

**ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ
КАТЕДРА „БИОЛОГИЯ НА РАЗВИТИЕТО“**

СПАС ДИМИТРОВ ДЖОГЛОВ

**ИЗСЛЕДВАНЕ НА ГЕНЕТИЧНА И СРЕДОВА КОМПОНЕНТА
ПРИ МЪЖЕ С РЕПРОДУКТИВНИ СМУЩЕНИЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ
на
ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

за придобиване на образователна и научна степен
„ДОКТОР“

Област на висше образование: 4. Природни науки, математика
и информатика

Професионално направление: 4.3. Биологични науки
Докторска програма: ГЕНЕТИКА

Научен ръководител:
Проф. д.б.н. Евгения Нешова Иванова

Пловдив 2019

Дисертационният труд съдържа 174 страници, 37 таблици, 24 фигури и 275 литературни източници.

Експерименталната работа по дисертационния труд е проведена в лабораторията по генетика на катедра „Биология на развитието“ и лабораторията по зоология на катедра „Зоология“ при Биологически факултет на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“.

Дисертационният труд е обсъден и предложен за защита на заседание на катедра „Биология на развитието“ при Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски“, проведено на 25.02.2019 г.

Заседанието на Научното жури за публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 10.05.2019 г. от 14 ч. в 15 аудитория на Биологическия факултет – гр. Пловдив, ул. „Тодор Самодумов“ № 2.

Материалите по защитата са на разположение на интересувалите се в Деканата на Биологически факултет при ПУ „Паисий Хилендарски“ – гр. Пловдив, ул. „Тодор Самодумов“ № 2.

Автор: Спас Димитров Джоглов

Заглавие: Изследване на генетична и средова компонента при мъже с репродуктивни смущения

Научно жури:

Проф. д.б.н. Мима Иванова Николова

Проф. д.с.н. Лилян Крумов Сотиров

Доц. д-р Иванка Велева Стоянова-Тодорова

Проф. д-р Теодора Атанасова Стайкова

Проф. д.б.н. Евгения Нешова Иванова

Университетско издателство „Паисий Хилендарски“, 2019

ВЪВЕДЕНИЕ

Човешкото безплодие, което се дефинира като неспособност да се зачене след година на сексуален контакт без използване на контрацептиви, е един от основните проблеми на общественото здраве за двойките в репродуктивна възраст, който засяга между 10% и 15% от тях. Мъжкото безплодие е свързано с приблизително половината от тези проблеми (Yu et al., 2015). Проучванията сочат, че в основата на този глобален проблем е влошаването на качеството на спермата. В тази връзка, проучванията на много изследователи са насочени към установяване на причините, провокиращи все по-често изявяващите се негативни тенденции в световен мащаб. Отчита се, че различни биологични и екологични фактори са свързани с понижаване качеството на спермата, търсят се начини за разшифроване на механизмите, които са в основата на тези асоциации. Генетични причини, проблеми в уrogenиталната и репродуктивната система, фактори, нарушаващи хода на гаметогенезата и функциите на гаметите, аномалиите в процеса на оплождането и ембрионалното развитие се изследват, анализират и обсъждат в контекста на връзката им с мъжкото безплодие. Много проучвания показват, че върху мъжкия фертилитет и безплодие влияние оказват и редица фактори на околната среда, както и особености в начина на живот и наличието на вредни навици. Консумирането на алкохол и цигари, употребата на андрогенни анаболни стероиди, различни медикаменти, професионални вредности и социално-психо-поведенчески аспекти (включително стрес) се анализират като възможни рискови фактори, свързани с мъжкото безплодие (Brezina et al., 2012; Yu et al., 2015). Въпреки, че вредното влияние на алкохола и цигарите върху човешкото здраве е неоспоримо и доказано чрез разнообразни комплексни проучвания, понастоящем не съществува консенсус относно ефекта от консумацията на алкохол и цигари върху качеството на семенните показатели и мъжкия инфертилитет като цяло. Не е проучен възможният синергичен и адитивен ефект между разнообразните вредни фактори, които могат да повлияят на мъжката плодовитост и в частност – на качеството на спермата (Martini et al., 2004). Затрудненията, свързани с интерпретирането на този въпрос произтичат и от факта, че в проучванията на някои автори, не се откриват отчетливи зависимости между тези вредни навици, репродуктивните способности и качеството на семенните показатели, което внася елемент на хаотичност и неотчетливост по отношение позицията на научната общност в това направление (Dikshit et al., 1987; Trummer et al., 2002).

Обследването на проблема с мъжкото безплодие сочи, че факторите на околната среда и начина на живот повлияват не само качеството на спермалните показатели, но и други съществени компоненти, свързани с мъжкото репродуктивно здраве. В случаите, при които сперматозоидите имат структурни или функционални аномалии, това не би могло да се от-

чете чрез конвенционален спермален анализ (Cunha et al., 2015) и се налага използването на разнообразни цитогенетични и молекулярно-генетични подходи. Сега е ясно, че нито един от прилаганите самостоятелно методи за анализ не е достатъчно чувствителен, за да определи точно качеството на сперматозоидите и мъжкия репродуктивен потенциал. Това е причината, поради която в настоящия момент вниманието на много изследователи е фокусирано върху прилагането на комплексни подходи, осигуряващи по-голяма точност и по-висока обективност при оценка на мъжкото репродуктивно здраве (Standerholen et al., 2014; Sapanidou et al., 2015).

В България целенасочените и комплексни проучвания в тази сфера са частични и непълни. Анализът на връзката между начина на живот, факторите на околната среда и мъжкия фертилитет показва, че причините, водещи до нарушаването му, са сложни (Ouzounova-Raykova et al., 2018), което всъщност е неоспорим факт.

Направеният литературен обзор обхваща анализирането на 275 литературни източника и показва наличие на противоречиви данни относно влиянието на определени фактори на средата и начина на живот върху мъжкото репродуктивно здраве. Анализът му сочи, че не е изяснен достатъчно убедително въпросът за промяната в качеството на спермалните показатели и ролята на конкретните причини или комплексите от тях. Недостатъчно обстойно е разглеждана връзката „фактори на средата и начина на живот – качество на спермалните показатели – генетични синдроми и ДНК увреждания“. Комплексните проучвания, като цяло, са по-малко. В немалка част са базирани на разнообразни подходи и методични вариации, при използване на различна по размер извадка, без стандартизация, непозволяващи качествен сравнителен анализ. Изключение от казаното са проучванията, основаващи се на стандартизираните методи, представени в международните издания на СЗО (1992, 1999, 2010). В България систематизираните и комплексни изследвания по проблема, засягащ генетичната и средовата компонента на мъжкото репродуктивно здраве са ограничени и без достатъчно ясни и конкретни заключения. В същото време, този въпрос се оказва с глобално значение предвид факта, че е в основата на човешката репродукция и е от изключителна важност за страната ни, предвид негативните демографски тенденции за последните десетилетия. Работата по изследването на този казус би могла да е полезна при разработване на стратегии за подобряване на репродуктивното здраве в България.

Всичко това мотивира необходимостта от осъществяването на настоящия дисертационен труд, неговата цел и конкретните му задачи.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото изследване е да се проучат възможните асоциации между фактори на средата и начина на живот, някои качествени спермални показатели и генетични фактори, характеризиращи комплексно особености на мъжкото репродуктивно здраве в България.

За осъществяването на предвидената цел е необходимо решаването на следните специфични задачи:

1. Проучване на медицинската история и събиране на данни относно фактори на средата и начина на живот (тютюнопушене, алкохол, наркотици, анаболни стероиди, медикаменти, професионални вредности и стрес), които биха могли да повлияят на мъжкото репродуктивно здраве;

2. Проучване на качеството на спермалните показатели: обем на еякулата (спермата); концентрация на сперматозоидите; подвижност на сперматозоидите и сперматозоидна морфология, както и отчитане на съпътстваща информация относно визкозитет и рН на еякулата, сперматозоидна аглутинация и левкоцитна концентрация;

3. Допълнително цитогенетично проучване в случаи на налични индикации за възможни хромозомни и геномни мутации;

4. Откриване и характеризиране на микроделеции в определени райони на Y хромозомата на базата на молекулярно-генетичен анализ;

5. Проучване на ДНК интегритета в спермалното ядро чрез прилагане на акридин оранж флуоресцентен тест;

6. Изучаване и характеризиране на възможни ДНК увреждания в ядрата на сперматозоидите чрез прилагане на кометен анализ;

7. Определяне и комплексно характеризиране на връзките между генетична и средова компонента при мъже с репродуктивни смущения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

I. МАТЕРИАЛ

Изследвани индивиди

В хода на настоящото изследване за периода 2014 – 2017 г. общо 1540 мъже на възраст между 18 и 64 години ($33 \pm 7,4$ г.) са посетили кабинет по репродуктивно здраве, подписали са лист за информирано съгласие, попълнили са анкетна карта за снемане на анамнеза и са подложили семенната си течност на анализ.

Всички участници в проучването са отговорили доброволно на въпроси, включени в анкета като са предоставили данни за медицинската си история. Така е получена информацията за местоживеене, за фак-

тори на средата, за вредни лични навици и са уточнени данни относно приемани медикаменти, наркотици, анаболни и стероидни препарати, техният вид (категория) и продължителността на периода, в който са приемани (или се приемат), наличието на стрес в ежедневието или по време на работа.

Тъй като преминали и/или съпътстващи заболявания на пикочополовата система носят важна информация и подпомагат точната интерпретация на получените резултати, подробната медицинска история и диагностицирането на заболяването са проучени и извършени, съответно, от медик специалист. Варикоцеле и крипторхизъм също са установени при физически преглед от лекар.

Включените в това изследване мъже са от територията на Централна и Южна България. В процентно съотношение, най-голям е дялът на живеещите в гр. Пловдив и в населени места от Пловдивска област – общо 63,7% . В изследваната извадка има пациенти и от областите Пазарджик, Стара Загора, Ямбол, Бургас, Кърджали и Смолян. Сред изследваните лица, 193 мъже не са пожелали да посочат данни относно местоживеенето си и конкретната причина за исканото изследване.

Всички събрани семенни проби са подложени на конвенционален спермален анализ (WHO, 1999), при което са отчетени показателите спермален обем (обем еякулат), вискозитет, рН, спермална концентрация, подвижност и морфология на сперматозоидите, както и наличие на други клетки, форми елементи, аглутинати.

На случаен принцип от общия брой изследвани индивиди е отделена извадка от 90 лица, сред които представители на всички заключения от спермалния анализ – нормозооспермия, астенозооспермия, олигозооспермия, олигоастенозооспермия, тератозооспермия, олигоастенотератозооспермия, астенотератозооспермия и азооспермия, които са подложени на акридин оранж флуоресцентен тест и единично-клетъчна гел-електрофореза (кометен анализ). Отделно от това, с цел установяване на възможни микроделеции в Y хромозомата, чрез прилагане на Real time PCR са проучени 50 индивида с азооспермия и олигоастенотератозооспермия.

Пробите от еякулати, използвани при провеждането на кометния, акридин оранж флуоресцентния и микроделеционния анализ са замразени и съхранявани при еднакви условия (-20°C) и за еднакъв период (4 до 6 месеца).

II. МЕТОДИ

За целите на планираното проучване е приложен комплекс от цитологични, цитогенетични и молекулярно-генетични методи. Снемането

на анамнеза и уточняването на детайли относно средовата компонента е осъществено чрез анкетиране и планирано събеседване.

Преди старта на проучването (провеждане на анкета, събеседване, събиране на материал, конкретни анализи) всички включени в него мъже са се запознали с целите и същността му и са подписали информирано съгласие за участието си в него.

Съобразно целите и задачите на планираното изследване са използвани следните методи:

1. Анкетиране и събеседване, снемане на анамнеза;
2. Конвенционален спермален анализ – изготвяне и микроскопски анализ на спермограма;
3. Цитогенетичен анализ – в случаи с налични показания за възможни хромозомни или геномни промени;
4. Молекулярно-генетичен анализ за наличие на микроделеции в Y хромозомата;
5. Акридин оранж флуоресцентен тест;
6. Кометен анализ;
7. Статистически анализ.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

ОБЩИ РЕЗУЛТАТИ ОТ АНКЕТНОТО ПРОУЧВАНЕ

Данните относно възрастта на изследваните мъже сочат, че 3,3% от включените в изследването мъже са на възраст до 20 г., 35,6% са на възраст между 21 и 30 г., 48,3% са между 31 и 40 г. и 12,8% са на възраст над 40 години. Мъжете от възрастовата категория 31 – 40 години съставляват групата с най-висок процент.

