



Универзитет „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ во Скопје
Факултет за ветеринарна медицина во Скопје
Школа за докторски студии
Ветеринарна медицина

Мартин Николовски, ДВМ

**ЗГОЛЕМУВАЊЕ НА КРИОПРЕЗЕРВАЦИСКИОТ КАПАЦИТЕТ НА
ЕЈАКУЛАТНИ МЕДИУМИ ЗА ОВЧЕПОЛСКА ПРАМЕНКА СО
УПОТРЕБА НА СЕМИНАЛНА ПЛАЗМА И ГЛУТАТИОН**

- докторска дисертација -

Ментор: Проф. д-р Тони Довенски

Скопје, 2019

ЗГОЛЕМУВАЊЕ НА КРИОПРЕЗЕРВАЦИСКИОТ КАПАЦИТЕТ НА ЕЈАКУЛАТНИ МЕДИУМИ ЗА ОВЧЕПОЛСКА ПРАМЕНКА СО УПОТРЕБА НА СЕМИНАЛНА ПЛАЗМА И ГЛУТАТИОН

Клучни зборови: сперматозоиди, овни, криопрезервација, редуциран глутатион, хомологна семинална плазма

INCREASING OF CRYOPRESERVING CAPACITY OF EJACULATE MEDIA FOR OVCHEPOLSKA PRAMENKA BY UTILIZING SEMINAL PLASMA AND GLUTATHIONE

Key words: spermatozoa, ram, cryopreservation, reduced-glutathione, homologous-seminal-plasma

Скопје, 2019

Skopje, 2019

Ментор: Проф. д-р Тони Довенски

редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје

Датум на одбрана: 02.07.2019

Членови на комисија:

Проф. д-р Владимир Петков, претседател

редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Проф. д-р Тони Довенски, ментор

редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Проф. д-р Флорина Поповска Перчиник

вонреден професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје при Универзитетот „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје

Проф. д-р Јозеф Лауринчик

редовен професор на Факултетот за природни науки при Универзитетот „Константин Филозоф“ во Нитра, Словачка

Проф. д-р Данијела Кировски,

редовен професор на Факултетот за ветеринарна медицина во Белград при Универзитетот во Белград, Р. Србија

БЛАГОДАРНИЦА

Голема благодарност за проф. д-р Тони Довенски, кој покрај својот менторски ангажман за ова истражување, безрезервно се вложуваше во моето стручно и научно усовршување. Сесрдечно му се заблагодарувам на мојот професор, проф. д-р Владимир Петков кој ми даваше совети и поддршка во мојата работа за ова истражување, но кој истовремено се вложуваше за мојот стручен и научен напредок.

Се заблагодарувам на проф. д-р Лазо Пендовски и проф. д-р Флорина П. Перчиниќ, за нивната логистичка поддршка на ова истражување.

Им се заблагодарувам на Моника Довенска, ДВМ, доц. д-р Бранко Атанасов, доц. д-р Никола Адамов, Живко Живкоски, д-р Ивица Ѓуровски, моите сегашни и поранешни студенти Димитар Божиновски, Бојан Смиљанов, ДВМ, Крум Манавски, ДВМ, Виктор Ристов, ДВМ и Ненад Димковски за нивниот значаен придонес во лабораториската работа на ова истражување.

Посебна благодарност оддавам на Мирослав Радески, ДВМ, за отвореноста во споделувањето на неговите совети и идеи во однос на експерименталниот дизајн и статистичката анализа на ова истражување.

Се заблагодарувам на сегашните и поранешните членови на деканатската управа на Факултетот за Ветеринарна Медицина во Скопје за нивната поддршка во обезбедување на неопходните материјали и простории во текот на изведувањето на експерименталните процедури.

Голема благодарност до Миша Савиќ од „IMV Technologies“ за поддршката на ова истражување со обезбедување на потребните лабораториски реагенси.

**Посветено на моите најмили Башак и Теон, и на мојата
почитувана мајка Косара, кои беа и се инспирација на
мојата работа.**

Во чест и сеќавање на мојот татко Јордан (1945-2011).

СОДРЖИНА

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ.....	viii
ЛИСТА НА ТАБЕЛИ, ГРАФИКОНИ И ПРИЛОЗИ.....	x
ИЗВАДОК.....	1
АВСТРАСТ.....	3
I. ВОВЕД.....	5
II. ПРЕГЛЕД НА НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА.....	8
1. Криопрезервација на сперматозоиди од овни во течен азот	8
1.1. Ефекти на криопрезервацијата врз морфолошкиот и функционалниот интегритет на сперматозоидите.....	10
1.2. Оксидативен стрес и кислородно-реактивни-радикали како причинители на криогени оштетувања на сперматозоидите.....	11
1.3. Криопротективни материи употребувани во протоколите за криопрезервација на сперматозоиди од мали преживари.....	13
1.3.1. Трехалоза.....	13
1.3.2. Синтетски блокатори на кристали од мраз.....	14
1.3.3. Жолчка од јајце и n-3 полинезаситени масни киселини.....	15
2. Антиоксидативен систем на семиналната плазма.....	17
2.1. Сезонски варијации на антиоксидативната ензимска активност во семиналната плазма од овни.....	17
2.2. Улогата на глутатионот во гаметите на цицачите.....	19
3. Изолација и карактеризација на главните протеински фракции на семиналната плазма од овни.....	21
3.1. Влијание на семиналната плазма и нејзините компоненти во криопрезервациониот успех.....	23
3.2. Улога на протеините од семиналната плазма во редуцирање на тирозинската фосфорилација.....	26
3.3. Ефекти на семиналната плазма од овни врз сперматозоидите и фертилноста кај овците.....	27
4. Значајност на кинематичките параметри на сперматозоидите при процена на нивната фертилна способност.....	32
4.1. Морфолошки карактеристики на сперматозоидите кај цицачите.....	32

4.2. Теорија за флагеларното движење на сперматозоидите.....	35
4.3. Компјутеризирана анализа на движењето на сперматозоидите (CASA).....	37
4.3.1. Кинематички CASA параметри на сперматозоидите.....	39
4.3.2. Дефинирање на хиперактивираниите сперматозоиди според CASA кинематичките параметри.....	43
III. ЦЕЛИ.....	45
IV. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ.....	47
1. Експериментална постапка.....	47
2. Мострирање на ејакулати.....	48
3. Квалитативна и квантитативна хомогенизација на свежите ејакулати во збирен изворен примерок.....	49
4. Експериментални компоненти и ејакулатни раствори.....	49
4.1. Хомологна семинална плазма (HSP).....	49
4.2. Антиоксидативна компонента.....	50
4.3. Ејакулатни криопрезервациски медиуми.....	50
4.4. Ејакулатни суспензии.....	50
5. Криотретман - замрзнување на ејакулатните суспензии во течен азот (-196°C).....	51
6. После криотретман.....	51
7. Лабораториска анализа на примероците.....	52
7.1. Одредување на ејакулатниот волумен.....	52
7.2. Проценка на ејакулатната густина.....	53
7.3. Проценка на сперматозоидната брановидна подвижност.....	53
7.4. Одредување на клеточната концентрација.....	53
7.5. Проценка на мембранскиот и морфолошкиот интегритет на сперматозоидите...	54
7.6. Проценка на кинетичките карактеристики на сперматозоидите.....	55
8. Статистичка обработка на податоците.....	57
V. РЕЗУЛТАТИ.....	59
1. Описна статистика на квалитативните и квантитативните карактеристики на свежите ејакулати во HPS	59
2. Статистичка сензитивност на одделните анализи	59
3. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните КМ за анализите на 0-часови од инкубацијата	59

4. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните КМ за анализите на 3-часови од инкубацијата	60
5. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните и експерименталните КМ во а-СТ методот, за анализите на 0- и 3-часови часови од инкубацијата	62
6. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните и експерименталните КМ во б-СТ методот, за анализите на 0- и 3-часови часови од инкубацијата.....	65
7. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај експерименталните КМ во а-СТ и б-СТ	69
VI. ДИСКУСИЈА.....	74
1. Квалитативни и квантитативни карактеристики на свежите ејакулати.....	74
2. Сензитивност на статистички модел.....	75
3. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните КМ за анализите на 0- и 3-часови од инкубацијата	76
4. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните и експерименталните КМ во а-СТ методот, за анализите на 0- и 3-часови часови од инкубацијата	77
5. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните и експерименталните КМ во б-СТ методот, за анализите на 0- и 3-часови часови од инкубацијата	81
6. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај експерименталните КМ во а-СТ и б-СТ	86
7. Резиме на дискусијата.....	93
VII. ЗАКЛУЧОЦИ.....	96
VIII. СПИСОК НА ЛИТЕРАТУРА И ДРУГИ ИЗВОРИ.....	98
IX. ТАБЕЛИ И ГРАФИКОНИ.....	116
X. ПРИЛОЗИ И СЛИКИ.....	133

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

1,3,5-CHD	1,3,5-циклохексанетриол
1,3-CHD	1,3-циклохексанедиол
1,4-CHD	1,4-циклохексанедиол
Ac	Интегритет на акрозомот
AFP	Антикристални протеини
ALH	Амплитудата на латерално застранување на главата од просечна траекторија
ATP	Аденозин-три-фосфатот
BCF	Фреквенцијата на флагеларна ротација
b-CT	Метод на суспендирање сперматозоиди со криопрезервациски медиум после-криопрезервација
BSP	Протеини во семинална плазма на говеда
CASA	Компјутерски асистирани анализа на ејакулати
CAT	Каталаза
CT	Криотретман
DHA	Докосахепаеноичната киселина
EPA	Еикосапентаеноичната киселина
FD	Фракционата димензија
GPx	Глутатион пероксидаза
GR	Глутатион редуктаза
GSH	Редуциран глутатион
GSSG	Оксидираниот облик на глутатион
H _Y	Хармонични амплитуди
HAR	Фреквенција на фундаментална хармонија
HBS	Основна осцилација на главата
HNI	Бранова ширина на сигналот или површина на фундаментална хармонија
HHI	Највисока хармонија на осцилации на главата од сперматозоидот
HLO	Најниска хармонија на осцилации на главата од сперматозоидот

HMX	Максимална амплитуда на осцилации на главата
HPS	Хомоген изворен примерок
HSP	Хомологна семинална плазма
KM	Криопрезервациски медиум
LDL	Липопротеинска фракција со ниска густина
LIN	Праволиниски индекс
LN	Течен азот
MAD	Средното аголно поместување
MAG	Магнитуда на фундаментална хармонија
n3 PUFA	n-3 долголанчестите полинезаситени масни киселини
n6 PUFA	n-6 долголанчестите полинезаситени масни киселини
Pm	Интегритет на плазмена мембрана
PUFA	Полинезаситени масни киселини
RCI	Релативен индекс на придонес
SOD	Супероксид дисмутаза
STR	Линеарен индекс
VAP	Брзина по просечна траекторија
VCL	Брзина по криволиниска траекторија
VEL	Категории на сперматозоиди според опсези на VAP
VSL	Брзина по праволиниска траекторија
WOB	Алинеарен индекс
a-CT	Метод на суспендирање сперматозоиди со криопрезервациски медиум пред-криопрезервација
KPP	кислородно-реактивните-радикали
Mo	Морфологија на сперматозоид
СП	Семинална плазма

ЛИСТА НА ТАБЕЛИ, ГРАФИКОНИ, ПРИЛОЗИ И ИЛУСТРАЦИИ

ЛИСТА НА ТАБЕЛИ

Табела 1. Квалитативни карактеристики на свежите овнешки ејакулати.....	116
Табела 2. Квантитативни карактеристики на свежите овнешки ејакулати при нивно вклучување во збирниот изворен примерок.....	116
Табела 3. Параметри на сензитивност на χ^2 тестови на независност според степени на слобода, ацентрален параметар и статистичка моќност.....	117
Табела 4. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според структурен и морфолошки интегритет (VIAB) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми пред криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	120
Табела 5. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според индекс на елонгација на сперматозоидна глава (EL) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми пред криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	121
Табела 6. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според брзина на криволиниска траекторија (VCL) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми пред криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	122
Табела 7. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според праволиниски индекс на траекторија (LIN) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми пред криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	122
Табела 8. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми пред криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	122
Табела 9. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според мотилна брзина (VEL) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми пред криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	123
Табела 10. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според структурен и морфолошки интегритет (VIAB) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	124
Табела 11. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според индекс на елонгација на сперматозоидна глава (EL) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	125

Табела 12. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според брзина на криволиниска траекторија (VCL) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	125
Табела 13. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според праволиниски индекс на траекторија (LIN) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	126
Табела 14. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	126
Табела 15. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според мотилна брзина (VEL) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	127
Табела 16. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според структурен и морфолошки интегритет (VIAB) за аналити суспендирани со експериментални криопрезервациски медиуми пред и после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	128
Табела 17. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според индекс на елонгација на сперматозоидна глава (EL) за аналити суспендирани со експериментални криопрезервациски медиуми пред и после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	129
Табела 18. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според брзина на криволиниска траекторија (VCL) за аналити суспендирани со експериментални криопрезервациски медиуми пред и после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	129
Табела 19. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според праволиниски индекс на траекторија (LIN) за аналити суспендирани со експериментални криопрезервациски медиуми пред и после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	130
Табела 20. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH) за аналити суспендирани со експериментални криопрезервациски медиуми пред и после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	131
Табела 21. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според мотилна брзина (VEL) за аналити суспендирани со експериментални криопрезервациски медиуми пред и после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација.....	132

ЛИСТА НА ГРАФИКОНИ

Графикон 1. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди при додавање на контролен криопрезервациски медиум (C) пред (a-CT) и после криотретман (b-CT), за анализи на 0-часа од инкубација (%) во категории според структурен и морфолошки интегритет (VIAB).....	118
Графикон 2. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди при додавање на контролен криопрезервациски медиум (C) пред (a-CT) и после криотретман (b-CT), за анализи на 0-часа од инкубација (%) во категории според индекс на елонгација на сперматозоидна глава (EL).....	118
Графикон 3. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди при додавање на контролен криопрезервациски медиум (C) пред (a-CT) и после криотретман (b-CT), за анализи на 0-часа од инкубација (%) во категории според брзина на криволиниска траекторија (VCL).....	118
Графикон 4. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди при додавање на контролен криопрезервациски медиум (C) пред (a-CT) и после криотретман (b-CT), за анализи на 0-часа од инкубација (%) во категории според праволиниски индекс на траекторија (LIN).....	118
Графикон 5. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди при додавање на контролен криопрезервациски медиум (C) пред (a-CT) и после криотретман (b-CT), за анализи на 0-часа од инкубација (%) во категории според амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH).....	118
Графикон 6. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди при додавање на контролен криопрезервациски медиум (C) пред (a-CT) и после криотретман (b-CT), за анализи на 0-часа од инкубација (%) во категории мотилна брзина (VEL).....	118
Графикон 7. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди при додавање на контролен криопрезервациски медиум (C) пред (a-CT) и после криотретман (b-CT), за анализи на 3-часа од инкубација (%) во категории според структурен и морфолошки интегритет (VIAB).....	119
Графикон 8. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди при додавање на контролен криопрезервациски медиум (C) пред (a-CT) и после криотретман (b-CT), за анализи на 3-часа од инкубација (%) во категории според индекс на елонгација на сперматозоидна глава (EL).....	119
Графикон 9. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди при додавање на контролен криопрезервациски медиум (C) пред (a-CT) и после криотретман (b-CT), за анализи на 3-часа од инкубација (%) во категории според брзина на криволиниска траекторија (VCL).....	119
Графикон 10. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди при додавање на контролен криопрезервациски медиум (C) пред (a-CT) и после криотретман (b-CT), за анализи на 3-часа од инкубација (%) во категории според праволиниски индекс на траекторија (LIN).....	119

