична оценка (32.45) в сравнение със средните стойности на показателите, получени за другата група (24.65) (Таблица 20 и Фигура 28a).

Таблица 20. Корелация на ММ/dMM с качеството на ембрионите.

	ММ	dMM
Добро качество	32.45	36.44
Лошо качество	24.65	25.05
Р коефициент	0.447	0.047

Същото се отнася и за разликата, отчетена за dMM в двете групи след добавяне на СССР (Фигура 28б). По-голяма разлика за отместването е намерена в групата на ембрионите с по-добро качество (36.44 спрямо 25.05 за dMM). За разлика от ММ, отклонението й dMM е статистически достоверно (P=0.047) в изследваните групи (Таблица 20).



Фигура 28. Графично разпределение на стойностите на ММ/dMM по групи (група 1 – „добро качество на ембрионите”; група 2 – „лошо качество на ембрионите”).

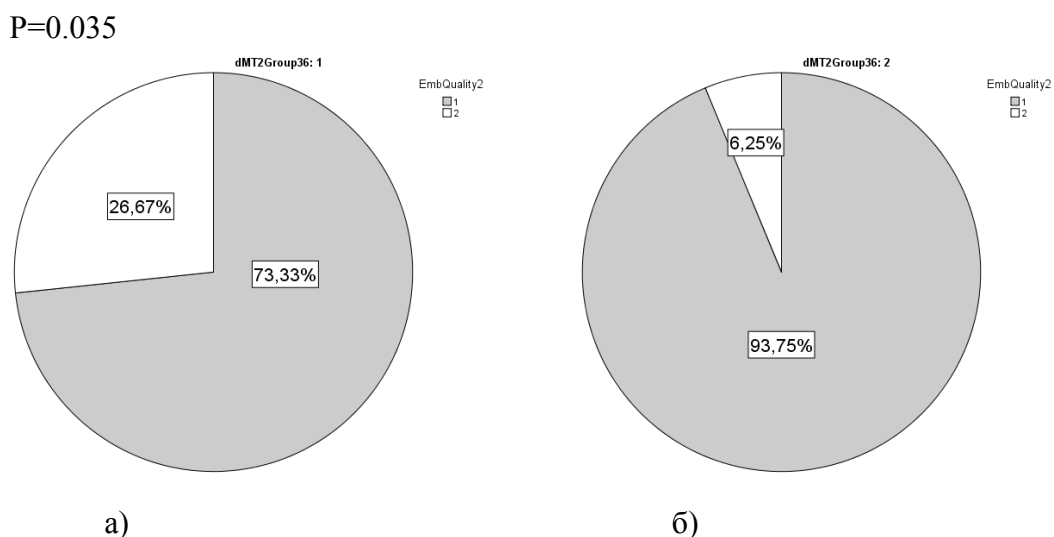
В литературата няма публикувани данни, изследващи връзката на митохондриалната маса с морфологичното качество на ембрионите. В публикация от 2011 г. Sousa и колеги сравняват две групи сперматозоиди: MTG-позитивна и MTG-негативна група и заключават, че MTG-позитивната субпопулация сперматозоиди съдържа значително по-голям брой капацитирани сперматозоиди (42.8 ± 6.1 спрямо 19.4 ± 3.1 , $P=0.001$), по-голям брой сперматозоиди с интактна акрозома (52.5 ± 5.5 спрямо 30.3 ± 4.9 , $P=0.005$) и много по-голям дял сперматозоиди с интактен хроматин (93.3 ± 1.0 спрямо 51.8 ± 2.8 , $P=0.0005$). Добре известно е, че всички тези условия са важни предпоставки за постигане на оплождане и правилното развитие на ембрионите (Sousa et al., 2011). Тези данни служат на авторите като причина да предположат по-добри резултати след АРТ за сперматозоиди, оцветени по-интензивно с MTG багрило. Предложената връзка, разбира се, е косвена и не може да се приеме като факт.

Анализът на нашите данни не показва статистически достоверна зависимост на ММ с качеството на ембрионите, но все пак се наблюдават по-високи средни стойности за ММ в групата на ембрионите с добро качество спрямо ембрионите с лошо качество (Фигура 28а). Нивата на промяната (dMM), обаче, се различават статистически достоверно в двете анализирани групи в полза на групата с добро качество – 36.44 спрямо 25.05 ($P=0.047$). Макар и непотвърдена статистически, разликата на ММ в двете групи е логична – вече се видя, че по-високите стойности за ММ са позитивно свързани с по-висок митохондриален мембранен потенциал (ММП) и по-добре работещи митохондрии като цяло. По-големите стойности на този показател се свързват негативно и с отместванията на другите анализирани митохондриални параметри –

dMM, dMMP, dCOP (Таблица 8). Не е изненадваща по-високата средна стойност в групата на „добрите” ембриони. Не толкова логична, обаче, е връзката на dMM с качеството на ембрионите. По-големи средни стойности за отместванията на този показател се установяват в групата на морфологично по-добрите ембриони (36.44). Ако следваме логиката на разсъжденията от точка 5.3 на резултати и дискусия, би трябвало да очакваме обратен резултат – по-малки стойности за отместванията в групата на по-добрите ембриони. Не всички ембриони с добра морфологична оценка, обаче, имат потенциала да достигнат до имплантация, клинична бременност и живо раждане. Не е задължително достоверните различия на етап морфологична оценка на ембрионите да се съотнесат и за крайния изход от ин витро процедурата. За нас най-важни са корелациите с крайните събития от АРТ-процедурите – имплантационен потенциал и живо раждане.

За да проверим какво е разпределението на ембрионите с по-добра и с по-лоша морфологична оценка в две групи, създадени на базата на разделянето на анализирания сперматозоиди, на такива с голямо и малко отклонение на анализирания аналит (в случая това е митохондриалната маса), ние проведохме съответния Chi-square анализ (Фигура 29).

На Фигура 29 е представено разпределението на ембрионите с добър и лош морфологичен профил, в групите с малка и голяма промяна на митохондриалната маса (dMM).



Фигура 29. Графично разпределение на стойностите на dMM при: а) dMT < 36 и б) dMT > 36 по групи (група 1 (сиво) – „добро качество на ембрионите”; група 2 (бяло) – „лошо качество на ембрионите”).

Резултатът от този анализ отново, този път със статистически достоверност (P=0.035), показва по-голям процент ембриони с отлично качество в групата с по-високи стойности за dMM (dMM > 36) – 93.75% спрямо 73.33%.

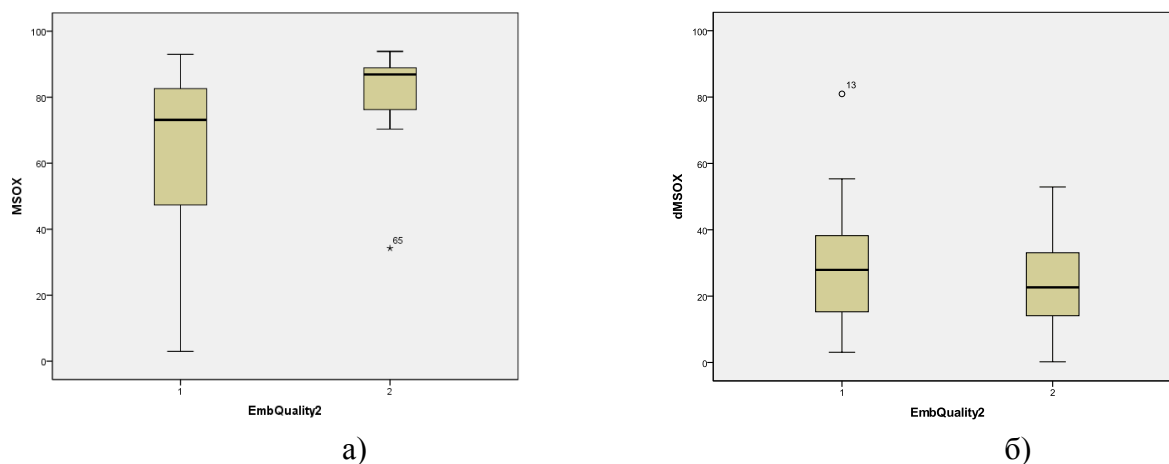
Явна е възможността на този показател да предсказва качеството на човешките ембриони.

5.5.4 Връзка на супероксидните (кислородните) радикали с качеството на човешките ембриони

Резултатите за влиянието на COP, измерени в сперматозоидите върху качеството на получените ембриони, са представени на (Фигура 30 и Таблица 21).

От данните, получени за връзката на COP/dCOP с качеството на ембрионите, може да се обобщи липсата на статистически достоверна корелация с морфологията на

ембрионите. Въпреки това, по-високи нива се отчитат в групата на ембрионите с лошо качество (77.89 спрямо 64.02). Промяната на dCOP показва по-големи стойности (27.74) в групата на морфологично добрите ембриони, но отчитаме по-голям процент сперматозоиди с високи стойности за COP в групата на ембрионите с лошо качество. Това е в съгласие с публикуваните резултатите и от други автори (Tremellen et al., 2008; Aitken et al., 2010) с разликата, че тези изследователи са отчетели нивата на COP, продуцирани в еякулата, а не в сперматозоидите, както сме направили ние.



Фигура 30. Графично разпределение на стойностите на COP/dCOP по групи (група 1 – „добро качество на ембрионите“; група 2 – „лошо качество на ембрионите“).

Таблица 21. Корелация на COP/dCOP с качеството на ембрионите.