Таблица 1. Обща информация относно броя индивиди, предоставили данни за възраст, фактори на средата и начина на живот, и за годините инфертилитет в семейството

Фактор Брой	Възраст	Повод	Професия	Вредности	Цигари	Алкохол
Валиден	1327	1352	1038	1197	1236	1230
Липса	213	188	502	343	304	310

Фактор Брой	Наркотици	Анаболни стероиди	Медикаменти	Заболявания	Стрес	Години инфертилитет
Валиден	1226	1227	1234	1241	1235	808
Липса	314	313	306	299	305	732

Анализът на обработените анкети показва, че от всички изследвани индивиди данни относно повод за изследване, професия, вредности, тютюнопушене, употреба на алкохол, наркотици, анаболни стероиди,

медикаменти и налични заболявания са предоставили от 1226 до 1352 мъже. Липсващите данни (до общия брой, включени в изследването 1540) са резултат от непосочена конкретна лична информация, липса на конкретен отговор по отделен поставен въпрос или несъответствия, изключващи данните от дискриптивния статистически анализ. (Таблица 1). По-голямата част от изследваните мъже (808) са уточнили годините, показателни за инфертилитета в семейството им.

При анализиране на обобщените данни относно повода за проведеното изследване (профилактика, инфертилитет, проследяване), резултатите показват, че 15,9% от мъжете са пожелали да го направят заради желание за профилактика, 72,8% – заради инфертилитет в семейството и 11,2% – заради периодично проследяване на състоянието им в хода на провеждано лечение. Прави впечатление високият процент на лицата, посочили като причина наличието на инфертилитет в семейството.

Предвид събраните и обработени данни относно професионалната заетост на изследваните индивиди, проучването показва, че 22,4% от тях са инженери, ИТ специалисти и работещи в офис, 20,5% – шофьори, автомонтьори и сервизни работници, 18,3% – земеделски работници, 11,8% – строители и дърводелци, 9,9% са безработни, 8,6% – студенти, 6,6% – полицаи, пожарникари, военни и спортисти и 1,8% са готвачи и работници в кухня. В тази група на изследвани лица е важно да се отбележи, че три професионални категории са с най-много представители – общо занимаващи се с интелектуален труд, работещи в сферите на транспорта и земеделието.

Сред включените в проучването мъже 8,8% са декларирали, че работят с химикали и в среда с вредни изпарения, 3,3% – че работят в различни промишлени производства (шивашка, текстилна, обувна, хранително-вкусова промишленост) и 1,5% – че са подложени на действието на физически фактори – рентгенови лъчи, високи температури, лъчева терапия.

Останалите 86,5% от изследваните лица не съобщават за работа при вредни условия на средата. От представените в таблицата данни е видно, че работещите в среда с химикали и вредни изпарения са с най-висок процент – над 2 или 3 пъти по-висок от установения за останалите две категории, отчели присъствието на вредности в работната им среда или в средата на живот.

Отделно от посочените по-горе данни, 5,2% от включените в изследването индивиди са декларирали, че работят или живеят под стрес. Макар и с невисок процент, тази група е от голям интерес за настоящото проучване заради възможната връзка на фактора „стрес“ с други показатели, засягащи мъжкото репродуктивно здраве.

Анализът на данните от анкетното проучване показва, че 57,7% от изследваните индивиди са непушачи. Сред останалите 42,3%, 21,4% са

декларирали, че пушат до 10 цигари на ден, 17,3% – че пушат по 20 цигари (1 кутия) на ден и 3,6% – че пушат по повече от 20 цигари на ден. В настоящото проучване като рискови са приети групите от мъже, пушещи по 20 и над 20 цигари на ден и резултатите от изследването показват, че това са общо 21%.

Сред включените в настоящото изследване индивиди 79% са заявили, че не употребяват алкохол. От останалите мъже (общо 21%) 15,5% са декларирали, че пият повече от 1 бира или 1 чаша вино по-често от 3 пъти седмично и 5,5% – че пият повече от 100 ml концентриран алкохол (> 35%) по-често от 3 пъти седмично. Именно тези две категории са включени за понататъшни анализи в хода на настоящото изследване.

Така наречените „твърди“ наркотици са вещества, които водят до физическа зависимост. Такива са хероин, хидрокодон, морфин, метамфетамин, кокаин и др. Приема се, че „меките“ наркотици не причиняват физическа зависимост, но някои от тях могат да доведат до психическа зависимост. Към тях се отнасят канабис, мескалин, псилоцибин, LSD, DMT и др.

Някои наркотични вещества не могат да бъдат категорично класифицирани по този начин, тъй като имат характеристики както на твърди, така и на меки наркотици. Примери за такива са MDMA, известен като екстази, кетамин, метокситамин, синтетичен канабис, амфетамин, кофевин и др. В настоящото проучване е събрана информация относно приема на наркотици, водеща до физическа и психическа зависимост като са отчетени данни за употреба на марихуана, кокаин, хероин и амфетамини. Получените резултати сочат, че 94,1% от включените в анализа индивиди не употребяват наркотични вещества. Останалите 3,2% и 2,7% употребяват наркотици от групите на „твърдите“ и „меките“, съответно.

Анаболните стероиди включват естествени (тестостерон) и синтетични андрогени (структурно сходни с тестостерона). Използването им е свързано с увеличаване на протеиновия синтез в клетките, особено в тези на скелетните мускули, а също така и с изявата на различни андрогенни и вирилизиращи ефекти, включително повлияващи развитието и поддържането на мъжки вторични сексуални характеристики.

В настоящото проучване 96,1% от участниците са декларирали, че не употребяват анаболни стероиди и 3,9% – че употребяват такива.

При събиране на данни от анкетното проучване, съществено внимание е обърнато на приема на медикаменти (лекарствени препарати) като потенциален рисков фактор за мъжкото репродуктивно здраве.

В този аспект, данните от проучването сочат, че 84,0% от участниците не приемат медикаменти. Останалите 16,0% съобщават за прием на различни лекарствени препарати, сред които антихипертензивни, ан-

тихистамини, антидепресанти, антибиотици, хормони и витамини като съпътстваща част от провеждано лечение.

Някои от приеманите лекарствени препарати са свързани с наличие на конкретни заболявания у изследваните мъже – сърдечно-съдови, алергии, депресии, възпалителни процеси в организма (антихипертензивни, антихистаминови, антидепресанти, антибиотици), а други имат връзка с репродуктивния им отговор (прием на хормони, витамини и др.).

Обобщените данни в хода на проучването относно негативните фактори на среда и начин на живот, съобщени от участниците показва, че 21% от тях са пушачи, 21% – употребяват алкохол, 16% употребяват медикаменти, 13% са подложени на професионални рискове, 5,9% – употребяват наркотици, 5,2% работят или живеят под стрес и 3,9% приемат анаболни стероиди (Таблица 2).

Таблица 2. Брой индивиди (N) и валиден процент (%) на участниците в проучването с информация относно факторите на средата и начина на живот (F – фактор): N – брой индивиди; % – процент; * 20 и повече от 20 цигари на ден; ** повече от 500 ml вино или еквивалентно количество концентрат (> 100 ml, > 35% алкохол), повече от 3 пъти седмично

F N/%	Вредности	Цигари*	Алкохол**	Наркотици	Анаболни стероиди	Медика- менти	Стрес
Да	162/13,5	259/21,0	258/21,0	72/5,9	48/3,9	197/16,0	64/5,2
Не	1035/86,5	977/79,0	972/79,0	1154/94,1	1179/96,1	1037/84,0	1171/94,8
Общо	1197/100	1236/100	1230/100	1226/100	1227/100	1234/100	1235/100

Събраната обща информация от анкетното проучване е добра основа за сравнителни анализи. Данните от проведените анкети са съпоставени с получените резултати от проведените анализи и с помощта на подходящи статистически подходи са комплексно обработени, за да се идентифицират конкретни зависимости между средови, общобиологични и генетични компоненти, кореспондиращи с мъжкото репродуктивно здраве, каквато е и целта на настоящото проучване.

СПЕРМАЛЕН АНАЛИЗ

От всички индивиди, участвали в проучването спермалните показатели обем на еякулат, сперматозоидна концентрация, подвижност и морфология са отчетени за 1294 до 1302 мъже. Липсващите данни се дължат на неинформативни проби или несъответствия, предоставили показания за изключването им от статистическия анализ. Данните за концентрация на левкоцити са отчитани само в случаите, при които са

установени показания за възможни или налични инфекции и поради това валидният брой мъже в тази група е по-малък.

ВИСКОЗИТЕТ И pH

В настоящото изследване от общо 1540 семенни проби, включени в спермалния анализ, в 47 от тях (3%) е отчетен повишен вискозитет (> 2 sm). Този резултат е значително по-нисък от резултатите, представените в литературата (Esfandiari et al., 2002). При всички от тези случаи в нашето проучване не е регистрирана връзка с понижение в подвижността на сперматозоидите, както и не е констатирано повлияване на останалите семенни показатели – обем на еякулат, сперматозоидна концентрация и морфология. Поради тази причина пробите с повишен вискозитет не са подложени на допълнително обследване чрез статистически анализ. Независимо от това, трябва да се вземе под внимание обстоятелството, че причини за абнормалностите, свързани с вискозитета могат да се крият в нарушените функции на допълнителните полови жлези (Станиславов и Николова, 2013).

Киселинността на семенната течност е резултат от концентрацията на водородни йони в простатния секрет и секрецията на семенните мехурчета (кисело и алкално pH, съответно), както и от отделящия се въглероден диоксид и ефектите на химичните реакции, настъпващи след еякулацията. Приема се, че определянето на pH не предоставя особено значима допълнителна информация към тази, свързана с резултатите от конвенционалния спермален анализ, с изключение на случаите при които в еякулата няма сперматозоиди и обемът е относително малък. В тази ситуация, при наличие на $\text{pH} < 7,0$ може да се търси връзка с диагнозата агенезия на Волфовата проводна система. При това, заради липсата на алкалните секрети от семенните мехурчета, такова състояние би могло да е индикатор за наличие на азооспермия (Станиславов и Николова, 2013). Като цяло, киселинността (pH) на семенната течност е важна за жизнеспособността, качеството и оплодителния потенциал на сперматозоидите. В ръководството на СЗО от 1999 (WHO, 1999) като референтни стойности на pH са посочени 7,2 и по-високи от тях.

В настоящото изследване и по отношение на включените в него участници, не са регистрирани отклонения от посочените референтни стойности на СЗО за pH (7,2 – 8,6).

ОБЕМ НА ЕЯКУЛАТ, КОНЦЕНТРАЦИЯ, ПОДВИЖНОСТ И МОРФОЛОГИЯ НА СПЕРМАТОЗОИДИТЕ

Данни относно честотата и валидния процент на участниците в проучването с параметрите за качество на спермата в или извън норма

са представени в Таблица 3, от която може да се види, че 18,8% от включените в изследването индивиди имат намален обем на еякулата, 23,1% от тях – снижена концентрация на сперматозоиди и 54,4% – подвижност на сперматозоидите, по-ниска от нормалната.

По отношение на сперматозоидната морфология, аномалии са отчетени при 16,5% от изследваните индивиди. Освен това, констатираниите морфологични дефекти са детайлно анализирани по групи и е определена честотата им на срещане, както поотделно, така и в разнообразни комбинации.

Освен това, констатираниите морфологични дефекти са детайлно анализирани по групи и е определена честотата им на срещане, както поотделно, така и в разнообразни комбинации.

При определяне на сперматозоидната морфология са отчетени разнообразни аномалии, които в низходящ ред и съобразно честотата си на срещане са както следва: шиловидни глави (95,2%); шийни дефекти (88%); аморфни глави (87,2%); микроцефални сперматозоиди (79,2%); цитоплазматични остатъци (48,8%); макроцефални сперматозоиди (42,4%); опашни дефекти (39,2%) и наличие на двойни глави (25,6%). В единичен случай е констатирано наличие на ацефални сперматозоиди (< 0,8%), но заради малката честота на срещане, този случай е изключен от статистическия анализ за морфология.

Таблица 3. Брой индивиди (N) и валиден процент (%) на участниците в проучването с информация относно параметрите за качество на спермата (обем на еякулат, концентрация и подвижност на сперматозоиди) в или извън норма* сравнени с референтните данни (WHO, 1999; Станиславов и Николова, 1913)

N / %	Качество на показателя	Обем на еякулата (ml)	Сперматозоидна концентрация (10 ⁶ /ml)	Сперматозоидна подвижност (% прогресивни)	Сперматозоидна морфология (% авнормални клетки)
Референтни стойности*	В норма	(2,0 – 6,0)	> 20	> 50	< 14
	Под норма	(< 2,0)	< 20	< 50	> 14
N/Валиден %	В норма	1013/81,2	998/76,9	594/45,6	1089/83,5
	Под норма	234/18,8	300/23,1	708/54,4	215/16,5
	Общо	1247/100	1298/100	1302/100	1304/100

При анализа на получените данни за сперматозоидна морфология прави впечатление фактът, че при отделните индивиди са налице комплекси от морфологични аномалии, както следва: в 32,8% – сперматозоиди с шиловидни глави и макроцефални сперматозоиди в съчетание с шийни дефекти; в 27,2% – сперматозоиди с аморфни и шиловидни глави в съчетание с шийни дефекти; в 20,8% – сперматозоиди с аморфни глави и макроцефални сперматозоиди в съчетание с шийни дефекти и цитоп-

лазматични остатъци; в 14,4% – всички отчетени дефекти с изключение на шийните; в 13,6% – сперматозоиди с аморфни и шиловидни глави, микроцефални сперматозоиди, опашни дефекти и цитоплазматични остатъци; в 11,2% – сперматозоиди с аморфни и двойни глави, микроцефални сперматозоиди и опашни дефекти и в 7,2% – шиловидни глави, микроцефални и макроцефални сперматозоиди, съчетани с шийни дефекти (Таблица 4).