Графикон 11. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди при додавање на контролен криопрезервациски медиум (С) пред (а-СТ) и после криотретман (b-СТ), за анализи на 3-часа од инкубација (%) во категории според амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH)..... 119

Графикон 12. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди при додавање на контролен криопрезервациски медиум (С) пред (а-СТ) и после криотретман (b-СТ), за анализи на 3-часа од инкубација (%) во категории мотилна брзина (VEL)..... 119

ЛИСТА НА ПРИЛОЗИ

Прилог 1: Дијаграматски приказ на експерименталната постапка..... 133

Прилог 2. Дозволена вредност за разликата помеѓу две последователни мерења во хемотометар, базирано врз интервал на доверба од 95%..... 134

Прилог 3. Средна вредност на GSH во сперматозоиди кај различни видови на цицачи..... 134

Прилог 4. Средна вредност на GSH во семинална плазма кај различни видови на цицачи..... 134

ЛИСТА НА СЛИКИ

Слика 1. Криволиниска (VCL), праволиниска (VSL) и просечна траекторија (VAP) на сперматозоид..... 135

Слика 2. Методи кои се користеле за изведување на амплитудата на латерално застранување од просечната траекторија на сперматозоидот (ALH)..... 135

ИЗВАДОК

Комплементарното делување на семиналните протеински и антиоксидативни компоненти во регулацијата на кислородните радикали беше основа за испитување на криопрезервацискиот потенцијал на tris-hydorymethyl-aminomethane-криопрезервациски медиуми (tris-КМ) суплементирани со редуциран-глутатион (GSH) и хомологна семинална плазма (HSP). Постигнување на повисок криопрезервациски (КП) успех за сперматозоиди од овчеполска праменка беше испитуван преку следните цели на истражувањето: 1. Проценување на КП успех на сперматозоиди од овчеполска праменка при суспендирање со HSP/GSH суплементиран tris-КМ; 2. Проценување на КП успех при суспендирање на сперматозоиди од овчеполска праменка во пред- или после-КП период; 3. Проценување на инкубационото време во оптимизирање на ефектите на HSP/GSH tris-КМ. Поединечни ејакулати беа земени од десет овни (овчеполска праменка) со метод на вештачка вагина. Свежите ејакулати беа инкорпорирани во збиен примерок кој беше поделен на аликвоти-примероци (N=240). Беа подготвени четири tris-КМ: 1. (C) - без HSP и GSH; 2. (E1) - со GSH (5 mM); 3. (E2) - со HSP (20 %); и (E3) - со GSH (5 mM) и HSP (20 %). Една половина од примероците беа суспендирани во пред- (а-СТ), а другата во после-КП (b-СТ) период. После КП во течен азот, спроведена со стандардизиран протокол, примероците беа сместени во инкубациони услови на температура од 37°C, и беа анализирани на 0- и 3-часови. Успехот на криопрезервациската беше проценуван според степенот на задржување на структурниот интегритет, морфологијата (Hancock-2) и мотилноста (CASA – Hamilton Thorne). Интерпретацијата беше изведена со χ^2 тест на независност, чии критериуми за значајност беа утврдени согласно степените на слобода, нивото на статистичка веројатност ($p < \alpha$) и минималната χ^2 вредност, пресметани алгоритмички (G*Power v.3.1). E3 во а-СТ методот на 0-часови имаше висока застапеност на неоштетени клетки со задржана морфологија (57,16 %) и задржана линеарност на траекторијата кај мотилните клетки. C во а-СТ методот на 0-часови имаше највисока застапеност на клетки со оштетен структурен интегритет и морфологија (6,82 %) како и изразена девијација на траекторијата кај мотилните сперматозоиди. Во b-СТ методот на 0-часови, не постоеше значително отстапување во категоријата на сперматозоиди со неоштетен структурен интегритет кај C (50,05 %), E2 (48,95 %) и E3 (48,25 %), но во однос на линеарноста на траекторијата, C примероците имаа висока застапеност во категориите кои имплицираа девијација и хиперактивирана мотилност. E3 примероците од а-СТ методот на 0-часови имаа повисока застапеност на

сперматозоиди со неоштетен структурен интегритет (57,16 %) во однос на примероците од ЕЗ во b-CT методот (48,25 %). Заклучно со ова, комбинираното користење на GSH (5 mM) и HSP (20%) во tris-криопрезервациски медиум употребен во пред-криопрезервацискиот период за сперматозоиди од овчеполска праменка, резултираше со значително повисок криопрезервациски капацитет на одмрзнатите сперматозоиди од овчеполска праменка во споредба со оние кои одделно содржеа GSH (5 mM) или HSP (20%). Инкубационото време во после-криопрезервацискиот период го зголемуваше бројот на оштетени и хиперактивирани сперматозоиди, а додавањето на криопрезервацискиот медиум со овие компоненти во после-криопрезервацискиот период значително го зголеми процентот на акрозомски-активирани клетки.

Клучни зборови: сперматозоиди, овни, криопрезервација, редуциран глутатион, хомологна семинална плазма

ABSTRACT

The complementary effect of protein and antioxidant components of the seminal plasma in regulating oxidative radical concentration was the basic concept of investigating the cryopreserving potential of tris-based (tris-hydroxymethyl-aminomethane) media (tris-CM) supplemented with reduced glutathione (GSH) and homologous-seminal-plasma (HSP) in aim of achieving higher cryopreserving (CP) potential of ovchepolska pramenka spermatozoa. The aims of this research were: 1. To assess the CP success of ovchepolska pramenka spermatozoa extended in HSP/GSH supplemented tris-CM; 2. To assess the CP success of ovchepolska pramenka spermatozoa extended prior- or following-CP; 3. To assess the optimizing effect of incubation time on HSP/GSH supplemented tris-CM. Single ejaculates were acquired from ten rams (ovchepolska pramenka) with artificial vagina method. Fresh ejaculates were pooled in single volume which was divided in aliquotes-samples (N=240). Four tris-CM were prepared: 1. (C) - HSP and GSH free; 2. (E1) - with GSH (5 mM); 3. (E2) - with HSP (20 %); and (E3) - with GSH (5 mM) and HSP (20 %). One half of the samples were extended prior- (a-CT), and the other following-CP (b-CT). After the CP in liquid nitrogen, the samples were placed in incubation chamber (37°C) and were assessed at 0- and 3-hours incubation. The CP success was assessed according to the degree of retaining structural integrity, morphology (Hancock-2) and motility (CASA – Hamilton Thorne). Interpretation was performed by Pearson's χ^2 test of independence, which was evaluated according to degrees of freedom, probability levels ($p < \alpha$) and minimal χ^2 value, determined algorithmically G*Power v.3.1). E3 in a-CT method at 0-hour incubation had the highest proportion of cells with intact structural integrity and morphology (57.16 %), and retained trajectory linearity of motile cells. C in a-CT method at 0-hour incubation had the highest proportion of cells with deteriorated integrity and morphology (6.82 %) as well as highly deviated trajectory of the motile cells. In b-CT method at 0-hour incubation, there were no significant discrepancies for spermatozoa categories with intact structural integrity in C (50.05 %), E2 (48.95 %), and E3 (48.25 %). Despite this, C had high deviation of trajectory linearity. E3 samples of a-CT at 0-hour incubation had higher proportion of spermatozoa with intact structural integrity (57.16 %) in relation to E3 samples of b-CT method (48.25 %). It was conclusive that the combined supplementation of GSH (5 mM) and HSP (20 %) in tris-CP media used for extending ejaculates prior CP, resulted in significantly higher CP capacity for ram spermatozoa of ovchepolska pramenka compared to other tris-CP media which contained GS (5 mM) or HSP (20 %). Post-thaw incubation time

of 3-hours has increased the number of spermatozoa with damaged structural integrity, affected morphology or hyper-activated motility, regardless of the CP-media or extending method.

Key words: spermatozoa, ram, cryopreservation, reduced-glutathione, homologous-seminal-plasma

I. ВОВЕД

Со забрзаниот развој на сточарството на глобално ниво, генетскиот диверзитет почнува да се редуцира во повеќе региони на светот (Mara и соp., 2013). Околу 17% од животинските видови се на прагот од истребување (Anzalone и соp., 2018). Како еден од обидите за намалување на овој тренд, е воспоставување на матични стада од одредени видови и раси на животни, но за тоа се неопходни големи финансирања кои најчесто се обезбедени на национално ниво (Prentice и соp., 2011). Како поевтина метода е искористена криопрезервацијата на гаметни клетки со која се овозможува пренос на расплоден материјал, без притоа да се врши транспорт на животни. Сепак, криопрезервацијата на гаметни клетки нема унифициран метод за сите животински видови, поради различните биолошки и функционални карактеристики.

Праменката како раса на овца е широко застапена на Балканскиот полуостров, фенотипски изразена во повеќе соеви. Во Р. С. Македонија (PCM), праменката е застапена во два соеви: овчеполски и шарпланински (Dzabirski и Andonov, 1998). Популацијата на овци во Р. С. Македонија од 1993 година има тренд на опаѓање кој се карактеризира со неколку позначителни периодични промени според статистичкиот годишник на РМ од 1999 до 2016. Првиот позначителен пад во бројноста се случува во периодот од 1993 – 1997 година, каде од околу 2,5 милиони овци се сведува на околу 1,5 милион. Вториот позначителен период е меѓу 1998 и 2006 година каде трендот е приближно линеарен, со бројност помеѓу 1,0 – 1,5 милион овци. Третиот период е од 2007 до 2015, кој повторно се карактеризира со намален, но линеарен тренд во бројноста, која се движи околу 0,7 – 0,8 милиони овци. Најголем дел од популацијата на овци во Р. С. Македонија се од мелезен тип, во кој фенотипски доминантно преовладува овчеполскиот сој (Dzabirski и Andonov, 1998). Според неофицијални податоци од здружението на одгледувачи на овчеполската праменка во Р. С. Македонија, кои се повикуваат на матично книговодство воведено во регистрираните одгледувачки објекти, бројот на овој автохтон сој изнесува околу 4,000 грла. Следејќи го опаѓачкиот тренд на популацијата на овци во Р. С. Македонија, вклучително и на овчеполската праменка, би можело да се очекува дека оваа тенденција ќе продолжи и во следните години доколку не се преземат соодветни мерки за нејзина заштита. Министерството за земјоделство, шумарство, водостопанство на Р. С. Македонија (МЗШВ) во 2010 година објави програма за заштита на биолошката разновидност во сточарството во која беше опфатена и овчеполската праменка. Факултетот за ветеринарна медицина во Скопје

(ФВМС) активно учествуваше во спроведувањето на оваа програма преку создавање на ген банка со криопрезервација на семенски материјал од машки расплодници.

Во репродуктивната биотехнологија, криопрезервацијата зазема значително место. Со замрзнување на ејакулати од мажјаци може да се обезбеди генетски и расплоден материјал за поголем број на грла со што се олеснува контролата на генетската селекција и се редуцираат финансиските трошоци за одгледување на машките расплодници. Дополнително, криопрезервираните ејакулати може безбедно да се транспортираат и манипулираат, независно од времето и местото на нивната употреба (Salamon и Maxwell, 2000). Целта на криопрезервацијата е да се суспендира метаболизмот на сперматозоидите при што периодот за нивно одржување би можел да биде речиси неограничен. Според одредени наоди (Salamon и соp., 2004), замрзнати овнешки ејакулати во течен азот (-196°C) може да ја задржат својата фертилна способност и до 35 години.

Криопрезервацијата во течен азот (криотретман) причинува значителни промени во клеточниот интегритет и функционалниот капацитет на сперматозоидите намалувајќи ја нивната фертилизирачка способност. Во криопрезервираните ејакулати од овни, 40-60% од клеточната популација имаат задржана подвижност (мотилност), а 20-30% имаат задржан биолошкиот и функционалниот интегритет (Salamon и Maxwell, 2000). Во однос на другите фармски одгледувани видови на животни, овие податоци укажуваат на ниската криотолеранција на овнешките сперматозоиди. Како можна причина се сметаат специфичности во структурата на клеточната мембрана и начинот на кој таа е афектирана, како на пример повисок степен на липидна пероксидација на мембранските фосфолипиди поради нивна поголема застапеност. Како главен причинител на овие процеси се кислородно-реактивните-радикали (КРР) кои произлегуваат од нормалната метаболичка активност на сперматозоидите (Salamon и Maxwell, 2000). Постејакулативните сперматозоиди имаат незначителни количини на цитоплазма, поради тоа што синтетските процеси не се неопходни за нивната функција, а главното депо за метаболички суровини како и за антиоксидативни компоненти е лоцирано во семиналната плазма (СП) (Alvarez и Storey, 1989). Најважни компоненти на ејакулатниот антиоксидативен систем кај овните, но и кај повеќето цицачи, се супероксид дисмутазата (SOD), каталазата (CAT), глутатион редуктазата (GR) и глутатион пероксидазата (GPx), (Marti и соp., 2007). Поради ниската концентрација на CAT во СП и цитоплазмата, приматот го заземаат редуцираниот глутатион (GSH) и GPx кои го

отстрануваат водородниот пероксид (Alvarez и Storey, 1989). Во научната литература познати се повеќе обиди за намалување на криолошки негативни ефекти кај овнешките сперматозоиди, кои вклучуваат употреба на антиоксидативни материи (Busak и сор., 2007), протеински фракции од семинална плазма на свежи ејакулати (Bergeron и сор., 2005), фосфолипидни компоненти (Manjunath и Thérien, 2002) и сл. Протеинските компоненти на СП се смета дека имаат стабилизирачки ефект на клеточната мембрана, па била употребувана во пред- и пост-криопрезервацискиот период со цел подобрување на криопрезервацискиот успех во *in-vitro* услови (Maxwell и сор. 1999; Ghaoui и сор., 2007; Mataveia и сор., 2010; Perez-Pe и сор., 2001). Други наоди се спротивставуваат на релативизирањето на улогата на СП за поттикнување на хиперактивација и акрозомска реакција, која неминовно би го намалила процентот на сперматозоиди способни да извршат фертилизација во пост-криопрезервацискиот период (Ledesma и сор., 2015; Rovegno и сор., 2013).

