



**ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ „ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ“**  
**БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ**  
**КАТЕДРА „БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ“**

*Александър Христов Александров*

*„Ефект на пребиотични олигозахариди върху човешкото здраве“*

**АВТОРЕФЕРАТ**

*на дисертационен труд за придобиване на образователна и научна степен  
„Доктор“ по докторска програма „Биохимия“, Професионално направление 4.3,  
Биологически науки*

Научни ръководители: **проф. д-р Илия Илиев**

Пловдив, 2020

Дисертационният труд съдържа 129 страници на формат А4, 18 таблици и 33 фигури. В библиографската справка са включени 140 заглавия на латиница. Експерименталната работа е извършена в лабораториите на катедра „Биохимия и микробиология” на ПУ „Паисий Хилендарски”, в лабораториите на Технологичен център на ПУ „Паисий Хилендарски”, ул. ”Костаки Пеев” №21 и в АСИМП „МЦ Салманида“, гр. Пловдив.

Дисертационният труд е обсъден на заседание на катедра „Биохимия и микробиология” към Биологически факултет на ПУ „Паисий Хилендарски”, проведено на 10.02.2020г. и насрочен за защита пред научно жури, сформирано със заповед Р 33-1176/ 6.03.2020г. на Ректора на Пловдивски университет „Паисий Хилендарски”.

Дисертационният труд е насрочен за защита пред научно жури в състав:

1. проф. дбн Ана Манева
2. проф. д-р Иван Пищийски
3. проф. д-р Василий Ишев
4. доц. д-р Тонка Василева
5. проф. д-р Илия Илиев

Публичната защита на дисертационният труд ще се състои на 18.06.2020г. от 11 часа в зала „Компас“ на ПУ Паисий Хилендарски, ул. „Цар Асен“ 24, Пловдив

*Изказвам най-сърдечни благодарности на научните си ръководители проф. д-р Илия Илиев и гл. ас. д-р Мариана Николова за оказаната ми помощ и доверие при разработването на настоящата дисертация. Благодаря на всички колеги от катедра „Биохимия и микробиология“ на ПУ „Паисий Хилендарски“ за споделения опит, съвети и подкрепа.*

## Използвани съкращения

<b>ART</b>	Асистирана репродуктивна технология
<b>°C</b>	Градуси по Целзий
<b>CASA</b>	Компютърно-асистиран спермален анализ
<b>cm</b>	Сантиметри
<b>CUPRAC</b>	Медредуцираща антиоксидантна активност
<b>DPPH</b>	Реактив за определяне на антирадикаловата а
<b>Folin - Ciocalteu's</b>	Реактив за определяне съдържанието на общи фенолни съединения по колориметричен метод
<b>FCSP</b>	Фукозо-съдържащи сулфатирани полизахариди
<b>FRAP</b>	Желязо-редуцираща антиоксидантна сила
<b>FSH</b>	Фоликулостимулиращ хормон
<b>fw</b>	Свежо тегло
<b>g</b>	Грамове
<b>GAE</b>	Еквивалент галова киселина
<b>HPLC</b>	Високоэффективна течна хроматография
<b>ICSI</b>	Интрацитоплазмено спермално инжектиране
<b>IMSI</b>	Морфологично селектиране на сперматозоиди
<b>IVF</b>	Инвитро оплождане
<b>IUI</b>	Интра-утеринна инсеминация
<b>IC<sub>50</sub></b>	Инхибираща концентрация 50%
<b><math>\lambda_{\max}</math></b>	Дължина на вълната
<b>L</b>	Литри
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	Микрограмове
<b>mg</b>	Милиграми
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	Микролитри
<b>ml</b>	Милилитри
<b>mm</b>	Милиметри
<b>MW</b>	Молекулна маса
<b>Nm</b>	Нанометри
<b>ROS</b>	Реактивни кислородни видове

<b>RSA</b>	Радикал-улавяща активност
<b>RT</b>	Време на задържане
<b>s</b>	Секунди
<b>TAC</b>	Общ антиоксидантен капацитет
<b>TE</b>	Еквивалент Trolox
<b>TESE</b>	Тестикуларна спермална екстракция
<b>TESA</b>	Тестикуларна спермална аспирация
<b>TFA</b>	Трифлуорооцетна киселина
<b>V</b>	Обем
<b>WHO</b>	Световна Здравна Организация

## *Въведение*

Инфертилитетът е глобално заболяване, което засяга около 15% от всички двойки в репродуктивна възраст. Това възлиза на 60-80 милиона двойки по света (WHO, 2010). Въпреки това, дългосрочен анализ на фертилитета е трудно да се направи поради факта, че все повече двойки отлагат или не планират да имат деца (Mascarenhas et al., 2012). Проблемът с фертилитета засяга с еднаква честота, както мъжете, така и жените (Templeton et al., 1991, Jarow et al., 2002, Abid et al., 2008).

Световни проучвания, анализиращи качеството на мъжката сперма, показват, че нейното качество се понижава, като е възможно това да рефлектира върху намаляващия фертилитет в световен мащаб (Rolland et al., 2012, Aitken, 2013). Има различни причини за мъжкото безплодие като варикоцеле, криптохордизъм, кистозна фиброза, инфекции и тумори (Agarwal et al., 2008). Съществуват и различни рискови фактори, които допринасят косвено за инфертилитета, като тютюнопушене, възпалителни заболявания и прием на лекарства (Afzelius et al., 1975, Anderson and Williamson, 1988, Tournaue и Cohlen, 2012). Причините и рисковите фактори за мъжкия фертилитет, често водят до повишаване на оксидативния стрес в спермата (Agarwal et al., 2008). Поради тези и други причини, става ясно, че оксидативният стрес е един от важните фактори за мъжкия фертилитет.

Субфертилните мъже често проявяват повишени нива на ROS и/или намален антиоксидантен капацитет в семенната течност и в сперматозоидите (Fuji et al., 2003). Сперматозоидите са особено уязвими към оксидативния стрес не само поради високото си съдържание на полиненаситени мастни киселини, но и поради присъщи недостатъци във вътреклетъчната ензимна антиоксидантна защита и ограничен капацитет за поправка на ДНК (Gharagozloo, 2011). За щастие, в репродуктивният тракт, включително епидидималните и семинални плазми, се съдържат ензимни и неензимни антиоксидантни молекули, които действат съвместно, за да защитят сперматозоидите срещу ред токсични кислородни метаболити. Тъй като оксидативният стрес на сперматозоидите и увреждането на ДНК са установени като важни фактори за мъжкото безплодие и постигането на здравословна бременност, има ясна обосновка за лечение с антиоксиданти на субфертилни мъже (Gharagozloo, 2011).

## ***Цел и задачи***

Целта на настоящия дисертационен труд, е да се изследва механизма на влияние на отделните компоненти от *Ascophyllum nodosum*, *Tribulus terrestris* и *Lycium barbarum* и техният синергизъм, включени в състава на препарата SEANERGIX, върху подобряване на качествените показатели на човешката сперматозоа *in vitro* и *in vivo*.

За изпълнението на целта са поставени следните задачи:

1. Получаване на полизахариди от *Ascophyllum nodosum*, при модифициране условията на екстракция.
2. Количествено определяне и качествена характеристика на полизахариди и полифеноли в *Ascophyllum nodosum* и *Lycium barbarum*.
3. Сравнителен анализ на антиоксидантна активност на използвания многокомпонентен продукт SEANERGIX и на изолирания полизахарид от *Ascophyllum nodosum*.
4. Изследване ефекта на изолираните полизахариди и отделните екстракти от *Ascophyllum nodosum*, *Tribulus terrestris* и *Lycium barbarum* върху  $\alpha$ -L-фукозидаза в сперматозоидите.
5. Изследване влиянието на многокомпонентен продукт SEANERGIX *in vivo* върху човешките сперматозоиди.

## ***Материали и методи***

### ***Материали:***

#### **1. Растителен материал**

В проучването са използвани изсушени и стрити на прах кафяви водорасли (*Ascophyllum nodosum*). Използван е и търговски продукт SEANERGIX, за преодолагаемо повишаване концентрацията и повдижността на сперматозидите с основно съдържание на кафяви водорасли, както и екстракт от трибулус, годжи бери и други екстракти.

#### **2. Биологичен материал**

В проучването са използвани проби от еякулат, получени на територията на АСИМП МЦ Салманида, гр. Пловдив. Всички пациенти са декларирали и подписали информирано съгласие. Пробите са вземани в периода 2017-2018г.

#### **3. Реактиви и химикали**

В процеса на работа са използвани:

Ацетон ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), ч.з.а, Райхим, кат. No. 0230, Ацетонитрил за HPLC ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ), Sigma-Aldrich, кат. No. 34851, DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), Sigma-Aldrich, кат. No.D9132, Етилов алкохол ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) 95%, ч.з.а, Валерус, кат. No. 1060, Folin-Ciocalteu's реагент, Merck, кат. No.1090010500, Меден хлорид дихидрат ( $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), Sigma-Aldrich, кат. No.C3279, Метилов алкохол за HPLC, Sigma-Aldrich, кат. No. 34885, Натриев ацетат трихидрат ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), ч.з.а., Валерус, кат. No. 2510, Натриев карбонат безводен ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), Валерус, кат. No. 2585, Натриева основа, ч.з.а., Райхим, кат. No. 2620, Неокупроин, Sigma-Aldrich, кат. No.484117, Солна киселина, ч.з.а., Райхим, кат. No. 3660, Галова киселина за HPLC, Sigma-Aldrich Chemie, кат. No. 27645-R, Sil-Select Stock™, Sperm Preparation Kit, FertiPro Belgium, Halosperm®, SCD DNA Fragmentation Kit, Halotech DNA Spain, Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), Sigma-Aldrich Chemie, кат. No. 238813

#### **4. Ензими и субстрати:**

$\alpha$ -(1-2,3,4,6)-L-Fucosidase (*Homo sapiens*), Megazyme, Ireland, кат. No E-FUCHS

4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside, Megazyme, Ireland, кат. No O-PNPAFC

### **Методи:**

## **5. Методи за изолиране на полизахариди**

За изолирането на полизахариди от *A. nodosum* се използва методика описана от Hentati et al., 2018 с модификация..

### **Екстракция на полизахариди**

За екстрахирането на полизахарид богат на фукоза се използва пречистен КЕЛП. Екстракцията на полизахарида се осъществява с 0,1 М HCl в съотношение пречистен КЕЛП към киселина 1:20, за 2h на магнитна бъркалка с нагряване ARE (VELP SCIENTIFICA, Italy) при 500 обр./min, T=60°C. Полученият екстракт се отделя от твърдия остатък чрез центрофугиране на центрофуга MPW-260 (MPW Med. instruments, Poland) при 5000 обр./min, за 15 min, T=20°C. Получената надутаячна течност се коагулира с 3 обема охладен EtOH при T= - 20°C, за 1h. Отделянето на коагулираният полизахарид става чрез центрофугиране при 5200 обр./min, за 15 min, T=4°C. Отделеният полизахарид се изсушава на стайна температура.

### **Пречистване на изолирания полизахарид богат на фукоза**

Изолираният полизахарид богат на фукоза се разтваря във вода и се диализира за 48h на студено, след което се лиофилизира на FreeZone® Plus<sup>tm</sup> 4.5 Liter Cascade Freeze Dry System (Labconco, USA).

## **6. Хидролизни методи**

### **Киселинна хидролиза**

Полизахаридът богат на фукоза в количество от 30 mg се хидролизира с 10 ml 3 M трифлуороцетна киселина при температура 121°C и налягане 1,2 Atm за 1 h. След това сместа се изпарява под вакуум при температура 50°C. Остатъкът се промива трикратно с дестилирана вода и се изпарява до сухо (Li et al., 2016).