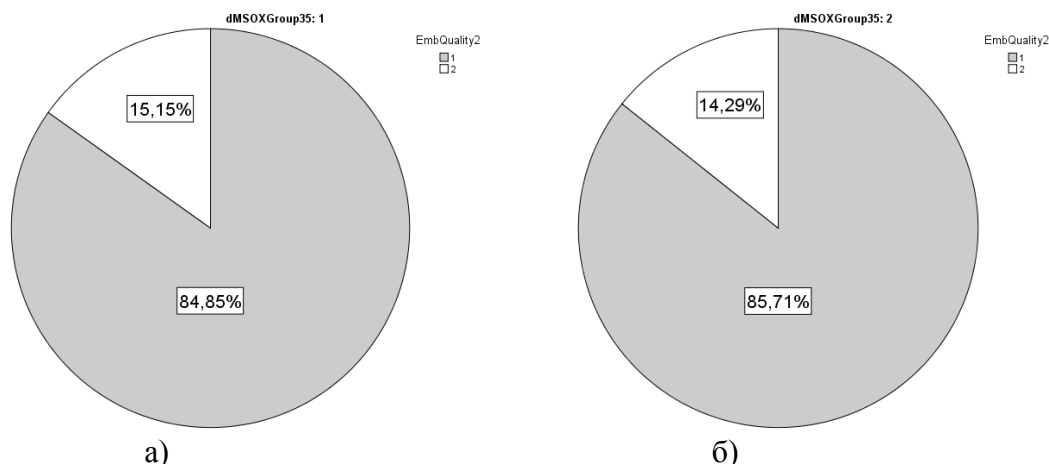
	COP	dCOP
Добро качество	64.02	27.74
Лошо качество	77.89	24.29
P коефициент	0.121	0.620

Saleh и колеги отново демонстрират негативна корелация между COP, отчетени в семиналната плазма и качеството на ембрионите след IVF или ICSI ($R=-0.89$, $P=0.007$) (Saleh et al., 2003). Връзката е отрицателна и значима, но COP са измерени отново в семиналната плазма. При нас не се наблюдава статистическа достоверност, но посоката на връзката е същата (негативна корелация). Противно на очакванията, промяната на този показател – dCOP, е по-голяма в групата на морфологично качествените ембриони (27.74 към 24.29, съответно) (Таблица 21). Връзката не е значима ($P=0.620$).

За да проверим какво е разпределението на ембрионите с по-добра и с по-лоша морфологична оценка в две групи, създадени на базата на разделянето на анализирания сперматозоиди, на такива с голямо и малко отклонение на анализирания аналит (в случая това са супероксидните радикали), ние проведохме съответния Chi-square анализ (Фигура 31).

На Фигура 31 е представено разпределението на ембрионите с добър и лош морфологичен профил в групите с малки (<35) и големи (>35) стойности за промяна на кислородните радикали dCOP. Избраната гранична стойност е 35.

P=0.432



Фигура 31. Графично разпределение на стойностите на dCOP при: а) dCOP<35 и б) dCOP>35 по групи (група 1 (сиво)– „добро качество на ембрионите“; група 2 (бяло)– „лошо качество на ембрионите“).

Резултатите се различават от обсъжданите по-горе връзки за този показател. Тук няма разлика в стойностите на отчетени добри (реципрочно лоши) ембриони в групите с по-високи (>35) или по-ниски (<35) стойности на dCOP – 85.71% към 84.85%, съответно. Статистическа достоверност също липсва (P=0.432).

От показаното в тази част може да се заключи, че нито COP, нито dCOP могат да се използват като предиктивни маркери за оценка на морфологичния статус на ембрионите.

5.6. Разлики на изследваните енергийни показатели (АТФ, ММП, ММ, COP) в групите на сперматозоидите, довели до образуването на успешно и неуспешно имплантирани човешки ембриони

Изводите за връзката на описаните в тази част параметри с късните събития след оплождането са направени върху значително по-малка извадка в сравнение с анализите, касаещи корелацията на същите параметри със стандартните спермални показатели. Това е така, защото индивидуалният план за АРТ-процедурата при част от пациентите е свързан със събиране и замразяване на ембриони и съответно отлагане на ембриотрансфера за неопределен период от време.

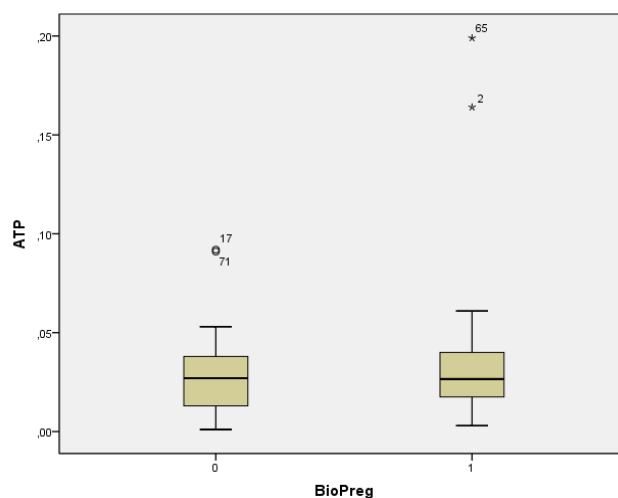
Таблица 22. Основни величини на описателната статистика на митохондриалните показатели при сперматозоиди, довели до получаването на неуспешно имплантирани ембриони (група 0) и успешно имплантирани ембриони (група 1).

		АТФ	JC	MT	MSOX	dJC	dMT	dMSOX
N	Valid (неимпл.)	25	27	27	27	27	27	27
N	Valid (импл.)	23	22	22	22	22	22	22
Средно – (неимпл.)		0.03	46.71	27.43	66.43	29.54	16.64	18.84
Средно – (импл.)		0.04	51.08	38.68	65.27	31.87	28.69	19.07
Медиана – (неимпл.)		0.03	46.38	22.81	77.87	26.32	13.56	22.62
Медиана – (импл.)		0.03	51.99	34.56	74.01	33.59	22.94	24.06
Ст. Отклонение – (неимпл.)		0.024	20.743	20.863	25.321	23.392	17.145	19.580
Ст. Отклонение – (импл.)		0.047	20.229	26.576	22.338	21.616	23.100	30.626

Обхват – (неимпл.)	0.091	87	67	91	103	74	88
Обхват – (импл.)	0.196	71	80	72	78	70	116
Минимум – (неимпл.)	0.001	3	0	3	-26	-19	-35
Минимум – (импл.)	0.003	8	4	21	-12	3	-51
Максимум – (неимпл.)	0.092	90	67	94	77	55	53
Максимум – (импл.)	0.0199	80	84	93	66	73	96

5.6.1. Разлики във вътреклетъчната концентрация на АТФ между двете групи сперматозоиди, довели до образуването на успешно и неуспешно имплантирани човешки ембриони

В двете анализирани групи има минимални разлики за средните стойности получени за АТФ: 0.02976 $\mu\text{M/ml}$ – за групата на неимплантираните спрямо 0.03957 $\mu\text{M/ml}$ – за групата на имплантираните ембриони (Фигура 32).



Фигура 32. Графично разпределение на стойностите на АТФ по групи (група 0 – „неуспешна имплантация“; група 1 – „успешна имплантация“).

Получените стойности за измерения АТФ кореспондират с резултатите на други автори, изследвали този параметър (0.005 $\mu\text{M/ml}$ и 0.02 $\mu\text{M/ml}$ за 10^5) (Megory et al., 1987). Анализът на резултатите не показва статистическа достоверна връзка между концентрацията на АТФ в сперматозоидите и резултата от биохимичния тест за бременност (Таблица 23 и Фигура 32). Нивата на измерения АТФ са по-високи в групата на имплантираните ембриони (0.04 $\mu\text{M/ml}$) в сравнение с АТФ, измерен в групата на неимплантираните (0.03 $\mu\text{M/ml}$). Разликата, обаче, не е достоверна ($P=0.360$) (Таблица 23).

Таблица 23. Корелация на АТФ с имплантирането на ембрионите.

	АТФ
Неимплантирани ембриони	0.02976 $\mu\text{M/ml}$
Имплантирани ембриони	0.03957 $\mu\text{M/ml}$
Р коефициент	0.35976

Подобен резултат е получен и в проучване на СЗО, публикувано във списание Fertility Sterility през 1992 г. (WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th Edition, 2010). Според авторите на статията нито стандартните спермални параметри, нито количеството на АТФ в сперматозоидите имат връзка с

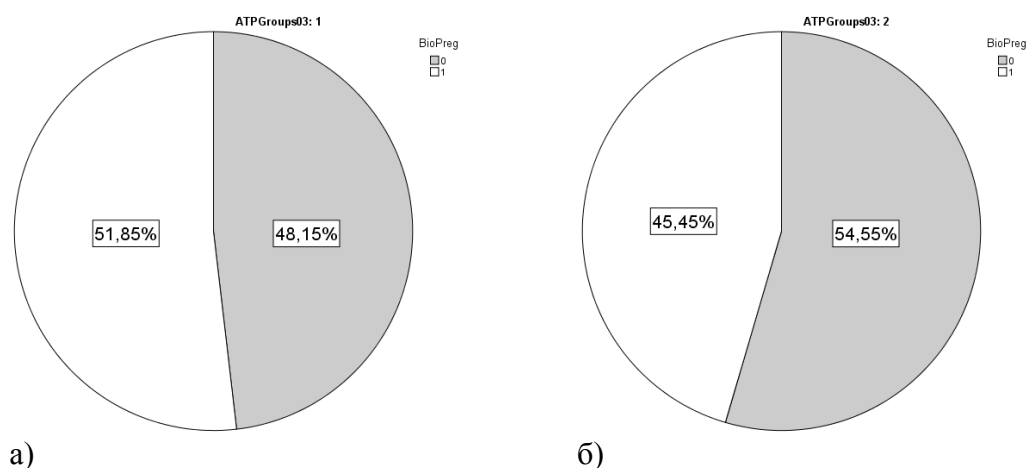
резултатите от теста за бременност и не могат да служат като параметър, предсказващ биохимична бременност при хората.