И покрај обемиот извор на научни информации за користењето на СП или GSH како додатоци во криопрезервациските медиуми со цел зголемување на криопрезервацискиот успех на ејакулати од овни, според нашите сознанија, не постојат податоци за нивно истовремено (комбинирано) користење во единствен медиум за постигнување на истата цел. Според одредени научни податоци, специфични протеински фракции на СП од овни имаат способност да стапуваат во интеракција со антиоксидативните компоненти, како што е глутатион-редуктазата, неопходна за нормално функционирање на GSH (García, E.M., и сор., 2006; Martí и сор., 2007). Оттука, следејќи ја оваа хипотеза, сметавме дека хомологната семинална плазма (HSP) во комбинација со GSH би можеле да го зголемат антиоксидативниот капацитет на свежите ејакулати и да обезбедат структурни елементи (протеински фракции, фосфолипиди, холестерол и сл.) кои би биле адсорбирани на оштетените домени од плазмената мембрана, репарирајќи ги. Овој комбиниран ефект во криопрезервациски медиуми, би можел да придонесе за зголемување на застапеноста на криопрезервирани сперматозоиди од овчеполска праменка кои имаат неоштетен структурен интегритет и задржан капацитет за оплодување. Очекувавме ефектите да бидат остварливи преку регулирањето на концентрацијата на оксидативните радикали кои поинтензивно се создаваат при лабораториска манипулација и криопрезервација на сперматозоидите, и преку зголемувањето на соодносот помеѓу СП и сперматозоидите. Со остварување на овие цели, очекувавме да го зголемиме криопрезервацискиот капацитет на класичните криопрезервациски медиуми кои се употребуваат за ејакулати

од овчеполска праменка, придонесувајќи во подобрување на протоколите за конзервирање на гаметни клетки од овој автохтон вид и сој на овци.

II. ПРЕГЛЕД НА НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА

1. Криопрезервација на сперматозоиди од овни во течен азот

Во ревијална студија (Salamon и Maxwell, 2000) се опишани неколку истражувања поврзани со криопрезервација на сперматозоиди, опишани подетално во понатамошниот текст. Првите обиди за криопрезервација на сперматозоиди од овни се направени во 1937 година од Bernstein и Petropavlovsky, подетално опишани во ревијалната студија. Користејќи раствор на глицерол (1 M, 9,2%), успешно замрзнале сперматозоиди од цицачи (зајак, морско прасе, овен, бик, нерез, пастув) и птици (еребица и петел) на температура од -21°C . Раствор на глицерол, со концентрации од $\geq 18\%$ имал токсичен ефект врз сперматозоидите. Smirnov во периодот помеѓу 1947-1950 година, ја истражувал витрификацијата на мали волумени ејакулати (0,05 - 0,10 mL) од овни и бикови, без употреба на глицерол. Од 19 осеменети овци, секоја со 3-5 осеменувања, со употреба на замрзнати ејакулати (15 min на -78°C), седум останале сјагни, со 11 живородени јагниња, а со осеменување на 11 крави, биле добиени 5 телиња. Истражувањата за криопрезервација продолжиле поинтензивно после 1950 година. Blackshaw и Emmens, во 1953 година утврдиле дека растворите за замрзнување кои биле користени за бикови, не давале иста ефикасност и кај овните. Во овој период биле истражувани цела плејада на криопротективни материи, криопрезервациски методи и криодефекти на сперматозоидите од цицачи. Нискиот криопрезервациски успех на сперматозоидите од овни (Watson, 2000; Medeiros, 2002), бил демонстриран со зголемена ембрионална смртност и нарушена миграција на сперматозоидите во женскиот генитален тракт (Gillan и соp., 2004; Barbas и Mascarenhas, 2009).

Постоечките криопрезервациски протоколи за мали преживари се модифицирани од оние за бикови (Chunrong и соp. 2018). Индикативно е дека тие се повеќе адекватни за сперматозоиди од кози отколку за овни (Chunrong и соp., 2018). Интрацервикалното осеменување со криопрезервирани сперматозоиди дава многу повисок успех кај козите во споредба со овците. Структурата на цервикалниот канал се смета како една од причините за разликите во овие резултати (Foote, 2002). Криопрезервацијата дејствува примарно на протоплазматската мембрана на сперматозоидите што доведува до

намалени функционални карактеристики (Holt, 2000). Во споредба со нискиот успех од интрацервикалното осмененување (Maxwel и сop., 1999), интраутериното депонирање на криопрезервирани сперматозоиди резултирало со многу повисоки вредности (Watson, 2000; Holt, 2000). Било демонстрирано дека за успешно интраутерино осемнување на овците (> 50% сјагност), неопходна е концентрација од 20 милиони криопрезервирани сперматозоиди, во споредба со интрацервикалното осемнување за кое се потребни 10 пати поголеми концентрации (Maxwel, 1986).

Криопрезервацијата значително го продолжува векот на складирање на сперматозоидите од цицачи во *in vitro* услови, примарно поради инхибиција на метаболитичката активност во замрзната состојба. Во ревијална студија (Chunrong и сop., 2018), е најден податок од конференциски материјали за криопрезервирани сперматозоиди од овни чија фертилна способност била задржана и до 35 години.

Методологијата за криопрезервација на сперматозоиди од овни најпрво ја вклучува фазата на собирање, која најчесто се изведува со метод на вештачка вагина, а поретко и со електроејакулација. Последниот метод најчесто е критикуван поради ефектот кој го има врз составот на СП, што може да резултира со намалена отпорност на сперматозоидите при криопрезервацијата (Chunrong и сop., 2018). Со цел да се избегнат негативните ефекти во оваа фаза, неопходно е да се елиминираат услови на контаминација (урина, фецес, крв и сл.) или на термален шок (ниски температури). Квалитативните и квантитативните карактеристики на ејакулатот се проценуваат непосредно после фазата на собирањето и најчесто вклучуваат проценување на волумен, клеточна концентрација, мотилност и морфолошка исправност на сперматозоидите. Дополнително, се користат тестови со кои се проверува интегритетот на протоплазматската и акрозомската мембрана (хипоосмотски тест-HOST или боење-Nancosk2), или *in vitro* фертилизациската способност на сперматозоидите (Faigl и сop., 2012). Утврдувањето на параметри за прецизно проценување на фертилната способност на сперматозоидите е дискутабилен процес за кој е неопходно опсежно истражување. Според одредени автори, HOST методот има висока веродостојност и повторливост (Matsuoka, T. и сop., 2006), но според други, уште поголема важност имаат мотилноста, хроматинскиот интегритет и митохондријалната активност (Kasimanickam и сop., 2011; Zhang и сop., 1998; Januskauskas и сop., 2003). И покрај бројните истражувања, сепак тешко е да се одреди еден параметар кој би давал најблиски вредности за фертилната способност на сперматозоидите, со оглед на тоа дека успешното оплодување зависи и

од други фактори, како што е еструсот кај женките, нивната фертилност, сезонската активност, но и методите кои се употребени за вештачко осеменување (интрацервикално или интраутерино) (Faigl и сор., 2012). После иницијалното проценување на квалитативните и квантитативните карактеристики на ејакулатот, може да се изврши негово суспендирање (разредување) во криопрезервациски медиуми (раствори), кои содржат Tris, фруктоза или гликоза, лимонска киселина, глицерол, антибиотици и жолчка од јајце. Степенот на разредување може да варира помеѓу 11 и 26 (Salamon и Maxwell, 2000) при што треба да се внимава да не се предизвика ефект на преголема разреденост. За овнешките ејакулати, се препорачува 2-5 кратно суспендирање на сперматозоидите, зависно од содржаните компоненти во растворот (Salamon и Maxwell, 2000). Постои можност и за двофазно разредување, каде најпрво се користи раствор без глицерол, а потоа и раствор со глицерол. Обично, концентрацијата на глицерол во овие раствори може да варира меѓу 4% и 6% (Salamon и Maxwell, 2000). Следната фаза е еквилибрација на сперматозоидите во ниски температури со намален метаболизам, која се постигнува со постепено намалување на температурата до +4°C во период од 1,5 до 2 часа, а потоа со задржување на оваа температура за уште 2 часа (Faigl и сор., 2012; Cseh и сор., 2012). Ова е неопходно за да се овозможи адаптација на сперматозоидите, но и еквилибрација на криопротективните материи (глицерол) во и надвор од клетката (Salamon и Maxwell, 2000). После еквилибраирањето, разредените ејакулати може да се замрзнат со автоматизиран протокол (-8°C/min), или спакуваните примероци (пластични паети) се изложуваат на температури од -75°C до -125°C, во временски период од 7-10 min, со нивно поставување над нивото на течниот азот (6 cm) (Salamon и Maxwell, 2000, Faigl и сор., 2012). Одмрзнувањето се изведува на температура од 35°C до 40°C (водена бања), во период од 30 sec.

1.1. Ефекти на криопрезервацијата врз морфолошкиот и функционалниот интегритет на сперматозоидите

Главните оштетувања кои ги претрпуваат сперматозоидите во процесот на криопрезервација се однесуваат на физичките (структурните) и функционалните (биохемиските) особини (Salamon и Maxwell, 2000). Плазмената, акрозомската мембрана, митохондриите, хромозомот и опашниот сегмент имаат различен степен на криогени оштетувања. Мотилноста како функционална, а опашниот дел и хроматинот

како структурна компонента, имаат поголема резистентност кон криолошките ефекти (Salamon и Maxwell, 2000). Протоплазматската, акрозомската мембрана и митохондриите се главните морфолошки структури кои имаат значителни промени во текот на криотретманот (Salamon и Maxwell, 2000). Преку биохемиски истражувања на сперматозоиди од циначи, било демонстрирано дека овие морфолошки дефекти се поврзуваат со ослободувањето на протеини и липиди од нивната структура (Derin-Bennett, и сop., 1973). Освен директното физичко влијание на криопрезервацијата врз претходно споменатите структури, удел имаат и индиректните влијанија, како што се KPP, чие создавање е поттикнато како последица на биохемиските и морфолошките оштетувања, со кои значително се намалува фертилната и мотилната способност на сперматозоидите (Salamon и Maxwell, 2000; Juvena и Stelletta, 2012). Температурните промени во опсегот меѓу 20°C и 0°C, предизвикуваат термален шок кој е проследен со нарушување на мембранскиот интегритет на клетките како последица на создавањето кристали од мраз (Drobnis и сop., 1993). Во температурниот опсег меѓу +5°C и +15°C настануваат пукнатини во нејзината структура со кои се појавуваат процеси на фазно одвојување (Drobnis и сop., 1993), кои се делумно повратни во физиолошките температурни размери (Perez-Pe и сop., 2001).

1.2. Оксидативен стрес и кислородно-реактивни-радикали како причинители на криогени оштетувања на сперматозоидите

KPP првенствено реагираат со полинезаситените масни киселини кои се составен дел на мембранските фосфолипиди и имаат важна улога во одржувањето на мембранскиот интегритет (Aitken, 1991). Меѓу позначајните видови на KPP се: супероксидните анјонски (O_2^-), хидроксидните (HO^-) и нитроксидните (NO^-) радикали (Lenzi и сop., 1996). Водородниот пероксид (H_2O_2), кислородот (O_2) и хидрохлорната киселина ($HOCl$), кои се создаваат како производи на метаболизмот, не се типични KPP бидејќи имаат електронски парови кои не се слободни да реагираат. Во аеробните клетки, најважен извор за O_2^- (полуживот 0.4-1000 μs) е електронскиот транспортен ланец во митохондриите и во ендоплазматскиот ретикулум. За секои четири електрони кои се предадени на цитохром оксидазниот комплекс, настанува редукција на еден молекул O_2 во два молекули на вода (Lenzi и сop., 1996). Некои делови од електронскиот транспортен ланец, особено NADH-коензим Q (CoQ) редуктазниот комплекс и

редуцираните форми на CoQ, отпуштаат неколку електрони на O₂ со унивалентна редукција, создавајќи O₂⁻, H₂O₂ и HO- радикали (унивалентен правец на редукција). Степенот на унивалентниот правец како и последователното создавање на KPP е правопрпорционално со одвивање на процесите на оксидативна фосфорилација и липопероксидација. Митохондриите имаат фосфолипиди во својата структура кои се со висок степен на незаситеност, што ги прави да бидат подложни на липопероксидативните процеси (Lenzi и сор., 1996). Супероксидните анјонски радикали се создаваат во микрозомите и протоплазматската мембрана. Хидропероксилните радикали се едни од најмоќните оксиданти и се најзастапената форма на супероксиди кои се создаваат во реакција со мембранските фосфолипиди. Имаат способност да вршат пероксидација на неестерифицирани масни киселини, отпочнувајќи сериска реакција (Bielski и сор., 1983). Водородниот пероксид е еден од најстабилните меѓупроизводи на кислородната редукција. Тој се создава при унивалентната редукција на кислородот, а може да се создава и во различни клетки кои се вклучени во воспалителни реакции преку мембранскиот NADH оксидазен систем и ксантин оксидазниот систем. За разлика од O₂⁻, водородниот пероксид ја поминува протоплазматската мембрана скоро исто како и водата. Во суштина, тој е цитотоксичен и има слаби оксидирачки својства, но во присуство на метали како што се железото или бакарот, создава многу потоксични хидроксилни радикали преку Фентоновата реакција (Lenzi и сор., 1996). Хидроксилните радикали се создаваат во фаза на респираторни реакции предизвикани од неутрофилите и макрофагите кои се помалку токсични производи од супероксидните анјони и водородниот пероксид. Разградувањето на липидните хидропероксиди во реакција со супероксидните анјонски радикали или во реакција со водородниот пероксид и метали, доведува до создавање на хидроксилни радикали. Тие се многу активни (полуживот 90.3 ns) и реагираат со скоро сите молекули во клетката, непосредно на местото на нивното создавање. Тие предизвикуваат биолошко оштетување на клетките, реагирајќи со структури кои се неопходни за нејзино нормално одржување во живот. Клеточната хомеостаза се одржува преку регулација во концентрацијата на материи кои лесно се пероксидаат, како што се полинезаситените масни киселини, но и преку ефективноста на системите за редукција на слободните радикали. Оксидативниот стрес би можел да се дефинира како нарушен сооднос помеѓу про-оксидативните и антиоксидативните материи, во кои првите преовладуваат (Lenzi и сор., 1996).