## **7. Хроматографски методи**

### **Определяне на монозахариден състав**

Въглехидратният състав на изолирания полизахарид е определен чрез високоефективна течна хроматографска система Konik-Tech с рефрактометричен детектор Shodex R1-101. За определяне на монозахаридния състав е използвана



хроматографска колана Tracer Excel ODSB 120, 5  $\mu\text{m}$  (150 x 0,4 mm), при подвижна фаза вода, скорост на потока 0,3 ml/min, температура на колоната 30°C. Идентифицирането на пиковете е осъществено по време на задържане спрямо стандарти на монозахаридите: фукоза, ксилоза, арабиноза, глюкоза, галактоза, маноза. За количественото определяне на монозахаридния състав са изготвени стандартни прави с линейни участъци между 5 - 20 mg/ml и с коефициент на корелация  $r^2 > 0,99$ .

## **8. Общи полифенолни вещества от *A. nodosum* и търговския продукт**

### ***Конвенционална двустепенна екстракция:***

Към 10 g проба се прибавят 200 ml екстрагент (80% ацетон подкислен с 0,5% HCl) и се поставят на електромагнитна бъркалка MICROSTIRRER (VELP SCIENTIFICA, Italy) при 500 rpm за 60 min на стайна температура. Полученият екстракт се центрофугира на високооборотна центрофуга за 12 min при 7700 rpm. Получената надутаячна течност се отделя, а утайката се залива с нови 200 ml екстрагент. Последва втората екстракция на при същите условия. Полученият екстракт отново се центрофугира за 12 min при 7700 rpm. Двете надутаячни течности се обединяват и се концентрират на ротационен вакуум изпарител до обем 20 ml, като температурата не надвишава 50°C.

## **9. Ензимни методи**

### ***Определяне на ензимна активност на $\alpha$ -L-фукозидаза (3.2.1.51)***

Активността на ензима  $\alpha$ -фукозидаза се определя по метода на Di Matteo et al. (1976) с известни модификации. Активността на  $\alpha$ -фукозидазата се определя по количеството отделен *p*-Nitrophenol (pNP) при разграждането на субстрата *p*-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucopyranoside (Nph-Fuc). Ензимният разтвор (0,005 U/ml) и субстратният разтвор (1 mM Nph-Fuc) са приготвени в цитратен буфер (15  $\mu\text{M}$  с pH 5,5).

Реакционната смес от 200  $\mu\text{l}$  съдържа 75  $\mu\text{l}$  Nph-Fuc (2 mM) разтвор, 50  $\mu\text{l}$  ензимен разтвор и различно количество инхибитори (L-фукоза, екстракт богат на полифеноли, полизахарид). Сместа се инкубира за 30 min при 37°C. Ензимната реакция се спира чрез прибавяне на 850  $\mu\text{l}$  0,2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Абсорбцията се измерва спектрофотометрично при 400 nm. Празната проба не съдържа ензим. Една единица ензимна активност (U) се дефинира като количеството ензим, което освобождава един  $\mu\text{mol}$  *p*-Nitrophenol за 1 min. Измерванията са извършени на спектрофотометър DU 800 (Beckman Coulter®, Brea, CA, USA).

## **10. Метод за обработка на проба от семенна течност**

Всички компоненти от системата и пробата се привеждат до стайна температура или до 37°C. Прехвърлят се 2,5 ml от горния слой на Sil-Select Plus в стерилна епруветка за центрофуга за еднократна употреба. С помощта на 3cc спринцовка с 1 1/2” 21 g игла, се поставят 2,5 ml Sil-Select Plus от долния слой под горния слой. Обръща се специално внимание, че двата слоя са ясно разделени. Това става чрез поставяне на върха на иглата на дъното на епруветката и бавно разпределяне на долния слой Sil-Select Plus. Този двуслоен градиент е стабилен до два часа. Внимателно се поставят до 2,5 ml от втечнена сперма върху горния слой с помощта на пипета за прехвърляне или спринцовка. Центрофугира се за 15 до 18 минути при 350 g до 400 g. Когато това центрофугиране приключи, утайката може да не е видима. В подобен случай е от съществено значение е да се продължи процедурата с второ центрофугиране от 3 до 5 минути. Отстранява се надутаячната течност до утайката. С помощта на спринцовка се добавят 2-3 ml от средата за промиване на сперматозоидите и утайката се разтваря отново. Центрофугира се за 8 до 10 минути при 300 g. По-високата концентрация на сперматозоиди ще изисква максимум 10 минути центрофугиране, за да се осигури пълното измиване на сперматозоидите. Надутаячната течност се отстранява до утайката и се промива втори път. Отстранява се надутаячната течност и утайката се накисва в подходяща среда и обем.

## **11. Спермален анализ**

### ***Оценка на качеството на еякулат***

Спермалният анализ, известен още като спермограма, е основният тест, който се извършва за оценка на фертилитета на мъжете. Той включва изследване на проба от прясно извлечена сперма под микроскоп и провеждане на набор от тестове. Анализът на спермата най-често се извършва ръчно, но компютърният анализ на спермата може да увеличи точността на оценката, ако е налице специализирано оборудване. Микроскопското изследване включва висококвалифициран специалист, който поставя малко количество сперма върху слайд и го изследва под микроскоп.

Резултатите се сравняват с референтните стойности, публикувани от Световната здравна организация. Тестът за анализ на сперма изследва редица характеристики на семенната течност и сперматозоидите, която съдържа: обем на еякулата, концентрация и брой, подвижност и морфология на сперматозоидите.

## **12. Тест за дисперсия на хроматин на сперматозоидите за ДНК фрагментация (SCD Test)**

Тестът за дисперсията на хроматин на сперматозоидите (SCD) определя способността на хроматина на сперматозоидите да се разпръсне, което спомага за идентифицирането на ДНК фрагментация на сперматозоидите. По време на SCD теста, сперматозоидите се излагат на солна киселина за денатуриране на хроматина и за превръщане на двойноверижната ДНК в ограничена еднOVERИЖНА ДНК. След денатуриране се използва разтвор за лизиране (разрушаване) на ДНК, който отпуска ДНК веригите. Тези получени бримки предотвратяват разсейването на хроматина в близките райони. Нивото на ДНК фрагментация се измерва чрез оценяване на размера на хроматиновата дисперсия, използвайки флуоресцентна или оптична микроскопия. Степента на увреждане на ДНК е обратно пропорционална на нивото на дисперсията.

## **13. Определяне на антиоксидантна активност**

Антиоксидантният потенциал е определен *in vitro* по няколко основни метода, базирани на улавяне на свободните радикали, използвайки 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) и желязо-редуцираща антиоксидантна сила (FRAP).

## ***Резултати и обсъждане***

### **Глава 1. Изследване антиоксидантната активност на многокомпонентния препарат SEANERGIX и на компонентите на *A. nodosum* и *L. barbarum***

В настоящото проучване бе използван многокомпонентен продукт с хипотезата, че той допринася за общото мъжко здраве, като подобрява количествените и качествените показатели на семенната течност, повишава сперматогенезата и намалява оксидативния стрес. Всяка таблетка от продукта съдържа екстракт от кафяви водорасли (*Ascophyllum nodosum*), български трибулус (*Tribulus terrestris*), корейски женшен (*Panax ginseng*), годжи бери (*Lycium barbarum*), джинджифил (*Zingiber officinale*), китайски лимонник (*Schisandra chinensis*) и многолистно пипериче (*Fallopia multiflora*). Количественото съдържание на всеки един от екстрактите е изразен в таблицата за състав по-долу.

Таблица 7. Състав на многокомпонентен продукт в една капсула и дневна доза

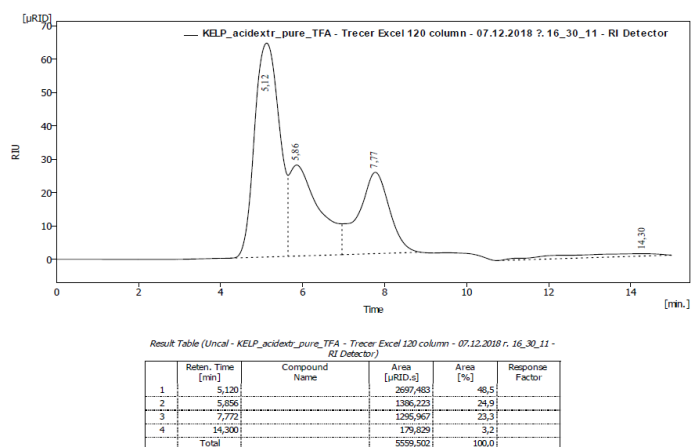
СЪСТАВКА:	1 КАПСУЛА	ДНЕВНА ДОЗА
КАФЯВИ ВОДОРАСЛИ <i>ASCOPHYLLUM NODOSUM</i>	170 mg	510 mg
БЪЛГАРСКИ ТРИБУЛУС <i>TRIBULUS TERRESTRIS</i>	110 mg	330 mg
КОРЕЙСКИ ЖЕНШЕН <i>PANAX GINSENG</i>	20 mg	60 mg
ГОДЖИ БЕРИ <i>LYCIUM BARBARUM</i>	20 mg	60 mg
ДЖИНДЖИФИЛ <i>ZINGIBER OFFICINALE</i>	20 mg	60 mg
КИТАЙСКИ ЛИМОННИК <i>SCHISANDRA CHINENSIS</i>	20 mg	60 mg
МНОГОЛИСТНО ПИПЕРИЧЕ <i>FALLOPIA MULTIFLORA</i>	20 mg	60 mg

### 1. Определяне на монозахариден състав на фукозо-съдържащи сулфатирани полизахариди (FCSP) или фукоидан в *Ascophyllum nodosum* чрез HPLC

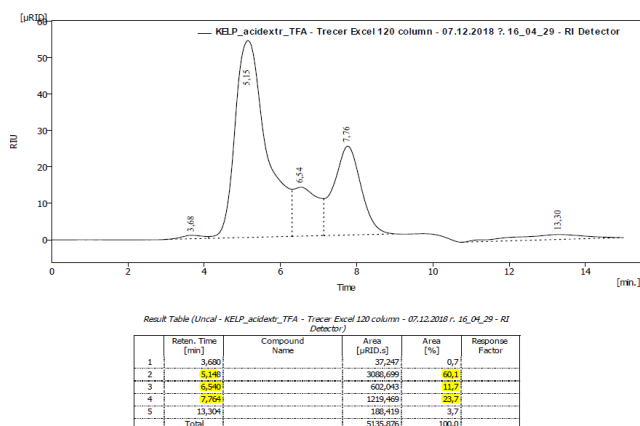
Предвид преобладаващото съдържание на кафяви водорасли в таблетките, основна цел в това проучване бе да се изолира и изследва полизахаридния състав. Предварителни проучвания показват, че *A. nodosum* са богати на фукозо-съдържащи сулфатирани полизахариди (FCSP). Фукозата е дезоксихексоза с алдехидна функционална група. Среща се в N-свързаните гликани по повърхността на клетките на бозайници, насекоми, растения и е основен компонент на полизахарида фукоидан. При фукоза съдържащите гликани, фукозата може да бъде терминалната модификация или да служи като място за залавяне на други захариди. При човешките N-свързани гликани, фукозата най-често е свързана чрез  $\alpha$ -1,6 връзка към редуциращия край, бета-N-ацетилглюкозамин. Оптимизирани бяха условията на екстракция и пречистване на полизахаридните фракции от *A. nodosum*. Получени бяха четири проби от полизахариди след предварително обезмасляване и допълнителна обработка за отделяне на алгининовата киселина: проба 1 – водна екстракция на полизахарид; проба 2 – водна екстракция на полизахарид с последващо отделяне на алгининовата киселина; проба 3 – киселинна екстракция на полизахарид; проба 4 – киселинна екстракция на полизахарид с последващо отделяне на алгининовата киселина. Пробите от полизахариди се хидролизират киселинно за определяне на монозахаридния състав. Установи се, че съдържанието на L-фукоза в изследваните проби е от 16.5% - 23.7% в зависимост от процедурата на пречистване.