Логично е да се очаква сперматозоидите, достигнали до яйцеклетката в женския репродуктивен тракт (*in vivo*), да съставляват популацията в еякулата с най-добра подвижност. От корелационния анализ в предните глави се вижда силна позитивна връзка между различните показатели, описващи подвижността (клас А: $R=0.456$, клас В: $R=0.393$) с нивата на АТФ, измерен в сперматозоидите. Налице е и значима негативна корелация между нивата на АТФ и случаите с неуспешно оплождане, т.е. за правилното оплождане и образуване на зигота е необходимо достатъчно количество АТФ. Тази връзка наистина е силна, но не е достатъчна за предсказване на събития, които се случват много напред във времето и се определят от други показатели.

За да проверим какво е разпределението на имплантираните и неимплантираните ембриони в две групи, създадени на базата на разделянето на анализиранияте сперматозоиди, на такива с високи и ниски стойности за АТФ, ние проведохме съответния Chi-square анализ (Фигура 33).

На Фигура 33 е представено разпределението на имплантираните спрямо неимплантираните ембриони в групите с ниски (<0.03) и високи (>0.03) стойности на АТФ. Избраната разделителна стойност е $0.03 \mu\text{M}$.

$P=0.064$



Фигура 33. Графично разпределение на стойностите на АТФ при: а) $ATP < 0.03$ и б) $ATP > 0.03$ по групи (група 0 (сиво) – „неуспешна имплантация“; група 1 (бяло) – „успешна имплантация“).

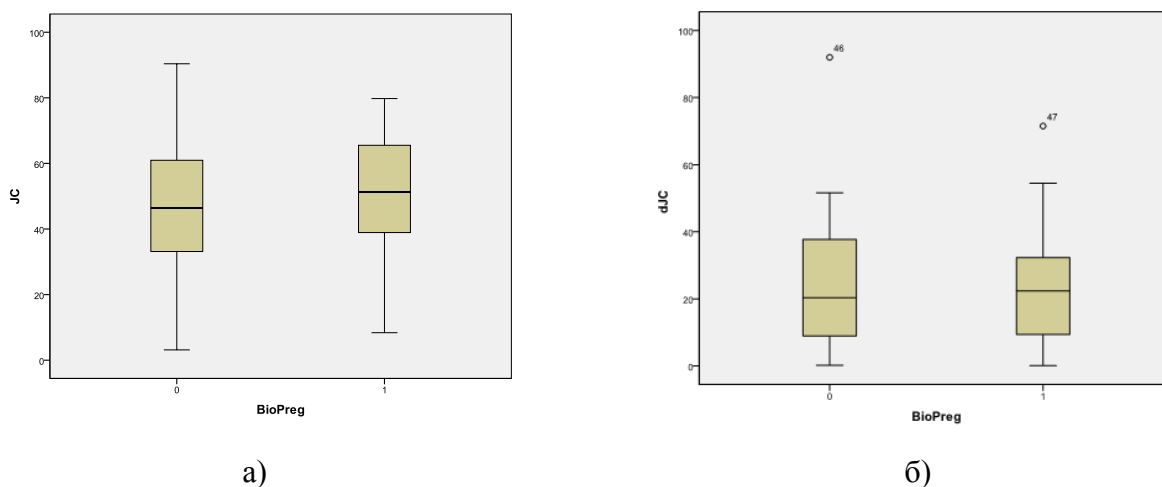
Повече имплантирани ембриони имаме в групата на сперматозоидите с по-малки стойности за АТФ (<0.03) – 51.85% спрямо 45.45%.

Анализът на данните показва, че измерването на АТФ в човешки сперматозоиди може да се използва за предсказване на оплодителния потенциал (образуването на 2PN), но не може да се използва за предсказване на изхода от АРТ и трябва да се използва внимателно и в комбинация с други фактори.

5.6.2. Разлики в митохондриалния мембранен потенциал (ММП/dММП) между двете групи сперматозоиди, довели до образуването на успешно и неуспешно имплантирани човешки ембриони

Връзката на митохондриалния мембранен потенциал на сперматозоидите с имплантационния потенциал на ембрионите е изследвана по два начина – като процент сперматозоиди с висок ММП (R3 – % сперматозоиди силно оцветени с JC-1 над 10^2) (Фигура 34а) и като разлика в този процент след погасяване на ММП (с СССР) – dММП (Фигура 34б).

След обработване резултатите за митохондриалния мембранен потенциал (ММП) и изменението на митохондриалния мембранен потенциал (dММП) не показват статистически значими различия между двете анализирани групи: $P=0.461$ – за ММП и $P=0.913$ – за dММП (Фигура 34 и Таблица 24).



Фигура 34. Графично разпределение на стойностите на ММП/dММП по групи (група 0 – „неуспешна имплантация”; група 1 – „успешна имплантация”).

Таблица 24. Корелации на ММП/dММП с имплантирането на ембрионите.

	ММП	dММП
Неимплантирани ембриони	46.71	25.28
Имплантирани ембриони	51.08	24.67
P коефициент	0.461	0.913

По-високи стойности за ММП се установяват в групата на успешно имплантираните ембриони (51.08 спрямо 46.71, съответно) (Фигура 34 и Таблица 24). Резултатът е логичен на фона на позитивната корелация, която този параметър показва с базисните семинални параметри – концентрация и подвижност, в настоящия (Фигура 33) и други анализи, а също и по-високите стойности, които отчитаме в групата на правилно оплодените яйцеклетки (2PN) (Таблица 11) и на ембрионите с по-добро качество (Таблица 19). Резултатът е логичен, но не е статистически достоверен.

В литературата има и други изследователи, търсещи връзка между митохондриалния потенциал и биохимичната бременност. В изследването си от 2002 г. Kasai и колеги изследват връзката на ММП с подвижността и резултатите от АРТ при 26 пациенти. Те намират достоверни разлики в двете групи по отношение на няколко параметъра, описващи подвижността (%MOT, VAP (mm/s), VSL (mm/s), VCL (mm/s) и %NA), а също и с оплождането. Разлика има и по отношение на имплантацията, но връзката с процента постигнати бременности не е статистически достоверна

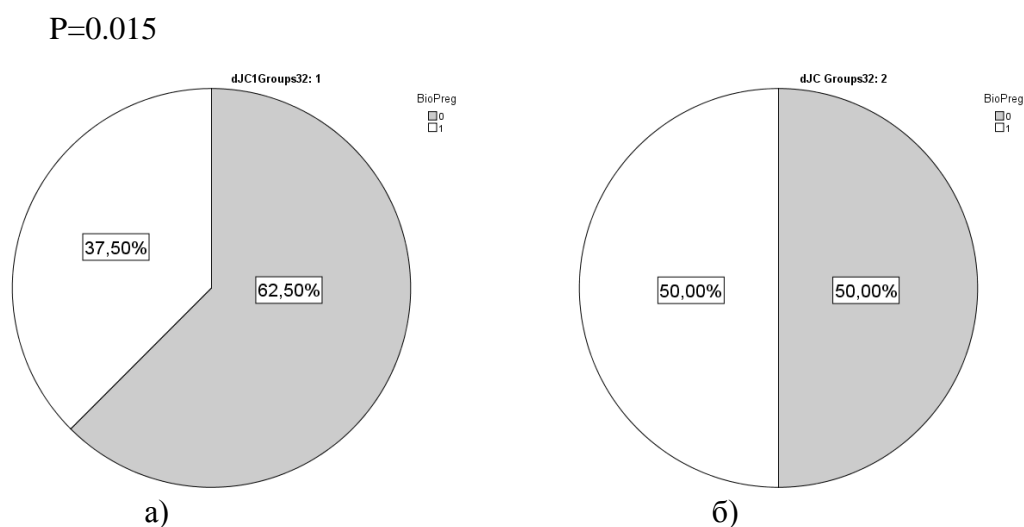
(сперматозоиди с висок ММП 37.5 (3/8)) срещу сперматозоиди с нисък ММП 23.1 (3/13)) (Kasai et al., 2002). Подобно на тях, друга група, анализираща връзката на ММП с класическите спермални показатели и изхода от АРТ, показва значима корелация на ММП с концентрацията, подвижността и морфологията, но не и с изхода от АРТ (Sharbatoghli et al., 2012). Анализът на 120 пациенти с инфертилитет от Marchetti и колеги показва резултати подобни на нашите. Значима корелация с базисните параметри на спермограмата и липса на статистически достоверна връзка с оплождането, имплантационния потенциал и клиничната бременност (Marchetti et al., 2012). Вероятно митохондриалният потенциал при сперматозоидите е динамичен показател, който се мени лесно при промяна в условията на култивиране (или в ин виво условия) и измерването му в свеж еякулат или след обработка, не носи предиктивна информация за по-късни събития след оплождането.

Анализирането на промяната в ММП (dММП) след добавянето на протонофора СССР в групата на неуспешно и успешно имплантираните ембриони не показва голяма (25.28 спрямо 24.67) или значима ($P=0.913$) разлика в двете групи (Таблица 24).