1.3. Криопротективни материји употребувани во протоколите за криопрезервација на сперматозоиди од мали преживари

1.3.1. Трехалоза

Истражувањата за употребата на трехалозата (α - D - глюкопиранозил - α - D - глюкопиранозид) се актуелни во криобиологијата и репродукцијата кај домашните животни. Инспирацијата за употребата на оваа материја како криопротектант е што истата е најдена во големи концентрации кај одредени видови на организми (бактерии, габи, растенија) во фаза на криобиоза и анхидробиоза (Pereira и сор., 2008). Понови истражувања со употреба на трехалозата во криопрезервација на сперматозоиди од овни потврдуваат на зголемување во криопрезервацискиот успех (Quan и сор., 2012; Aisen и сор., 2002; Jafaroghli и сор., 2011). Во друго истражување, нагласен е негативниот ефект на трехалозата при нејзина употреба во многу високи концентрации, како последица на осмотски шок (Aisen и сор., 2002). Во споредба со други облици на олигосахариди, како што е сукрозата, ефектот на трехалозата е индициран како посупериорен (Aboagla и сор., 2003; Quan и сор., 2012; Jafaroghli и сор., 2011). Сепак, постојат и контрадикторни наоди кои даваат различни толкувања за ефектот на трехалозата и сукрозата врз мотилноста на сперматозоидите (Molinia и сор., 1994), што може да се должи на различните експериментални поставки. За разлика од моносахаридите, трехалозата не може да ја помине протоплазматската мембрана, па нејзиното примарно дејство е екстрацелуларно. Сепак, според други извори, за оптимално дејство на трехалозата, неопходно е таа да биде присутна на двете страни од клеточната мембрана (Crowe и сор., 2001). Биле направени обиди за нејзино интрацелуларно внесување преку термотропна липидно-фазна транзиција (Sathpaty и сор., 2004) и микроинјектирање (Eroglu и сор., 2003), но резултатите и ефективноста на овие методи би требало да биде дополнително валидирана. Сè уште е недоволно познат механизмот на криопротективно дејство на трехалозата, иако е познато дека неговата стаклено-транзициска температура (-30°C) е многу повисока во однос на конвенционалните криопротектанти, како што е етилен гликолот (-85°C) и глицеролот (-65°C) (Pereira и сор., 2008). Нејзиниот примарен ефект е во поттикнување на екстрацелуларната витрификација и намалување на процесот за создавање на кристали од мраз. Има способност да ја замени водата во макромолекулите преку водородните врски и ја зголемува флуидноста на протоплазматската мембрана, со што го намалува процентот на криодефекти (Aboagla и сор., 2003; Crowe и сор., 2001). Се претпоставува дека трехалозата може и физички да ја заштити протоплазматската

мембрана преку спречување на прекумерните волуменски промени во текот на криопрезервацијата (Liu и сор., 1998). Посочени се и антиоксидативни својства на трехалозата во мали концентрации (Tuncer и сор., 2013; Iqbal и сор., 2016), како и редуцирање на осмотската сензитивност и иницирање на акрозомска реакција во текот на криопрезервација на сперматозоиди од овни (Ahmad и сор., 2015).

1.3.2. Синтетски блокатори на кристали од мраз

Спречувањето на кристали од мраз во текот на криопрезервацијата претставува голем предизвик во криобиологијата. Со оглед на нивното дејство врз биолошкиот интегритет на криопрезервираните клетки, би постоело значително подобрување на успехот во криопрезервацијата доколку тие се редуцираат. Кај некои поедноставни организми, идентификувани се неколку протеини кои учествуваат во криопротекцијата, и им овозможуваат нормално функционирање на ниски температури (криотолеранција). Ваков облик на протеини е откриен кај вид на антарктички риби (DeVries и Wohlschlag, 1969). Тие најпрво биле именувани како антикристални протеини (AFP), кои влијаат врз процесот на формирање кристали од мраз (Chapsky и Rubinsky, 1997; Ishiguro и Rubinsky, 1994), спречуваат рекристализација (Knight и сор., 1984; Knight и сор., 1988), и стапуваат во реакција со протоплазматската мембрана (Rubinsky и сор., 1991; Rubinsky и сор., 1992), обавувајќи го криопротективното дејство и врз ткива од цицачи. До сега, овие протеини се употребувани во криопрезервација на сперматозоиди од овци (Payne и сор., 1991), говеда (Prathalingam и сор., 2006), глувци (Koshimoto и Mazur, 2002), и шимпанза (Younis и сор., 1998). AFP имале позитивен ефект врз мотилноста на сперматозоидите од шимпанза (Younis и сор., 1998) и на задржување на акрозомскиот интегритет на сперматозоиди од овни (Payne и сор., 1991). Сепак, постојат дебати за нивната применливост, со оглед на тоа што се покажале како неуспешни во блокирањето на кристали од мраз при криопрезервација на сперматозоиди од глувци (Koshimoto и Mazur, 2002). Во моментот, достапни се три видови на комерцијални AFP (AFP-I, AFP-III, и антифриз гликопротеин) (Prathalingam и сор., 2006). Со оглед на нивната висока цена, биле направени обиди за синтетизирање на нови материи кои би ги замениле AFP (Wang и сор., 2003; Wowk и Fahy, 2002; Wowk и сор., 2000), при што случајно биле откриени непротеински материи (Chou, 1992). За спречување на витрификациските ефекти бил предложен и поливинил алкохолот (Wowk и Fahy, 2002; Wowk и сор., 2000). Биле

правени и обиди за моделирање на молекуларната структура на овие материи при замрзнување, со што тенденцијата била да се создаде форма која нема да прави физичко оштетување на клетките (Taylor и сор., 2004). Материи како 1,3,5-циклохексанетриол (1,3,5-CHD), 1,3-циклохексанедиол (1,3-CHD), и 1,4-циклохексанедиол (1,4-CHD) имале соодветна геометриска структура на молекуларната конформација со која можело да се влијае врз начинот на формирање на кристалите од мраз (Taylor и сор., 2004). 1,3,5-CHD има инхибиторен ефект во апоптозата на криопрезервираните сперматозоиди од овни (Quan и сор., 2013). Криопротективниот ефект на 1,3-CHD врз сперматозоиди е нешто поизразен во однос 1,4-CHD (Taylor и сор., 2004).

1.3.3. Жолчка од јајце и n-3 полинезаситени масни киселини

Липидниот состав на протоплазматската мембрана е важен фактор кој ја дефинира сензитивноста на сперматозоидите кон криодефекти, мотилноста, и клеточниот интегритет (Hammerstedt и сор., 1990). Висока застапеност имаат n-3 долголанчестите полинезаситени масни киселини (n3 PUFA), особено докосахекаеноичната киселина (DHA) и еикосапентаеноичната киселина (EPA) (Esmaeili и сор., 2015; Strzezek и сор., 2004). Овие структурни карактеристики ѝ овозможуваат на протоплазматската мембрана поголема флуидност со што таа е поотпорна на криодефектите (Rooke и сор., 2001). Докажано е дека, од сите PUFA во мембранските структури на сперматозоидите, DHA е најдоминантна, и нејзината концентрација е високо корелирана со мотилноста и фертилната способност (Samadian и сор., 2010). Во текот на криопрезервацискиот процес, концентрацијата на DHA опаѓа поради липопероксидативните процеси (Kaeoket и сор., 2008) поттикнати од KPP (Martinez-Soto и сор., 2013). Додавањето на PUFA во разредители за криопрезервација, било предложено како метод за редуцирање на криодефектите од KPP (Wathes и сор., 2007). Кај биковите овој ефект бил забележан по алиментарно додавање на DHA (Gholami и сор., 2010). Додавањето на DHA и EPA во цитратни разредители за криопрезервација на биковски сперматозоиди ја намалило нивната мотилност и клеточен интегритет при ладење во период од 7 дена (Kiernan и сор., 2013), но ја подобрило мотилноста и мембранскиот интегритет кај криопрезервирани сперматозоиди од нерези (Chanariwat и сор., 2012). DHA во друг тип не криоразредител (BioXcell), покажал позитивни криопрезервациски својства на сперматозоидите од бикови (Kaka и сор., 2017). За криопрезервација на сперматозоиди

од овни биле направени обиди за додавање на DHA преку рибино масло, по што биле констатирани подобрени карактеристики на одмрзнатите клетки (Abdi-Benemar и сор., 2015). Претходните наоди биле потврдени во друго истражување (Thagilou и сор., 2017), каде било утврдено дека додавањето на различни концентрации на n-3 PUFA нема подобрувачки ефект на криопрезервираните сперматозоиди од овен. Повисоки концентрации (50 ng/mL^{-1}) додадени во криопрезервацискиот разредител ја намалиле вкупната мотилност, биолошкиот интегритет, протоплазматскиот интегритет, и го зголемиле процентот на сперматозоиди со нарушена морфологија. Како причина се наведува додавањето на жолчка од јајце кое го зголемува учеството на PUFA во суспензијата со сперматозоиди што придонесува до интензивирање на липопероксидативните процеси кои го нарушуваат интегритетот на клетките. Овие наоди биле во контрадикторност со претходно наведените извори, што остава простор за дополнително истражување и интерпретирање на резултатите. Дополнително, како причина за нискиот криопрезервациски успех е наведено отсуството на додатни количини на антиоксиданси кои би придонеле за еквилибриумот со KPP. Во друго истражување, било забележано дека додавањето на α -токоферол во криопрезервациски разредител за сперматозоиди од овни го подобрува криопрезервацискиот успех (Abdi-Benemar и сор., 2015). Слично, додавањето на L-цистеин во криопрезервациски разредител со жолчка од јајце, дало значително подобрување во криопрезервацискиот успех на сперматозоиди од нерези (Chanariwat и сор., 2009). Било забележано дека n-3 PUFA суплементираниот криопрезервациски разредител имал повисоко изразени негативни ефекти врз сперматозоидите од овни кои биле добиени во расплодниот период (Септември), во споредба со оние добиени во вон-расплодниот период (Јули). Ова било објаснето со различниот начин на интеракција помеѓу квалитативните карактеристики на ејакулатите и n-3 PUFA (Thagilou и сор., 2017). Соодносот на n-6 и n-3 PUFA во опашниот дел на сперматозоидот е помал во текот на летниот период, споредбено со зимскиот (Argov-Argaman и сор., 2013). Во текот на летниот период, учеството на DHA од вкупната концентрација на PUFA во сперматозоидите од овни изнесува 44,9% (Diaz и сор., 2015). Овие сезонски варијации ги објаснуваат разликите во криопрезервацијата на сперматозоидите од овни и нивното однесување во однос на криопротективните компоненти на разредителот (пр. PUFA) (Thagilou и сор., 2017). Оттука, се претпоставува дека во сезоната во која ејакулатите имаат висок процент на сперматозоиди со високи квалитативни карактеристики и високи концентрации на n-3 PUFA, додавањето на дополнителни количини предизвикува поголем процент на

оштетувања, споредбено со ејакулати добиени во други сезони (Thagilou и сор., 2017). Дополнително, се препорачува користење на антиоксидативни материи во криопрезервациските разредители со кои би се еквилибрирал ефектот на KPP кои се создаваат во текот на криопрезервацијата (Thagilou и сор., 2017).

2. Антиоксидативен систем на семиналната плазма

Во ејакулатите на овни главните, компоненти на антиоксидативниот систем се: SOD, GR, GPx, GSH, оксидираниот облик на глутатион (GSSG), и CAT (Marti и сор., 2007; Ghaoui и сор., 2007). СП е единствениот телесен секрет кој содржи највисока концентрација на антиоксиданси што го компензира недостатокот на цитоплазма и интрацелуларни антиоксидативни ензими во сперматозоидите (Juyena и Stelletta, 2012). Ензимот CAT, кој е со потекло од надсемениците, ги заштитува незрелите сперматозоиди кои сè уште се наоѓаат во нивниот лумен, додека SOD и GP кои се лачат во семиналните везикули ја обавуваат оваа функција во постејакулативниот период (Zubkova и Robaire, 2004). Дел од овие ензими се идентификувани во неколку региони на сперматозоидот: SOD во акрозомот, постакрзомот и опашниот дел, GPx во постакрзомот и апексот (врвот) на главата, и GR во опашниот дел (Marti и сор., 2008). Од трите изоформи на SOD кај преживарите (Cu-Zn-SOD, Mn-SOD и екстрацелуларниот e-SOD), Cu-Zn-SOD е најактивната форма во СП, додека останатите две имаат значително помала активност (Cardozo и сор., 2006). SOD врши спонтанa трансформација на O^{2-} во O_2 и H_2O_2 , а CAT го трансформира H_2O_2 во H_2O и O_2 (Alvarez и сор., 1987).

2.1. Сезонски варијации на антиоксидативната ензимска активност во семиналната плазма од овни

Концентрацијата на KPP има висока корелација со инфертилноста кај разни видови на цицачи (Huszar и Vigue, 1994; Sharma и Agarwal, 1996). Неопходно е постоење на рамнотежа во нивното создавање за да може да се одвиваат нормално процесите на сперматозоидна активација и оплодување (Pasqualotto и сор., 2001). Прекумерното создавање или целосното неутрализирање на KPP доведува до нарушување на нормалните клеточни процеси. Прекумерните концентрации генерално доведуваат до

липопероксидативни процеси кои ја нарушуваат мотилноста на сперматозоидите преку исцрпување на аденозин-три-фосфатот (АТР), независно од интензитетот на оксидативната фосфорилација (Armstrong и сор., 1999). Утврдено е дека во одредена концентрација, КРР се неопходни за нормално одржување на мотилноста, иницирање на хиперактивацијата, капацитацијата и врзувањето за *zona pellucida* на јајце-клетките (Allamaneni и сор., 2004). СП содржи висок антиоксидативен капацитет кој го сочинуваат антиоксидативните компоненти кои се лачат во епидидимисот (Potts и сор., 1999). Намалувањето на антиоксидативниот капацитет е поврзано со зголемена липидна пероксидација во клеточните мембрани и инфертилност (Chen и сор., 2001).

Утврдени се значителни разлики во протеинскиот состав на СП во зависност од сезоната (Cardozo и сор., 2006). Во периодот на сезонска апстиненција, одредени протеински фракции не можат да се идентификуваат во СП на овни (Potts и сор., 2000). СП во расплодниот период се карактеризира со повисока концентрација на протеини, а во апстинентниот со повисока активност на антиоксидативни материји (GR, GPx, SOD и CAT) (Potts и сор., 2000). Слични наоди се потврдени и при споредување на последователните ејакулати од ист расплодник (Potts и сор., 2000). Повисока активност на SOD, GR и CAT била забележана во првите ејакулати кои имале помал квалитет на сперматозоидите, додека GPx била со повисока активност во вторите ејакулати (Ollero и сор., 1996). Овој податок наведува на претходни наоди кои имплицираат дека GRD, GPx и SOD главно се лачат во простатата, а CAT е со потекло од повеќе аксесорни полови жлезди (Yeung, 1998). GPx со епидидимално потекло, кој е претходно опишан кај нерезите и глущите (Jimenez и сор., 1990), има декапацитирачки ефект врз сперматозоидите (Okamura и сор., 1997). Освен неговата примарна антиоксидативна улога, оваа компонента на СП ја игра заштитната улога во однос на сперматозоидите и преку декапацитирачките својства (Aitken и сор., 1994).