Таблица 4. Честота на срещане на различни типове анормална морфология на сперматозоидите и комбинации от тях при 125 мъже с Тератозооспермия: N – брой индивиди; % – процент на изява; (+) – наличие. Броят на индивидите надвишава 125 и процентът на мъжете с аномалии в морфологията надвишава 100 заради изявата на различни аномалии у един и същ индивид.

Дефекти в морфологията на анализиранияте сперматозоиди								Честота	
Аморфни глави	Шиловидни глави	Микроцефални	Макроцефални	Двойни глави	Опашни дефекти	Шийни дефекти	Цитоплазматични остатъци	N	%
+	+	+			+		+	17	13,6
	+	+				+		41	32,8
+		+		+	+			14	11,2
+			+			+	+	26	20,8
	+	+	+			+		9	7,2
+	+					+		34	27,2
+	+	+	+	+	+		+	18	14,4
109 87,2	119 95,2	99 79,2	53 42,4	32 25,6	49 39,2	110 88	61 48,8	Общо: N %	

При анализа на получените данни е важно да се обърне внимание на обстоятелството, че морфологичните особености на сперматозоидите са във връзка с оплодителния капацитет на индивида и оценката на сперматозоидната морфология има прогностична стойност в асистиранията репродукция (Chemes and Alvarez, 2013).

Резултатите от настоящото проучване показват, че Тератозооспермията е хетерогенно състояние, включващо разнообразни изменения във формата на различни сперматозоидни компоненти. Морфологичните аномалии се съчетават и с различни функционални нарушения, с промени в качеството и функцията на сперматозоидния хроматин и с изявата на различни генетични аномалии, което повлиява негативно репродуктивния потенциал (Chemes and Alvarez, 2013).

Обобщаването на резултатите от проведения конвенционален спермален анализ в комплекс позволява извеждането и характеризирането на определени заключения относно репродуктивния потенциал на включените в проучването мъже.

Обобщените данни относно направените в настоящото проучване заключения от конвенционалния спермален анализ са представени в Таблица 5, от която е видно, че сред включените в изследването индивиди 43,9% са с нормозооспермия.

Таблица 5. Заключения от проведения конвенционалния спермален анализ: N – брой индивиди; % – процент

Заключение	N	%	Валиден %
Нормозооспермия	572	37,1	43,9
Астенозооспермия	398	25,8	30,6
Олигозооспермия	18	1,2	1,4
ОлигоАстенозооспермия	99	6,4	7,6
Тератозооспермия	3	0,2	0,2
ОлигоАстеноТератозооспермия	96	6,2	7,4
АстеноТератозооспермия	29	1,9	2,2
Азооспермия	87	5,6	6,7
Валиден N/%	1302	84,5	100,0
Липса	238	15,5	
Общо	1540	100,0	

За останалите изследвани чрез този анализ мъже, честотата на срещани отклонения е както следва: 30,6% са с астенозооспермия, 7,6% са с олигоастенозооспермия, 7,4% са с олигоастенотератозооспермия, 6,7% са с азооспермия, 2,2% са с астенотератозооспермия, 1,4% са с олигозооспермия и 0,2% са с тератозооспермия.

Установените в нашето проучване факти са тревожни, тъй като демонстрират, че над 50% от изследваните мъже са с някаква степен на репродуктивни проблеми, като в немалка част от тях причината е комплексна и засяга качеството на повече от един спермален показател. В тази връзка прави впечатление констатацията, че при 6,7% от включените в проучването мъже изобщо няма производство на сперматозоиди, а при 7,4% от тях са налице значителни нарушения на трите променливи – концентрация, подвижност и морфология на сперматозоидите. Това обстоятелство е важно да се разгледа и в контекста на връзката му с проучваните фактори на средата и начина на живот, от една страна, и възможните увреждания на ДНК в ядрата на сперматозоидите и наличието на хромозомни и генномни мутации в организма, от друга страна, тъй като споменатите

фактори биха могли да са основните рискови компоненти, определящи качеството на мъжкото репродуктивно здраве.

В хода на нашия експеримент е направено и съпътстващо проучване по отношение концентрацията на левкоцити. Без това да има пряко отношение към качеството на спермалните показатели, индиректно може да е индикатор за налични инфекции в половата система. Данните за концентрация на левкоцити са отчитани само за мъжете, при които са установени показания за възможни или налични инфекции (N = 718). Получените от нас резултати показват, че при 40,5% от подложените на това клинично изследване мъже, левкоцитите са над нормата.

Левкоцитите произвеждат значимо количество свободни радикали – обстоятелство, което силно негативно може да повлияе функцията на сперматозоидите, а също и да има потенциален мутагенен ефект. Това обстоятелство не е за пренебрегване и следва да се проучи по-детайлно чрез характеризирани връзката между концентрацията на левкоцитите и възможните увреждания на ДНК в сперматозоидите.

Включените в проучването мъже са анализирани и по отношение оценката за наличие на аглутинация. Това е важно, защото образуването на конгломерати от сперматозоиди намалява тяхната способност за прогресивно движение, което може да е свързано и с намаляване на плодовитостта.

Могат да се характеризират 4 степени на аглутинация в семенната течност: изолирани аглутинати – в случаите, при които един аглутинат съдържа по-малко от 10 сперматозоиди, а повечето от клетките са свободни; средна степен на аглутинация – в случаите, при които в един аглутинат има от 10 до 50 клетки, но има и свободни сперматозоиди; значителна степен на аглутинация – в случаите, при които аглутинатите съдържат повече от 50 клетки и само единични сперматозоиди са свободни; тежка степен на аглутинация – в случаите, при които аглутинатите са взаимосвързани и няма налични свободни сперматозоиди. Проучванията показват, че наличието на аглутинация се свързва с имунологични причини, кореспондиращи с мъжкото безплодие. Установено е, че при мъже с антитела, при които е констатирана по-висока степен на аглутинация е налице и намалена сперматозоидна подвижност (Станиславов и Николова, 2013).

Данните от нашето проучване сочат, че при 8,1% от включените в изследването мъже са налични различни по тип аглутинати. На базата на разположението на подвижните сперматозоиди в групи, са констатирани аглутинати от трите типа: глава – глава; опашка – опашка и глава – опашка. В хода на изследването е определена честотата на срещане на различ-

ните типове аглутинации и е установено, че в 47,1% от лицата с налични аглутинации е налице типът „глава – опашка“, при 40,5% от тях – типът „опашка – опашка“ и при 12,4% – типът „глава – глава“. Предвид характеризираните степени на аглутинация, резултатите от нашето проучване показват, че откритите аглутинати при около 8%-те от изследваните мъже са преобладаващо от типа на изолираните, при които един аглутинат съдържа до 10 сперматозоида.

Описателната статистика в това проучване е информативна относно честотата на срещане на определен фактор на средата или начина на живот, както и по отношение характеризиранието на качествените спермални показатели сред проучваната извадка. От представените данни става ясно, каква част от включените в изследването индивиди употребяват цигари, алкохол, наркотици, анаболни стероиди, работят и живеят в среда с вредности или под стрес, както и каква е професията им. В същото време, включените в проучването индивиди са с определени качествени спермални показатели и е известно, каква част от тях са с малък обем на еякулата, с понижена сперматозоидна концентрация и подвижност, както и с повишен процент на морфологични аномалии в сперматозоидите. Статистическата обработка на тези описателни данни позволява да се търсят, установят и характеризират определени зависимости между двете групи показатели – фактори на средата и начина на живот, от една страна, и качествени спермални показатели, от друга страна.

При това характеризиране са използвани различни статистически подходи (χ^2 , Gamma, Fisher's exact test), с помощта на които да се установи статистическа значимост, както и в случаите на налична такава да се определи посоката на влияние на изследвания фактор.

Анализът на резултатите от проучването показва, че факторите стрес, прием на лекарствата, тютюнопушене и консумацията на алкохол оказват най-голямо влияние върху качеството на спермата (обем на еякулат, сперматозоидна концентрация и подвижност). Въздействието на професионалните вредности върху подвижността на сперматозоидите също е отчетливо (Таблица 6).

В същото време, получените в хода на това изследване резултати не показват статистически значими зависимости между спермалните показатели и употребата на наркотици и анаболни стероиди.

Тестът Gamma се прилага за установяване посоката на влияние, в случаите при които факторът е статистически значим. Прегледът на данните в Таблица 6 показва, че обемът на еякулата статистически значимо негативно се влияе от тютюнопушене, алкохол и стрес. Това означава, че при системно пушене по 20 и повече цигари на ден, при консумация на

алкохол 3 пъти седмично (500 ml бира или вино, или 100 ml концентрат) и при налични ситуации на стрес на работното място или в семейството, обемът на еякулата намалява. Факторите тютюнопушене, прием на медикаменти и стрес повлияват статистически значимо негативно сперматозоидната концентрация – при системно пушене, при прием на медикаменти и при действие на стрес върху индивида, концентрацията на сперматозоидите намалява. Вредности като високи температури, лъчева терапия и др., както и употребата на алкохол като фактори на средата повлияват статистически значимо позитивно сперматозоидната подвижност, а приемът на медикаменти – негативно. Това означава, че при увеличаване въздействието на първите два фактора, сперматозоидната подвижност се увеличава, а при приема на медикаменти – намалява.

Таблица 6. Статистически зависимости между включените в изследването спермални показатели и анализирани фактори на средата и начина на живот, установени чрез точните тестове χ^2 , Gamma и Fisher. Gamma тестът е приложен с цел установяване посоката на влияние, в случаите при които факторът е статистически значим ($P < 0,05$)

Фактор \ Статистически тест	Вредности	Цигари	Алкохол	Наркотици	Анаболни стероиди	Медикаменти	Стрес
Обем на еякулат							
χ^2 тест	0,815	0,018	0,002	0,730	0,331	0,112	0,021
Gamma тест		-0,224	-0,164				-0,379
Точен тест на Фишер Fisher's exact test							
Сперматозоидна концентрация							
χ^2 тест	0,231	0,008	0,894	0,952	0,956	0,000	0,024
Gamma тест		-0,204				-0,300	-0,294
Точен тест на Фишер Fisher's exact test	0,229	0,010	0,934			0,000	0,032
Сперматозоидна подвижност							
χ^2 тест	0,031	0,389	0,037	0,460	0,758	0,012	0,109
Gamma тест	0,181		0,145			-0,197	
Точен тест на Фишер Fisher's exact test	0,033	0,400	0,041		0,770	0,013	0,122

Анализът на зависимостите между факторите на средата и начина на живот и сперматозоидната морфология демонстрира стойности на значимост чрез χ^2 теста, както следва: медикаменти – морфология (χ^2 тест – 0,147); вредности – морфология (χ^2 тест – 0,017); професии – морфология

(χ^2 тест – 0,003). Тези резултати показват, че има различия по отношение влиянието върху сперматозоидната морфология на използваните медикаменти, практикуваните професии и вредностите на средата. Значимо по-висока е вероятността вредности и професии да носят по-голям риск за качеството на сперматозоидната морфология. Тази страна на проблема подлежи на допълнително обследване. В настоящия труд, с цел доизясняване на въпроса, е планирано по-подробно проучване на връзката между установените аномалии в сперматозоидната морфология и уврежданията в ДНК на сперматозоидното ядро.

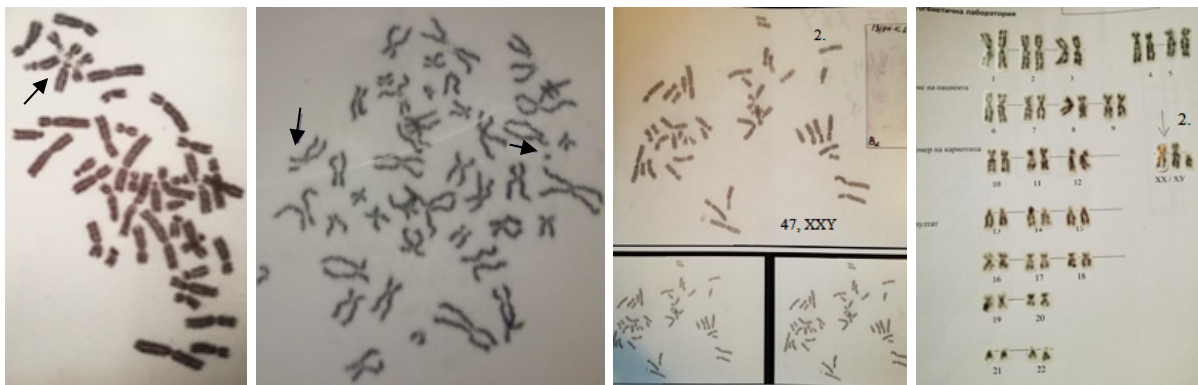
Възможната роля на околната среда и начина на живот за качеството на спермалните показатели е обсъждана от редица автори. Различни дебати, спекулации и противоположни възгледи могат да бъдат проследени в изследванията, посветени на този проблем (Dikshit et al., 1987; Vine, 1996; Torres-Calleja et al., 2001; Matzuk and Lamb, 2008; Li et al., 2011; Brezina et al., 2012; Ouzounova-Raykova et al., 2018).