Логично е по-слабото отместване за имплантираните спрямо неимплантираните ембриони поради по-добрата компенсация на негативното влияние на СССР върху мембрания потенциал и функционалния статус на митохондриите. Разликите в двете групи са минимални, а и липсата на достоверност прави този показател (dММП) неподходящ за предсказване на имплантационния потенциал на човешки ембриони според този анализ.

За да проверим какво е разпределението на имплантираните и неимплантираните ембриони в двете групи с голямо и малко отклонение на dММП, ние проведохме съответния Chi-square анализ (Фигура 35).

На Фигура 35 е представено разпределението на имплантираните спрямо неимплантираните ембрионите в групите с ниски (<32.83) и високи (32.83) стойности за промяна на митохондриалния потенциал (dММП). Избраната гранична стойност е 32.83.



Фигура 35. Графично разпределение на стойностите на dММП при: а) $dММП < 32.83$ и б) $dММП > 32.83$ по групи (група 0 (сиво) – „неуспешна имплантация“; група 1 (бяло) – „успешна имплантация“).

Наблюдават се повече случаи на имплантирани ембриони в групата с по-висок митохондриален потенциал $dММП > 32.83$ спрямо тази с по-нисък $dММП < 32.83$ (50% към 37.50%, съответно) (Фигура 35). Този резултат е статистически достоверен $P=0.015$. Разликата е 13% и не е достатъчна за категоричното определяне на

вероятността за имплантация на ембрионите – 50% или 37% И в двата случая вероятността да не познаем изхода след трансфер е голяма (50% към 63%, съответно).

Анализът на данните не дава възможност за използване на тези показатели (ММП и dММП) като предиктивни по отношение на имплантацията на ембрионите и/или по-късни събития.

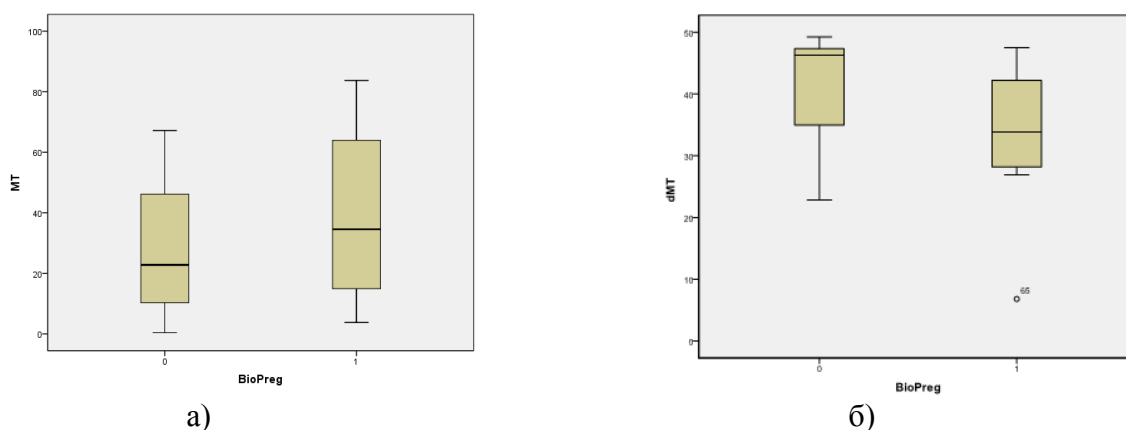
Тези и други показатели са използвани за изготвяне на прогностичен модел за определяне на имплантационния потенциал на човешки ембриони. Необходим е анализ на по-голям брой пациенти, за да може този показател да придобие по-голямо значение по отношение на достигането до биохимична бременност или други важни събития след АРТ.

5.6.3. Разлики в митохондриалната маса (ММ/dММ) между двете групи сперматозоиди, довели до образуването на успешно и неуспешно имплантирани човешки ембриони

Подобно на другите митохондриални показатели връзката на митохондриалната маса (ММ) с имплантационния потенциал на ембрионите е изследвана по два начина – като процент сперматозоиди с нива за ММ над 10^1 (Фигура 36а) и като разлика в този процент след погасяване на ММ (dММ) с СССР (Фигура 36б) (Таблица 25).

За съжаление митохондриалната маса (ММ) не е ясно дефинирана (описва много параметри – маса, обем, работна площ на митохондриите). В научната литература няма ясно описание какво точно отразява и как се измерва най-добре. Затова и паралелно все още се публикуват съобщения за използването на МТG, например, от една страна за измерване на митохондриалния потенциал, а от друга – на митохондриалната маса. МТG се използва основно за визуализиране на митохондрии в ин витро експерименти. Това, което се знае за него, е, че е липофилно багрило и се свързва с мембраните и най-вече с ВММ. Необходими са допълнителни по-детайлни изследвания, които да разкрият партньорите на МТG в митохондриите.

В нашето изследване сме избрали да отразяваме ММ с багрилото MitoTracker Green (MTG) на базата на съобщенията на редица автори, анализирали това багрило (Agnello et al., 2008). За нас митохондриалната маса изразява функционалния потенциал на митохондриите в най-голяма степен (сравнен с останалите параметри).



Фигура 36. Графично разпределение на стойностите на ММ/dММ по групи (група 0 – „неуспешна имплантация”; група 1 – „успешна имплантация”).

Таблица 25. Корелации на ММ/dMM с имплантирането на ембрионите

	ММ	dMM
Неимплантирани ембриони	27.43	40.24
Имплантирани ембриони	38.68	33.49
P коефициент	0.103	0.150

От приложените данни (Фигура 36 и Таблица 25) се наблюдава по-висока средна стойност за ММ в групата на имплантираните ембриони – 38.68 към 27.43, съответно, за неимплантираните. Въпреки липсата на достоверност ($P=0.103$), тази разлика отразява важна според нас тенденция – ММ/dMM се свързват в най-голяма степен с „нормални” стойности за класическите параметри, както се установи в корелационния анализ по-рано и още – високите базисни нива на ММ преди добавянето на СССР, рефлектират най-добре върху основни събития в ин витро процедурите – качество на ембрионите (Таблица 20) и най-вече имплантационния им потенциал (Таблица 25).

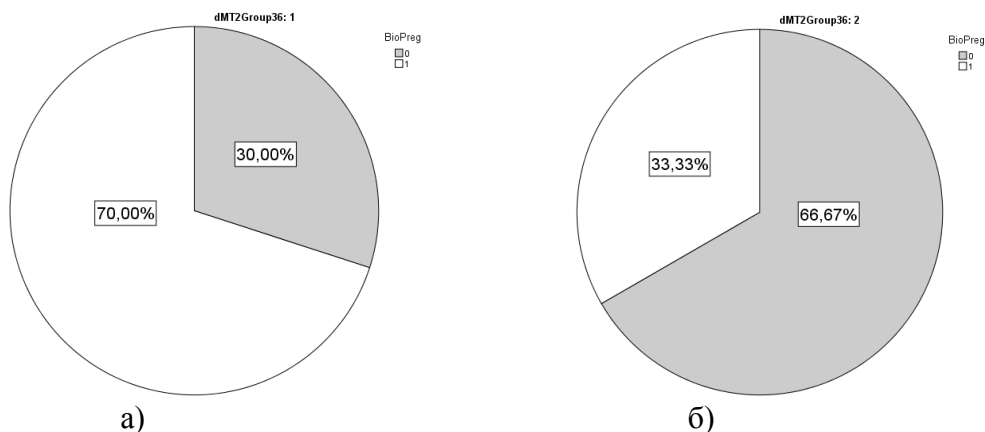
Резултатите, получени за промяната в митохондриалната маса (dMM) в двете анализирани групи (неимплантирани и имплантирани ембриони), показват по-високи средни стойности за показателя dMM в групата неимплантираните спрямо групата на имплантираните (40.24 към 33.49, съответно) (Таблица 25). Разликата не е достоверна ($P=0.150$), но подкрепя тезата ни, че сперматозоидите с високи базисни нива на ММ компенсират в по-голяма степен негативния ефект на СССР върху промяната на ММ (dMM), както и върху промяната на останалите митохондриални показатели (dMMP и dCOP). И наистина, корелационният анализ, представен по-горе в тази част от разработката, показва негативна връзка на ММ с dMM, dMMP и dCOP (Фигура 13в).

Засега в специализираната литература няма други данни, свързващи митохондриалната маса на сперматозоидите с имплантацията на ембрионите. Въпреки това, резултатите на Sousa и колеги показват ясно, че MTG-позитивни сперматозоиди са сперматозоиди с по-добри структурни и функционални характеристики. Открити са значими позитивни връзки с други параметри – тясно свързани с функционалността на човешките сперматозоиди (виталност, капацитация, акрозомна реакция и интегритет на ДНК). За силно MTG-позитивните сперматозоиди са установени по-високи количества от специфични митохондриални протеини, изграждащи митохондриалните мембрани – COI, COVIc, както и на протеини, участващи в репликацията (POLG) и транскрипцията (TFAM) на митохондриалния геном. В по-рано проведено изследване (Amaral et al., 2007) авторите откриват позитивна корелация на тези протеини със стандартните спермални показатели – концентрация, подвижност и морфология, и предполагат участието им в генерирането на MMP и в определяне на митохондриалната функционалност. Логично е сперматозоидите с по-добра възможност да капацитират с по-интактна акрозоми и с по-нисък процент фрагментация, да са и с по-добър потенциал да оплождат – да дадат ембриони с по-добър имплантационен потенциал.