Многу често, изворот на КРР е интрацелуларен, како што е случајот со олигозооспермните мажјаци, чии сперматозоиди произведуваат релативно високи концентрации на КРР (Gomez и сор., 1996). Додавањето на антиоксидативни ензими (CAT или SOD) не покажало голема ефективност во однос на овие КРР поради нивното екстрацелуларно дејство (Twigg и сор., 1998). Демонстрирани се репаративните (García, E.M., и сор., 2006; Barrios и сор., 2000) и превентивните ефекти (Perez-Pe и сор., 2001) на протеините од СП во однос на одредени промени во клеточната мембрана при термален стрес. Дополнително, истражена е нивната интеракција со антиоксидативниот

систем на СП, при што одделно била утврдена активноста на секоја од антиоксидативните компоненти (GR, GPx, SOD и CAT) во фракциите на СП. GR е изолиран од фракции кои имаат молекуларна маса од околу 100 kDa (Garcia, E.M., и сор., 2006), додека SOD и GPx се издвоени во останатите фракции. Супероксид дисмутазите се класифицирани во зависност од типот на метални јони кои ги содржат во својата структура: Cu/Zn SOD (бакар/цинк) и Mn SOD (манган). Cu/Zn SOD е хомодимер со молекуларна маса од 32,5 kDa (Lenzi и сор., 1996). Mn SOD е хомотетрамер со молекуларна маса од 88 kDa (Lenzi и сор., 1996). Во протеинските фракции на СП, SOD може да се најде во повеќе молекуларни облици, поради високата тенденција на полипептидите да стапуваат во меѓусебни интеракции (Colas и сор., 2009). Широката дистрибуција на GPx во различните фракции на СП би можело да се објасни со постоење на две негови форми, едната како тетрамер од 88 kDa, а другата како мономер од 18 kDa, кои меѓусебно може да стапат во интеракција (Garcia, E.M., и сор., 2006). Активноста на CAT не е утврдена во ниту една фракција, најверојатно поради негова инактивација или поради високиот степен на разредување во текот на анализирањето (Marti и сор., 2007). Фракциите во кои постои најголема активност на GPx и SOD покажуваат најголем капацитет за репарација (Garcia, E.M., и сор., 2006; Barrios и сор., 2000) и превенирање (Perez-Pe и сор., 2001) на криоштетувањата во клеточната мембрана. Главните компоненти на овие фракции се протеините RSP-14 и RSP-20, кои се носители на заштитните и декапацитирачки ефекти (Bergeron-Annick и сор., 2005). Истражувањето предлага дека заштитните ефекти на СП во однос на криолошките оштетувања, може делумно да се препише на нејзината антиоксидативна активност (Martin и сор., 2007). Со Wester-blot анализа е утврдено дека овие протеини не се субјективни единци, туку се составени од повеќе протеински фрагменти (Gardoza и сор., 2007). Сè уште не е утврдено дали овие протеини имаат антиоксидативна улога, покрај тоа што се декапацитирачки и стабилизирачки фактори за сперматозоидната мембрана (Martin и сор., 2007).

2.2. Улогата на глутатионот во гаметите на цицачите

Глутатионот (GSH) е трипептиден тиол (γ -глутамилцистеинглицин). Претставува непротеинска сулфхидрилна компонента застапена во клетките на цицачите која има различни биолошки функции. Овој тиол има значајна улога во детоксификација и антиоксидација на егзогени и ендогени соединенија, но и во одржување на

интрацелуларниот редокс потенцијал. Сулфхидрилната група е главниот носител на антиоксидативната улога на глутатионот. Во зависност од неговата реактивност, тој постои во две форми: оксидиран- (GSSG) и редуциран глутатион (GSH). Тој стапува во реакција со KPP во содејство со ензимите GPx и GR. Преку неговата тиолна група може да делува директно на водородниот пероксид, супероксидниот анјон и хидроксилните радикали, додека со сулфхидрилната група може да реагира со алкоксилните радикали и хидропероксидите. GR ја врши трансформацијата GSSG во GSH (Lenzi и сор., 1996). GPx и SOD се во тесна корелација со две протеински фракции од СП (RSP-14 и RSP-20) кои имаат заштитен ефект на сперматозоидите при криопрезервација (Martí и сор., 2007). GPx е ензим кој содржи селен, а негова главна улога е да ја катализира редукцијата на водородниот пероксид (и липидните пероксиди) во присуство на GSH, кој потоа се претвора во GSSG. Повторна редукција на GSSG се остварува преку ензимот GR во присуство на никотинамид аденин динуклеотид фосфат (NADH-P) кој се реобновува во пентозофосфатниот циклус.

Во ејакулатот кај цицачите, антиоксидативната одбрана се состои од ензимски и не-ензимски системи, од кои вториот е главно претставуван од GSH. Главната функција на GSH во ејакулатот кај цицачите е поврзана со неговата интеракција со други системи со кои превентивно делува на KPP. Редокс улогата на GSH овозможува спротивставување на ефектите од оксидативниот стрес врз сперматозоидите, кој се манифестира со липидна пероксидација на клеточната мембрана, иреверзибилно онеспособување на мотилната функција, оштетување на хроматинската маса и губење на интрацелуларните ензими во екстрацелуларниот простор (Aitken и сор., 1994). Во прилог 3 и 4 се прикажани средните вредности за концентрациите на GSH во сперматозоидите и СП кај различни видови на цицачи. Од приложените вредности, е евидентно дека највисока застапеност на GSH во сперматозоидите имаат глувците, а најниска нерезите. Во прилог на овие наоди, може да се додаде и податокот што GPx и GR имаат ниска или речиси незабележителна активност во сперматозоидите кај нерезите (Li, 1975). Истовремено, нерезите имаат висока застапеност на GSH во СП (Stzerek и сор., 1999). Во текот на матурацијата на сперматозоидите кај бикови (од епидидимис до ејакулаторни облици), било забележано значително намалување на GSH концентрацијата, за речиси 75 % (Agrawal и Vanha-Perttula, 1988). Во матурираните облици на сперматозоиди кај биковите, SOD и GSH се двата најзначајни антиоксидантни компонентни. Во научно истражување, кое анализираше сперматозоиди од шест расплодни бикови, прикажани се

индивидуални варијации во интрацелуларните концентрации на GSH кај биковите, кои имале опсег помеѓу вредностите 295 и 691 pmol/mg протеини (Bilodeau и сор., 2000). Во СП на пастувите, главната компонента на тиолниот антиоксидативен систем е GSH, кој е за 10 пати со повисока концентрација во однос на онаа кај нерезите. Сепак, не се најдени дополнителни научни податоци за неговата концентрација и во сперматозоидите кај пастувите со цел да се изврши пообјективна споредба.

Постојат податоци кои наведуваат дека интрацелуларната концентрација на GSH има брза тенденција за намалување во аеробни услови на инкубирање (Bilodeau и сор., 2000). Како причина, се наведува реакцијата на тиолната група од GSH со други молекули, по што тој добива недетектибилна конфигурација, па се нарекува „скриен GSH“ (Benard и Balasubramanian, 1995). Ова е потврдено со податокот што не постои последователна обратнопропорционална промена во концентрацијата на GSSG. Скриениот GSH, всушност претставува спој на протеински молекул со GSH преку дисулфидна врска. На овој начин, GSH е заштитен од влијанието на оксидативните радикали, и може да се складира во клетката како резервен облик на антиоксиданс. Другото објаснување за намалувањето на GSH и GSSG при инкубирање во аеробни услови е нивното транспортирање надвор од клетката преку клеточната мембрана (Van Klaveren и сор., 1997).

Концентрацијата на антиоксидансите во СП варира според расата, сезоната и фреквенцијата на мострирање на ејакулатите (Ollero и сор., 1996). Забележана е повисока активност на GR, GPx, SOD и CAT во ејакулати кои имаат пониски фертилни карактеристики или во ејакулати кои се мострирани во вонрасплодниот период (Cardozo и сор. 2006). Повисоката антиоксидативна активност во СП која потекнува од вакви ејакулати се смета дека ги компензира недостатоците на сперматозоидите и обезбедува поголема можност за фертилизација (Cardozo и сор. 2006).

3. Изолација и карактеризација на главните протеински фракции на семиналната плазма од овни

Најголемиот процент на протеини во СП на цидачите припаѓаат во две поголеми групи на протеини. Едната главна група е сочинета од протеини кои се нарекуваат спермоадхезини, и го претставуваат мнозинството на протеини во СП кај нерезите и пастувите. Другата е сочинета од протеини кои содржат домени на фибронектин, тип 2,

и го претставуваат мнозинскиот протеински состав во СП кај биковите. Шест типови на спермоадхезини се идентификувани во СП кај нерезите кои зафаќаат 30% од вкупната протеинска маса: AWN1, AWN2, AQN1, AQN3, PSP-I, и PSP-II (Varela и сор., 1997). Кај пастувите е идентификуван само еден тип на спермоадхезин во СП (HSP-7), (Reinert и сор., 1996). Во СП кај биковите се идентификувани два аналогни протеини на спермоадхезини: aSFP (Dostalova и сор., 1994) и Z13 (Tedeschi и сор., 2000). Спермоадхезините се секреторни производи на семиналните везикули, со исклучок на AWN-1 кој е присутен само во спермата и е со епидидимално потекло, а се синтетизира во *rete testis* и *tubuli recti* (Topfer-Petersen и сор., 1998).

Протеините кои содржат фибронектин тип 2 домени, се идентификувани во СП кај говедата и се означени како BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, и BSP-30 kDa (заеднички се означуваат како BSP протеини) (Manjunath и Therien, 2002). Тие се секреторни производи на семиналните везикули. Во СП кај козите откриени се следните хомолози на BSP протеините: GSP-14, GSP-15, GSP-20 и GSP-22 kDa (Villemure и сор., 2003). BSP протеините имаат својство да стапуваат во интеракција со мембранските холински фосфолипиди на сперматозоидите кои спаѓаат во групата на HDL (липопротеини со висока густина) и LDL (липопротеини со ниска густина) (Manjunath и Therien, 2002). Овие својства ги дефинираат биолошките ефекти на BSP протеините врз сперматозоидната клеточна мембрана во текот на оплодувањето, кои може да бидат изразени со нејзина стабилизација (декапацитација) или дестабилизација (капацитација). Во текот на ејакулацијата, при мешање на клеточната и течната фаза на ејакулатот, доаѓа до интеракција на BSP протеините со сперматозоидите што предизвикува ефлукс на холестерол од клеточната мембрана кој резултира со нејзина целосна реорганизација. Доколку BSP протеините стапат во интеракција со мембранските холински фосфолипиди, тие ја намалуваат нивната динамиката и кинетика (Bergeron и сор., 2005).

Спротивно на позитивните ефекти на BSP протеините во однос на фертилизацијата, препознаени се и негативни ефекти во однос на криопрезервацијата (Bergeron и сор., 2005). Демонстрирано е дека ефлуксот на фосфолипиди и холестерол од мембранскиот матрикс е во корелација со концентрацијата и времето на експозиција со BSP протеините, што може да предизвика значителни нарушувања на биолошкиот интегритет на клетките доколку бидат изложени на високи концентрации (Manjunath и Therien, 2002). Успешно е демонстрирано врзувањето на BSP протеините од СП со

липопротеинска фракција со ниска густина (LDL) присутна во жолчка од јајца од кокошки-несилки кои се користат во производството на разредители за замрзнување на семе (Manjunath и сор., 2002). Со оваа интеракција е објаснет заштитниот ефект на LDF во однос на ефлуксот на липидни компоненти од сперматозоидната мембрана (холестерол и холински фосфолипиди) (Bergeron и сор., 2005). Во СП од овни се идентификувани протеински фракции кои имаат способност да се врзат за клеточната мембрана со што ја зголемуваат отпорноста кон термални шокови при криопрезервација, но исто така имаат способност и да ги репарираат одредени криодефекти. Овие ефекти се забележани доколку се додаваат на изолирани сперматозоиди кои биле третирани на ниски температури (Barrios и сор., 2001; Perez-Pe, и сор., 2001).

Околу 45% од изолираните протеински фракции во СП на овни отпаѓаат на спермоадхезини со маса од 15,5 kDa, а другата поголема фракција припаѓа на BSP протеините кои зафаќаат околу 20% (RSP-15 kDa, RSP-16 kDa, RSP-22 kDa и RSP-24 kDa). Спермоадхезинот 15,5 kDa кај овните покажува голема секвенционална сличност со AQN-1 протеинот (~70%) кој е изолиран во СП кај нерезите и кој има улога во процесот на капацитација (Topfer-Petersen и сор., 1998). Споделувајќи ја способноста за врзување со хепарин, се претпоставува дека улогата на овие два протеини е иста, односно дека учествуваат во процесот на капацитација, во врзувањето на сперматозоидот за *zona pellucida* и овидукталниот епител. Според молекуларните истражувања, имуноафинитетните анализи и хепарин-врзувачките карактеристики, индикативно е дека мнозинскиот дел од протеините на СП (спермоадхезините и BSP протеините) покажуваат структурна идентичност или сличност со СП протеините кај другите видови на цицачи (нерези, пастуви, јарци) и се карактеризираат со исти биолошки ефекти (Bergeron и сор., 2005).

3.1. Влијание на семиналната плазма и нејзините компоненти во криопрезервацискиот успех

СП претставува сложена биолошка суспензија која содржи голем број на компоненти чиј сооднос може да се разликува меѓу мажјаците (Juvena и Stelletta, 2012). Ејакулатот претставува суспензија на клетки (сперматозоиди) во секрет на семиналните жлезди, кој се нарекува семинална плазма (СП). Таа претставува сложен медиум преку кој се спроведуваат биохемиски процеси во сперматозоидите. Нејзината рН вредност варира

помеѓу видовите на животни, но кај преживарите претежно има кисела-кон-неутрална вредност. Компонентите на СП се лачат во тестисите (лат. *rete testis*), надсемениците (лат. *epididymis*) и секундарните полови жлезди (семинални жлезди) (Juyena и Stelletta, 2012). Кај малите преживари во семинални жлезди се вбројуваат: семиналните везикули, простатата, и булбоуретралните жлезди. Нивните секрети имаат најголем удел во волуменот на ејакулатот. Секретот на семиналните везикули имаат најголем удел во волуменот на СП (Juyena и Stelletta, 2012). Составот и функцијата на СП се разликува помеѓу видовите на животни, помеѓу мажјаците од ист вид, но и помеѓу последователните ејакуланти од ист мажјак (Juyena и Stelletta, 2012). Влијание може да имаат фактори како што се должина на денот, исхрана, активноста на ензимите, метаболитичката активност на сперматозоидите и сл. Најголем придонес во протеинскиот состав на СП кај преживарите имаат семиналните везикули и надсемениците (Chandonnet и сор., 1990). Протеинските фракции во СП имаат различна улога врз сперматозоидите. Нивниот ефект може да се манифестира преку модификации во составот и структурата на протоплазматската мембрана или преку други структурни и функционални модификации кои го регулираат клеточниот и биолошкиот интегритет (Juyena и Stelletta, 2012; White и сор., 1987).