В настоящото проучване, както вече бе коментирано, статистически значимо негативно въздействие върху обема на еякулата е наблюдавано във връзка с тютюнопушенето, употребата на алкохол и състоянието на стрес – Gamma: -0,224; -0,164 и -0,379, съответно. Намалването на сперматозоидната концентрация се свързва статистически значимо с тютюнопушенето, употреба на лекарства и състоянието на стрес (Gamma: -0,204, -0,300 и -0,294, съответно). Понижаването на сперматозоидната подвижност е статистически значимо свързано с употребата на медикаменти (Gamma: -0,197). Интересен е установеният факт на позитивно повлияване на подвижността на сперматозоидите от вредности и алкохол (Gamma: 0,181 и 0,141, съответно). Подобно на резултатите от изследванията на други автори (Auger et al., 2001; Dada et al., 2001; Iaizzo et al., 2010; Yu et al., 2014), данните от това проучване демонстрират значимото влияние на цигари, алкохол, медикаменти и стрес върху качеството на спермата. За разлика от получените тук резултати, в изследванията на други автори не се откриват такива отчетливи зависимости (Wong et al., 2000; Martini et al., 2004). Базирайки се на получените данни в хода на техните проучвания, те правят заключение, че консумацията на алкохол или цигари не променя спермалното качество (Martini et al., 2004) и че пушенето на цигари изглежда е само незначителен рисков фактор (Wong et al., 2000) за мъжкото репродуктивно здраве. Резултатите от нашето проучване показват, че употребата на наркотици и анаболни стероиди не повлиява значимо параметрите за качество на спермата, за разлика от установеното от други автори (Torres-Calleja et al., 2001; Cohen and Honig, 2005), които съобщават за констатиран висок процент на мъже с азооспермия и олигоспермия

(Torres-Calleja et al., 2001), за намалена концентрация и подвижност на сперматозоидите, както и за нарушения в тяхната морфология (Cohen and Honig, 2005) при мъже, употребяващи анаболни стероиди.

ЦИТОГЕНЕТИЧЕН АНАЛИЗ

В хода на настоящото проучване на цитогенетичен анализ са подложени общо 17 мъже. Заключениета от конвенционалния спермален анализ за 11 от тях са азооспермия, а при останалите 6 индивида е диагностицирана тежка форма на олигоастенотератозооспермия. При цитогенетичното анализиране на тази група от 17 мъже е установено, че значима част са с нормален мъжки кариотип (70,6%). Сред останалите 29,4% са намерени три случая със синдром на Клайнфелтер (17,6%), един случай на балансирана транслокация 13/21 (5,9%) и един случай на хроматидни разкъсвания с дислокации (5,9%) – Фигура 1.



Фигура 1. Хромозомни и геномни аномалии: 1. Транслокация – метафазна пластинка – 45, XY, t (13;21) и хроматидна фрагментация с дислокация; 2. Синдром на Клайнфелтер, 47, XXY – метафазна пластинка и кариограма

Мъжете със синдром на Клайнфелтер се отнасят към групата на пациентите с азооспермия, а тези с констатирани структурни хромозомни аберации – към групата на пациентите с олигоастенотератозооспермия. И в двата случая връзката между установената мутация (геномна, хромозомна) и мъжкия инфертилитет е очевидна. В този аспект, данните от нашето проучване подкрепят установеното и от други автори (Ferlin et al., 1998; O'Flynn O'Brien et al., 2009), с тази особеност, че констатираната от нас транслокация не е между 13 и 14, а между 13 и 21 хромозома. Важно е да се обърне внимание на констатираното обстоятелство, че структурни аберации, засягащи 13 хромозома вероятно кореспондират с мъжкия инфертилитет, независимо от това дали са в транслокационни обмени с 14 или с 21 хромозома.

На базата на проведения цитогенетичен анализ може да се направи заключение, че геномни мутации от типа на синдрома на

Клайнфелтер и структурни мутации от типа на транслокации и хроматидни фрагментации имат пряко отношение към мъжкия инфертилитет и по-специално към състоянията на азооспермия и олигоастенотератозооспермия.

АЗООСПЕРМИЯ

Важна задача в хода на това проучване е проследяването и характеризирането на различни причини, водещи до изневзгода на необструктивна азооспермия, както и установяването на потенциални връзки между генетични и екологични фактори, свързани с това заболяване.

Както е видно от получените резултати, в 6,7% от изследваните мъже е налично заключението азооспермия (Таблица 5).

В 3,4% от тази група е установено, че причина за азооспермия е цитогенетично установен класически синдром на Клайнфелтер (открит при трима мъже).

Синдромът на Клайнфелтер е геномна мутация, при която се наблюдава най-малко една допълнителна X хромозома в мъжкия кариотип (47, XXУ). Честота му на срещане е между 0,1% до 0,2% в общата популация и може да достигне до 3,1% в популации, за които е съобщена повишена честота на безплодие (Gudeloglu and Parekattil, 2013). Данните от нашето проучване показват, че сред мъжете, страдащи от азооспермия 16% са пушачи, 11,1% – употребяващи алкохол, 8% – приемащи медикаменти, 5,1% са работещи в среда с професионални вредности, 4,9% са приемали анаболни стероиди и 1,3% – наркотици.

По отношение на спермалния показател „обем на еякулат“, нашите данни сочат, че при 24,4% от мъжете с азооспермия този показател е под нормата (< 2,0 ml), а при 3,5% – над нормата (> 6 ml). При мъжете със синдром на Клайнфелтер, средният обем на еякулата е средно с 0,64 ml по-малко, отколкото при другите пациенти. Констатирана е левкоцитоспермия (над $1 \times 10^6/ml$) при 33,3% от мъжете в тази група.

Анализът на данните от нашето проучване относно връзката между обема на еякулата и тютюнопушенето показва, че пушачите отделят средно с 0,61 ml по-малко еякулат в сравнение с непушачите ($U = 1,334$, $P = 0,187$). Сравнението на установения среден обем на еякулата по групи в зависимост от интензивността на тютюнопушенето сочи, че с увеличаването на количеството изпушени цигари на ден се увеличава и обемът на отделения еякулат (Dzhoglov and Ivanova, 2016). Това най-вероятно се дължи на увеличеното производство на семенни мехурчета и секрети на простататна жлеза като израз на локалната ексудативна съдова реакция, която може да бъде резултат от интензивното пушене. Подобна тенденция е установена и за друг рисков фактор – алкохол. Не е констатирана значи-

телна разлика в обема на еякулата между лицата, употребяващи наркотици и тези, които не употребяват. Данните от проучването ни показват също, че пациентите, които пушат марихуана, отделят значително по-малко по обем еякулат ($1,25 \pm 1,06$ ml) в сравнение със средния обем на еякулата при цялата група ($2,62$ ml). В същото време, средният обем на еякулата при мъжете от „кокаиновата група“ е $3,43 \pm 1,09$ ml, което е значително по-високо от средния обем на изследваната група.

Обобщавайки данните от проучването, може да се направи заключение, че азооспермията е пряко свързана със синдром на Клайнфелтер, както и че фактори като тютюнопушене и употреба на алкохол са сред по-честите, кореспондиращи със заключението азооспермия.

МИКРОДЕЛЕЦИИ В Y ХРОМОЗОМАТА

Приблизително 5 до 10% от мъжете с азооспермия или тежка олигоспермия имат делеции в зоната на азооспермичния фактор (AZF) – Yq11, която съдържа гени, контролиращи процеси на сперматогенезата. Три различни AZF области (обозначавани като „a“, „b“ и „c“) са локализиращи в този регион от центромера до теломера на дългото рамо на Y хромозомата.

В късото рамо на Y хромозомата е локализиран генът SRY (sex-determining region of the Y chromosome – полово-определящ регион в Y хромозомата), който е отговорен за мъжката тенденция в развитието на гонадите, както и ZFY участъкът, хомоложен на ZFX, намиращ се в X хромозомата – zinc finger protein genes, обозначаван като ZFX/Y.

В хода на настоящото проучване на PCR микроделеционен анализ на Y хромозомата са подложени общо 48 мъже с азооспермия и тежка олигоастенотератозооспермия. Получените резултати показват присъствие на микроделеции, както в зоната на азооспермия AZF в дългото рамо на Y, така и в късото рамо на тази хромозома, по-специално в участъците SRY и ZFX/Y.

Като резултат от нашето изследване се установи, че поотделно наличните микроделеции в Y хромозомата на включените в проучването мъже с азооспермия и тежка олигоастенотератозооспермия са с честота на срещане в рамките на тази група, както следва: AZFa – 20,8%; AZFb – 35,4% от тях; AZFc – 33,3%; SRY – 66,7% и ZFX/Y – 25%.

Данните, представени в Таблица 7 показват, че при 29,2% от изследваните мъже от тази група не са открити микроделеции в Y хромозомата. Сред всички останали, самостоятелно микроделециране е констатирано в субрегиона AZFa на Yq (2,1%) и в SRY зоната на Yp (22,9%). За всички останали мъже с азооспермия и олигоастенотератозооспермия са

установени различни комбинации от микроделеции в два (AZFb + AZFc, AZFa + SRy, AZFb + SRy, AZFc + SRy и SRy + ZFX/Y с честота за всяка комбинация от 2,1%), три (AZFa + AZFc + SRy – честота 2,1%, AZFb + AZFc + SRy – честота 8,3% и AZFb + SRy + ZFX/Y – честота 2,1%), четири (AZFa + AZFb + AZFc + SRy – честота 4,2%, AZFa + AZFb + SRy + ZFX/Y – честота 2,1%, AZFa + AZFc + SRy + ZFX/Y – честота 2,1% и AZFb + AZFc + SRy + ZFX/Y – честота 8,3%) или пет (AZFa + AZFb + AZFc + SRy + ZFX/Y – честота 6,3%) участъка/субучастъка едновременно (Таблица 7). Прави впечатление високият процент аномалии в SRy региона – самостоятелно и в комбинации – общо 66,7% – при обследваната извадка от мъже с азооспермия и олигоастенотератозооспермия.

Таблица 7. Честота на срещане на установени микроделеции в Y хромозомата по райони в късото и дългото ѝ рамо и комбинации от тях при анализиранияте (48) мъже със заключение азооспермия и олигоастенотератозооспермия

Микроделеции по райони и установени комбинации от тях	Брой индивиди (N)	Валиден % в изолираната извадка
Липса	14	29,2
AZFa	1	2,1
AZFb + AZFc	1	2,1
SRy	11	22,9
AZFa + SRy	1	2,1
AZFb + SRy	1	2,1
AZFc + SRy	1	2,1
AZFa + AZFc + SRy	1	2,1
AZFb + AZFc + SRy	4	8,3
AZFa + AZFb + AZFc + SRy	2	4,2
SRy + ZFX/Y	2	4,2
AZFb + SRy + ZFX/Y	1	2,1
AZFa + AZFb + SRy + ZFX/Y	1	2,1
AZFa + AZFc + SRy + ZFX/Y	1	2,1
AZFb + AZFc + SRy + ZFX/Y	4	8,3
AZFa + AZFb + AZFc + SRy + ZFX/Y	3	6,3
Общо	48	100,0

Предвид това установено обстоятелство, в хода на нашето проучване са анализирани и възможните статистически значими зависимости между наличието на микроделеции в SRy региона от Yp и микроделециите в другите изследвани зони на Y хромозомата. Детайлният анализ на тези възможни асоциации показва, че микроструктурните аномалии в този регион са статистически значимо обвързани с микроделеции в ZFX/Y региона на Yp и в AZFa, AZFb и AZFc субрегионите на Yq (значимост по χ^2 тест: 0,005; 0,079; 0,003; 0,005, съответно и по точния тест

на Fisher: 0,003; 0,078; 0,002 и 0,004, съответно). При всички тези значими зависимости е изчислен и статистическият показател Gamma, чрез който може да се определи и посоката на установената зависимост. Данните от изследването сочат, че за всички по-горе описани зависимости Gamma е с положителна стойност (0,709; 0,875; 0,860 и 1,0, съответно за връзката между SRY региона и AZFa, AZFb и AZFc от Yq и ZFX/Y от Yp. Това означава, че структурните хромозомни аберации в SRY региона провокират осъществяването на микроделеции в останалите опоменати субрегиони.

Отделно от това са установени и някои статистически значими зависимости по отношение на микроделециите в Y хромозомата при мъже с азооспермия и олигоастенотератозооспермия и някои от качествените спермални показатели, от една страна, и проучваните фактори на средата и начина на живот, от друга страна. **В хода на проучването е констатирано конкретно следното:** 1) **Установените микроаберации в SRY региона са в статистически значима зависимост с тютюнопушенето;** (значимост: χ^2 тест – 0,016; точен тест на Fisher – 0,02); 2) **Констатираните микроделеции в AZFa субрегиона на Yq са в статистически значима зависимост с обема на еякулата** (значимост: χ^2 тест – 0,05; точен тест на Fisher – 0,04); 3) **Откритите микроделеции в ZFX/Y региона на Yp са в статистически значима зависимост с обема на еякулата** (значимост: χ^2 тест – 0,014; точен тест на Fisher – 0,06).