Нашите резултати потвърждават данните получени от Sousa и дори отиват по-далеч, поставяйки въпроса за използването на този показател за определяне на по-далечни събития в АРТ-процедурите като например имплантационния потенциал и клиничната бременност.

За да проверим горното твърдение ние проведохме Chi-square анализ (Фигура 37) за разпределението на имплантираните и неимплантираните ембриони в групите с големи (>36) и малки (<36) отмествания на митохондриалната маса (dMM) (Фигура 37). Разграничителната стойност за тези две групи е 36%.

P<0.001



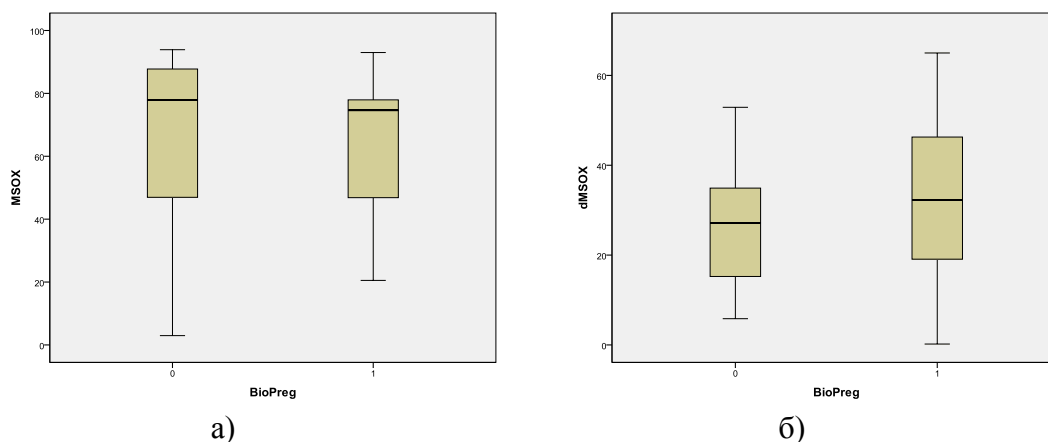
Фигура 37. Графично разпределение на стойностите на dMM при: а) dMM<36 и б) dMM>36 по групи (група 0 (сиво)– „неуспешна имплантация”; група 1 (бяло) – „успешна имплантация”).

Резултатите са красноречиви – повече забременели пациентки в групата с по-малка промяна в митохондриалната маса (dMM<36) – 70%, спрямо 30 % в групата с по-голяма промяна в митохондриалната маса (dMM>36). Тук вече имаме значима разлика (P<0.001). Може би най-важната в контекста на търсенията ни – да открием показател, който с най-голяма сила (точност) да предскаже имплантационния потенциал на производните ембриони.

Считаме, че този показател е най-подходящ кандидат за оценка и селекция на сперматозоиди за нуждите на АРТ и най-вече за предсказване на имплантационния потенциал на ембрионите.

5.6.4. Разлики в количествата на супероксидните (кислородните) радикали (COP/dCOP) между двете групи сперматозоиди, довели до образуването на успешно и неуспешно имплантирани човешки ембриони

Връзката на супероксидните радикали (COP) с имплантационния потенциал на ембрионите е изследвана по два начина – като процент сперматозоиди с нива на COP над 10^1 (Фигура 38а) и като разлика в този процент след погасяване на COP (с СССР) – dCOP (Фигура 38б и Таблица 26).



Фигура 38. Графично разпределение на стойностите на COP/dCOP по групи (група 0 – „неуспешна имплантация”; група 1 – „успешна имплантация”).

Таблица 26. Корелации на COP/dCOP с имплантирането на ембрионите.

	COP	dCOP
Неимплантирани ембриони	66.43	25.58
Имплантирани ембриони	65.27	32.69
P коефициент	0.867	0.181

Както и при определяне на качеството на ембрионите, определянето на имплантационния им потенциал чрез измереното количество COP в сперматозоидите се свързва с по-големи стойности на COP в групата на ембрионите с лоша морфология и слаб имплантационен потенциал. Разликите в измерените COP между двете групи са несъществени – 66.43 спрямо 65.27 (група 0 към група 1) и недостоверни ($P=0.867$).

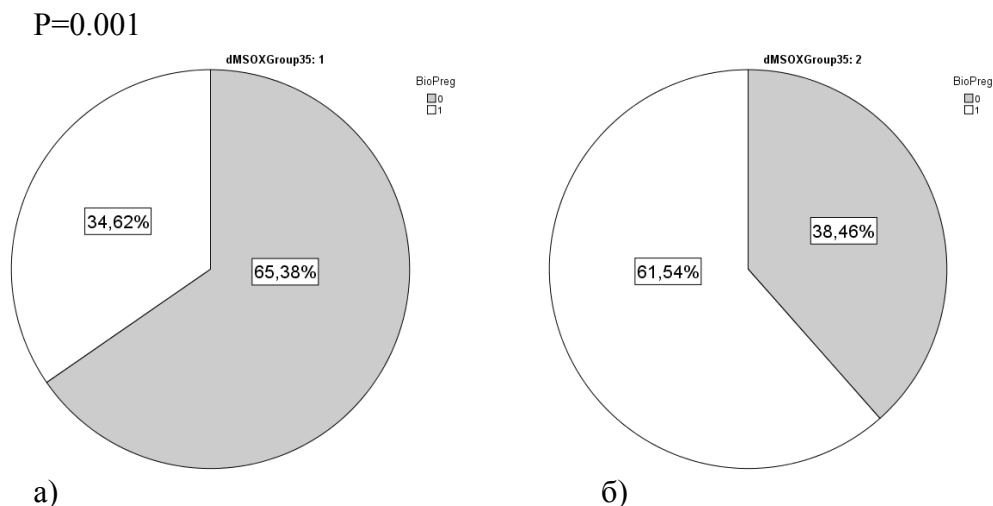
Подобна връзка не е коментирана в литературата досега. Анализите са концентрирани основно върху нивата на COP в семиналната плазма (обкръжението на сперматозоидите), но не и на радикалите, формирани в сперматозоидите. Има публикации, показващи негативна корелация на COP в плазмата с оплодителната способност и процента постигната бременност (Zorn et al., 2003; Aitken et al., 1991). Подобни резултати са получени и от други автори (Yumuga et al., 2009). Повишените нива на COP в семиналната плазма водят до патологични промени като пероксидация на ненаситени мастни киселини (отговорни за флуидитета на мембраната на сперматозоидите), което нарушава процесите на акрозомна реакция и сливането на мембраните на двете гамети (Lobascio et al., 2015).

Способността на сперматозоидите да генерират COP по-скоро е отражение на функционалния капацитет на ЕТВ в митохондриите на сперматозоидите и на синтезирания АТФ като следствие от работата ѝ. Затова и по-рано описаните корелации на COP с подвижността са правопрпорционални и значими. Наличието на радикали в сперматозоидите има нормално физиологично обяснение. Редица процеси в мъжките гамети, особено тези, протичащи в крайните отдели на женския репродуктивен тракт – истмуса на тръбата (капацитация, акрозомна реакция, фузия с оолемата), протичат с участието на COP, генерирани в сперматозоидите (Wang et al., 2003). Така че те са част от нормалното функциониране на митохондриите в сперматозоидите и взимат участие във важни процеси свързани с оплождането. Присъствието на свободни радикали в средата има увреждащ ефект върху сперматозоидите, но дали същото може да се каже за нивата на COP в сперматозоидите не е ясно. По-високи са, например, нивата на COP в групата на правилно оплодените яйцеклетки (2PN), а също и в групата на морфологично добрите зиготи. Тази логика, обаче, се губи при разглеждане на нивата на COP по отношение на морфологичното качество на ембрионите (Таблица 21), а също и при определяне на имплантационния им потенциал, където нивата на COP са по-високи (Таблица 26). Резултатите за абсолютната стойност на COP и връзката им с обсъжданите събития са противоречиви и поставят използването им за селекция на сперматозоиди и предсказване на по-късни събития под въпрос.

Подобно на dMMP, анализирайки връзката на промяната на COP (dCOP) с имплантационния потенциал на ембрионите, отчитаме по-високи стойности за показателя в групата на имплантираните ембриони – 32.69 спрямо 25.58 (група 1 към група 0, съответно) (Фигура 38б и Таблица 26). Това все пак дава възможност супероксидните радикали да се използват, но като отместване (dCOP) за предсказване на имплантационния потенциал. Разработването на предиктивен модел ги представят като вероятен кандидат при определяне на имплантацията на ембриона – те отпадат накрая след проведения регресионен анализ.

За да проверим какво е разпределението на имплантираните и неимплантираните ембриони в двете групи с голямо и малко отклонение на dCOP, ние проведехме съответния Chi-square анализ (Фигура 39). Избраната гранична стойност е 35.

На Фигура 39 е представено разпределението на имплантираните спрямо неимплантираните ембрионите в групите с ниски (<35) и високи стойности (>35) за промяна на супероксидните радикали (dCOP). Разграничителната стойност за двете групи е 35. В групата с dCOP>35 имплантираните ембриони са 61.54%, докато в тази с dCOP<35 – имплантираните ембриони са почти два пъти по-малко – 34.62%. Разликата е статистически значима (P=0.001). Вероятността да се предскаже имплантационният потенциал не е по-голяма, отколкото ако използване промяната на ММП, където макар и значима разликата е едва 13%. Още по-обещаващ е вече коментираният резултат за dMM, при който разликата е значима и е близо 40%.