Успехот во инкубирањето на криопрезервирани сперматозоиди со СП директно ќе зависи од нејзиниот состав (D'Alessandro и Martemucci, 2003). Неколку научни истражувања прикажуваат докази за способноста на одделни компоненти од СП, особено на неколку протеински фракции, да се адсорбираат на површината на ејакулираните сперматозоиди (Bernardini и сор. 2011). Оваа способност може да се искористи во инкубирањето на одмрзнатите сперматозоиди со СП, а успехот во репарационите процеси на мембраната се правопрпорционални со концентрацијата на протеинската фракција (Muñio-Blanco и сор. 2008). Во научната литература постојат извори кои прикажуваат зголемување на криопрезервацискиот успех и во случаи каде СП се инкубира со ејакулатите пред криотретманот (Perez-Pe и сор., 2001). Со термална денатурација на протеините од СП, овие ефекти изостануваат, слично како и во примероците кај кои нема додадено СП (García, E.M., и сор., 2006). Липопротеините како компонента на СП не учествуваат во репарациските процеси на мембраната, ниту пак можат истата да ја заштитат од термален шок (Barríos и сор., 2000).

Кај овните се идентификувани следните протеински фракции кои претставуваат 30% од вкупните протеини во СП: RSP-14 kD, RSP-16 kD, RSP-20 kD и RSP-24 kD (Bergeron и

сop., 2005). RSP-14 е идентификуван како стабилизатор на мембранските фосфолипиди и цитоскелетот (Barríos и сop., 2000). RSP-14 и RSP-20 се идентификувани како протеински фракции кои имаат заштитен и репаративен ефект врз сперматозоиди кои имале криопрезервациски третман (Pérez-Pé и сop., 2001). Додавањето на протеините од СП во медиум за разредување на ејакулати пред криотретманот, го спречува или намалува оштетувањето на протоплазматската мембрана преку инхибиција на тирозинската фосфорилација (Pérez-Pé и сop., 2002), ја одржува активноста на антиоксидативните ензими и нивната дистрибуција на површината на клетките (Martí и сop., 2008), и го подобрува степенот на криопрезервација преку зголемување на процентот на клетки со задржан биолошки интегритет (Pérez-Pé и сop., 2001). Протеините од СП на бикови не можат да ги постигнат овие ефекти кај криопрезервирани сперматозоиди од овни поради видовата специфичност во нивното дејство (García, E.M., и сop., 2006). Сезонските варијации на гонадотропните хормони како и на нивните рецептори во тестисите, влијаат врз составот на СП (Cardozo и сop., 2006). Во расплодниот период на овните, кој во северната хемисфера трае меѓу Септември и Ноември, СП има најголема концентрација на протеини (Perez-Pe и сop., 2001; Cardozo и сop., 2006). Со раслојување на гел електрофореза (SDS-PAGE) е потврдено дека највисок степен на зголемување во расплодниот период имаат две протеински фракции со маса од 14 kD и 20 kD за кои се смета дека се директни носители на претходно опишаниот заштитен ефект на СП во текот на криопрезервацијата (Muñó-Blanco и сop. 2008).

Влијанието на СП врз зрелите постејакулаторни сперматозоиди е опсежно истражувана кај различни видови на животни. Меѓу главните ефекти кои таа ги има се: активација и поттикнување на мотилната активност на сперматозоидите (Juyena и Stelletta, 2012); обезбедува нутритивен и пуферски ефект; врши стабилизација на протоплазматската мембрана инхибирајќи го процесот на капацитација сè до нивно транспортирање во женскиот генитален систем (Villemure и сop., 2003); го регулира сперматозоидниот транспорт кај коњите (Troedsson и сop., 2005) ја овозможува интеракцијата помеѓу сперматозоидите и јајце-клетката кај говедата (Souza и сop., 2008).

Постојат спротивставени заклучоци во научната литература околу третирањето на сперматозоидите со СП од овни во посткриопрезервацискиот период. Според едни, додавањето на СП во одмрзнати овнешки ејакулати влијае врз одржување и зголемување на мотилноста, протоплазматскиот, митохондријалниот интегритет, митохондријалната

респирација, и општо, во зголемување на отпорноста при криотретманот (Maxwell и сор., 2007; Ghaoui и сор., 2007; Mataveia и сор., 2010). Други автори заклучуваат дека СП нема никакви ефекти врз одмрзнатите сперматозоиди (de Graaf, 2007; Ledesma и сор. 2005), или дека таа може да има негативно влијание врз мотилноста, биолошкиот интегритет, и степенот на преживување (Rovegno и сор., 2015).

Со оглед на неопходноста на антиоксидативните материи во СП кои се речиси единствениот заштитен механизам на сперматозоидите од КРР, секаков третман кој вклучува разредување или отстранување на компонентите од СП може значително да го намали иницијалниот антиоксидативен капацитет (Maxwell и Stojanov, T., 1999). Додавањето на СП во инкубациониот медиум после одмрзнувањето на ејакулатите го намалува оксидативното оштетување на сперматозоидите кај луѓето (Potts и сор., 1999), го задржува хроматинскиот интегритет и ја спречува липидната пероксидација (Alvarez и Storey, 1989). Други студии го посочуваат позитивниот ефект на GSH и GSSG, додадени во разредители на основа на Tris, врз мотилноста, биолошкиот интегритет и фертилноста на сперматозоиди од овни (Bucak и сор., 2007).

3.2. Протеините од семиналната плазма ја редуцираат фосфорилацијата на тирозинот во протеините на протоплазматската мембрана кај овнешки сперматозоиди по криотретман

Ниските температури имаат негативен ефект врз биолошкиот и функционалниот интегритет на сперматозоидите (Salamon и Maxwell, 2000). Сперматозоидите од овни имаат многу поголема осетливост на ниско-температурни шокови во однос на другите видови животни (бикови, нерези, коњи) (Salamon и Maxwell, 2000). Во научната литература се предлага хипотезата дека овие промени во сперматозоидите се должат на предвремено иницираната капацитација која ја предизвикуваат ниските температури (Pérez-Pé и сор., 2001). Процесот на капацитација вклучува ефлукс на холестерол и мембрански врзани протеини од сперматозоидната мембрана што резултира со мембранска дестабилизација, зголемување на мембранската флуидност и пропустливост, и алтерација во мобилноста на мембранските протеини (Yeagle, 1991). Капацитацијата која е последователна на нискотемпературните промени во сперматозоидите при процесот на криопрезервација, се претпоставува дека е директно поврзана со процеси на тирозинска фосфорилација (Pérez-Pé и сор., 2002). Додавањето

на протеини од СП во медиумот за разредување, пред изложувањето на нискотемпературен шок, значително го зголемува степенот на живи сперматозоиди после одмрзнувањето преку неутрализирање на процесите на тирозинска фосфорилација. Репаративните ефекти на протеините од СП во однос на веќе капацитираните сперматозоиди не се должат на неутрализирањето на ефектите од тирозинската фосфорилација, туку се поврзани со други механизми (Pérez-Pé и сор., 2002). Без оглед на видот на нискотемпературен третман на сперматозоидите (криопрезервација или разладување на +4°C), намалувањето на нивната фертилна способност се должи на предвремената капацитација која настанува последователно на тирозинската фосфорилација (Pérez-Pé и сор., 2002).

3.3. Ефекти на семиналната плазма од овни врз сперматозоидите и фертилноста кај овците

Постојат голем број на научни податоци кои имаат спротивставени заклучоци за употребата на СП при криопрезервацијата на сперматозоиди. Првично се сметало дека сперматозоидите од нерез после одмрзнувањето имаат повисок степен на преживување доколку бидат изложени на автологната СП, по што истата се заменува со вештачки медиум (Pursel и Johnson, 1975). Во поновата научна литература може да се најдат податоци со кои се опишуваат штетните ефекти на СП во текот на инкубацијата после одмрзнувањето (Cormier и Bailey, 2003), но исто така и податоци кои индицираат дека додавањето на 20% СП може да има декапацитирачки и репарирачки ефект при инкубирање на 39°C или при разладување на 4°C (Vadnais и сор., 2005). Додавањето на изолирана СП од пастуви во вештачки медиум за разредување на ејакулати го зголемува степенот на преживување на разладените сперматозоиди од пастуви и го задржува нивниот хроматински интегритет (Love и сор., 2002). Во процесот на криопрезервација на ејакулатите од пастуви, рутински се врши отстранување на СП, која има штетен ефект врз сперматозоидите доколку се изложени долговремено пред замрзнувањето (Moore и сор., 2005). Во СП плазма на овните, идентификувани се протеински фракции со големина меѓу 5 и 10 kDa кои ги редуцираат штетните ефекти на сперматозоидите при разредувањето (Ashworth и сор., 1994). Дополнително, при додавање на СП на одмрзнати сперматозоиди од овни, се постигнува подобрување на фертилната способност при интрацервикално осеменување (Maxwell и Johnson, 1999). Разликите во

заклучоците од научните истражувања може да се рефлектираат од меѓувидовите, меѓурасните, меѓуиндивидуалните, па дури и интраиндивидуалните варијации во протеинскиот состав на СП, и варијациите во соодносот на декапацитирачките и капацитирачките протеински фактори (Maxwell и сор., 2007). СП е сложен комплекс на органски и неоргански компоненти како и протеини кои имаат позитивни или негативни ефекти врз сперматозоидите во однос на степенот на преживување при криопрезервацијата. Нивната концентрација може да варира помеѓу мажјациите од ист вид, но и кај ист мажјак во зависност од некои амбиентални фактори, како што се сезоната, исхраната, атмосферската температура, начинот на собирање на ејакулатите, стресот и сл. (Perez-Pe и сор., 2001). Позитивните ефекти на протеините од СП се препишуваат само на одредени фракции чие дејство може да биде ограничено или анулирано од други компоненти во целата СП. Индицирано е дека во екстрахираните протеински компоненти на СП од овни се содржи ниско-молекуларен масен фактор кој го спречува нивното адсорбирање за сперматозоидите, а со тоа го оневозможува одржувањето на нивниот биолошки интегритет (García, E.M., и сор., 2006). Степенот на адсорбција на овие „корисни“ протеини од СП е зависно од потеклото на сперматозоидите (епидидимални, постејакулаторни или овидуктални), но и од начинот на кој тие се манипулирани (разредување, криопрезервација и сл.). Лабораториското третирање на ејакулатите може да предизвика ослободување на компоненти од клеточната мембрана на сперматозоидите, овозможувајќи слободни места за врзување и реакција со други лиганди, што всушност се случува при процесот на капацитација и лажна (индуцирана) акрозомска реакција. Влијанието на СП врз сперматозоидите може да биде зависно и од составот на вештачкиот медиум во кој се врши разредување на сперматозоидите. Жолчката од јајце која се користи во приготвувањето на овие медиуми содржи липопротеинска фракција со ниска густина (LDF) која реагира со 14, 15 и 16 kDa RSP протеините во СП на овните и ја спречува нивната адсорбција за клеточната мембрана, што има значајна улога во одржувањето на нивниот биолошки интегритет изразен преку нивниот декапацитирачки ефект (Manjunath и сор., 2002).

СП не може да обезбеди целосна заштита на сперматозоидите при третман со ниски температури. Медиумите кои се користат за разредување на ејакулатите содржат компоненти кои се неопходни за да се намалат криодефектите на сперматозоидите при ниски температури (Salamon и Maxwell, 1995). Функцијата на сперматозоидите може да се одржува долг временски период во длабоко замрзната форма (Gillan и сор., 2004), но

фертилизирачката способност на ваквото семе е со значително пониска стапка во однос на свежите ејакулати кои немале криотретман (Gillan и Maxwell, 1999). Во научната литература, успехот во концепцијата со користење на длабоко замрзнато семе од овни, значително варира меѓу авторите на научните трудови (Paulenz и сор., 2005; Maxwell и Hewitt, 1986). Поради етичките прашања кои се поставуваат околу алетрнативните методи за фертилизација (лапароскопско интракорнуално осеменување), а со цел подобрување на фертилизирачката способност на длабоко замрзнатите ејакулати, науката е приморана да истражува други помалку инвазивни методи. Од тука, произлегува и идејата за подобрување на медиумите кои се користат во замрзнувањето и разредувањето на ејакулатите кои се предмет на криотретмани. Употребата на СП при криотретманот е актуелна тема во ветеринарната андрологија и веќе резултира со добивање на корисни информации за идните истражувања во оваа област. Веќе е познато дека додавањето на СП од овни или на нејзина протеинска фракција (>10 kDa) во медиумот за разредување, резултира со зголемување на мотилноста, акрозомскиот, мембранскиот и хроматинскиот интегритет после одмрзнувањето (Ollero и сор., 1997). Во друго истражување е демонстрирано намалување на процентот на акрозомски активирани и капацитирани сперматозоиди, и зголемување на способноста за пенетрирање низ цервикален мукус во одмрзнати ејакулати на кои се додава цела СП (Maxwell и сор., 1999).

Криотретманот врши нарушување на биолошкиот интегритет на сперматозоидите и го намалува степенот на нивното преживување после одмрзнувањето, како последица на молекуларните промени кои се идентични со процесот на капацитација (Cormier и Bailey, 2003). Овој облик на промени, во научната литература се означува како „лажна капацитација“ со цел да се поистовети со функционалните промени на сперматозоидите кои настануваат после одмрзнувањето, а се слични со вистинската капацитација. При лажната капацитација, настанува зголемена пропустливост на клеточната мембрана кон калциумови јони, што резултира со морфолошки и функционални промени кои по извесно време, надвор од женскиот генитален систем, доведува до клеточна смрт, без да се оствари фертилизацијата (Maxwell и сор., 2007). Лажно капацитираните сперматозоиди ја поседуваат способноста за *in-vitro* фертилизација на оцити и интеракција со овидуктални епителијални клетки, што е карактеристично за нормално капацитираните сперматозоиди (Gillan и сор., 2000). Овие промени, сепак, не претставуваат вистинска капацитација (Green и Watson, 2001), па истражувани се

факторите во СП кои може да делуваат како стабилизирачки или декапацитирачки компоненти за клеточната мембрана (Ledezma и сор., 2015; Rovegno и сор., 2013). Се смета дека нормалната капацитација која резултира со ефлукс на холестерол од мембраната (Cross, 2003), промени во мембранскиот протеински состав и промената на трансмембранската протеинска дистрибуција (Suzuki-Toyota и сор., 2000), иницијално е резултат на интеракцијата помеѓу протеините од СП и мембраната на сперматозоидите (Maxwell и сор., 2007). Овие декапацитирачки фактори во СП се отстрануваат или модифицираат при транзитирањето на сперматозоидите низ женскиот генитален тракт (Maxwell и сор., 2007). Доколку овие компоненти се додадат на одмрзнати сперматозоиди, се очекува продолжување на животниот век на сперматозоидите, нивно декапацитирање, репарирање на мембранските структурни дефекти настанати во текот на капацитацијата, и инхибирање на целокупната плејада на промени кои го следат процесот на вистинска или лажна капацитација (Barríos и сор., 2000; Barríos и сор., 2005; Wolfe и сор., 2001).