Резултатите от HPLC анализите са представени във фигури 4, 5, 6, 7, 8 и 9 срещу стандартен разтвор на L-фукоза от 10mg/ml, колона TRACER EXCEL 120 ODS-B, елуент 100% H<sub>2</sub>O, K=0.3ml/min, P= 2.1-2.3 MPa, T= 10min. при 30°C. Като основен

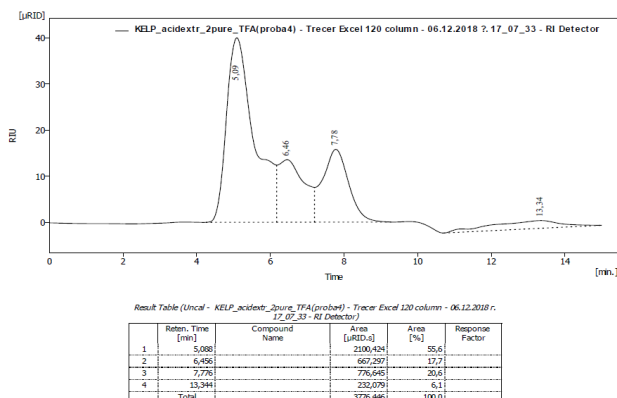
монозахарид е установена L-фукозата, като се наблюдава и съдържание на други незначителни компоненти като D-маноза, D-галактоза, D-арабиноза, D-глюкоза, ксилоза и глюкуронова киселина.



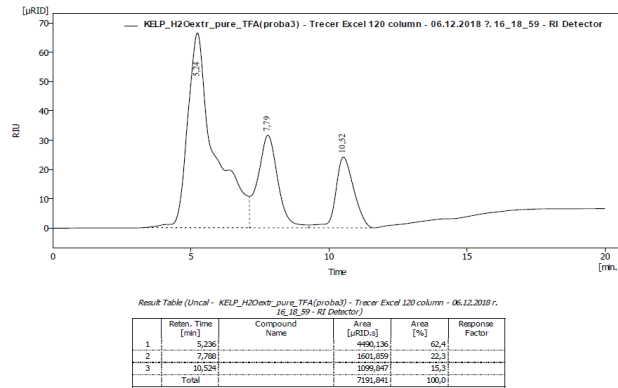
Фигура 4. HPLC профил на полизахарид от *A. nodosum* получен чрез киселинна екстракция и след отделяне на алгинови киселина. RT: 7,77min - L-фукоза; Area = 23.3%



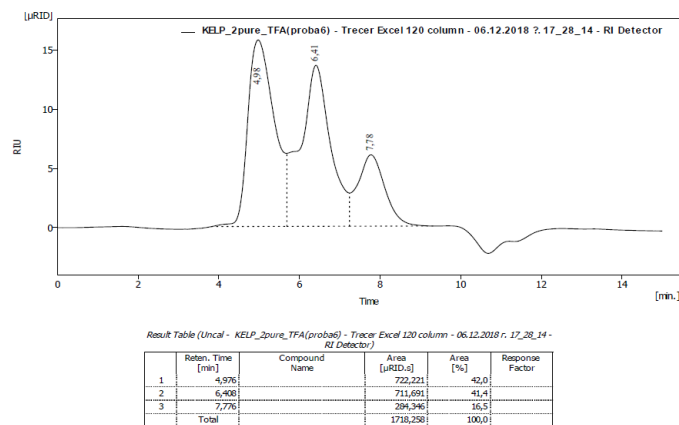
Фигура 5. HPLC профил на полизахарид от *A. nodosum* получен чрез киселинна екстракция. RT: 7,76min - L-фукоза; Area = 23.7%



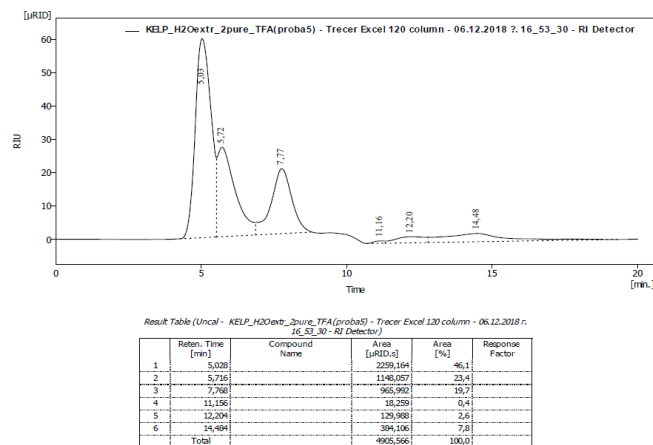
Фигура 6. HPLC профил на полизахарид от *A. nodosum* получен чрез киселинна екстракция 2 и след отделяне на алгиновина киселина. RT: 7,78min - L-фукоза; Area = 20.6%



Фигура 7. HPLC профил на полизахарид от *A. nodosum* получен чрез водна екстракция и след отделяне на алгиновина киселина. RT: 7,79min - L-фукоза; Area = 22.3%



Фигура 8. HPLC профил на полизахарид от *A. nodosum* получен чрез водна екстракция. RT: 7,78min - L-фукоза; Area = 16.5%



Фигура 9. HPLC профил на полизахарид от *A. nodosum* получен чрез водна екстракция 2 и след отделяне на алгининова киселина. RT: 7,77min - L-фукоза; Area = 19.7%

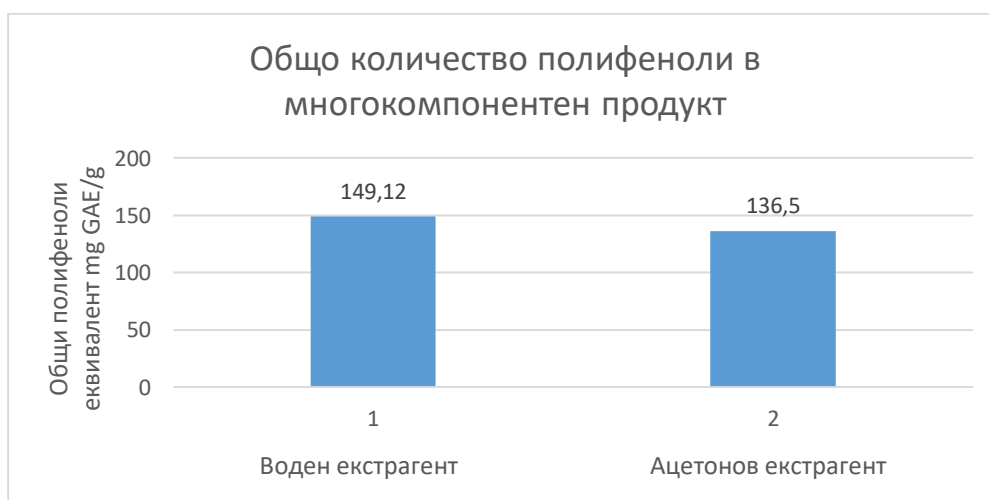
## 2. Определяне на общото количество полифеноли в екстракт от многокомпонентен продукт Seanergix

*Оптимизиране условията на екстракция на общи полифеноли*

Проведен е сравнителен анализ на типа екстракционен метод (конвенционална и ултразвукова екстракция), вид екстрагент (вода и ацетон) и използвано съотношение при които се постига максимално извличане на полифенолни съединения от изследвания екстракт.

*Общо полифенолно съдържание*

Общото полифенолно съдържание в екстракта от многокомпонентен продукт Seanergix е определено чрез оптимизиране условията на екстракция. При всички използвани екстрагенти (вода и ацетон) е спазен хидромодул 1:20. В резултат на приложените екстракционни процедури са получени два типа екстракти: водни и ацетонови. Данните за общото съдържание на полифеноли са представени на фигура 10.

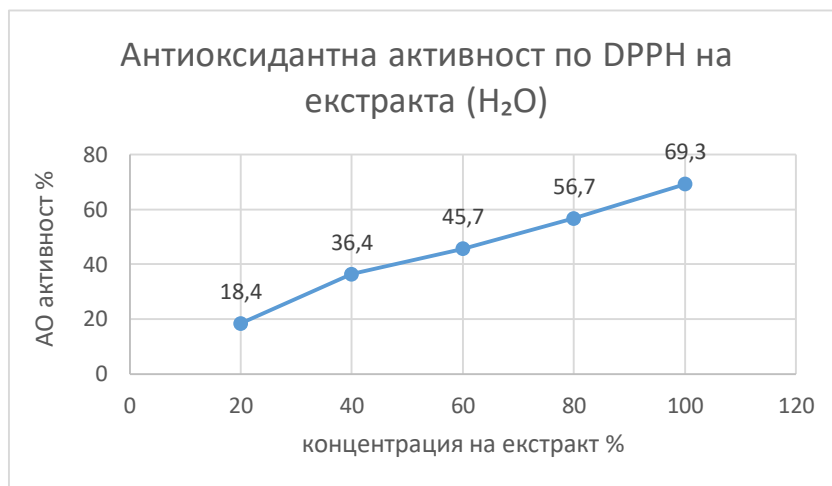


Фигура 10. Общо количество полифеноли в многокомпонентен продукт Seanergix; воден екстрагент – 149.12 mg GAE/g; ацетонов екстрагент – 136.5 mg GAE/g

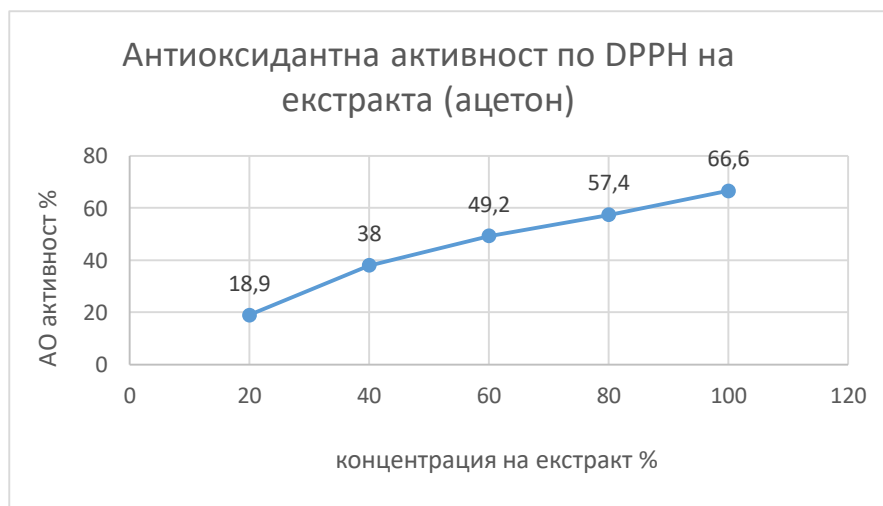
Установиха се близки стойности на полифеноли при двата екстракта, като при водния водния екстракт съдържанието на полифеноли е с 8.5% повече от това при ацетоновите екстракти.