Фигура 39. Графично разпределение на стойностите на dCOP при: а) dCOP<35 и б) dCOP>35 по групи (група 0 (сиво) – „неуспешна имплантация“; група 1(бяло)– „успешна имплантация“).

Резултатите поставят под въпрос възможността за използване на абсолютните стойности на COP, но не и промяната им за определяне на качеството на сперматозоидите, както и за предсказване на качеството на зиготите, ембрионите и имплантационния им потенциал. Промяната показва по-високи стойности не само в групата на имплантираните ембриони, но също и при определяне на оплодителния потенциал на сперматозоидите (28.83 за 2PN, спрямо 26.03 за 0PN), и на морфологичното им качество.

5.7. Разработка на прогностичен модел

5.7.1. Избор на показатели

За да могат да бъдат оценени достатъчно голям брой прогностични показатели, които да бъдат включени в разработения прогностичен модел, нивото на достоверност на проведените тестове за различия е либерално (P<0.15).

Сравнително големият размер на изследваната извадка от пациенти/сперматозоиди позволи стъпковият регресионен анализ (Backward Elimination) да е проведен едновременно за всички изследвани показатели на сперматозоидите. Регресионният анализ показва, че единствения подходящ показател от всички изследвани (16 бр.), е изменението на митохондриалната маса (dMM) (Таблица 27).

Таблица 27. Показатели, които показват статистически значими различия ($P < 0.1$) при проведените тестове *t*-тест в зависимост от биохимичния тест за бременност (1 гр. – с положителен *+hCG*; 2 гр. – с отрицателен *-hCG*).

Показател (P коефициент)
0.05 < P < 0.15
dMM (0.15)

Останалите митохондриални показатели (ММП, СОР, АТФ) нямат необходимата сила да бъдат включени в прогностичен модел, описващ резултата от биохимичния тест за бременност, тъй като се характеризират с по-лесно изменение на стойностите, което ги прави нестабилни.

5.7.2. Логистичен регресионен модел/уравнение с подбрани показатели

Подбраният прогностичен показател е включен при съставянето на следното регресионно уравнение:

$$\text{Logit } P = 2,806 - (0,0791 * dMM)$$

$$P = 1 / (1 + E^{-\text{logit}P}),$$

където *P* е вероятността за успешна имплантация (положителен тест за бременност) на ембриони, получени при използването на еякулат с дефинирано изменение на митохондриална маса на сперматозоидите (*dMM*).

5.7.3. Оценка на точността на разработения модел

Изчислените точност на оценяване на положителните (*Recall*) и отрицателните резултати (*Specificity*) са съответно 70.00% и 72.72% (Таблица 28).

Таблица 28. Точност на прогностичния модел.

Праг на вероятността за положителна класификация	0.500
Точност на оценяване на положителен резултат	70.00%
Точност на оценяване на отрицателен резултат	72.72 %
Обща точност	71.43 %

Получената точност на модела е задоволително висока като се има предвид наличието на голям брой „женски” фактори, оказващи влияние върху имплантацията на ембрионите, които не са включени в него. Тези допълнителни фактори са свързани с качеството на яйцеклетките и влиянието, което има това върху последващото развитие на ембрионите, условията на култивиране на получените ембриони, рецептивността на ендометриума и други.

5.8. Заключение

Статистически значимата разлика на митохондриалната маса (нейната промяна dMM) в групата на имплантираните и неимплантираните ембриони дава възможност този показател да се включи в алгоритъм за селекция на сперматозоиди. Тъй като анализираният митохондриални показатели са динамични (променят се във времето в зависимост от условията), може да се очаква „подобряване“ в стойностите им след ин витро или ин vivo „лечение“ на сперматозоидите. За ММП, СОР и АТФ и промяната им е по-динамична (случва се по-често), по-лесно се повлиява от промени в микрообкръжението на митохондриалните мембрани, затова и тези показатели нямат сила за включване в предиктивен модел. ММ е по-стабилен показател, той се повлиява по-трудно и това го прави по-подходящ по отношение на предсказването потенциала за имплантиране на човешките ембриони. Търсенето и намирането на условия за повлияване на митохондриалните показатели (както в ин витро, така и в ин vivo условия) биха дали възможност за търсена промяна на качеството на мъжките гамети и подобряване на имплантационния потенциал на развитите се от тях ембриони.

С настоящата дисертация се опитахме да проверим дали митохондриалната функция може да се използва като допълнителен критерий, с който да се постигне по-ефективна селекция на човешки сперматозоиди за нуждите на АРТ. Това с особена сила важи за случаите с тежък мъжки стерилитет, където селекцията на "най-добрия" сперматозоид е от съществено значение за постигането на успешен резултат. Получените от нас данни показват, че митохондриалният статус отразява важни характеристики на сперматозоидите като по-висока концентрация в еякулата, по-добра подвижност, способността да се оплоди яйцеклетката, а също и да се даде началото на ембриони с по-добри качества и по-добри имплантационни потенциали. Тези резултати подсказват, че митохондриалният статус отразява важни качества на човешките сперматозоиди и това го прави добър кандидат за критерий, въз основа на който да се постигне отдиференциране на субпопулация от сперматозоиди с по-добри функционални характеристики.

6. ИЗВОДИ

Взаимовръзка между изследваните митохондриални показатели и стандартните показатели на спермограмата

6.1. Анализираният митохондриални показатели (АТФ, митохондриален мембранен потенциал, митохондриална маса и супероксидни радикали), проявяват най-силна позитивна връзка с конвенционалните параметри на спермограмата – подвижност и концентрация.

6.2. АТФ, ММП и ММ показват негативна връзка с вискозитета на еякулата.

6.3. Вътреклеетъчната концентрацията на АТФ в сперматозоидите е в положителна взаимовръзка с морфологичната оценка по стриктните критерии на Крюгер.

Взаимовръзка на изследваните митохондриални показатели един спрямо друг

6.4. Митохондриалната маса корелира пряко и вероятно определя митохондриалния мембранен потенциал. Не се наблюдават преки връзки с другите митохондриални параметри.

6.5. Високите нива, отчетени за митохондриалната маса, корелират негативно с промените на останалите показатели (dMM, dMMP, dCOP).

6.6. Промените в митохондриалните параметри показват повече и по-силни връзки с качеството на сперматозоидите и късните събития след АРТ от абсолютните им стойности.

Оплождане и качество на зиготите

6.7. Липсата на оплождане (0PN) се свързва с по-ниски нива на вътреклетъчен АТФ в сперматозоидите, както и с понижени стойности за COP и за промяната им dCOP.

6.8. Сперматозоидите, водещи до нормално оплождане (2PN), показват по-високи нива за всички изследвани показатели и промяната им.

Качество на ембрионите

6.9. В групата на сперматозоидите, довели до образуване на ембриони с добро качество, се наблюдават по-високи стойности за ММП и ММ и по-ниски за количеството вътреклетъчни супероксидни радикали (COP).

6.10. Ембрионите, получени от сперматозоиди с по-малки изменения за митохондриалния мембранен потенциал (dММП), с по-големи стойности за промените на митохондриалната маса (dММ) и супероксидните радикали (dCOP), са с по-добра морфологична оценка.

Имплантиране на ембрионите

6.11. Сперматозоидите, дали началото на успешно имплантирани ембриони, се характеризират с по-високи стойности за ММП, ММ, АТФ и по-малки промени за отклоненията им (dММП и dММ).

Прогностична сила и подбор на показатели

6.12. С най-голяма прогностична сила по отношение на имплантационния потенциал на човешките ембриони се отличава изменението на митохондриалния маса (dММ). Изграденият предиктивен модел дава 70% позитивна и 72% негативна предиктивна сила за промяната на митохондриалната маса по отношение имплантационния потенциал на ембрионите.

7. ДОПЪЛНИТЕЛНИ ИЗВОДИ И ВРЪЗКИ, ПРЯКО СВЪРЗАНИ С ПРАКТИКАТА В ИН ВИТРО КЛИНИКАТА

АТФ-свързани изводи за качеството на зиготите, ембрионите и имплантационния им потенциал

7.1. По-висок процент зиготи и ембриони с добра морфологична оценка се намират в групата с нисък АТФ (<0.03). Имплантираните ембриони също са повече в групата с АТФ по-нисък от 0.03. Този показател може да се използва за оценка на морфологичното качество на зиготите, не може да се използва за оценка на морфологичното качество на ембрионите, не може да се използва за оценка на имплантационния им потенциал.

ММП-свързани изводи за качеството на зиготите, ембрионите и имплантационния им потенциал

7.2. Няма корелация между морфологията на зиготите и ембрионите и отклонението за ММП – dММП. Повече имплантирани ембриони има в групата с по-голямо отместване dММП (>32.83).

ММ-свързани изводи за качеството на зиготите, ембрионите и имплантационния им потенциал

7.3. По-висок процент зиготи и ембриони с добра морфологична оценка се намират в групата с голямо отместване dMM (>36). Повече имплантирани ембриони има в групата с по-малко отместване dMM (<36).

СОР-свързани изводи за качеството на зиготите, ембрионите и имплантационния им потенциал

7.4. Морфологичното качество на зиготите и ембрионите не зависи от промяната на СОР – dСОР. Повече имплантирани ембриони има в групата с по-голямо отместване на dСОР (>35).

8. НАУЧНИ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Оригинални научни приноси

1. Установени и описани са взаимовръзките между митохондриалните показатели на сперматозоидите и стандартните параметри на спермограмата (въздържание, обем, високзитет, рН, концентрация, подвижност и морфология).