Во истражувања со замрзнати-одмрзнати сперматозоиди, заклучено е дека нивните функционални и фертилни карактеристики се подобруваат по додавањето на СП (Maxwell и сор., 1999). Хипотетизирано е дека позитивните компоненти на СП се наоѓаат во фракцијата која не содржи везикули, и е присутна независно од тоа дали овните се вазектомирани или не. Се смета дека потеклото на овие компоненти е пост-епидидимално, и највероватно се создаваат во везикуларната аксесорна полова жлезда. Со термална денатурација на СП од овни, позитивниот ефект на замрзнати-одмрзнати сперматозоиди од овни изостанува, што индицира дека природата на овие компоненти е дефинитивно протеинска (Maxwell и сор., 2007). Според истото истражување, се тврди дека мембранската везикуларна фракција на СП нема никакви ефекти во однос на сперматозоидната и мембранска функција како и на целокупната фертилизирачка способност на одмрзнатите сперматозоиди. Во друго научно истражување е направена изолација на мембранските везикули од СП на овни и истите биле прочистени со масено-селективна хроматографија (El-Hajj Ghaoui и сор., 2007). Заклучено е дека овие мембрански везикули не може да се идентификуваат во СП која потекнува од вазектомирани овни, што индицира на тоа дека истите имаат тестикуларно или епидидимално потекло (El-Hajj Ghaoui и сор., 2006). Протеинските масени опсези на двете фракции од СП на вазектомирани и невазектомирани овни, биле во согласност со наоди од други истражувања (Bergeron и сор., 2005). Без оглед на тоа дали СП се добива

од вазектомирани или невазектомирани овни, истата има позитивен ефект врз мотилините карактеристики на замрзнатите-одмрзнатите сперматозоиди од овни, како и врз нивната фертилизирачка способност во однос на матурирани ооцити (Maxwell и сор., 2007). Мембранската везикуларна фракција од СП на невазектомирани овни нема никаков ефект врз замрзнатите-одмрзнатите сперматозоиди доколку се додава во нормална концентрација. Единствено, при трикратно зголемување на оваа концентрацијата во медиумот за инкубирање може да се забележат позитивни ефекти (Maxwell и сор., 2007). Остаточните протеини кои се врзани за везикуларните фракции, а не за самите везикули, се причина за појава на разликите во овие ефекти во зависност од концентрацијата.

Степенот на разредување на ејакулатите непосредно пред замрзнувањето или при сексирањето (раздвојување на сперматозоидите врз основа на X/Y хромозомот), неминовно влијае врз мотилноста, мембранскиот статус и фертилизирачката способност на сперматозоидите (Maxwell и Johnson, 1997). Покажано е дека додавањето на 10% автологна СП од овен или нерез во медиумот за разредување ја подобрува мотилноста и биолошкиот интегритет на сперматозоидите од соодветните ејакулати при разредување на 400, односно 20 пати (Catt и сор., 1997). Автологната СП може да има индивидуална варијација, па нејзините ефекти во одредени околоности, може да се манифестираат со позитивно или негативно во однос на замрзнатите-одмрзнати сперматозоиди (Maxwell и сор., 2007). Хетерологната СП (од овен на нерез или од нерез на овен) генерално се смета дека има негативни ефекти врз сперматозоидите (Catt и сор., 1997). Компонентите во СП на нерезите кои имаат позитивни ефекти врз сперматозоидите се идентификувани во PSP-II поединицата на PSP-I/PSP-II спермоадхезинот (Garcia и сор., 2006). Кај овните, овие позитивни ефекти на СП се алоцирани во RSP-14/20 (Barríos и сор., 2005) или во спермоадхезините (Bergeron и сор., 2005), но последните имаат помалку јасно дефинирани ефекти поради тоа што имаат ист степен на дејство за замрзнати-одмрзнати или сексирани сперматозоиди како и кај биковите (Maxwell и сор., 2007). Во друго истражување, демонстрирани се позитивните ефекти на СП преку нејзино додавање во медиумите за нативно боење на сперматозоидите (Maxwell и сор., 1997). СП додадена во медиумите за нативно боење или за суспендирање на сперматозоидите, го редуцира негативното влијание при разредувањето и го стабилизира мембранскиот статус на клетките, што може да се забележи со помала застапеност на аглутинирани сперматозоиди во размаските (Maxwell и Johnson, 1999).

4. Значајност на кинематичките параметри на сперматозоидите при процена на нивната фертилна способност

4.1. Морфолошки карактеристики на сперматозоидите кај цицачите

Фертилната способност на сперматозоидите е во висока корелација со нивната мотилност (Mortimer, 1997). Оваа карактеристика на сперматозоидите е зависна од нивната структура која им овозможува подвижност во ејакулатниот медиум. Иако, сперматозоидите кај различни видови на животни имаат специфичности, сепак тие делат неколку заеднички карактеристики. Генералната структура на сперматозоидите кај цицачите е дефинирана со глава и опашка, која е поделена на среден, главен и завршен дел. Главната функција на главениот дел е пренесување на хаплоиден сет на хромозоми до ооцитот. Функцијата на опашката (лат. *Flagellum*) е да овозможи подвижност (мотилност) на сперматозоидите со која би го преминувал патот низ женскиот генитален тракт и би извршил пробивање (пенетрација) на надворешната обвивка на јајце клетката (лат. *Zona pellucida*). Структурните карактеристики на сперматозоидната глава и опашка ги овозможуваат овие функционални улоги. Покрај претходно споменатите делови на флагелумот, тој за главата е поврзан со структурна компонента која се нарекува „сврзувачки регион“. Внатрешноста на флагелумот е составена од „аксонема“, која се состои од две централни микротубули, кои се опколени со девет парови на микротубули (Pedersen, 1991). Аксонемата се протега по целата должина на опашката, завршувајќи само со централниот пар во завршниот дел од опашката. Секој пар се состои од „А“ поединица која има облик на буквата „О“, и „В“ поединица која има облик на буквата „С“ со чии краеве се поврзува за поединицата-А. Околу микротубулите постои обвивка која ја сочинуваат спирално извиткани фиброзни влакна. Кај животните со внатрешно оплодување, покрај микротубуларната обвивка постои и надворешна густа обвивка. На поединицата-А се прикачени динеински нишки кои се составени од повеќе поединици на аденозин-три-фосфатен (АТФ) комплекс кој е одговорен за ослободување на енергија со која се овозможува лизгање на микротубуларните парови еден во однос на друг, причинувајќи заоблување на аксонемата во однос на нејзината надолжна оска, со што се создава кинетичка енергија (Gibbons, 1965). Овој процес вклучува серија на повторливи процеси на прикачување и откачување на динеинските нишки од микротубулите (Marchese-Ragona и Johnson, 1990). Соседните микротубуларни парови се споени со

врски од нексин (Stephens, 1970) помеѓу А и В подединиците (Baccetti и сор., 1985). Се претпоставувало дека овие врски ја одржуваат аксијалната структура при поместување на соседните микротубуларни парови, односно дека ја одржуваат нивната симетрија (Linck, 1979). Во првичните студии за улогата на овие нексински врски, било прикажано дека доколку истите бидат дигестирани, настанува зголемување на аксонемалниот агол, што последично резултира со намалување на амплитудата во флагеларното искривување. Оттука, било констатирано дека тие имаат значајна улога во одржување на амплитудата на флагеларното движење (Brokaw, 1980). Во понатамошни истражувања, било увидено дека нексинските врски можат да се поместуваат, овозможувајќи непречено поместување на микротубулитите, но исто така имаат улога и во одржување на оптималниот простор помеѓу паровите за да се овозможи соодветна интеракција со динеинските нишки (Bozkurt и Woolley, 1993). Прецизниот механизам со кој настанува интеракција помеѓу динеинот и тубулинот не бил доволно проучен, но се знаело дека за неа е неопходна В-подединицата на соседниот микротубуларен пар и АТР (Gagnon, 1995). Од секоја А-подеданица се протегаат радијални нишки кон централниот слој (Hopkins, 1970). Овие нишки се состојат од 17 протеини, од кои 12 се прикачени за подединицата-А, а 5 се насочени кон централниот пар (Gagnon, 1995). Било познато дека дел од овие протеини се фосфорилирани, но не било познато значењето во функцијата на флагелумот (Curry и Rosenbaum, 1993). Радијалните нишки имале циклус на откачување-закачување во процесот на лизгањето на соседните микротубуларни парови. Аксонемата кај е опкружена со девет надворешни густы снопови на влакна кои се прикачени за дисталниот дел од сегментираните столбови во средишниот дел од опашката (Fawcett, 1975; Baccetti и сор., 1976). Секој сноп е поврзан со еден од микротубуларните парови и е соодветно нумериран. Овие снопови се составени од кератинозен тип на протеини, организирани во кора (кортекс) и срцевина (медула) (Baccetti et al., 1976). Постојат два типа на полипептидни ланци поврзани со дисулфидни мостови кои се создаваат во текот на епидидималното созревање на сперматозоидите (Olson и Sammons, 1980). Било утврдено дека должината на секој сноп завршува на различна точка од должината на флагелумот, но таа е константна за секое од сноповите (Serres и сор., 1983). Најголем дел (60%) тие се протегаат во главниот дел на флагелумот, составени од два кратки снопови (3 и 8 со 8,6 nm), три снопови со средна должина (2, 4 и 7 со 17-21 um) и четири со најголема должина (5, 6, 9 со 31-32 um, и 1 со 35 um). Во најраните истражувања за улогата на густите снопови во фибриларната подвижност, се претпоставувало дека тие имаат моторна улога на аксијалната структура. Во

подоцнежни истражувања на сперматозоиди од жаба, било заклучено дека густите снопови кои се целосно одвоени од аксијалната структура, подеднакво се извиткуваат како и неа при флагеларното движење (Swan, 1980). Отука се утврдило дека нивната улога е стабилизирачка, а не моторна, како што првично се претпоставувало. Ова било докажано со сперматозоиди од животински видови кај кои не постојат густите снопови, па флагелумот има максимална амплитуда на закривување уште во проксималниот дел (Denehy, 1975). Во споредба со нив, кај цицачите, максималното искривување започнува подистално, непосредно после терминалните краеве на густите снопови (Woolley, 1985). Се претпоставувало дека асиметричното терминално завршување на густите снопови по должината на флагелумот имало влијание врз етапното ширење на бранот на аксијалното закривување (Serres, 1983), но сепак овој ефект бил прикажан и кај модели на сперматозоиди без густе снопови (Woolley, 1985).

Срзувачкиот сегмент на сперматозоидот е составен од сегментирани цилиндрични структури и густа фиброзна структура (лат. Capitulum) (Fawcett, 1975). Главата и опашката на сперматозоидот се споени преку капитулумот и базалната плоча на јадрото. Се претпоставувало дека цилиндричните прстени се зглобно поврзани, намалувајќи ги силите кои би можеле да го откинат овој дел при флагеларното движење (Cury и Rosenbaum, 1993). Проксималната центриола е поставена во вдлабнување на првиот прстен од фиброзната структура на капитулумот, перпендикуларно во однос на рамнината на флагелумот.

Средниот сегмент од флагелумот се протега од завршниот дел на сврзувачкиот сегмент до таканаречениот анулус (лат. annulus), кој го претставува преодот помеѓу средниот и главниот сегмент. Во овој дел се содржани митохондриите кои имаат хеликална поставеност и кои се одговорни за создавање на енергијата неопходна за мотилноста на флагелумот (Cury и Rosenbaum, 1993).

Главниот сегмент се протега помеѓу средниот и завршниот сегмент на флагелумот. Во него се наоѓа фиброзната обвивка која претставува цитоскелет за аксонемата и надворешните густе влакна. Составена е од две периферни и надолжни траки во рамнина на централниот пар на микротубули, поврзани со полукружни ленти кои се разгрануваат и анастомизираат (Fawcett, 1975). Овие две траки се поврзани со најкратките фиброзни снопови и со соодветните микротубуларни парови, следејќи ги до нивната завршна точка во флагелумот. Дисулфидните мостови во молекуларната структура на оваа фиброзна

обвивка, ја дефинираат нејзината стабилизирачка и рестриктивна улога при мотилноста на флагелумот. Аксонемалниот комплекс е прикачен за протоплазматската мембрана на сперматозоидот преку структура која наликува на патент преку надворешниот густ сноп-1. На овој начин, се овозможува поголема ефикасност во движењето кое би било невозможно без оваа врска (Koehler, 1983).

Завршниот сегмент од опашката се наоѓа дистално од терминалниот дел на фиброзна обвивка. Аксијалната микротубуларна структура е покриена само со аксонема и протоплазматска мембрана. Аксонемалните елементи постепено исчезнуваат по должината на овој сегмент. Најпрво, недостасуваат динеинските нишки, па централниот пар на микротубули, па настанува одвојување на микротубуларните парови, за на крај од овој сегмент, да се забележи недостасување на В-подединицата (Wooley, 1985).

Целиот сперматозоид е прекриен со протоплазматска мембрана (Pm), но акрозомот (Ac), јадрото и митохондриите се енкапсулирани во сопствени мембрански структури. Протоплазматската мембрана има дополнителни поделби во различни сегменти од клетката. Така, кај сперматозоиди од бикови биле идентификувани два региони на Pm, едниот во пределот на Ac, а другиот во пост-акрозомалниот остаток од клетката (Koehler, 1983). Во подоцнежни студии било демонстрирано дека лектините (Nicolson и Yanagimachi, 1974) и моноклоналните антителиа (Myles и sor., 1981) имаат специфичен афинитет за врзување со Pm посочувајќи дека мембраната има локални регулациони механизми (Nicolson и Yanagimachi, 1974). Неспецифичните региони на врзување за флагеларниот дел од Pm било индикативно за постоење на мобилност на гликопротеините кои биле нејзин составен дел (Koehler, 1983). Сепак, одредени домени од сперматозоидот биле идентификувани како постабилни во смисла на гликопротеинската мобилност, а се претпоставувало дека ова придонесува задржување на специфичноста на одреден сегмент од Pm (Holt, 1984). Овој заклучок одел и во прилог на фактот што метаболичките процеси во главата и флагелумот значително се разликувале во периодот пред фертилизацијата. Така, кај главата тие се минимизирани, во однос на флагелумот каде се високо изразени.

4.2. Теорија за флагеларното движење на сперматозоидите

Познато е дека флагеларното искривување настанува како резултат на асиметричното поместување на аксонемалните компоненти, но точниот механизам сè уште не е добро

познат. Енергијата за ова придвижување потекнува од динеин-АТР-азната активност, чиј супстрат е АТР. Регенерирањето на овој енергетски супстрат настанува преку метаболизирање на гликоза или фруктоза до лактат, или во митохондриите преку Кребсовиот циклус. Како што е претходно опишано, искривувањето на аксонемата и на целокупниот флагелум настанува како резултат на циклично поместувањето на микротубуларните парови еден во однос на друг. Доколку паровите се нумерираат во зависност од нивната поставеност во однос на стрелките од часовникот, иницијалното прикачување на динеинските нишки е за паровите кои би се наоѓале на 1 и 2 часот и продолжува сервиски до деветиот пар. Овој цикличен сервиски процес секогаш се одвива интегрално и не може да биде повремено запрен и рестартиран од истите парови. Доколку поради било каква причина, процесот е прекинат, циклусот секогаш започнува повторно од првиот пар, односно не постои „меморија“ за рестартирање на процесот од паровите каде тој бил привремено паузиран. Ваквиот начин на аксонемално искривување, предизвикува хеликален изглед на опашката чие движење се одвива по хеликално искривени рамнини во облик на елипса кај флагелумот од овнешките сперматозоиди (Denehy и сор., 1975). Тридимензионалниот изглед на флагелумот кај другите видови на цицачи може да има свои геометриски карактеристики.