### 3. Антиоксидантна активност на получените екстракти от многокомпонентен продукт Seanergix и полизахариди

В настоящето проучване бяха извършени сравнителни анализи за антиоксидантна активност на екстракта от многокомпонентния продукт Seanergix. Антиоксидантната активност се определи по методите FRAP и DPPH, базирани на различни методики. Използваният сравнителен подход послужи да се получи по-пълна представа за антиоксидантната активност на екстракта от изследвания продукт. Екстрактите, изследвани по метода DPPH са воден и ацетонов, докато по метода FRAP са воден и киселинен екстракт. Малко по-високи стойности, изразени като Trolox еквивалент антиоксидантен капацитет в процент, са получени при DPPH анализа при водна екстракция на полифеноли (69.3%), отколкото при ацетоновата екстракция (66.6%) (Фиг. 11 и 12).



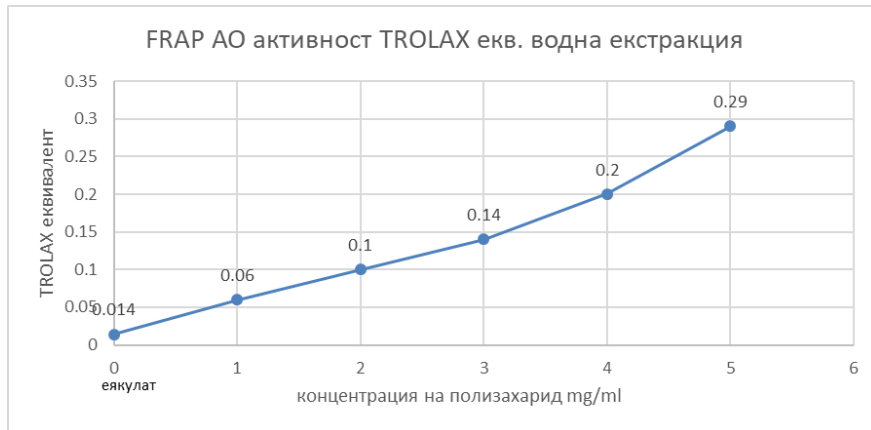
Фигура 11. Антиоксидантна активност по DPPH на екстракта от многокомпонентен продукт Seanergix (водна екстракция)





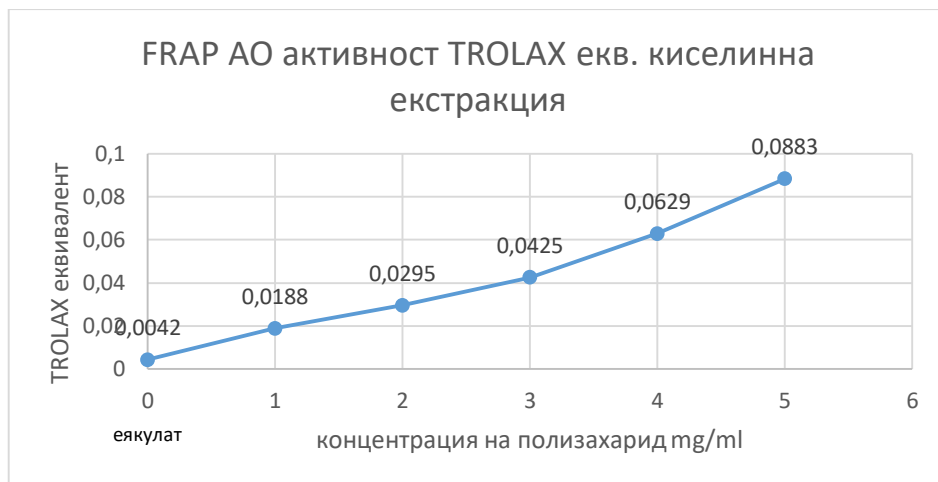
Фигура 12. Антиоксидантна активност по DPPH на екстракта от многокомпонентен продукт Seanerxix (ацетонова екстракция)

Измерената антиоксидантна активност по метода FRAP в присъствие на еякулат е 3.6 пъти по-висока при полизахарид получен чрез водна екстракция, отколкото при полизахарид получен от ацетонова екстракция (Фигура 13 и 14).



Фигура 13. FRAP антиоксидантна активност на полизахарид от *Ascophyllum nodosum* TROLAX еквивалент водна екстракция в присъствие на еякулат

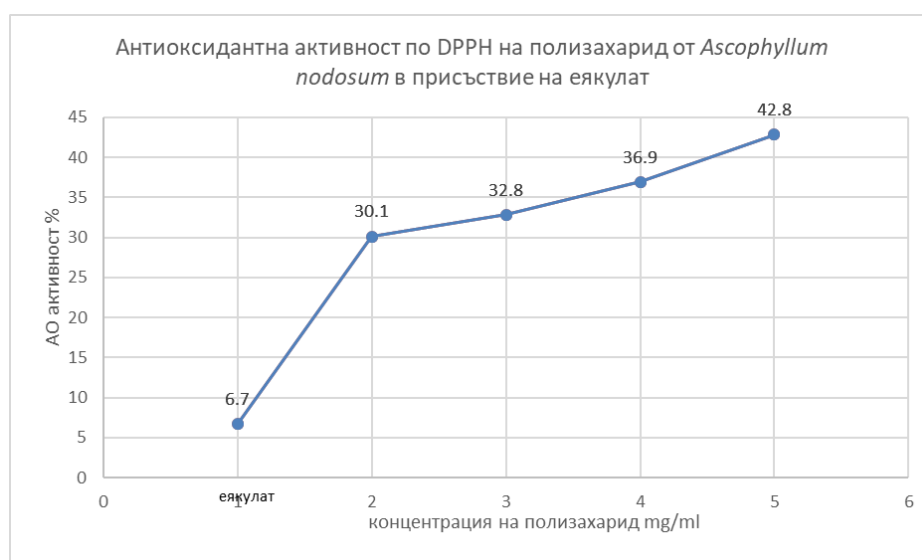
Корелацията е на лице при концентрация на полизахарид от *Ascophyllum nodosum* в присъствие на еякулат от 1mg/ml до 5mg/ml.



Фигура 14. FRAP антиоксидантна активност на полизахарид от *Ascophyllum nodosum* TROLAX еквивалент киселинна екстракция в присъствие на еякулат

Проведено е и изследване за радикало-улавящ капацитет по метода DPPH за антиоксидантна активност на екстракт от полизахарид от *Ascophyllum nodosum* в присъствиен на еякулат. От получените данни, става ясно, че базисната антиоксидантна

активност в еякулата е в порядъка на 6.7% (Фигура 15). Това се дължи на естествено налични антиоксидантни защити главно в семенната течност и в по-малка степен в самите сперматозоиди. С увеличаване на концентрацията на фукоидановия полизахарид в експерименталната среда се наблюдава пропорционално завишаване на радикало-улавящата активност, а именно 30.1% при 2mg/ml, 32.8% при 3mg/ml, 36.9% при 4mg/ml и 42.8% при 5mg/ml полизахарид. Тези данни ясно сочат за повишените нива на антиоксидантната защита при наличието на изследвания полизахарид в еякулата. Силен антиоксидантен ефект се наблюдава още при прибавяне на 2mg/ml полизахарид (30.1% от максималната антиоксидантна активност), която се увеличава с още 30% до 42.8% от максималната антиоксидантна активност при концентрация 5mg/ml от полизахарида. Данните са представени във Фигура 15.



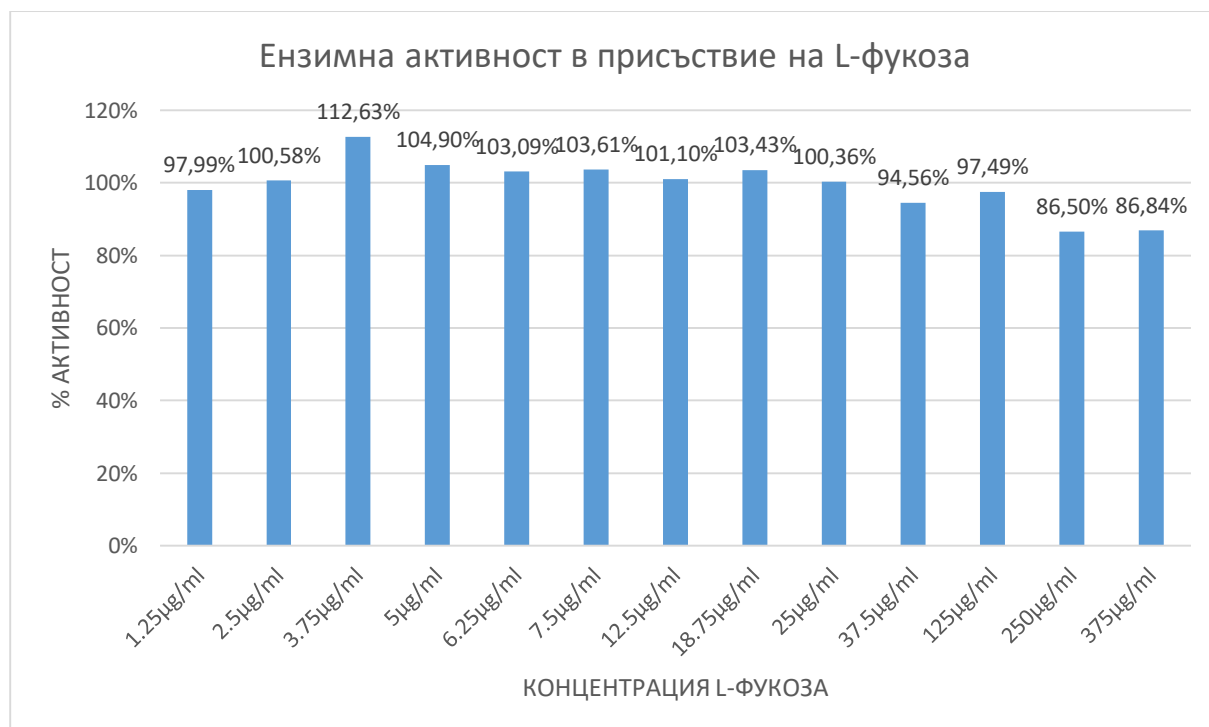
Фигура 15. Антиоксидантна активност по DPPH на полизахарид от *Ascophyllum nodosum* в присъствие на еякулат

Резултатите от настоящото проучване показват, че сред различните полизахариди, получени от кафяви водорасли, фукоиданът проявява висока антиоксидантна активност и потентност за елиминиране на свободни радикали. Нашите резултати потвърждават положителна връзка между съдържанието на сулфат и антиоксидантната активност. Настоящите данни дават основа за по-нататъчни експерименти за идентифициране и характеризиране на специфични съединения със сравнително висока антиоксидантна активност. Фукоиданът има и редица други биологични свойства. Резултати показват също, че включването на богати на

антиоксиданти полизахариди или техните фракции вероятно ще предотврати окислителното влошаване на спермата.