2. Разгледани, анализирани и описани са взаимовръзките на изследваните митохондриални показатели един спрямо друг и спрямо отклоненията в абсолютните им стойности след добавяне на протонофора СССР.

3. Установените взаимовръзки между митохондриалните показатели на човешките сперматозоиди и качеството на зиготите дават възможност за използване на отчетените нива на АТФ в сперматозоидите за прогнозиране на морфологичното качество на получените зиготи.

4. Анализирани и описани са ефектите от различните видове митохондриални показатели на човешките сперматозоиди върху качеството на получените от тях зиготи и ембриони.

5. Открита е връзката на митохондриалния статус на човешките сперматозоиди с успеха от ин витро процедурата – липса или наличие на имплантация. За първи път се отбелязва силната връзка на митохондриалната маса с вероятността за успешна имплантация.

Научни приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдена е силната взаимовръзка на митохондриалните показатели (АТФ, ММ, ММП и СОР) с два от основните параметри на спермограмата – концентрация и подвижност.

2. Потвърден е по-големият процент отчетени оплождания в групата на сперматозоидите с висок ММП в сравнение с групата сперматозоидите с нисък ММП.

3. Потвърждава се измерването на СОР преди ин витро оплождане като предиктивен маркер за оценка на изхода от ин витро процедурата и като способ за селекция на сперматозоиди за АРТ.

Научно-приложни приноси

1. Подбрани са най-подходящите митохондриални показатели за оценка на потенциалната възможност на човешките сперматозоиди, водещи до успешно имплантиране на производните им ембриони.

2. Предложени са гранични (cut-off) стойности на митохондриалните показатели за предсказване на шансовете за успешна имплантация.

3. Разработен е прогностичен модел (с чувствителност и специфичност > 70%) за предсказване на успешна имплантация на базата на митохондриалната маса на сперматозоидите.

4. Получените резултати могат да се приложат при разработката и оценка на ефективността на иновативни подходи за селекция на човешки сперматозоиди, използвани при АРТ-процедурите.

9. СПИСЪК НА НАУЧНИТЕ ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИЯТА

Staykov V., Chaushev T., Gogeva S., Parvanov D., Stamenov G., Dzhambazov B. 2016. Correlations between ATP levels of human spermatozoa and classical semen parameters. *Annuaire de l'Université de Sofia "St. Kliment Ohridski" Faculte de Biologie*, 101(4): 125-131.

Staykov V., Chaushev T., Gogeva S., Parvanov D., Dzhambazov B. 2017. Relationship between some mitochondrial parameters of human spermatozoa with standard semen parameters and ART outcome after ICSI procedure. (accepted).

Участие в научни форуми във връзка с дисертацията

Chaushev T., Parvanov D., Gogeva S., Velikova D., Stamenov G., **Staikov V.** 2015. Mitochondrial mass (MM) - the best candidate, among mitochondrial functionality markers in human spermatozoa for prediction of successful embryo implantation. 31st Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), Lisbon, PORTUGAL, June 14-17, 2015. *HUMAN REPRODUCTION*, 30, Suppl. 1, Pages:167-168. Meeting Abstract: P-104.

10. ЛИТЕРАТУРА, ЦИТИРАНА В АВТОРЕФЕРАТА

- Agarwal, A., Allamaneni, S. S., Nallella, K. P., George, A. T., Mascha, E. (2005). *Correlation of reactive oxygen species levels with the fertilization rate after in vitro fertilization: a qualified meta-analysis*. Fertil Steril; 84(1): 228-231.
- Agarwal, A., Ikemoto, I., Loughlin, K. R. (1994). *Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens*. J Urol; 152(1): 107-110.
- Agarwal, A., Prabakaran, S., Allamaneni, S. (2006). *What an andrologist/urologist should know about free radicals and why*. Urology; 67(1): 2-8.
- Agnello, M., Morici, G., Rinaldi, A. M. (2008). *A method for measuring mitochondrial mass and activity*. Cytotechnology; 56(3): 145-149.
- Aitken, R. J., Baker, M. A., De Iuliis, G. N., Nixon, B. (2010). *New insights into sperm physiology and pathology*. Handb Exp Pharmacol; 198: 99-115.
- Aitken, R. J., Baker, M. A. (2013). *Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa: contributions to infertility and impacts on development*. Int J Dev Biol; 57(2-4): 265-272.
- Aitken, R. J., Clarkson, J. S., Fishel, S. (1989). *Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function*. Biol Reprod; 41(1): 183-197.
- Aitken, R. J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J. P., Milne, P., Jennings, Z., Irvine, D. S. (1998). *Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa*. Biol Reprod; 59(5): 1037-1046.
- Aitken, R. J., Irvine, D. S., Wu, F. C. (1991). *Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility*. Am J Obstet Gynecol; 164(2): 542-551.
- Armstrong, J. S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W. J., Sikka, S. C. (1999). *Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism*. Free Radic Biol Med; 26(7-8): 869-880.
- Auger, J., Ronot, X., Dadoune, J. P. (1989). *Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment*. J Androl; 10(6): 439-448.
- Aydemir, B., Onaran, I., Kiziler, A. R., Alici, B., Akyolcu, M. C. (2008). *The influence of oxidative damage on viscosity of seminal fluid in infertile men*. J Androl; 29(1): 41-46.
- Bagkos, G., Koufopoulos, K., Piperi, C. (2014). *A new model for mitochondrial membrane potential production and storage*. Med Hypotheses; 83(2): 175-181.
- Buckman, J. F., Hernández, H., Kress, G. J., Votyakova, T. V., Pal, S., Reynolds, I. J. (2001). *MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants*. J Neurosci Methods; 104(2): 165-176.
- Chan, S. Y., Chan, Y. M., Tucker, M. J., Leong, M. K., Leung, C. K. (1990). *The diagnostic value of seminal adenosine triphosphate (ATP) in an in vitro fertilization (IVF) program*. Andrologia; 22(6): 531-537.
- Chan, S. Y., Wang, C. (1987). *Correlation between semen adenosine triphosphate and sperm fertilizing capacity*. Fertil Steril; 47(4): 717-719.
- Chung, T. W., Ho, C. P. (1999). *Changes in viscosity of low shear rates and viscoelastic properties of oxidative erythrocyte suspensions*. Clin Hemorheol Microcirc; 21(2): 99-103.
- de Lamirande, E., Gagnon, C. (1995). *Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects*. Hum Reprod; 10, Suppl 1: 15-21.
- Donnelly, E. T., O'Connell, M., McClure, N., Lewis, S. E. (2000). *Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa*. Hum Reprod; 15(7): 1552-1561.
- Du Plessis, S. S., Gokul, S., Agarwal, A. (2013). *Semen hyperviscosity: causes, consequences, and cures*. Front Biosci (Elite Ed); 5: 224-231.
- Espinoza, J. A., Paasch, U., Villegas, J. V. (2009). *Mitochondrial membrane potential disruption pattern in human sperm*. Hum Reprod; 24(9): 2079-2085.
- Forero-Gonzalez, R. A., Celeghini, E. C., Raphael, C. F., Andrade, A. F., Bressan, F. F., Arruda, R. P. (2012). *Effects of bovine sperm cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes*. Andrologia; 44, Suppl 1: 154-159.

- Ghaleno, L. R., Valojerdi, M. R., Hassani, F., Chehrazi, M., Janzamin, E. (2014). *High level of intracellular sperm oxidative stress negatively influences embryo pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection treatment*. *Andrologia*; 46(10): 1118-1127.
- Griffiths, E. J. (2000). *Mitochondria-potential role in cell life and death*. *Cardiovasc Res*; 46(1): 24-27.
- Griveau, J. F., Le Lannou, D. (1997). *Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology*. *Int J Androl*; 20(2): 61-69.
- Harrell, F. (2001). *Regression modeling strategies with applications to linear models, logistic regression and survival analysis*. Springer-Verlag. New York. *Statist Med*; 22: 2531–2532.
- Heymans, M., van den Berg, T., van der Windt, D., Terwee, C. (2011). *Prognostic models, Institute of Health and Care Research*. rev. No 1.1; 7 pp.
- Irvine, D. S., Aitken, R.J. (1985). *The value of adenosine triphosphate (ATP) measurements in assessing the fertilizing ability of human spermatozoa*. *Fertil Steril*; 44(6): 806-813.
- Jain, S. K., Ross, J. D., Levy, G. J., Duett, J. (1990). *The effect of malonyldialdehyde on viscosity of normal and sickle red blood cells*. *Biochem Med Metab Biol*; 44(1): 37-41.
- Kasai, T., Ogawa, K., Mizuno, K., Nagai, S., Uchida, Y., Ohta, S., Fujie, M., Suzuki, K., Hirata, S., Hoshi, K. (2002). *Relationship between sperm mitochondrial membrane potential, sperm motility, and fertility potential*. *Asian J Androl*; 4(2): 97-103.
- Keij, J. F., Bell-Prince, C., Steinkamp, J. A. (2000). *Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs*. *Cytometry*; 39(3): 203-210.
- Késmárky, G., Fehér, G., Koltai, K., Horváth, B., Tóth, K. (2006). *Viscosity, hemostasis and inflammation in atherosclerotic heart diseases*. *Clin Hemorheol Microcirc*; 35(1-2): 67-73.
- Krausz, C., Mills, C., Rogers, S., Tan, S. L., Aitken, R. J. (1994). *Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: relationships with motility and fertilization in vitro*. *Fertil Steril*; 62(3): 599-605.
- Krohn, A. J., Wahlbrink, T., Prehn, J. H. (1999). *Mitochondrial depolarization is not required for neuronal apoptosis*. *J Neurosci*; 19(17): 7394-7404.
- Lenzi, A., Culasso, F., Gandini, L., Lombardo, F., Dondero, F. (1993). *Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility*. *Hum Reprod*; 8(10): 1657-1662.
- Levin, R. M., Shofer, J., Wein, A. J., Greenberg, S. H. (1981). *ATP concentration of human spermatozoa: lack of correlation with sperm motility*. *Andrologia*; 13(5): 468-472.
- Liu, Y., Fiskum, G., Schubert, D. (2002). *Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain*. *J Neurochem*; 80(5): 780-787.
- Lobascio, A. M., De Felici, M., Anibaldi, M., Greco, P., Minasi, M. G., Greco, E. (2015). *Involvement of seminal leukocytes, reactive oxygen species, and sperm mitochondrial membrane potential in the DNA damage of the human spermatozoa*. *Andrology*; 3(2): 265-270.
- Marchetti, C., Obert, G., Deffosez, A., Formstecher, P., Marchetti, P. (2002). *Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm*. *Hum Reprod*; 17(5): 1257-1265.
- Marchetti, P., Ballot, C., Jouy, N., Thomas, P., Marchetti, C. (2012). *Influence of mitochondrial membrane potential of spermatozoa on in vitro fertilisation outcome*. *Andrologia*; 44(2): 136-141.
- Megory, E., Shoham, Z., Madgar, I., Lunenfeld, B., Modan, M., Weissenberg, R. (1987). *ATP content in human semen and sperm quality*. *Arch Androl*; 19(3): 243-247.
- Meseguer, M., Garrido, N., Martínez-Conejero, J. A., Simón, C., Pellicer, A., Remohí, J. (2004). *Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males*. *J Assist Reprod Genet*; 21(12): 445-451.
- Pendergrass, W., Wolf, N., Poot, M. (2004). *Efficacy of MitoTracker Green and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues*. *Cytometry A*; 61(2): 162-169.
- Pfaffertott, C., Meiselman, H. J., Hochstein, P. (1982). *The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability*. *Blood*; 59(1): 12-15.
- Poot, M., Zhang, Y. Z., Krämer, J. A., Wells, K. S., Jones, L. J., Hanzel, D. K., Lugade, A. G., Singer, V. L., Haugland, R. P. (1996). *Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains*. *J Histochem Cytochem*; 44(12): 1363-1372.