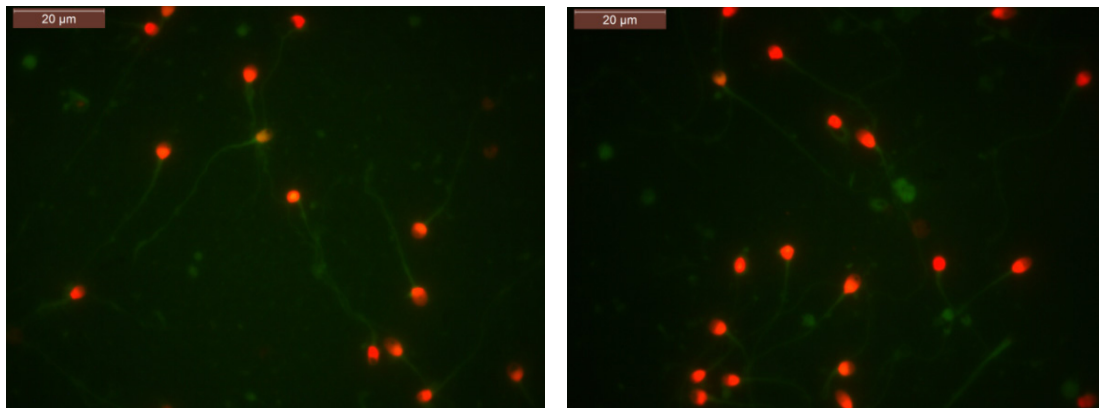
Освен посочените асоциации, може да бъде обобщено и следното: 1) **Съобразно характеристиките на тази проучвана група, качествените показатели подвижност и морфология на сперматозоидите за всички изследвани мъже е под нормата, предвид факта, че тези индивиди са лишени изцяло от сперматозоиди при диагноза азооспермия или са с намален брой сперматозоиди ($< 20 \times 10^6/ml$) при диагноза олигоастенотератозооспермия;** 2) **От изследваните мъже с азооспермия и тежка олигоастенотератозооспермия в тази група проблемите в SRY региона са преобладаващи;** 3) **При диагнозите азооспермия и тежка олигоастенотератозооспермия в тази група проблемите в останалите проучвани региони/субрегиони на Y хромозомата в по-голямата си част са съпроводени с проблем в SRY региона.**

Нашето проучване показва висока честота на срещане на микроаберациите в SRY региона –самостоятелно и в комбинации, както и микроаберации в ZFX/Y само в комбинации. Подобни комплексни резултати по отношение на свързаността на микроделециите в двете рамена на Y хромозомата не открихме като описани в проучваната литература и това ни дава основание да ги приемем за оригинални.

ФЕРТИЛИТЕТЕН ПОТЕНЦИАЛ И АКРИДИН ОРАНЖ ФЛУОРЕСЦЕНТЕН ТЕСТ

Интегритетът на ДНК в сперматозоидните ядра би могъл да се разглежда като маркер за качеството на сперматогенезата и потенциала за мъжки фертилитет. Установено е, че около 10% от сперматозоидите на фертилните мъже и приблизително 20 – 25% от тези на мъжете с инфертилитет имат измерими нива на увреждане на ДНК (Smith et al., 2006).

За проучване на ДНК интегритета в сперматозоидите при мъже с репродуктивни проблеми е използван акридин оранж флуоресцентен тест (Фигура 2). В този анализ са включени 87 мъже – представители на всички заключения от спермалния анализ – нормозооспермия, астенозооспермия, олигозооспермия, олигоастенозооспермия, тератозооспермия, олигоастенотератозооспермия, остенотератозооспермия и азооспермия, които са подложени на акридин оранж флуоресцентен тест.



Фигура 2. Микрофотографии, представящи висока степен на ДНК увреждане в сперматозоидите на изследваните мъже

Получените резултати са базирани на четиристепенна скала, отговаряща на процента на клетките с ДНК увреждания в ядрата им (Evenson et al., 1999).

Данните относно броя и валидния процент на участниците в акридин оранж флуоресцентния тест и качеството на фертилитетния потенциал, определено на базата на четиристепенната скала в зависимост от процента на сперматозоиди с нарушен интегритет на ДНК в ядрата им са представени в Таблица 8, а информация относно качеството на спермалните показатели при мъжете, проучвани чрез акридин оранж флуоресцентния тест е представена в Таблица 9.

Данните от Таблица 8 показват, че почти половината от изследваните мъже в тази група имат отличен фертилитетен потенциал. Заедно с тези, които имат добър такъв, съставляват общо 58,6%. Smith et al. (2006) обръщат внимание на факта, че около 20 – 25% от сперматозоидите на мъжете

с инфертилитет имат увреждания на ДНК в ядрата си. *Анализът на резултатите от нашето изследване показва, че общо 41,4% от изследваните мъже имат ДНК фрагментации в над 20% от ядрата на сперматозоидите си.* Важно е да се отбележи, че сред тези индивиди *значително по-голям е дялът на мъжете с лош фертилитетен потенциал (32,2%), отколкото на тези със задоволителен такъв (9,2%).* При тези установени от нас високи нива на ДНК увреждания, е изключително важно да се анализира възможността за асоциации между нарушения ДНК интегритет на сперматозоидните ядра и качеството на анализиранияте чрез конвенционален спермален анализ показатели.

Таблица 8. Брой (N) и валиден процент на индивиди с ДНК фрагментации в сперматозоидните ядра съгласно четиристепенната скала на Evenson et al. (1999) за фертилитетен потенциал: отличен – увредени клетки под 15%; добър – увредени клетки между 15% и 20%; задоволителен – увредени клетки между 20% и 30%; беден (лош) – увредени клетки повече от 30%.

Ниво на ДНК фрагментации и фертилитетен потенциал	N	Валиден %
Отличен	43	49,4
Добър	8	9,2
Задоволителен	8	9,2
Беден/лош	28	32,2
Общо	87	100,0

Данните от Таблица 9 сочат, че 41,4% от изследваните в тази група мъже имат прогресивна сперматозоидна подвижност под нормата, 20% от тях са с понижена под нормата концентрация на сперматозоиди и 11,5% имат над 14% сперматозоиди с абнормална морфология. Резултатите от нашето проучване в ограничената извадка, макар и в по-слаба степен, отколкото за цялата изследвана група от над 1500 мъже, показват тенденции към зависимости между изследваните спермални показатели (концентрация, подвижност и морфология на сперматозоидите) и някои от факторите на околната среда и начина на живот. Не са установени конкретни зависимости с висока статистическа значимост, а тенденции, както и възможната посока на действие на определения фактор, които съвпадат с вече коментиранияте по отношение резултатите от конвенционалния спермален анализ.

Статистически данни за зависимостите между качествените спермални показатели и нивата на фрагментации на ДНК в ядрата на сперматозоидите са включени в Таблица 10 ($P < 0,001$).

В настоящото проучване не са установени също категорични зависимости между факторите на средата и начина на живот, от една страна, и отчетените нива на ДНК фрагментациите в ядрата на сперматозоиди-

те, от друга, и според нас този факт се дължи на малкия размер на изследваната извадка – 87 индивида.

Таблица 9. Данни относно качеството на спермалните показатели при мъжете, проучвани чрез акридин оранж флуоресцентния тест: N – брой индивиди; % – валиден процент на участниците в теста; *референтни стойности по Станиславов и Николова (2013) и WHO, (1999)

N / %	Качество на спермалния показател	Сперматозоидна концентрация (10 ⁶ /ml)	Сперматозоидна подвижност (% прогресивни)	Сперматозоидна морфология (% абнормални клетки)
Референтни стойности*	В норма	> 20	> 50	< 14
	Под норма	< 20	< 50	> 14
Данни от проучването	В норма	69/79,3	51/58,6	77/88,5
	Под норма	18/20,7	36/41,4	10/11,5
	Общо	87/100	87/100	87/100

Таблица 10. Разлики между сравняваните групи и статистически значими зависимости, базирани на χ^2 и Gamma* тестовете, между изследваните спермални показатели и качеството на фертилитетния потенциал, определено чрез нивото на ДНК фрагментации в сперматозоидните ядра. *Gamma тестът е използван за определяне посоката на влияние в случаите, при които факторът е значим (P < 0,001)

Фертилитетен потенциал	Отличен	Добър	Задоволителен	Лош	χ^2 тест	Gamma тест
Качество на спермалния показател						
Подвижност на сперматозоидите						
Под норма	8,4%	2,8%	19,4%	69,4%	0,000	-0,929
В норма	78,4%	13,7%	2,0%	5,9%		
Концентрация на сперматозоидите						
Под норма	5,6%	0,0%	0,0%	94,4%	0,000	-0,947
В норма	60,9%	11,6%	11,6%	15,9%		
Морфология на сперматозоидите						
Под норма	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,000	-1,000
В норма	55,8%	10,4%	10,4%	23,4%		

В хода на настоящото проучване са отчетени статистически значими зависимости между изследваните качествени спермални показатели (концентрация, подвижност и морфология на сперматозоидите) и нивата на ДНК увреждания в сперматозоидните ядра (Таблица 10). Отрицателните стойности на показателя Gamma демонстрират, че с намаляване на сперматозоидната концентрация, подвижност и нормална морфология, честотата на ДНК фрагментациите в ядрата се увеличава.

Както може да се види от Таблица 10, За всичките 69,4% от изследваните в тази група мъже с намалена подвижност на сперматозоидите, 94,4% с концентрация на сперматозоиди под нормата и 100% от тях с абнормна морфология на сперматозоидите са с лош фертилитетен потенциал и високи нива на ДНК увреждания. В същото време, мъжете с нормални спермални показатели – подвижност, концентрация и морфология на сперматозоидите демонстрират високи нива на ДНК фрагментации, съответно в 5,9%, 15,9% и 23,4%.

Резултатите от нашето проучване сочат, че измерените нива на ДНК увреждания в ядрата на сперматозоидите чрез прилагане на акридин оранж флуоресцентния тест са значимо демонстративни за качеството на спермалните показатели. Идентифицираните в нашето изследване статистически значими зависимости между спермални показатели и нива на ДНК увреждания в сперматозоидите са достатъчно ясни и отчетливи и биха могли да се използват в бъдещи детайлни изследвания, посветени на мъжкото репродуктивно здраве и на потенциалните рискове за влошаването му.

Въпреки, че в нашето проучване не са отчетени статистически значими зависимости (значимост по χ^2 теста – 0,9) между обследваните възрастови групи и нивата на ДНК увреждания **може да се коментира тенденцията с увеличаване на възрастта да се увеличава и честотата на ДНК фрагментации в сперматозоидните ядра.**

В контекста на използвания за характеризиране на ДНК интегритета в сперматозоидните ядра акридин оранж флуоресцентен тест, следва да се обърне внимание на още едно интересно обстоятелство, отчетено в хода на настоящия експеримент – концентрацията на левкоцитите за включените в обследваната извадка мъже (Таблица 11).

Таблица 11. Зависимост между концентрацията на левкоцити и качеството на фертилитетен потенциал на база ниво на ДНК увреждания, установено чрез акридин оранж флуоресцентен тест: значимост по χ^2 теста – 0,024; Gamma – 0,473

Левкоцити	Фертилитетен потенциал	Отличен	Добър	Задоволителен	Лош	Общо N/%
	N/%					
В норма	Брой	29	4	2	10	45
	%	64,4%	8,9%	4,4%	22,2%	100
	% от общия брой	35,4%	4,9%	2,4%	12,2%	54,9
Над норма	Брой	13	2	6	16	37
	%	35,1%	5,4%	16,3%	43,2%	100
	% от общия брой	15,9%	2,4%	7,3%	19,5%	45,1
Общо	Брой	42	6	8	26	82
	%	51,2%	7,3%	9,8%	31,7%	100

Данните от проучването сочат наличие на статистически значима зависимост между левкоцитната концентрация и нивото на ДНК увреждания в анализираната група (значимост по χ^2 теста – 0,024). Положителната стойност на показателя Gamma (0,473) демонстрира, че с увеличаване на концентрацията на левкоцитите нараства и вероятността (рискът) от увеличаване честотата на ДНК фрагментации в сперматозоидните ядра. От Таблица 11 е видно, че при 59,5% от мъжете, при които е отчетена левкоцитна концентрация над нормата е установен и задоволителен (16,3%) или лош (43,2%) фертилитетен потенциал.

На базата на проведения конвенционален спермален анализ са направени заключения относно комплексните нива на негативни промени в качествените показатели за концентрация, подвижност и морфология на сперматозоидите, а на базата на проведения акридин оранж флуоресцентен тест са отчетени нивата на ДНК увреждания в сперматозоидните ядра. Биостатистическият анализ на двете групи признаци показва категорично наличието на статистически значими зависимости между тях (значимост по χ^2 теста – 0,00), а положителната стойност на показателя Gamma (0,932) води към заключението, че *пониженото качество на проучваните спермални показатели е свързано с понижено качество на фертилитетния потенциал* (Таблица 12).