## Глава 2 Изследване влиянието на различни екстракти върху ензимната активност на човешка $\alpha$ -L-фукозидаза

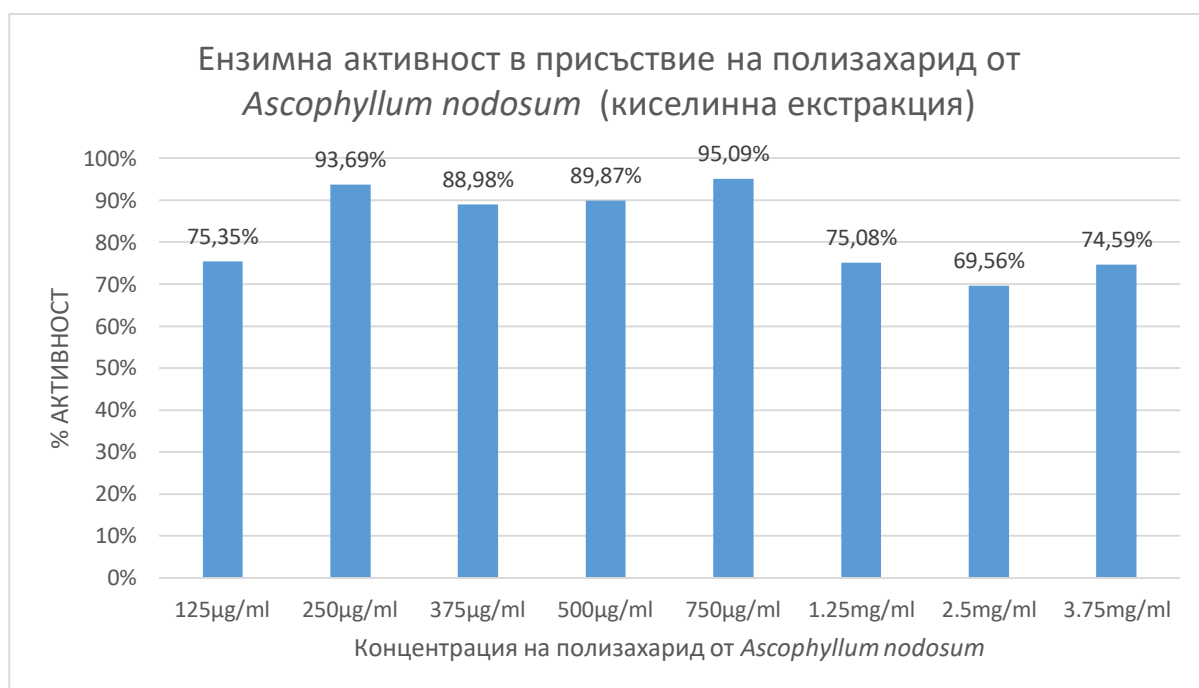
Следващата серия от изследвания беше концентрирана върху влиянието на различните компоненти от многокомпонентния продукт върху ензимната активност на човешката  $\alpha$ -L-фукозидаза. Алфа-L-фукозидаза е ензим, който разгражда фукозидазните връзки на термалната L-фукоза с останалите монозахариди от полизахаридната структура. Фукозата е считана за основен енергиен източник за сперматозоидите, както и да играе ключова роля в капацитацията и адхезията към яйцеклетката. Тези изследвания включиха серия от повторения и съпоставки в различни концентрации на чиста фукоза, полифеноли от *A. nodosum*, полизахариди от келп, пречистени и лиофилизирани екстракти от *A. nodosum*, трибулус, годжи бери, както и на многокомпонентния продукт Seanergix.



Фигура 16. Влияние на L-фукоза върху активността на човешка  $\alpha$ -L-фукозидаза

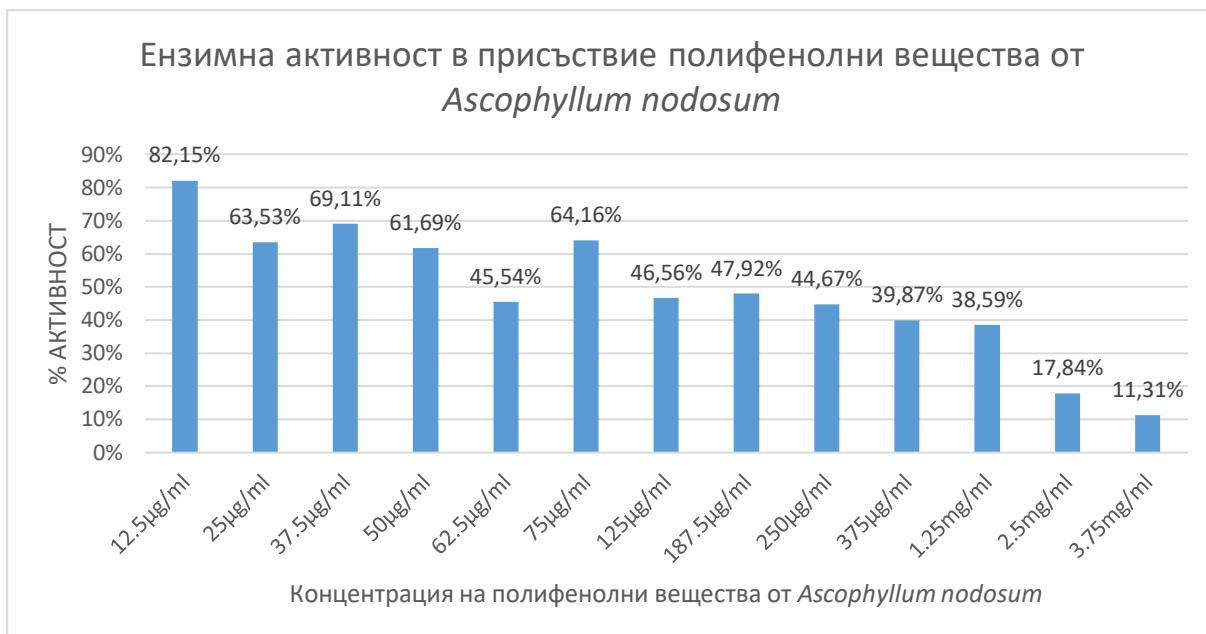
От получените резултати за  $\alpha$ -L-фукозидазната активност в присъствие на L-фукоза става се установи, че настъпва около 15% инхибиране при концентрация на L-

фукоза над 250µg/ml. Това потвърждава тяхното стабилно взаимодействие и е отправна точка към въвеждане на променливи компоненти и концентрации от изследвания продукт по-нататък. В присъствието на полизахарид от *Ascophyllum nodosum* след киселинна екстракция, не се отчита влияние в активността на α-L-фукозидаза при концентрация до 750µg/ml. По-високи концентрации на получения пречистен полизахарид от 1.25mg/ml до 3.75mg/ml инхибират α-L-фукозидазната активност до 25% от изходната ензимна активност (Фигура 17).



Фигура 17. Влияние на полизахарид от *A. nodosum* (киселинна екстракция) върху активността на човешка α-L-фукозидаза

Алфа-L-фукозидазната активност се инхибира в различна степен в присъствие на полифеноли, екстрахирани от *Ascophyllum nodosum*. Концентрации на полифеноли от 25µg/ml до 375µg/ml показват от 37% до 57% инхибиране. Десет пъти по-високи концентрации инхибират около 90% от ензимната активност (Фигура 18).



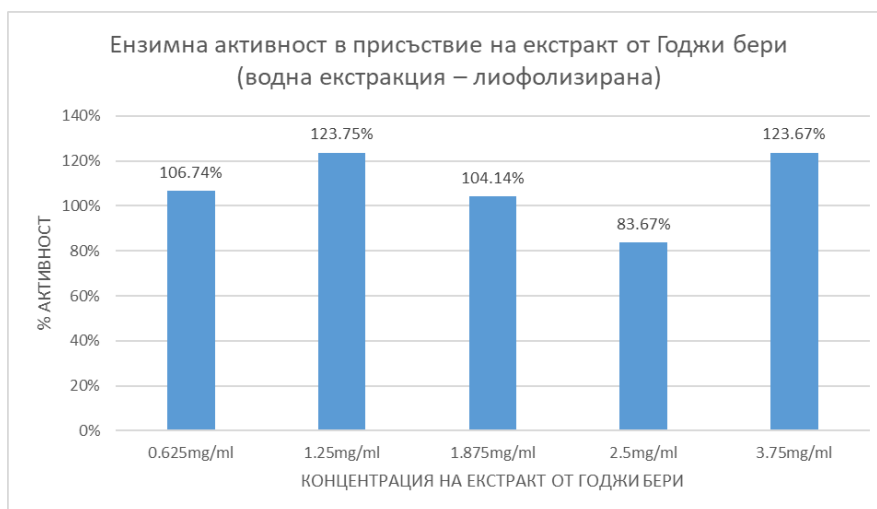
Фигура 18. Влияние на полифенолни от *A. nodosum* върху активността на човешка  $\alpha$ -L-фукозидаза

При сравнителен анализ на ензимното инхибиране в присъствие на воден екстракт от многокомпонентен продукт Seanerģix се наблюдава инхибиращ ефект върху  $\alpha$ -L-фукозидазата при концентрация 2.5mg/ml (Фигура 19). При концентрация от 0.625mg/ml се наблюдава активиране на  $\alpha$ -L-фукозидазата до 133%. Активиране в по-ниски проценти (111%-113%) се установи при концентрации от 1.25mg/ml до 1.875mg/ml



Фигура 19. Влияние на лиофилизиран воден екстракт от многокомпонентен продукт Seanerģix върху активността на човешка  $\alpha$ -L-фукозидаза

За да сравним ефекта на други компоненти от състава на Seanerģix върху  $\alpha$ -L-фукозидазната активност, изследвахме воден и лиофилизиран екстракт от годжи бери и активна субстанция от *Tribulus terrestris*. Ензимната активност на  $\alpha$ -L-фукозидазата с екстракт от годжи бери води до активиране от 4% до 24% на ензимната активност (Фигура 20).



Фигура 20. Влияние на лиофилизиран воден екстракт от *L. barbarum* върху активността на човешка  $\alpha$ -L-фукозидаза.

В следващите изследвания, проучихме влиянието на активната субстанция от *Tribulus terrestris*, получена от Софарма АД, върху активността на човешката  $\alpha$ -L-фукозидаза. При всички изследвани концентрации на субстанцията от 0.625mg/ml до 3.75mg/ml се установи значително активиране на изследвания ензим (Фигура 21). При концентрации от 1.25mg/ml до 2.5mg/ml се наблюдава двукратно увеличение на  $\alpha$ -L-фукозидазната активност. Получените резултати ясно демонстрират, че оптималната доза за активиране на изследвания ензим е 1.875mg/ml (211% активност).