- Pousette, A., Akerlöf, E., Lundin, A., Rosenborg, L., Fredricsson, B. (1986). *On the use of adenosine triphosphate for estimation of motility and energy status in human spermatozoa*. *Int J Androl*; 9(5): 331-340.
- Saleh, R. A., Agarwal, A., Nada, E. A., El-Tonsy, M. H., Sharma, R. K., Meyer, A., Nelson, D. R., Thomas, A. J. (2003). *Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility*. *Fertil Steril*; 79, Suppl 3: 1597-1605.
- Scorrano, L., Petronilli, V., Colonna, R., Di Lisa, F., Bernardi, P. (1999). *Chloromethyltetramethylrosamine (Mitotracker Orange) induces the mitochondrial permeability transition and inhibits respiratory complex I. Implications for the mechanism of cytochrome c release*. *J Biol Chem*; 274(35): 24657-24663.
- Sharbatoghli, M., Valojerdi, M. R., Amanlou, M., Khosravi, F., Jafar-abadi, M. A. (2012). *Relationship of sperm DNA fragmentation, apoptosis and dysfunction of mitochondrial membrane potential with semen parameters and ART outcome after intracytoplasmic sperm injection*. *Arch Gynecol Obstet*; 286(5): 1315-1322.
- Sorice, M., Circella, A., Cristea, I. M., Garofalo, T., Di Renzo, L., Alessandri, C., Valesini, G., Esposti, M. D. (2004). *Cardiolipin and its metabolites move from mitochondria to other cellular membranes during death receptor-mediated apoptosis*. *Cell Death Differ*; 11(10): 1133-1145.
- Sousa, A. P., Amaral, A., Baptista, M., Tavares, R., Caballero Campo, P., Caballero Peregrín, P., Freitas, A., Paiva, A., Almeida-Santos, T., Ramalho-Santos, J. (2011). *Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential*. *PLoS One*; 6(3): e18112.
- Steyerberg, E. W., Vickers, A. J., Cook, N. R., Gerds, T., Gonen, M., Obuchowski, N., Pencina, M. J., Kattan, M. W. (2010). *Assessing the performance of prediction models: a framework for traditional and novel measures*. *Epidemiology*; 21(1): 128-138.
- Sukcharoen, N., Keith, J., Irvine, D. S., Aitken, R. J. (1995). *Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: importance of sperm morphology and leukocyte contamination*. *Fertil Steril*; 63(6): 1293-1300.
- Sukcharoen, N., Keith, J., Irvine, D. S., Aitken, R. J. (1996). *Prediction of the in-vitro fertilization (IVF) potential of human spermatozoa using sperm function tests: the effect of the delay between testing and IVF*. *Hum Reprod*; 11(5): 1030-1034.
- Tremellen, K. (2008). *Oxidative stress and male infertility - a clinical perspective*. *Hum Reprod Update*; 14(3): 243-258.
- Troiano, L., Granata, A. R., Cossarizza, A., Kalashnikova, G., Bianchi, R., Pini, G., Tropea, F., Carani, C., Franceschi, C. (1998). *Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility*. *Exp Cell Res*; 241(2): 384-393.
- Vaya, A., Martinez, M., Carmena, R., Aznar, J. (1993). *The lipid composition of red blood cells and their hemorheological behavior in patients with primary hyperlipoproteinemia*. *Clin Hemorheol*; 13(4): 447-457.
- Vigue, C., Vigue, L., Huszar, G. (1992). *Adenosine triphosphate (ATP) concentrations and ATP/adenosine diphosphate ratios in human sperm of normospermic, oligospermic, and asthenospermic specimens and in their swim-up fractions: lack of correlation between ATP parameters and sperm creatine kinase concentrations*. *J Androl*; 13(4): 305-311.
- Wang, X., Sharma, R. K., Gupta, A., George, V., Thomas, A. J., Falcone, T., Agarwal, A. (2003). *Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study*. *Fertil Steril*; 80, Suppl 2: 844-850.
- WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen – 5th edition. (2010). World Health Organization (2010). *Department of Reproductive Health and Research*; 287: 38-44.
- Yeung, C. H., De Geyter, C., De Geyter, M., Nieschlag, E. (1996). *Production of reactive oxygen species by and hydrogen peroxide scavenging activity of spermatozoa in an IVF program*. *J Assist Reprod Genet*; 13(6): 495-500.
- Yumura, Y., Iwasaki, A., Saito, K., Ogawa, T., Hirokawa, M. (2009). *Effect of reactive oxygen species in semen on the pregnancy of infertile couples*. *Int J Urol*; 16(2): 202-207.
- Zorn, B., Vidmar, G., Meden-Vrtovec, H. (2003). *Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection*. *Int J Androl*; 26(5): 279-285.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодаря на научния ми ръководител *проф. д-р Балик Джамбазов* за непрестанната подкрепа, професионализъм, коректност, прецизност, търпение и 100%-ва помощ, оказани във всеки миг през всичките години от познанството ни. Благодаря ти, *Балик*, за искрата още от далечната 2004 г.!

Изказвам искрена благодарност и признателност към *Тодор Чаушев* за предадените знания и умения, за безрезервната подкрепа и постоянна готовност за съдействие и помощ. Благодаря ти, *Тошо*, че ми подари частица от себе си и че продължаваш да го правиш!

Благодаря на *д-р Георги Стаменов* за оказаното доверие и възможност да съм част от екипа, водещ ежедневна борба за разрешаване на репродуктивните проблеми на семействата и сбъдването на съкровения им желания. Благодаря ти, *Док*, за различното и нестандартно мислене!

Сърдечна благодарност към колегите биолози *Силвия Гогева* и *Димитър Първанов* за отделеното време, за предоставената помощ и знания, с които допринесоха за съществуването на част от дисертацията. Благодаря ви, *Силве* и *Митак*, че го направихте!

Изказвам огромна благодарност и признателност към останалите колеги биолози и медицински лаборанти от болница «Надежда», които имат пръст в ин витро: *Виляна Георгиева, Деница Великова, Елица Филипова, Ивайло Рангелов, Ивка Иванова, Илиян Джагаров, Кристина Николова, Магдалена Василева, Мария Костова, Мария Серафимова, Павел Цонев, Стефка Николова, Ферихан Шабан*, както и към новоприсъединилите се през последната една година биолози – *Диана Иванова, Ефросини Таскуди, Мирай Ибрям, Румяна Ганева*. Благодаря ви за подкрепата, разбирането и готовността за оказване на помощ при нужда!

Благодаря на приятелите ми, че винаги са насреща, когато имам нужда от тях и че винаги продължаваме разговорите си оттам, откъде сме ги приключили!

Благодаря на майка ми и баща ми, че са се срещнали, създали и успели да възпитат добре мен и прекрасните ми братя *Стойчо* и *Мирослав*, с които идеално се разбираме и винаги се подкрепяме. Много сте ми важни, опора сте ми във всичко!

И накрая, но не на последно по значимост място, благодаря на съпругата ми *Славяна* за това, че се появи в живота ми, че озвучи и оцвети дните ми. Благодаря ти, *Яневче*, за постоянното «ръчкане» и «цвърчене», за любовта и обичта, за всеотдайността и че си винаги до мен!