Таблица 12. Зависимости между направените с конвенционален спермален анализ заключения и качеството на фертилитетния потенциал, определен на база ниво на ДНК увреждания, установено чрез акридин оранж флуоресцентен тест: значимост по χ^2 теста – 0,00; Gamma – 0,932

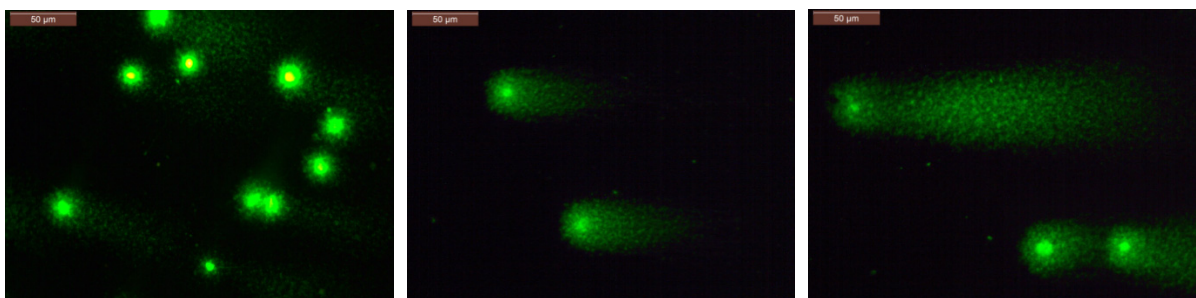
Заключение	Фертилитетен потенциал		Отличен	Добър	Задоволителен	Лош	Общо
	N/%						
Нормозооспермия	Брой		40	7	1	3	51
	%		78,4	13,7	2,0	5,9	100,0
	% от общия брой		46,0	8,0	1,1	3,4	58,6
Астенозооспермия	Брой		2	1	7	6	16
	%		12,5	6,3	43,8	37,5	100,0
	% от общия брой		2,3	1,1	8,0	6,9	18,4
Олигоастенозооспермия	Брой		1	0	0	9	10
	%		10,0	0,0	0,0	90,0	100,0
	% от общия брой		1,1	0,0	0,0	10,3	11,5
Олигоастенотератозооспермия	Брой		0	0	0	8	8
	%		0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	% от общия брой		0,0	0,0	0,0	9,2	9,2
Астенотератозооспермия	Брой		0	0	0	2	2
	%		0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	% от общия брой		0,0	0,0	0,0	2,3	2,3
Общо	Брой		43	8	8	28	87
	%		49,4	9,2	9,2	32,2	100,0
	% от общия брой		49,4	9,2	9,2	100,0	100,0

Налице са достатъчно основания да се приеме, че акридин оранж флуоресцентният тест е достатъчно информативен за качеството на фертилитетния потенциал, защото отчетените чрез него нива на ДНК фрагментации са в статистически значими зависимости с качествените спермални показатели.

ФЕРТИЛИТЕТЕН ПОТЕНЦИАЛ И КОМЕТЕН АНАЛИЗ

Резултатите от флуоресцентната микроскопия, визуалното класифициране на наблюдаваните комети, както и статистическите данни от проведения кометен анализ са представени в поредица от таблици и микрофотографии.

На Таблица 13 е обобщена информацията относно качеството на кометните показатели % на ДНК в опашката, дължина на опашката и опашен момент като са отчетени минимални, максимални и средни стойности за всеки един от класовете от 1 до 4. В частта „Материал и методи“ е обяснено, че класифицирането на кометите е направено на базата на % ДНК в опашката. Използваната скала е подобна на приложената при отчитане на резултатите от акридин оранж флуоресцентния тест (Evenson et al., 1999), но е съобразена с конкретните получени резултати от кометния анализ и е в съответствие с прилагането на подобни скали от други изследователи (Castillo et al., 2015; Cunha et al., 2015). Клетките с цяла, ненарушена ДНК в ядрата микроскопски изглеждат като „слънца“. Техните ядра са интактни с разположено около тях симетрично хало от ДНК. Към класовете от 1 до 4 са класифицирани клетки с различна степен на ДНК увреждания – от ниска (до 12% ДНК в опашката) до значителна ($\geq 30\%$ ДНК в опашката), което отговаря, съответно и на много добър, добър, задоволителен и лош фертилитетен потенциал. Микроскопски те наподобяват „комети“, чиято глава съдържа неувредена ДНК, а опашката – фрагментирана (Фигура 3).



Фигура 3. Различни класове комети с различен % ДНК в опашката и с различна дължина на опашката

Резултатите от анализа на заснетите при флуоресцентната микроскопия микрофотографии показват, че при обследваните в тази извадка, най-висок е процентът (46,8%) на мъжете с преобладаващи комети от клас 1 (Таблица 13).

Кометите от класове 2 и 3 се отчитат при 8,9% и 10,1% от изследваните лица, съответно. Данните от проучването ни сочат, че е съществено висок и процентът (34,2%) на мъжете с преобладаващи комети от клас 4 (Таблица 13, Фигура 3).

Това демонстрира, че в анализираниите клетки са налице различни по обхват ДНК фрагментации, което определя и наличието на генетични увреждания с различна степен. За това свидетелстват средните, минимални и максимални стойности на показателя % ДНК в опашката от данните за изследвани индивиди, както и стойностите на останалите два отчетени кометни показателя – дължина на опашката и опашен момент (Таблица 13).

Таблица 13. Данни относно качеството на кометните показатели – средни, минимални и максимални стойности, стандартно отклонение – SD и стандартна грешка – SE (P < 0.001)

Качество кометен показател	N %	Средна стойност	SD	SE	95% интервал на достоверност за средна стойност		Мин. стойност	Макс. стойност
					Долна граница	Горна граница		
% на ДНК в опашката								
Клас 1	37/46,8	6,970	3,315	0,545	5,864	8,075	1,752	18,136
Клас 2	7/8,9	12,727	5,800	2,192	7,363	18,090	4,596	21,148
Клас 3	8/10,1	11,231	5,871	2,076	6,323	16,139	4,606	20,486
Клас 4	27/34,2	13,954	7,030	1,353	11,173	16,735	4,481	31,418
Общо	79/100	10,298	6,142	0,691	8,923	11,674	1,752	31,418
Дължина на опашката								
Клас 1	37/46,8	5,272	3,560	0,585	4,0852	6,460	0,012	14,818
Клас 2	7/8,9	9,815	5,875	2,220	4,382	15,248	1,396	17,429
Клас 3	8/10,1	9,003	5,193	1,836	4,661	13,344	2,162	18,654
Клас 4	27/34,2	13,704	8,226	1,583	10,450	16,958	4,388	39,985
Общо	79/100	8,934	6,913	0,778	7,386	10,483	0,012	39,985
Опашен момент								
Клас 1	37/46,8	0,773	0,719	0,118	0,533	1,012	0,000	3,629
Клас 2	7/8,9	2,115	1,641	0,620	0,597	3,633	0,392	4,373
Клас 3	8/10,1	2,285	2,509	0,887	0,188	4,383	0,420	7,711
Клас 4	27/34,2	3,280	3,217	0,619	2,008	4,553	0,330	13,419
Общо	79/100	1,902	2,396	0,270	1,365	2,439	0,000	13,419

В проучваната извадка не е установено преобладаващо присъствие на комети от клас 0, което би могло да се обясни с наличието на известен брой фрагменти, експресирани въпреки неутралните условия на инкубиране и електрофореза като резултат от специфичната компактизация на хроматина в сперматозоидните ядра.

Миграцията на ДНК в резултат на генотоксичен ефект на даден фактор се отчита чрез показателите % на ДНК в опашката и дължина на опашката. Смята се, че показателят % на ДНК има предимство, защото може да бъде стандартизиран в хода на изследването и съпоставен със стойности, получени при други изследвания (Collins et al., 2008). Този показател се приема за най-подходящ при оценка на генотоксичния ефект, тъй като нараства успоредно с увеличаване на интензивността на токсичните агенти и е независим от условията на визуалния анализ.

Препоръчва се показателят дължина на опашката да не се използва като единствен критерий за оценка на генотоксичен ефект, тъй като кометната опашка може да нараства и при ниски нива на увреждания в различни електрофоретични условия. Като недостатък на този показател се приема и неговата висока чувствителност по отношение на фоновата интензивност при анализа на микрофотографиите, което е свързано с определянето на края на опашката. От друга страна, заради своята чувствителност, показателят дължина на опашката позволява да се изгради бърза визуална представа за конкретна ситуация, а отчитането му е от значение за изчисляване на опашния момент.

Показателят опашен момент отчита едновременно както миграцията на увредена ДНК в опашката, така и относителното количество на ДНК в опашката. При ниски дози на генотоксично действие, стойността му проявява отклонение от установената линейна зависимост от дозата и за него липсват строго определени стандартни единици. Този показател разкрива зависимостта между определен клас на получените комети и директното ниво на увреждане на клетките. Тъй като дължината на опашката участва в изчисляването на опашния момент, а е известно, че клетки от различни тъкани и биологични видове могат да имат специфична изява в дължината на опашката, е възможно при близки нива на увреждане да се получат различни стойности на опашния момент. Това е още една причина, за оценка на геномните увреждания да се предпочита показателят % ДНК в опашката, чиято стойност не се повлиява от посочените обстоятелства (Collins et al., 2008). Независимо от това, използването на този показател е препоръчително за провеждането на качествени генотоксични изследвания (Burlinson et al., 2006).

В хода на нашето проучване са разгледани и анализирани стойностите и на трите посочени кометни показатели. Сравнителният анализ на получените данни показва наличието на статистически значими различия при високи нива на достоверност между стойностите на трите кометни показатели за отделните групи, различаващи се по качество на фертилитетния потенциал (ANOVA: $P < 0,001$). В същото време, t тестът показва статистически значими зависимости между кометните параметри % ДНК в опашката, дължина на опашката и опашен момент, от една страна и качествените спермални показатели концентрация, подвижност и морфология на сперматозоидите, от друга страна.

По-подробна информация за това е представена в Таблица 14, от която е видно, че % на ДНК в опашката на кометите, отчетени при мъже с концентрация на сперматозоиди под нормата (15,632) е почти два пъти по-висок в сравнение с установения при индивиди с нормална сперматозоидна концентрация (8,725). Отчетливи са разликите при двете сравнявани групи (под норма и в норма) и по отношение на кометните показатели дължина на опашката (15,550 и 6,982) и опашен момент (3,997 и 1,284), съответно. В същата посока на взаимодействие са и установените статистически значими зависимости с другите два спермални показатели – сперматозоидна подвижност и морфология. От данните, представени в Таблица 14 е видно, че при намалена под нормата подвижност на сперматозоидите, средните стойности на трите кометни показатели (% ДНК в опашката, дължина на опашката и опашен момент) са по-високи (12,920; 12,375 и 2,910), отколкото при отчетените за мъжете с нормална сперматозоидна подвижност (8,213; 6,198 и 1,100), съответно. Статистически значима е и връзката между трите кометни показатели и морфологията на сперматозоидите. От представената в Таблица 14 информация става ясно, че процентът на ДНК в опашката, дължина на опашката и опашен момент са със значително по-високи стойности при мъжете, за които са отчетени високи нива на морфологични аномалии и нормална морфология под норма (16,998; 16,818 и 4,774, съответно), в сравнение с тези, при които процентът на клетките с нормална морфология е в норма (9,328; 7,792 и 1,486, съответно). Изчислената чрез t теста значима достоверност за случаите със статистически значими зависимости е $P \leq 0,05$.

Таблица 14. Зависимости между средните стойности на кометните показатели (% ДНК в опашката, дължина на опашката и опашен момент) и качеството на спермалните показатели (концентрация, подвижност и морфология на сперматозоидите): N – брой индивиди; SD – стандартно отклонение; SE – стандартна грешка ($P \leq 0,05$)

Кометен показател	Качество на спермален показател	N	Средно	SD	SE
Концентрация					
% ДНК в опашката	под норма	18	15,632	7,211	1,700
	в норма	61	8,725	4,823	0,618
Дължина на опашката	под норма	18	15,550	8,809	2,076
	в норма	61	6,982	4,810	0,616
Опашен момент	под норма	18	3,997	3,618	0,853
	в норма	61	1,284	1,432	0,183
Подвижност					
% ДНК в опашката	под норма	35	12,920	6,723	1,136
	в норма	44	8,213	4,760	0,718
Дължина на опашката	под норма	35	12,375	7,904	1,336
	в норма	44	6,198	4,472	0,674
Опашен момент	под норма	35	2,910	3,080	0,521
	в норма	44	1,100	1,194	0,180
Морфология					
% ДНК в опашката	под норма	10	16,998	9,153	2,894
	в норма	69	9,328	4,963	0,597
Дължина на опашката	под норма	10	16,818	10,988	3,475
	в норма	69	7,792	5,327	0,641
Опашен момент	под норма	10	4,774	4,599	1,454
	в норма	69	1,486	1,5487	0,186

От представените в таблицата данни може да се отчете, че в случаите с понижена сперматозоидна концентрация и подвижност, както и при наличие на сперматозоиди с абнормална морфология извън нормата, формираните комети имат осезаемо по-дълги опашки, което отчетливо се визуализира и при класифицирането им (Фигура 3).