Фигура 21. Влияние на активната субстанция от *T. terrestris* върху активността на човешка  $\alpha$ -L-фукозидаза

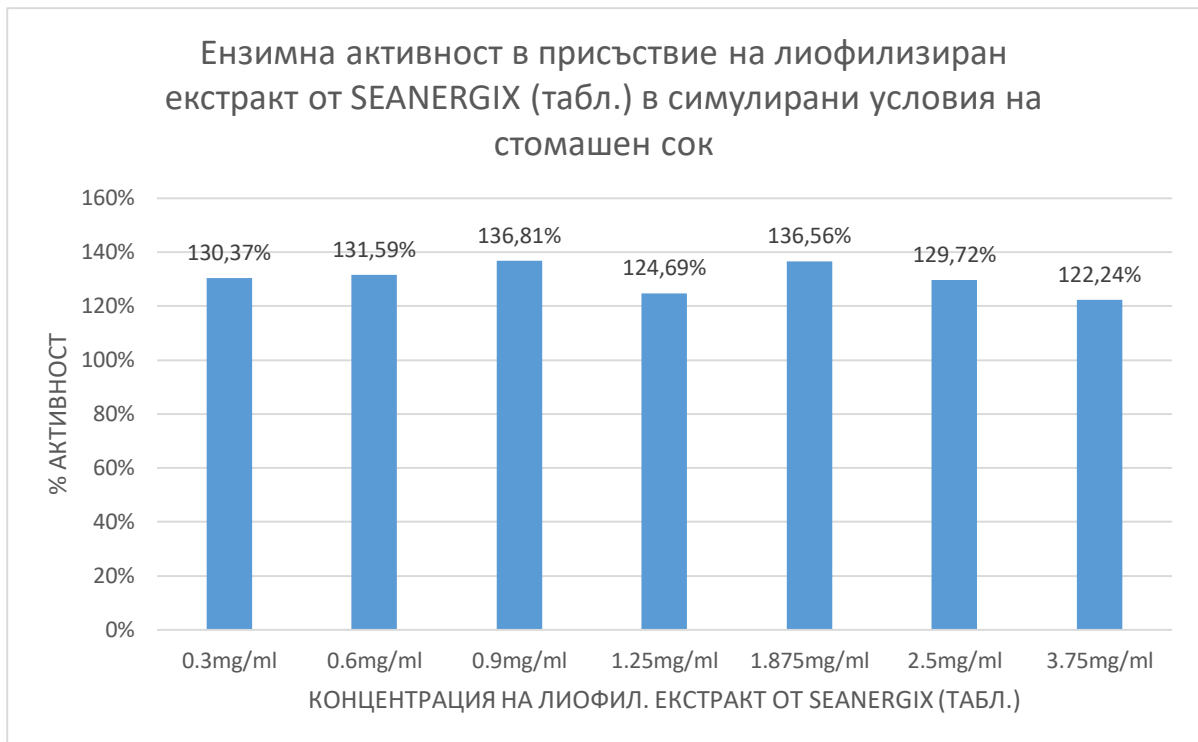
В следващите експерименти проверихме влиянието на активната субстанция от *Tribulus terrestris*, лиофилизиран воден екстракт от Годжи бери, лиофилизиран екстракт на изследваните кафяви водорасли *Ascophyllum nodosum* и лиофилизиран воден екстракт от хранителната добавка SeanerGix върху ензимната активност на  $\alpha$ -L-фукозидазата след обработка в стомашен сок. Активността на  $\alpha$ -L-фукозидазата в присъствие на лиофилизиран екстракт от кафявите водорасли след симулирани условия на стомашна среда се запазва около 90% при концентрация от 0,3 mg/ml до 1.875 mg/ml. По-високи концентрации от екстракта (2.5mg/ml и 3.75mg/ml) чувствително инхибират ензимната активност до 60% (Фигура 22). В сравнение с резултатите без обработка в симулираните условия на стомашния сок се наблюдава по-слабо инхибиране на изследваната ензимна активност, което може да се дължи на частичната хидролиза на лиофилизирания екстракт без да имаме към момента данни за структурната промяна на отделните компоненти от екстракта.



Фигура 22. Ензимна активност на  $\alpha$ -L-фукозидаза в присъствие на лиофилизиран воден екстракт от кафяви водорасли *A. nodosum* след обработка в симулирани условия на стомашен сок

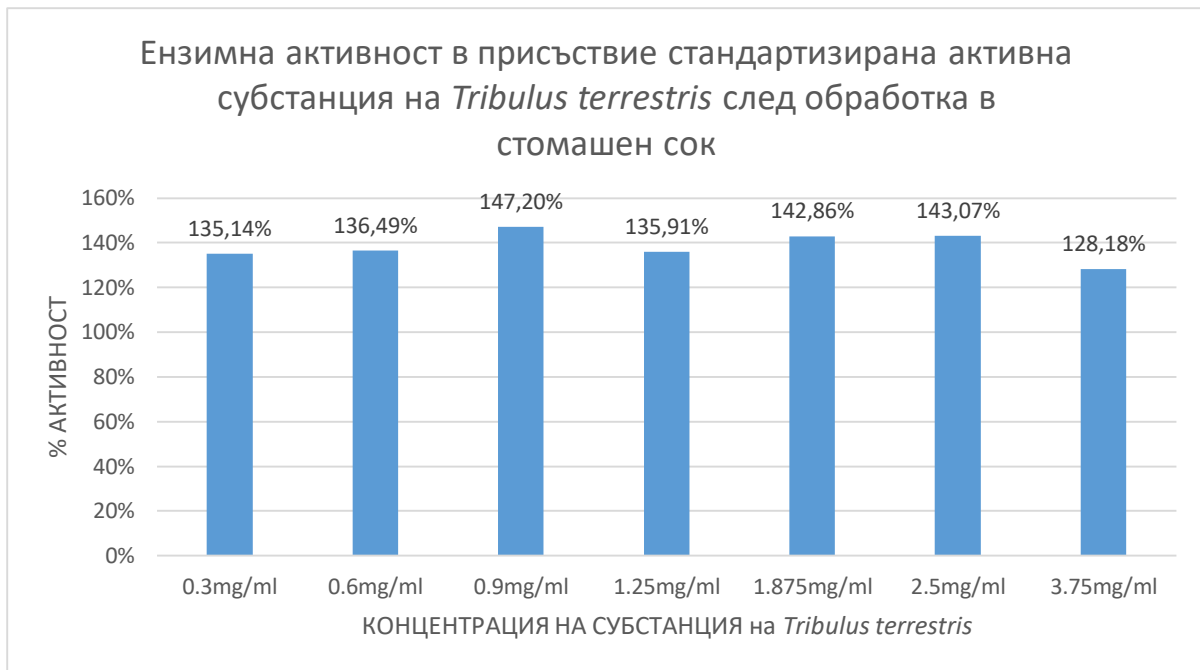
Ензимната активност на  $\alpha$ -L-фукозидазата в присъствие на лиофилизиран екстракт от многокомпонентен продукт *Seanergix* след обработка в симулирани условия на стомашна среда е по-висока с 24 до 30 % независимо от концентрацията му в реакционната смес (Фигура 23). Резултатите чувствително се различават с тези без обработка в стомашен сок, където активиране се наблюдава само при концентрация 0.3mg/ml, докато при концентрации над 0.9 mg/ml настъпва съществено инхибиране на ензимната активност. Вероятна причина може да се търси в настъпила частична хидролиза на отделни компоненти на екстракта и промяна на структурата им. Това е довело до промяна на сродството им с отделни центрове в третичната структура на фукозидазата, което повлиява сродството на ензима със субстрата. Тази хипотеза предстои да се докаже в бъдещи изследвания.





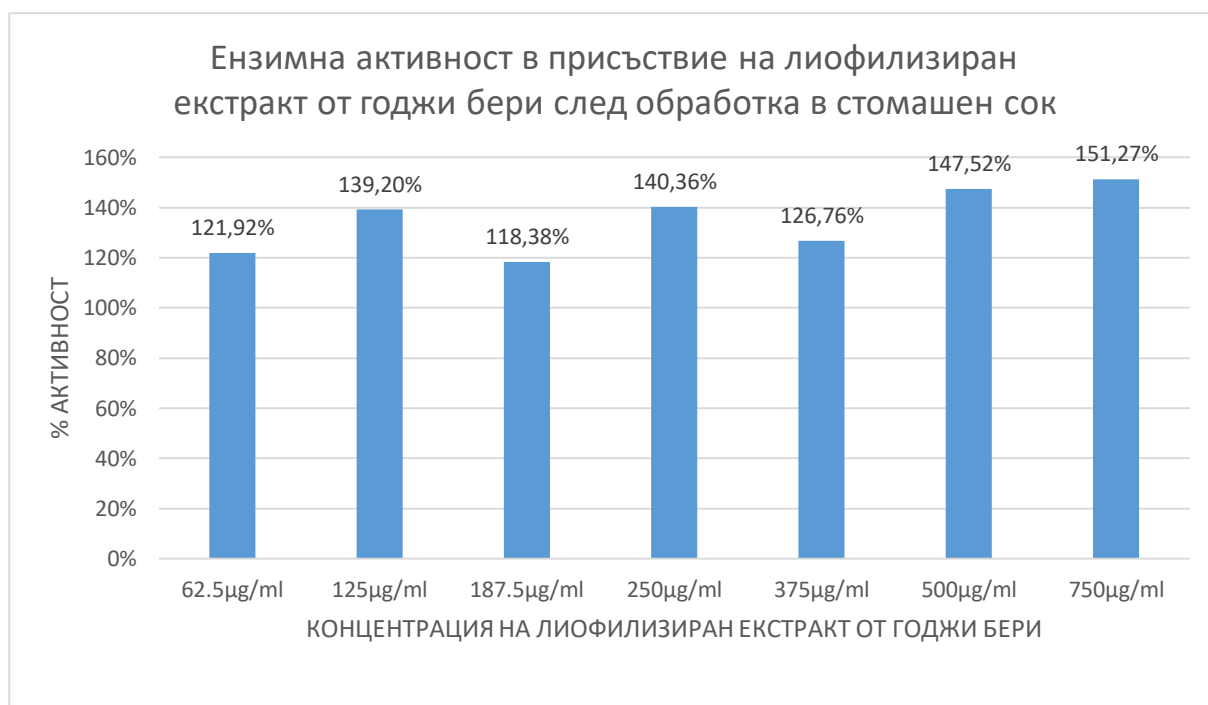
Фигура 23. Ензимна активност на  $\alpha$ -L-фукозидазата в присъствие на лиофилизиран воден екстракт от SEANERGIX (таблетка) в симулирани условия на стомашен сок

Ензимната активност на  $\alpha$ -L-фукозидазата в присъствие на стандартизирана субстанция от *Tribulus terrestris* след симулирани условия на стомашна среда се активира чувствително между 30 и 50% независимо от концентрацията му в реакционната смес (Фигура 24). В сравнение с резултатите без третиране в условия на стомашен сок активирането е по-слабо с около 60%, което предполага настъпили хидролизни процеси на част от компонентите на субстанцията. Това вероятно е намалило синергистичния им ефект върху ензимната активност. Можем само да предположим, че променените химични структури на част от компонентите е намалило сродството им с определени участъци в ензимната молекула.



Фигура 24. Ензимна активност на  $\alpha$ -L-фукозидазата в присъствие на стандартизирана субстанция на *T. terrestris* след обработка в стомашен сок

При изследване влиянието на лиофилизиран екстракт от годжи бери след симулирани условия на стомашна среда се установи активиране на ензимната активност на  $\alpha$ -L-фукозидазата в диапазона от 22% до 51% в концентрации на екстракта от 0.3mg/ml до 3.75mg/ml (Фигура 25). Активирането е сходно с това при действието на субстанцията от трибулус, което предполага, че отделните компоненти на екстракта на годжи бери имат подобен ефект с този на съставките в трибулус. Не се наблюдава синергистичен ефект върху изследвания ензим на компонентите от двата продукта (трибулус и годжи бери), при сравнение с резултатите от таблетката на Seanerģix. Нещо повече, активирането на изследвания ензим е по-слабо в сравнение с чистите субстанции, което вероятно се дължи на ниската им доза в таблетките. Твърде разнородния по химичен състав продукт както от трибулус, така и от годжи бери, вероятно има комплексно въздействие. За да се установи механизма на действие на всеки компонент са необходими допълнителни анализи след финно пречистване и структурен анализ на отделните компоненти.



Фигура 25. Ензимна активност на  $\alpha$ -L-фукозидазата в присъствие на лиофилизиран екстракт от *L. barbarum* след симулирано въздействие в условия на стомашен сок.

Khaleghi et al и Shaiful et al (2016) изследвали човешки сперматозоиди инкубирани с 40 и 50  $\mu\text{g/ml}$  екстракт от *Tribulus terrestris*. Те отчитат увеличаване на общата подвижност и подобряване на концентрацията и морфологията на сперматозоидите при мъжете и обобщават, че екстрактите от *Tribulus terrestris* подобряват общия фертилитет при мъжете. Базирано на това изследване, Asadmobini et al (2016) установяват, че подвижността и жизнеността на сперматозоидите са подобрени благодарение на антиоксидантните свойства на екстракти от *Tribulus terrestris* и установяват, че екстракти от *Tribulus terrestris* могат да се използват като безопасна алтернатива за лечение на сексуални разстройства. Sansalone et al (2014) изследвали екстракти на активното вещество от *Tribulus terrestris* (препарати като Tradamix TXx1000) за еректилна дисфункция при мъжете. Резултатите показали подобрене в ерекцията, еякулацията и в качеството на живот, особено при мъже с умерена артериална дисфункция.