Прилагането на Oneway теста показва статистически значими зависимости между трите кометни показатели и установените с помощта на конвенционалния спермален анализ диагнози (заключения) – Таблица 15.

Sheikh et al. (2008) констатира в свое проучване 4 пъти по-висок процент на ДНК увреждания при инфертилни мъже и наличие на негативна корелация със спермалните показатели подвижност и морфология, без да установят сходна зависимост с показателя концентрация на сперматозоиди.

Таблица 15. Установени зависимости между средните стойности на кометните показатели и заключенията от спермалния анализ: N – брой индивиди; SD – стандартно отклонение; SE – стандартна грешка; P < 0,001

Заключение (диагноза)	N	Средна стойност	SD	SE	95% интервал на достоверност за средна стойност		Мин. стойност	Макс. стойност
					Долна граница	Горна граница		
% на ДНК в опашката								
Нормозооспермия	44	8,213	4,760	0,718	6,766	9,660	1,752	21,148
Астенозооспермия	15	9,944	4,619	1,193	7,387	12,503	4,606	19,782
Олигоастенозооспермия	10	13,304	4,519	1,429	10,072	16,537	9,418	22,194
Олигоастенотератозооспермия	8	18,542	9,0889	3,213	10,943	26,140	5,413	31,418
Астенотератозооспермия	2	10,822	8,966	6,340	-69,734	91,377	4,482	17,161
Общо	79	10,298	6,142	0,691	8,923	11,674	1,753	31,418
Дължина на опашката								
Нормозооспермия	44	6,198	4,472	0,674	4,839	7,558	0,012	17,429
Астенозооспермия	15	8,489	4,437	1,146	6,032	10,946	2,162	18,654
Олигоастенозооспермия	10	13,758	5,954	1,883	9,499	18,017	6,518	27,754
Олигоастенотератозооспермия	8	17,791	11,512	4,070	8,166	27,415	4,594	39,985
Астенотератозооспермия	2	12,928	11,000	7,778	-85,906	111,762	5,149	20,706
Общо	79	8,934	6,913	0,778	7,386	10,483	0,012	39,985
Опашен момент								
Нормозооспермия	44	1,100	1,194	0,180	0,737	1,463	0,000	4,373
Астенозооспермия	15	1,669	1,821	0,470	0,661	2,678	0,387	7,711
Олигоастенозооспермия	10	2,909	1,764	0,558	1,647	4,171	1,228	6,789
Олигоастенотератозооспермия	8	5,358	4,897	1,732	1,264	9,451	0,609	13,419
Астенотератозооспермия	2	2,438	2,981	2,108	-24,343	29,218	0,330	4,545
Общо	79	1,902	2,396	0,270	1,365	2,439	0,000	13,419

Chi et al. (2011) установяват също негативна корелация между спермални показатели и нивото на ДНК увреждания, което намалява, когато спермалната подвижност и нормална морфология се увеличават.

За разлика от тяхното проучване, в което не е констатирана корелация със спермалната концентрация, нашите резултати сочат такава статистически значима зависимост.

Резултатите от настоящото проучване са сходни с тези на Aydos et al. (2015), които установяват негативни зависимости между ДНК увреждания и спермални показатели, но също така и високо ниво на ДНК аномалии (повече от 32%) при олигоастенотератозооспермия.

По отношение на факторите възраст, вредности, алкохол, наркотици и медикаменти проведеният чрез тестовете Oneway и *t* статистически анализ не показва отчетливи статистически значими зависимости със стойностите на кометните показатели за отделните групи с различен фертилитетен потенциал.

При комплексното разглеждане на кометните и спермалните показатели, не е констатирана статистически значима зависимост с обема на еякулата, както и с концентрацията на левкоцитите.

Независимо от липсата на висока статистическа достоверност, потенциалните тенденции в нашето проучване биха могли да се характеризират на базата на конкретните получени стойности. Сред сравняваните възрастови групи трите кометни показатели (% ДНК в опашката, дължина на опашката и опашен момент) имат най-високи стойности при възрастовата група от 21 до 30 години (11,965, 10,131 и 2,457, съответно) и сравнително по-високи стойностите на тези показатели за мъжете на възраст от 31 до 40 години (9,870, 8,614 и 1,796, съответно), което насочва вниманието към тези възрастови категории като потенциално рискови по отношение на ДНК увреждания в ядрата на сперматозоидите им. Данните от проведения *t* тест по отношение на зависимостите с фактора вредности показват, че различните вредности статистически значимо могат да се асоцират с кометните показатели % на ДНК в опашката и опашен момент ($P < 0,05$), но не и с показателя дължина на опашката ($0,5 > P > 0,1$). В този аспект резултати показват, че при мъжете, подложени на вредни влияния като химикали, изпарения, лъчетерапия, химиотерапия и вредни промишлени производства и трите кометни показатели са с по-високи стойности, в сравнение с отчетените за лицата, които не са декларирали подобни вредни въздействия.

По отношение влиянието на тютюнопушенето може да се отчете, че и трите кометни показатели са с по-високи стойности при мъжете пушачи, както следва: 11,544; 10,576 и 2,382 в сравнение с непушачите: 9,784; 8,418 и 1,728, съответно за % ДНК в опашката, дължина на опашката и опашен момент.

Влиянието на фактора алкохол върху кометните показатели също не е статистически значимо, но данните от проучването ни отново показват наличие на по-високи стойности на кометните показатели при мъжете, употребяващи алкохол, в сравнение с тези, които не употребяват.

За да се провери дали има статистически значими зависимости между фактора наркотици и кометните показатели, е приложен Oneway тестът. Получените резултати не демонстрират значима достоверност между фактор и показатели (ANOVA: $0,6 > P > 0,2$), но независимо от това може да се отчете обстоятелството, че стойностите на кометните показатели са по-високи при мъжете, декларирали употреба на „меки“ наркотици, в сравнение с тези, посочили употреба на „твърди“ наркотици.

В нашето проучване не бяха констатирани статистически значими зависимости и по отношение влиянието на факторите медикаменти и анаболни стероиди върху трите кометни показатели, но и тук са налице различия в изявата на ДНК увреждания между лицата, употребяващи такива препарати и тези, които не упогребяват.

В хода на статистическата обработка на резултатите е направен и регресионен анализ по отношение на трите кометни показатели. Данните от този анализ са категорични, че чрез познаване стойността на единия от показателите, е възможно да се предскажат стойностите на другите два с висока статистическа достоверност ($P = 0,00$). В регресионния анализ коефициентът R показва качеството на прогнозата, а размерът (големина) на ефекта е мярката, която определя относителната важност на статистически значимите резултати. Интерпретацията относно големината на ефекта (в абсолютна стойност), съгласно Cohen (1988) сочи, че при $R > 0,7$ ефектът е много по-голям от типичния – обстоятелство, което се отчита и при резултатите от нашето проучване ($R = 0,782; 0,847$ и $0,846$).

Може да се обобщи, че резултатите от кометния анализ демонстрират наличие на отчетливи статистически значими зависимости, както следва: 1) между самите кометни показатели % ДНК в опашката, дължина на опашката и опашен момент ($R > 0,7$); 2) между анализираниите кометни показатели % ДНК в опашката, дължина на опашката и опашен момент, от една страна и спермалните показатели концентрация, подвижност и морфология на сперматозоидите, от друга страна ($P < 0,05$); 3) между анализираниите кометни показатели % ДНК в опашката, дължина на опашката и опашен момент, от една страна и направените заключения (диагнози) с помощта на конвенционалния спермален анализ ($P < 0,001$).

Независимо от липсата на статистически значими зависимости, могат да се имат предвид следните тенденции: 1) при възрастовите категории 21 – 30 и 31 – 40 години средните стойности на кометните показатели са по-високи; 2) факторите вредности, тютюнопушене, алкохол и анаболни стероиди повлияват негативно кометните показатели; 3) „меките“ наркотици оказват по-силно влияние върху кометните показатели в сравнение с „твърдите“.

ЗАКЛЮЧЕНИЯ И ИЗВОДИ

Проведеният в хода на настоящото изследване комплексен анализ на причините за влошаване качеството на мъжкото репродуктивно здраве предоставя информация относно генетични и средови компоненти, свързани с него. Чрез прилагането на разнообразни методи на изследване са проучени фактори на средата и начина на живот, конвенционални спермални, цитогенетични и молекулярно-генетични показатели, които носят потенциален риск за мъжкия фертилитетен потенциал.

Получените в настоящото изследване резултати, обсъждането им и направените анализи и обобщения дават основание за извеждането на следните изводи:

1. Събраната обща информация дава основания да се приеме, че фактори на средата и начина на живот като професия, вредности, тютюнопушене, употреба на алкохол, наркотици, анаболни стероиди, медикаменти, налични заболявания и стрес са потенциално рискови за мъжкото репродуктивно здраве в България;

2. Анализът на качествените спермални показатели сочи, че над 50% от изследваните мъже са с някаква степен на репродуктивни проблеми, като в немалка част от тях причината е комплексна и засяга качеството на повече от един от спермалните показатели. Констатирано е, че при 6,7% от анализиранияте мъже няма производство на сперматозоиди, а при 7,4% от тях са налице значителни нарушения на трите спермални променливи – концентрация, подвижност и морфология на сперматозоидите.

3. Установени са статистически значими зависимости между проучваните спермални показатели и факторите на средата, както следва: тютюнопушенето, употребата на алкохол и работата (или живота) в условия на стрес повлияват статистически значимо негативно обема на еякулата; тютюнопушенето, употребата на лекарства и състоянията на стрес водят до намаляване на сперматозоидната концентрация; употребата на медикаменти води до понижаване на сперматозоидната подвижност, а анализиранияте вредности и употребата на алкохол – до повишаването ѝ;

4. Геномни мутации от типа на синдрома на Клайнфелтер и структурни хромозомни мутации като транслокации и хроматидни аберации имат пряко отношение към мъжкия инфертилитет и по-специално към състоянията на азооспермия и олигоастенотератозооспермия, а фактори на средата и начина на живот като тютюнопушене и употреба на алкохол са сред по-честите, кореспондиращи със заключението азооспермия;

5. Микроделеционният анализ на Y хромозомата показва, че: установените микроаберации в SRY региона са в статистически значима зависимост с тютюнапушенето, а констатираните микроделеции в ZFX/Y региона на Yp и в AZFa субрегиона на Yq са статистически значимо обвързани с обема на еякулата;

6. Установена е висока честота на срещане на микроаберациите в AZFa, AZFb и AZFc субрегионите от дългото рамо на Y хромозомата, както и на микроаберации в SRY и ZFX/Y регионите от късото рамо на Y хромозомата;

7. Проблемите в SRY региона на Yp са преобладаващи при изследваните мъже с азооспермия и тежка олигоастенотератозооспермия, а установените аномалии в останалите проучвани региони/субрегиони на същата хромозомата, в по-голямата си част са съпроводени с такива в SRY региона;

8. Общо 32.2% от изследваните с акридин оранж флуоресцентен тест мъже и 34,2% от изследваните чрез кометен анализ имат ДНК увреждания в над 30% от сперматозоидите си;

9. Чрез прилагане на акридин оранж флуоресцентния тест са отчетени статистически значими зависимости между изследваните качествени спермални показатели и нивата на ДНК увреждания в сперматозоидните ядра, както и между заключенията от конвенционалния спермален анализ и установените нива на ДНК увреждания. Установено е, че с увеличаване честотата на ДНК фрагментации, сперматозоидната концентрация и подвижност, както и броят клетки с нормална морфология намаляват. Констатирана е статистически значима зависимост между левкоцитната концентрация и нивото на ДНК увреждания в анализиранията група като е установено, че с увеличаване на концентрацията на левкоцитите нараства и рискът от увеличаване честотата на ДНК фрагментации в сперматозоидните ядра.

10. Резултатите от кометния анализ демонстрират наличие на отчетливи статистически значими зависимости между: трите кометни показатели; между анализиранияте кометни показатели и спермалните показатели и между анализиранияте кометни показатели и направените с помощта на конвенционалния спермален анализ заключения.

11. Установените в настоящото изследване зависимости биха могли да се използват при анализ, прогноза и превенция на мъжкия фертилитет, както за изготвяне на стратегия за подобряване качеството на мъжкото репродуктивно здраве в България.

ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Приноси с оригинален научен характер:

1. Оригинален принос на дисертационния труд е прилагането на комплексен подход за проучване на генетична и средова компонента на мъжкото репродуктивно здраве, установяването и характеризирането чрез конвенционални, цитогенетични и молекулярно-генетични подходи на статистически значими зависимости между фактори на средата, спермални показатели и нива на ДНК увреждания в сперматозоидите;

2. С оригинален характер е установеното, че над 50% от изследваните мъже са с някаква степен на репродуктивни проблеми, като причините са комплексни и засягат качеството на повече от един от спермалните показатели, че при 6,7% от анализиранияте мъже няма производство на сперматозоиди, а при 7,4% от тях са налице значителни нарушения на трите спермални променливи – концентрация, подвижност и морфология на сперматозоидите;

3. С оригинален характер е установеното обстоятелство, че проблемите в SRУ региона на Ур са преобладаващи при изследваните мъже с азооспермия и тежка олигоастенотератозооспермия, а установените аномалии в останалите проучвани региони/субрегиони на същата хромозома, в по-голямата си част са съпроводени с такива в SRУ региона и като цяло са с висока честота;

4. Оригинални по характер са установените обстоятелства, че между 32% и 35% от включените в изследването мъже имат ДНК увреждания в над 30% от сперматозоидите си.

Приноси с оригинален научно-приложен характер:

1. Установено е, че фактори като професия, вредности, тютюнопушене, употреба на алкохол, наркотици, анаболни стероиди, медикаменти, налични заболявания и стрес са свързани с мъжкото репродуктивно здраве и крият потенциален риск за него, което предполага и необходимост от популяризиране на установеното и разработване на дейности по превенция и профилактика;

2. Данните от проведения регресионен анализ са категорични, че чрез познаване стойността на единия от изследваните кометни показатели, с висока статистическа достоверност е възможно да се предскажат стойностите на другите два – обстоятелство, което би могло успешно да се прилага за прогностична дейност;

3. Установеното в хода на проучването демонстрира, че комплексното прилагане на трите използвани молекулярно-генетични подходи е препоръчително с оглед на възможността да бъдат разгледани в детайли различни генетични аспекти на мъжкото репродуктивно здраве и да бъдат характеризирани по-обстойно генетичните причини за мъжкия инфертилитет.

Приноси с потвърдителен характер

1. Потвърдено е изказаното и от други автори мнение, че конвенционалният спермален анализ следва да се прилага в комбинация с други експериментални подходи с оглед увеличаване на ефективността му, както и че са налице зависимости между качеството на спермалните показатели и нивата на ДНК увреждания в ядрата на сперматозоидите;

2. Потвърдено е, че синдромът на Клайнфелтер и други хромозомни аномалии са значима причина за азооспермия;

3. Потвърдено е, че микроделециите в AZF района на дългото рамо на Y хромозомата са свързани с азооспермия и олигозооспермия.

Приноси с методичен характер

1. Избрана, описана и приложена е оптимална и ефективна комбинация от конвенционални, цитогенетични, молекулярно-генетични и биостатистически подходи за детайлни анализи на генетична и средова компонента при мъже с репродуктивни смущения.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИТЕ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. **Dzhoglov S.**, Boyadzhiev D., Ivanova E. N. 2018. Association between some environment and lifestyle factors with male semen quality parameters: semen volume, spermatozoa concentration and motility. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, in press. IF – 0.270

2. **Dzhoglov S.**, Mitkovska V., Boyadzhiev D., Ivanova E. N. 2018. Complex study on dependencies between some sperm quality parameters and the DNA integrity in the spermatozoa nuclei in accordance with environmental and lifestyle factors. *Ecologia Balkanica*, in press (Scopus).

3. **Spas Dzhoglov**, Evgeniya Ivanova .2016. Study on biological and environmental factors for azoospermia. *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 5 (2):139-143

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ

Международни

1. Yordanova V., **Dzhoglov S.**, Vulkova G. 2015. Screening PCR method to support Y-microdeletions syndrome. VI Congress southeast European medical forum – Odesa, September, 9-12. 2015.

2. **Dzhoglov S.**, Yordanova V. , Ivanova E., Vulkova G. 2015. Clinical-genetics analysis in men with disrupted spermatogenesis. VI congress southeast European medical forum – Odesa, September, 9-12. 2015.

Национални с международно участие

3. **Dzhoglov S.**, Mitkovska V., Boyadzhiev D., Ivanova E. N. 2018. Complex study on dependencies between some sperm quality parameters and the DNA integrity in the spermatozoa nuclei in accordance with environmental and lifestyle factors. Third Anniversary Scientific Conference on Ecology – November 1 – 3, 2018, Plovdiv, Bulgaria.

4. **Dzhoglov S.**, Boyadzhiev D., Ivanova E. N. 2018. Environment and lifestyle factors in association with male semen quality parameters. Third Anniversary Scientific Conference on Ecology – November 1 – 3, 2018, Plovdiv, Bulgaria.

Национални

5. **Dzhoglov S.**, Mitkovska V., Boyadzhiev D., Ivanova E. N. 2018. DNA damage levels in different sperm abnormalities. „Days of Science 2018“, Union of Scientists in Bulgaria – Plovdiv. November 1 – 2, 2018.

6. **Spas Dzhoglov**, Evgeniya Ivanova. 2015. Study on biological, genetic and environmental factors for azoospermia. Втора Национална младежка конференция „Биологически науки за по-добро бъдеще“, 2015, Пловдив.

7. **Spas Dzhoglov**, Evgeniya Ivanova. 2016. Biological and environmental factors in relation for a case of acrophalic spermatozoa. Първа национална конференция за докторанти, 2016, Пловдив.

УЧАСТИЯ В ПРОЕКТИ

И15 ФС017 „Хетеротопия на здравето при население в репродуктивна възраст“ МОН, ФНИ при Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“, 2015 – 2016 – участник в научния колектив

ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. Станиславов Р., Николова В. 2013. Андрологична Лаборатория Стандартизирани методи, Мениджмънт, Вътрешен и Външен Лабораторен контрол. Издателство:Симел-София.
2. Auger J., Eustache F., Andersen A. G., Irvine D. S., Jørgensen N., Skakkebaek N. E., Suominen J., Toppari J., Vierula M., Jouannet P. 2001. Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. Hum. Reprod. 16(12): 2710–2717.
3. Aydos O. S., Yükselten Y., Kaplan F., Sunguroğlu A., Aydos K. 2015. Analysis of the correlation between sperm DNA integrity and conventional semen parameters in infertile men. Turk J Urol; 41(4): 191–197.

4. Brezina, P. R., Yunus, F. N., Zhao, Y. 2012. Effects of pharmaceutical medications on male fertility. *Journal of reproduction and infertility*. 13(1): 3–11.
5. Burlinson B., Tice R. R., Speit G., Agurell E., Brendler-Schwaab S. Y., Collins A. R., Escobar P., Honma M., Kumaravel T. S., Nakajima M. Sasaki Y. F., Thybaud V., Uno Y., Vasquez M., Hartmann A. 2006. In Vivo Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. *Mutat Res.*627(1): 31–35.
6. Castillo J., Estanyol J.M., Ballescà J. M., Oliva R. 2015. Human sperm chromatin epigenetic potential: genomics, proteomics, and male infertility. *Asian Journal of Andrology*. 17: 601–609.
7. Chemes H. E, Alvarez S. C. 2013. Tales of the tail and sperm headaches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail, *Asian J Androl*. 14: 14–23.
8. Chi H. J., Chung D. Y., Choi S. Y., Kim J. H., Kim G. Y., Lee J. S., Lee H. S., Kim M. H. 2011. Integrity of human sperm DNA assessed by the neutral comet assay and its relationship to semen parameters and clinical outcomes for the IVF-ET program. *Reprod.Med*. 38(1): 10–17.
9. Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ: Lawrence Earlbaum Associates.
10. Cohen J. J., Honig S. 2005. Anabolic steroid-associated infertility: a potentially treatable and reversible cause of male infertility. *Fertil.Steril*. 84: 223.
11. Collins A. R., Oscoz A. A., Brunborg G., Gaivao I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C. C., Stetina, R. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*. 23(3): 143–151.
12. Cunha M., Sá R., Rocha E., Barros A., Sousa M. 2015. Sperm DNA fragmentation is related to sperm morphological staining patterns. *Reprod. BioMedicine* . 31(4): 506–515.
13. Dada R., Gupta N.P., Kucheria K. 2001. Deterioration Of sperm morphology in men exposed to high temperature. *J. of the Anatomical Society of India*. 50 (2): 107–111.
14. Dikshit R. K., Buch J. B., Mansuri S. M. 1987. Effect of tobacco consunption on semen quality of a population of hypofertile males, *Fertil.Steril*.(48): 334–336.
15. Esfandiari N., Saleh R. A., Abdoos M., Ruozrokh A., Nazemian Z. 2002. Positive bacterial culture of semen from infertile men with asymptomatic leukocytospermia. *International Journal of Fertility and Womens Medicine* 47 (6): 265–270.
16. Evenson D. P., Jost L. K., Marshall D., Zinaman M. J., Clegg E., Purvis K., de Angelis P., Claussen O. P. 1999. Utility of the sperm chromatin

- structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic; *Hum.Reprod.* 14 (4): 1039–1049.
17. Ferlin A., Foresta C., Garolla A., Moro E., Pistorello M., Barbaux S., Rossato M. 1998. High frequency of well defined Y chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell only syndrome. *Hum. Reprod.* 13: 302–307.
 18. Iaizzo R., Martinez A. G., Cattaneo A. R., Ruhlmann C. 2010. Statistical model to predict the impact of different lifestyle and environmental factors on seminal parameters. *Fertil.Sterili.* 94 (4): 230.
 19. Li Y., Lin H., Li.Y., Cao Y. 2011. Association between socio-psycho-behavioral factors and male semen quality: systematic review and meta-analyses. *Fertil. Steril.* 95(1): 116–123.
 20. Martini A. M., Molina R. I., Estofán D., Senestrari D., de Cuneo M. F., .2004, Effects of alcohol and cigarette consumption on human seminal quality; *Fertil. Steril.* 3(22).
 21. Matzuk M. M., Lamb D. J. 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med.*14(11): 1197–213.
 22. O'Flynn O'Brien K. L., Varghese A. C. A., Garwal A. 2009. The genetic causes of male factor infertility: a review. *Fertil. Steril.* 93(1): 1–12.
 23. Ouzounova-Raykova V., Baykushev R., El Tibi M., Mitov I. 2018. Genital mycoplasmas and ureaplasmas and abnormal semen quality in infertile Bulgarian men. *Comptes rendus de l'Acad´emie bulgare des Sciences*, 71, 7, 978–983.
 24. Sapanidou V., Taitzoglou I., Tsakmakidis I., Kourtzelis I., Letouris D., Theodoridis A., Zervos I., Tsantarliotou M. 2015. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. *Theriogenology.* 84 (8): 273–1282.
 25. Sheikh N., Amiri I., Farimani M., Najafi R., Hadeie J. B. 2008. Correlation between sperm parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men; *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 6 (1): 13–18.
 26. Smith R., Kaune H., Parodi D. 2006. „Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress,“ *Human Reproduction.* 21(4): 986–993.
 27. Standerholen F. B., Myromslien F.D., Kommisrud E., Ropstad E. 2014. Comparison of Electronic Volume and Forward Scatter Principles of Cell Selection Using Flow Cytometry for the Evaluation of Acrosome and Plasma Membrane Integrity of Bull Spermatozoa. 85A(8).
 28. Torres-Calleja J., González-Unzaga M., DeCelis-Carrillo R., Calzada-Sánchez L., Pedrón N. 2001. Effect of androgenic anabolic steroids on

- semen parameters and hormone levels in bodybuilders. *Fertil. Steril.* 74(5).
29. Trummer H., Habermann H., Haas J., Pummer K. 2002. The impact of cigarette smoking on human semen parameters and hormones. *Hum. Reprod.* 17 (6): 1554–1559.
 30. Vine M. F. 1996. Smoking and male reproduction: a review. *International Journal of Andrology.* 19 (6): 323–337.
 31. Wong W. Y., Thomas C.M.G., Merkus H. M. W. M., Zielhuis G. A. Doesburg W. H., Steegers-Theunissen R. P. M. 2000. Cigarette smoking and the risk of male factor subfertility: minor association between cotinine in seminal plasma and semen morphology; *Fertil. Steril.* 74 (5): 930–935.
 32. World Health Organization (WHO) (1999). World Health Organization (WHO) Laboratory manual for the examination of human semen and sperm – cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge University Inc. Cambridge, UK: 138.
 33. Yu, X. W., Wei, Z. T., Jiang, Y. T., Zhang, S. L. 2015. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(9): 14634–14646.
-

БЛАГОДАРНОСТИ

Издавам благодарност на:

проф. д.б.н. Евгения Н. Иванова – за оказаната помощ и подкрепата в хода на това проучване;

на гл. ас. д-р Весела Митковска – за умелото ръководство при провеждане на анализите за определяне качеството на ДНК в сперматозоидните ядра и на катедра „Зоология“ за предоставената база за експериментална работа;

на доц. д-р Дойчин Бояджиев – за неоценимата помощ при провеждане на статистическия анализ на получените резултати;

на катедра „Биология на развитието“ и на Биологическия факултет при Пловдивския университет „Паисий Хилендарски“ – за предоставената възможност да осъществя настоящото проучване;

на моето семейство – за търпението и подкрепата...