Според Keshtmand et al. (2014) екстракти от *Tribulus terrestris* могат да се използват успешно при плъхове след химиотерапия за подобряване на параметрите на спермата. Защитният ефект се дължи на наличието на антиоксиданти, които имат централни и периферни механизми на активност. Ghanbari et al (2014) съобщават, че екстрактите от *Tribulus terrestris* намаляват неблагоприятните ефекти на диабета върху

възпроизводството на мъжки плъхове. Екстрактите подобряват параметрите на сперматогенезата и повишават нивото на серумния тестостерон. Kumari и Singh (2015) изследвали мишки, страдащи от оксидативен стрес. Те установяват, че екстрактите от *Tribulus terrestris* подобряват сперматогенезата, предизвикана от метронидазол в тестисите, но само високи дози (200mg/kg), възстановяват сперматогенезата. Авторите предполагат, че този ефект се дължи от наличието на антиоксидантни флавоноиди, а не стероидни сапонини. Препарат на базата на екстракти от *Tribulus terrestris* може да бъде приеман безопасно, без да се повлиява потенциала за плодовитост при мъжете.

Erkan и Nehir (2016) изследвали екстракти от *Tribulus terrestris* и съобщават, че сапонините имат инхибиращ ефект върху  $\alpha$ -глюкозидазата ( $IC_{50}$  6967  $\pm$  343 и 2885  $\pm$  85.4  $\mu$ g/mL, съответно) и  $\alpha$ -амилазата ( $IC_{50}$  343  $\pm$  26.2 и 167  $\pm$  6.12  $\mu$ g/mL, съответно). Най-високото инхибиране на *Tribulus terrestris* е върху липазата - 15.3  $\pm$  2.03 и 9,74  $\pm$  1,09  $\mu$ g/mL, съответно. Хранителните добавки на базата на *Tribulus terrestris* са мощни инхибитори на основните ензими при усвояване на въглехидрати и липиди *in vitro*.

### **Глава 3. Изследване ефекта на многокомпонентен продукт SEANERGIX върху спермални показатели на пациенти.**

#### **1. Резултати от спермални анализи на пациенти след прием на многокомпонентен продукт**

За целта на проучването се използва многокомпонентен продукт, който по предварителни хипотези повишава концентрацията и подвижността на сперматозидите. Неговите съставки включват: кафяви водорасли, Български трибулус, годжи бери, джинджирил, китайски лимонник, корейски женшен и многолистно пипериче.

Бе извършено клинично проучване при 32 пациенти, които приемаха препарата в продължение на 90 дни. Пациентите бяха разделени на 2 проучвателни групи, съответно 12 пациента в група 1 и 20 пациента в група 2 според периода на време, в който са събирани данните. Бе извършен спермален анализ на ден 0 (или преди прием на препарата), ден 60 (2 месеца след прием) и ден 90 (3 месеца след прием на препарата). Данните от спермалния са съпоставени и е установен ефекта от прием на препарата. В изследваните параметри се включва обем на еякулата, брой сперматозоиди в 1ml семенна течност, общ брой на сперматозоиди в целия обем на еякулата, процент на нормокинетични сперматозоиди, процент на бавни

сперматозоиди, процент на акинетични сперматозоиди, както и общ брой нормокинетични сперматозоиди

Освен спермалния анализ са сравнени и данните от изследвания за ДНК фрагментация на сперматозоидите на всеки пациент на ден 0 (или преди прием на препарата), ден 60 (2 месеца след прием) и ден 90 (3 месеца след прием на препарата). Данните от процента на ДНК фрагментация са съпоставени и е установен ефекта от прием на препарата.

От данните получени в проучването проведено при n=12 пациента в група 1 става ясно, че има подобрене на общия брой нормокинетични сперматозоиди в 12 от 12 от случаите след 90–дневен прием на многокомпонентния продукт. Общият процент на спермалните показатели е средно покачен с 81.9% след 90 дневен прием на таблетки от препарата Seanerxi.

От данните получени в проучването проведено при n=12 пациента в група 1, става ясно, че има подобрене на общия брой сперматозоиди в 11 от 12 от случаите след 90–дневен прием на многокомпонентния продукт Seanerxi. Общият брой на сперматозоиди е средно покачен с 19.8% (Фигура 26).



Фигура 26. Общ брой сперматозоиди след ден 0, ден 60 и ден 90 от прием на таблетки от препарата Seanerxi при 1 група доброволци

От данните получени в проучването проведено при n=12 пациента в група 1, става ясно, че има подобрене в общия процент бързо подвижни сперматозоиди в 12 от

12 от случаите след 90–дневен прием на многокомпонентния продукт. Общият процент на бързо подвижни сперматозоиди е средно покачен с 38.4% (Фигура 27).



Фигура 27. Процентно съотношение на бързо подвижни сперматозоиди след ден 0, ден 60 и ден 90 от прием на таблетки от препарата Seanergix при 1 група доброволци

От данните получени в проучването проведено при n=12 пациента в група 1, става ясно, че има подобрение на общия брой нормокинетични сперматозоиди в 12 от 12 от случаите след 90–дневен прием на многокомпонентния продукт. Общият брой на нормокинетични сперматозоиди е средно покачен с 61.9% (Фигура 28).

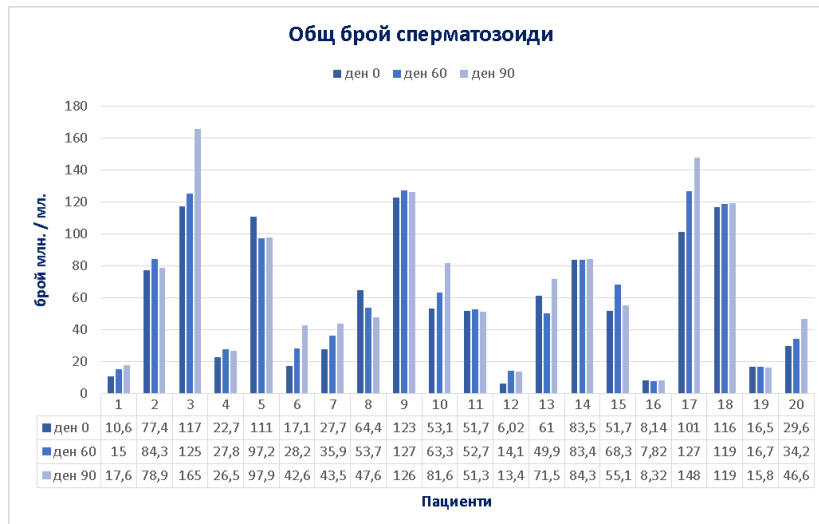


Фигура 28. Общ брой нормокинетични сперматозоиди след ден 0, ден 60 и ден 90 от прием на таблетки от препарата Seanergix при 1 група доброволци

От данните получени в проучването проведено при n=20 пациента в група 2, става ясно, че има подобрение на общия брой нормокинетични сперматозоиди в 16 от

20 от случаите след 90–дневен прием на многокомпонентния продукт. Общият процент на спермалните показатели е средно покачен с 72.03% след 90 дневен прием.

От данните получени в проучването проведено при n=20 пациента в група 2, става ясно, че има подобрене на общия сперматозоиди в 17 от 20 от случаите след 90–дневен прием на многокомпонентния продукт. Общият брой на сперматозоиди е средно покачен с 24.1% (Фигура 29).



Фигура 29. Общ брой сперматозоиди след ден 0, ден 60 и ден 90 от прием на таблетки от препарата Seanergix при 2 група доброволци

От данните получени в проучването проведено при n=20 пациента в група 2, става ясно, че има подобрене в общия процент бързо подвижни сперматозоиди в 15 от 20 от случаите след 90–дневен прием на многокомпонентния продукт. Общият процент на бързо подвижни сперматозоиди е средно покачен с 16.7% (Фигура 30).



Фигура 30. Процентно съотношение на бързо подвижни сперматозоиди след ден 0, ден 60 и ден 90 от прием на таблетки от препарата Seanergix при 2 група доброволци

От данните получени в проучването проведено при n=20 пациента в група 2, става ясно, че има подобрене на общия брой нормокинетични сперматозоиди в 16 от 20 от случаите след 90–дневен прием на многокомпонентния продукт. Общият брой на нормокинетични сперматозоиди е средно показан с 24.1% (Фигура 31).

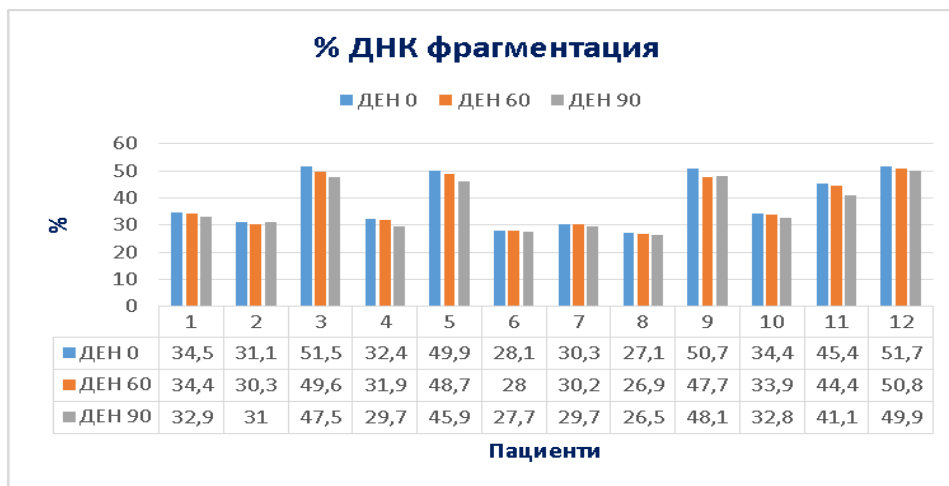


Фигура 31. Общ брой нормокинетични сперматозоиди след ден 0, ден 60 и ден 90 от прием на таблетки от препарата Seanergix при 2 група доброволци

## 2. Изследване на ДНК фрагментация

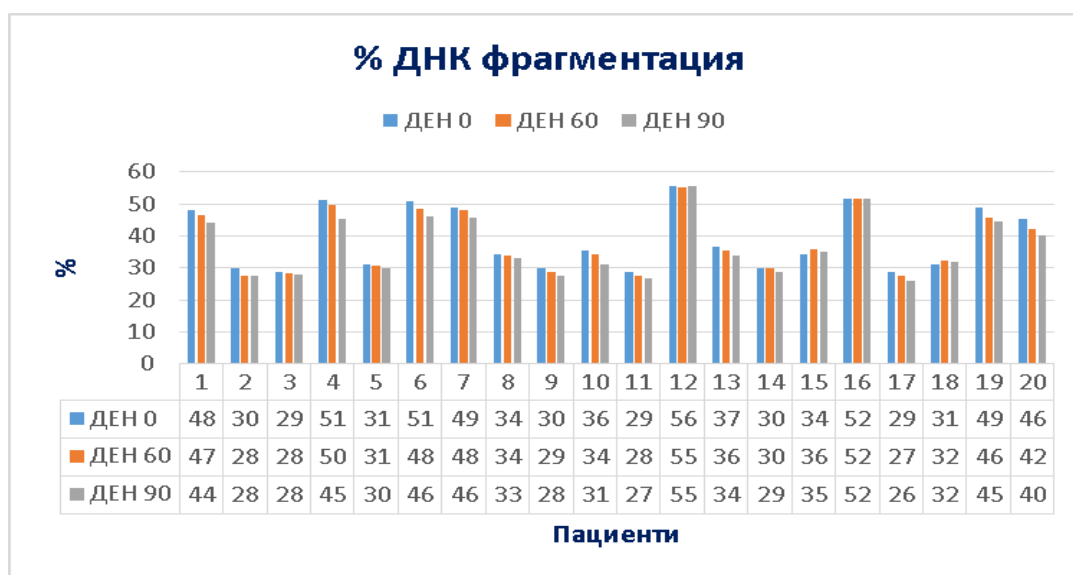
От данните получени в проучването проведено при n=12 пациента в група 1, става ясно, че има понижаване на процента на сперматозоиди с ДНК грагментация в 12 от 12 от случаите след 90–дневен прием на многокомпонентния продукт. Общият процент на сперматозоиди с ДНК фрагментация е средно понижен с 5.5% (фигура 32).





Фигура 32. Процент на ДНК фрагментация след ден 0, ден 60 и ден 90 от прием на таблетки от препарата Seanergix при 1 група доброволци

От данните получени в проучването проведено при n=20 пациента в група 2, става ясно, че има понижаване на процента на сперматозоиди с ДНК грагментация в 18 от 20 от случаите след 90–дневен прием на многокомпонентния продукт. Общият процент на сперматозоиди с ДНК фрагментация е средно понижен с 6.4% (фигура 33).



Фигура 33. Процент на ДНК фрагментация след ден 0, ден 60 и ден 90 от прием на таблетки от препарата Seanergix при 2 група доброволци

## *Обобщение*

Оксидативният стрес е изследван в продължение на четири десетилетия. Досега е постигнат значителен напредък от описателното характеризиране на този процес до очертаване на молекулярните механизми, подчертаващи адаптивните отговори и таргетираните манипулации на очакваните отговори. Токсичността на кислорода е присъщо предизвикателство за аеробния живот, включително за сперматозоидите, клетките, отговорни за размножаването на вида. Оксидативното увреждане на мембраните на сперматозоидите, протеините и ДНК-то е свързано с промени в механизмите на трансдукция на сигнали, които влияят върху фертилитета.

Сперматозоидите и овоцитите притежават присъща, но ограничена способност за генериране на ROS за подпомагане на процеса на фертилизация. Въпреки, че съществуват различни защитни механизми, включително антиоксидантни ензими, витамини и биомолекули, балансът между ползите и рисковете от ROS и антиоксиданти вещества, изглежда необходим, за оцеляването и функцията на сперматозоидите. Антиоксидантите  $\alpha$ -токоферол (витамин А), аскорбиновата киселина (витамин С), ретиноидите (витамин А) и фукоидана са мощни противоягенти на реактивни кислородни видове. Много проучвания са изследвали ролята на тези и други антиоксиданти за подобряване на параметрите на спермата.

Произходът и етиологията на повишените ROS при мъже с неоптимално качество на сперматозоидите са все по-ясни, като представят много пътища за потенциална терапия. Въпреки това, за да се оцени потенциала на антиоксидантните системи, ще са необходими добре разработени рандомизирани контролирани проучвания. Освен това, прооксидативните и антиоксидантните свойства на терапевтиците, в момента получават повече внимание, също като част от антиинфекциозни терапии.

Производството на ROS, може да бъде полезно или вредно за живите организми; това се отнася и за сперматозоидите, които изискват ниски нива на ROS, за да покажат пълния си капацитет при фертилизацията. Обратно, оксидативният стрес уврежда сперматозоидите и много други клетъчни типове; прекомерни нива на ROS се свързват с много заболявания, включително диабет, рак, атеросклероза и болестта на Паркинсон.

Окислителният стрес, може също да е следствие от нездравословен начин на живот, като пушене, злоупотреба с алкохол или излагане на химическо или

електромагнитно замърсяване. ROS са важни фактори за регулирането на функцията на сперматозоидите, както в позитивен, така и в негативен смисъл. По този начин, тези клетки генерират ниски нива на ROS, за да насърчават капацитета и функционалното развитие на поведението на сперматозоидите, необходими за оплождането, включително хиперактивиране и представяне на молекулите на разпознаване на повърхността. Ако оплождането не настъпи, продължаващото генериране на ROS активира присъщата апоптотична каскада. Бъдещият напредък в тази област изисква идентифициране на най-важните клетъчни цели за действие на ROS, както и откриване на основните механизми и последствия от взаимодействието между ROS и клетъчните компоненти. Механизмите, отговорни за отстраняването на ROS и тяхното регулиране, ще бъдат втората гореща тема за продължаващите изследвания на метаболизма на ROS.

През последните години беше открито, че ROS и ROS-регулираните пътища са активно включени в модифицирането на различни клетъчни процеси, започвайки от основния метаболизъм и хормоналната сигнализация, до сложни процеси като оплождане и развитие. Гореспоменатите, заедно с някои биотехнологични пътища, биха разширили и свързаните с ROS изследвания в практически насоки. Ето защо остава много да се научи за ефектите от ROS върху биологичните системи, адаптивните стратегии, които преодоляват ROS атаката, както и естественото използване на ROS в сигнализирането и регулирането на метаболизма.

## **ИЗВОДИ**

1. Основната съставка на многокомпонентен препарат SEANERGIX са кафявите водорасли *Ascophyllum nodosum*, които съдържат полизахарида фукоидан в концентрация до 8%. Доказано е над 25% съдържание на терминална L-фукоза в изолирания фукоидан от изследваните водорасли *Ascophyllum nodosum*.
2. Доказана е антиоксидантна активност на многокомпонентен препарат SEANERGIX и на полизахаридите от *Ascophyllum nodosum* и *Lycium barbarum* по методите FRAP и DPPH.
3. Активната субстанция на *Tribulus terrestris* активира човешката  $\alpha$ -L-фукозидаза над 200%, като оптималната доза е 1,875 mg/ml. Обработката на изследваната субстанция в условията на стомашен сок редуцира активирането на  $\alpha$ -L-фукозидазата до 147%.

4. Установи се, че лиофилизиран воден екстракт от *Lycium barbarum* в концентрации 750 µg/ml активира човешката α-L-фукозидаза до 151% след симулирано обработване в стомашен сок.
5. Доказано е, че липсва синергистичен ефект на компонентите от *Lycium barbarum* и *Tribulus terrestris* върху човешка α-L-фукозидаза след симулирано обработване в стомашен сок.
6. Доказан е инхибиращ ефект до 25% от изходната активност на α-L-фукозидазата на фукоидан от *Ascophyllum nodosum* върху човешка α-L-фукозидаза в концентрации на получения пречистен полизахарид от 1.25mg/ml до 3.75mg/ml.
7. Доказан е инхибиращ ефект на полифенолите от *Ascophyllum nodosum* върху човешка α-L-фукозидаза в концентрации от 25µg/ml до 375µg/ml показват от 37% до 57% инхибиране. Десет пъти по-високи концентрации инхибират около 90% от ензимната активност получения пречистен полизахарид от 1.25mg/ml до 3.75mg/ml до 25% от изходната активност на α-L-фукозидазната активност.
8. Прием на многокомпонентния препарат SEANERGIX от доброволци с репродуктивни проблеми in vivo подобрява параметрите на спермалния им анализ след 90 дневен прием – увеличение на общия брой сперматозоиди средно с 21.75%, увеличение процента на нормокинетичните сперматозоиди с 27.55% и увеличение общия брой на нормокинетичните сперматозоиди с 43%.
9. След 90 дневен прием на SEANERGIX от доброволци с репродуктивни проблеми in vivo се доказва намаляване на процента на ДНК фрагментация средно с 6%.

## **ПРИНОСИ**

### **Приноси с оригинален характер**

1. В резултат на проведените изследвания за първи път се доказва активирането на човешката α-L-фукозидаза над 200% при воден екстракт на годжи бери и до 147% от компонентите на воден екстракт от годжи бери след симулирана обработка в стомашен сок;

2. Установено е за първи път активиращото действие на активната субстанция от *Tribulus terrestris* над 200% при влагане без симулирана обработка в стомашен сок и до 151% след симулирана обработка в стомашен сок;

### **Приноси с потвърдителен характер**

1. В резултат на проведените *in vivo* изследвания на Seanergix с доброволци с репродуктивни проблеми се доказва ефекта на компонентите на препаратa върху намаляване на оксидативния стрес, както на целия организъм, така и на репродуктивната система.
2. В резултат на проведените *in vitro* изследвания на компоненти от Seanergix (фукоидан от *Ascophyllum nodosum*, активна субстанция от *Tribulus terrestris* и полизахарид от *Lycium barbarum*) се доказва техния антиоксидантен ефект и активиране процесите на сперматогенеза.

### ***Публикации във връзка с дисертацията***

1. Nikolova M., **Aleksandrov A.**, Iliev I. (2017) “Alpha-glucosidase inhibitory effect and antioxidant properties of different extracts from *Lycium barbarum L.*”, Journal of BioScience and Biotechnology, vol.7, issue 2/3. p-p. 91-95
2. **Aleksandrov A.**, Mollova D., Iliev I. (2020) “Influence of bioactive substances from *Ascophyllum nodosum*, *Lycium barbarum* and *Tribulus terrestris* on the quality characteristics of human spermatozoa”, Journal of BioScience and Biotechnology, 2020, in press

### ***Участия в национални и международни научни форуми***

1. Nikolova M., **Aleksandrov A.**, Iliev, I., (2017) “Effects of Extract of Goji Berry on  $\alpha$ -Glucosidase Activity and Antioxidant Properties”, 4<sup>th</sup> BalkanBio Scientific Conference on Biology, 1-3 November 2017 Plovdiv, Bulgaria, abstract p-p 29-30 (poster).

## ***Effect of prebiotic oligosaccharides on human health***

*Aleksandar Aleksandrov*

Infertility is a global disease that affects about 15% of all couples of reproductive age. This amounts to around 60-80 million couples worldwide. Global studies analyzing male sperm have shown that its quality is decreasing, possibly reflecting a worldwide decline in fertility. Subfertile men often exhibit increased levels of reactive oxygen species and reduced antioxidant capacity in seminal fluid and in sperm.

In this study, we mainly investigated the influence of the major bioactive substances from *A. nodosum*, *L. barbarum* and *T. terrestris* on total sperm count, percentage of normokinetic sperm and total count of normokinetic sperm during an in vivo experiment. Moreover we studied the effect of these substances on the levels of sperm DNA fragmentation. We optimized established methods for extraction and also determined the antioxidant activity of the various substances on human spermatozoa. On the other hand, we studied how the extracts from the multicomponent product, *A. nodosum*, *L. barbarum* and *T. terrestris* influence the activity of human  $\alpha$ -L-fucosidase.

As a result of the current study it was determined that *A. nodosum*, *L. barbarum* and *T. terrestris* and their major bioactive components have an impact on the quality characteristics of human spermatozoa, specifically the total sperm count, the percentage of normokinetic sperm, the total count of normokinetic sperm and the level of sperm DNA fragmentation after 90 days of administration to a group of volunteers. They are shown to exhibit strong antioxidant potential that has a beneficial impact on the process of spermatogenesis. We also concluded that the multicomponent product, *L. barbarum* and *T. terrestris* activated human  $\alpha$ -L-fucosidase up to 200%.