Кај некои видови на животни било забележано дека микротубуларните парови 5 и 6 се однесуваат како интегрална целина (физичка или функционална) (Afzelius, 1988). Подоцнежни истражувања на демембранизирани сперматозоиди од стаорци и бикови покажале дека паровите 3 и 8 се поврзани за централниот микротубуларен пар (Lindemann и сор., 1992; Kanous и сор., 1993). Во истите истражувања било демонстрирано дека постојат две групи на парови кои би можеле да се издвојат како интегрални целини (9, 1, 2 и 4, 5 - 6, 7). Паровите 9, 1, 2 секогаш се издвојувале први. Тие повеќе наликувале на сплескани снопови, отколку на единечни парови. Со ваквата организација во аксијалната структура можело да се објасни моделот на флагеларното движење кај различните видови цицачи.

Како продолжение на оваа теорија за флагеларното движење, била предложена таканаречената теорија за „геометриски стисок“ со која првично било објаснето движењето на цилиите и флагелумите со должина од 10 μm (Lindemann, 1994a,b), а подоцна била применета и за сперматозоидите кај цицачите, посебно за биковите (Lindemann, 1996). Оваа теорија предлагала дека сврзувачкиот сегмент на сперматозоидот овозможува фиксна точка за движењата на флагелумот преку

надворешните густе влакна. Според оваа теорија, се сметало дека сврзувачкиот сегмент е неопходен за да се овозможи нормален циклус на воспоставување врски со динеинските нишки.

Преку модел на сперматозоиди од *Ciona* (морски вид на животно), било демонстрирано дека внатрешните динеински нишки се неопходни за одржување на закривеноста на опашката, додека надворешните се неопходни за совладување на отпор од надворешната средина (вискозитет) (Brokaw, 1996). Ова било забележано преку феноменот на брза промена во амплитудата и должината на пропагирачките бранови на флагелумот без притоа да се менува иницијалниот мотилен бран. Кај сперматозоидите на луѓето било демонстрирано дека не постојат надворешни динеински нишки, па поради тоа и покрај тоа што биле мотилни, сепак нивната брзина и VCF биле за половина со пониски вредности во однос на другите цицачи (Jouannet и сор., 1983). Ова било потврдено и со друго истражување во кое биле отстранети надворешните динеински нишки преку третирање со 0,5 M раствор на KCl (Gibbons, 1974).

4.3. Компјутеризирана анализа на движењето на сперматозоидите (CASA)

Концептот на оваа анализа се базира на микроскопски видео снимки од сперматозоиди на која софтверот ги забележува клетките врз основа на нивната големина, контраст и подвижност во однос на референтни рамки од сликата. Следејќи го нивниото движење, се врши реконструирање на сперматозоидната патека од која алгоритамски се пресметуваат и изведуваат поголем број на кинематички параметри (Mortimer, 1997). Микроскопската снимка се изведува во темна контрастна фаза во која главата на сперматозоидите има контрастно бела боја во однос на темната позадина. Софтверот за CASA може да варира помеѓу различни производители. Некои системи (пр. CellSoft), ја идентификуваат главата на сперматозоидот како континуитет на графички пиксели врз основа на кои се пресметува средината односно центроидот, додека други (CellTrack) ја утврдуваат положбата на сперматозоидот врз основа на периферните граници на главата од кои се утврдува центарот. Системот на HamiltonThorne ја утврдува најсветлата точка од главата на сперматозоидот врз основа на која го врши следењето. Генерално, овие системи се базираат врз утврдување на позицијата на главата, но само еден систем врши утврдување и на флагеларното движење (Strömberg-Mika Cell Motility Analyser). Поради различните методи за утврдување на позицијата на сперматозоидите, но и поради

постоењето на различни алгоритми со кои се вршат пресметките, резултатите на различни истражувања може да имаат неистоветна интерпретација. Грешките во резултатите при CASA анализата настануваат најчесто поради погрешно обележување на други структури во анализот наместо сперматозоиди или поради неправилно обележување на нивната патека на движење. Аглутинацијата на сперматозоидите не претставува проблем за поновите софтвери бидејќи големината на аглутинатот ги надминува граничните вредности за единечна клетка, па тие не се вклучуваат во завршните пресметки. Сепак, доколку суспензијата на клетки е премногу висока, може да дојде до преклопување на клетките во видното поле на снимката, што би можело да предизвика отчитување на една, наместо на две или повеќе преклопени клетки. Овој проблем е решлив со тоа што суспензијата на клетки обично се подесува на одредена концентрација која нема да предизвика вакво преклопување. Во случајот со HamiltonThorne, софтверот не дозволува отчитување доколку процени дека постои превисока концентрација на клетки, и дава предупредување дека е неопходно да се направи дополнително разредување. Следењето на патеката на движење е дефинирана во зависност од вредноста за „површината на максимална веројатност“ во која би бил лоциран означениот сперматозоид во последователните делови од снимката. Оваа вредност е вклучена во алгоритмот на софтверот и е правопрпорционална од максималната брзина на сперматозоидот, а обратнопропорционална од фреквенцијата на снимање, изразена во херци (Hz). Доколку концентрацијата на сперматозоидите е премногу голема, површината на максимална веројатност е поголема за секој сперматозоид, па се зголемува и можноста за преклопување на овие површини од два и повеќе сперматозоиди, што би претставувало проблем за софтверот. Одредени софтверски решенија (Strömberg-Mika Cell Motility Analyser) успешно се справуваат со овој проблем преку векторска анализа на индивидуалните патеки на движење со што се намалува ризикот од заменување на траектории од други клетки при нивна реконструкција.

Потенцијалот на CASA анализата во предвидување на фертилната способност на сперматозодите е докажана во повеќе истражувања (Mortimer, 1997; Mortimer и соp., 1986). Најчесто кинематичките карактеристики на сперматозоидите се споредувани со способноста за пенетрација низ цервикален мускус од овци (Mortimer и соp., 1986), *in-vitro* (Sukcharoen и соp., 1996) и *in-vivo* фертилизација (Macleod и Irvine, 1995). Најголем дел од CASA анализите ги пресметуваат средните вредности за кинематичките

параметри на цели популации во анализот. Овие податоци најчесто тешко се толкуваат бидејќи имаат големи варијации. Како подобро решение е предложено да се дефинираат популации на сперматозоиди во рамките на еден анализ врз основа на формата и изгледот на нивните траектории.

4.3.1. Кинематички CASA параметри на сперматозоидите

Кинематичките CASA параметри претставуваат временско зависни геометриски варијабли кои се разликуваат според пресметките за маса и сила (Drobnis и соp., 1988). Иако, најголем дел од клиничките проценки за фертилноста на сперматозоидите се базираат на движењето на главата од сперматозоидот, сепак флагеларното движење кое ја дефинира мотилноста, е важно да се земе во предвид. Така, во зависност од начинот на движење на флагелумот, може да се создадат различни форми на траекторија кои може засебно да се интерпретираат. Методот за утврдување на сперматозоидниот центроид продуцира неколку варијабли (параметри) кои се општоприфатливи во клиничките андролошки проценки: брзина на криволиниска (VCL), праволиниска (VSL) и просечна траекторија (VAP). Секој од овие параметри ја опишува прогресијата на сперматозоидот од различни аспекти. Сите овие параметри се всушност дводимензионални проекции на патеката на сперматозоидот и сите ја изразуваат брзината на сперматозоидот со единица должина во однос на единица време. VCL ја претставува брзината на сперматозоидот по траекторијата на неговото движење која во дводимензионалната рамнина наликува на линија со бројни латерални девијацијации. Во минатото, ова се изведувало мануелно со следење на секој сперматозоид од снимката и со исцртување на неговата траекторија. Модерните CASA софтвери се способни за автоматско исцртување и пресметување на оваа вредност. VSL е изведена од VCL траекторијата, и ја претставува брзината на сперматозоидот по правата линија исцртана меѓу почетната и крајната точка на движење. VSL е изведена од VCL и ја претставува брзината на сперматозоидот по просечната траекторија на движење која би се наоѓала измеѓу онаа на VCL и VSL (слика 1). Геометриски, таа може да се добие со пресметување на средната точка помеѓу спротивните апекси на VCL кои после нивно спојување би ја формирала средната траекторија (слика 1). Математичкиот модел подразбира утврдување на x и y координати во фиксен координативен систем од кои се утврдуваат средни вредности, кои потоа се забележуваат со точки. Линијата добиена со спојување

на овие точки кои ги означуваат средните вредности на координатите има налик на VCL, па со нејзино израмнување може да се добие просечната патека (Mortimer и Mortimer, 1990). Добиената вредност на VAP зависи и од фреквенцијата на снимање, па така повисоки брзини на снимање даваат помали девијации на VCL, што би резултирало со пониски вредности на VAP, и спротивно. Hamilton Thorne има софтверско решение кое користи алгоритам за израмнување на VCL, земајќи ја во предвид релативната распореденост на соседните точки од траекторијата. На овој начин израмнувањето никогаш не е премногу високо ниту премногу ниско, давајќи најпрецизна пресметка на VAP.

За дополнително опишување на траекториите, може да се пресметаат следните индекси: праволиниски (LIN), кој го претставува соодносот помеѓу VSL и VCL, линеарен (STR) кој го претставува соодносот помеѓу VSL и VAP, и алинеарен (WOB) кој го претставува соодносот помеѓу VAP и VCL. LIN има повисоки вредности кога сперматозоидите имаат траекторија која е повеќе слична или иста со онаа на VSL, и спротивно. Доколку траекторијата на движење е со високи латерални амплитуди во однос на VSL, тогаш STR може да има повисоки вредности од LIN, но сепак тие би биле премногу ниски за да може да се опише движењето како прогресивно или линеарно. Во сите ситуации каде VAP и VCL имаат слични вредности, односно кога траекторијата има циркуларен изглед, тогаш WOB може да резултира со високи вредности. И спротивно, кога траекторијата е широка, WOB има релативно ниски вредности. Овој параметар порано бил именуван како „криволиниска прогресивност“ индицирајќи на релативно утврден правец на движење, но со големо застранување на главата од VSL.

Амплитудата на латерално застранување на главата (ALH) ја рефлектира девијацијата на сперматозоидот од одреден правец на движење, аналоген на VAP. ALH не ја дефинира амплитудата на искривување на опашката, туку начинот на аксијалното искривување. Постојат неколку методи за утврдување на вредноста на ALH: метод на средна точка (слика 6-a) – со кој се врши повлекување на линија помеѓу два соседни пикови на која се утврдува средна точка, а потоа се утврдува растојанието помеѓу пикот и средната точка на линијата; метод на перпендикуларно растојание (слика 6-b) – се повлекуваат паралелни линии на пиковите и на ниво на нултна висина, по што се утврдува растојанието помеѓу нив; перпендикуларен геометриски метод (слика 6-c) – слично како претходно, се повлекуваат паралелни линии на пиковите и нултните рамнини, по што се спушта перпендикуларна права од линијата на пикот кон нултната линија. Добиените

вредности на ALH со методот на средна точка и геометрискиот метод, може да имаат исти вредности кај траектории кои немаат големи варијации. Во спротивна ситуација, овие вредности може значително да се разликуваат (Mortimer, 1997). Постои уште еден метод за кој е неопходно да се направи израмнување на траекторијата при што ќе се утврдат вредности кои ќе ја претставуваат разликата помеѓу координатите на вистинската траекторија со оние на израмнетата. Овие вредности се дуplo помали од ALH, која може едноставно да се пресмета со нивно помножување со два (Mortimer, 1997) (слика 6-d).

Без оглед на методот, точноста на добиената ALH вредност е зависна од варијабилноста на траекторијата. Колку е таа пониска, толку и добиената ALH вредност ќе биде поточна. Во спротивно, интерпретацијата може да биде погрешна. Фреквенцијата на снимање е дополнителен фактор кој влијае на овој параметар (Mortimer, 1997). Високата фреквенција на снимање може да резултира со голем број на пикови кои би биле мали. Разликите помеѓу вистинската и израмнетата патека може да бидат премногу мали за да се добие правилна интерпретација на координатите.

Фреквенцијата на флагеларна ротација (BCF) го рефлектира бројот на вртења кои ги прави флагелумот во единица време, или бројот на пресретнувања на VCL со VAP траекториите изразена во херци (Hz). Математички, оваа вредност се добивала од бројот на локални максими на $Ri-1$, со претпоставка дека првиот локален максимум се наоѓа пред првото пресретнување на VCL со VAP (Mortimer и Mortimer, 1990). Фреквенцијата на снимање има правопрпорционално влијание врз оваа вредност која е со иста величинска природа како и неа (Mortimer, 1997). Варијабилноста на траекторијата има ист ефект како и за ALH, со што големите варијации доведуваат до многу мали разлики помеѓу Ri при што појавата на пикови може да биде погрешно интерпретирана. При математичката пресметка бил користен и таканаречениот Nyquist-ов број (Nq) кој е еднаков на бројот на прикази (точки на траекторија) во снимката, поделен со два (Walker, 1988). За добивање на репрезентативен приказ од траекториите на сперматозоидите, било прифатливо да фреквенцијата на приказите биде помала од Nq . Во спротивно, можноста за пропуштање на одредени прикази се сметала за висока, а добиената BCF вредност како неверодостојна (Walker, 1988).

Средното аголно поместување (MAD) претставува мерка за степенот на искривеност на траекторијата, кое се дефинира како просечна вредност од апсолутните вредности на

аголот кој се создава при секоја промена во правецот на движење на сперматозоидот (Boyers и сор., 1989). Слични вредности се апсолутниот и алгебарскиот агол (Stephens и Hoskins, 1990). Апсолутниот агол ја претставува средната вредност на сите агли во однос на VAP траекторијата, независно од промената на насоката, додека алгебарскиот ја претставува истата вредност, но со додавање на позитивни и негативни вредности зависно од промената на насоката. Со воведување на методот за следење на центроидот како сигнал, наместо како дводимензионална проекција од тридимензионалната траекторија, се дошло до дефинирање на неколку други кинематички параметри: фреквенција на фундаментална хармонија (HAR), магнитуда на фундаментална хармонија (MAG), бранова ширина на сигналот или површина на фундаментална хармонија (HHI) (Davis *et al.*, 1992, најниска (HLO) и највисока (HHI) хармонија на осцилации на главата од сперматозоидот, максимална амплитуда на осцилации на главата (HMX), основна осцилација на главата (HBS) и хармонични амплитуди (H_Y) (Boyers и сор., 1989). Сите овие параметри ја изразуваат хармонијата на траекторијата, пресметани со Fourier-ова трансформација, но не биле вклучени во рутинските кинематички параметри поради тоа што не била докажана јасна врска.

Поради комплексноста на центроидната траекторија за различни сперматозоиди, бил предложен метод за фракциона димензија на траекторијата (Mandelbrot, 1983). За изведување на ваква анализа било потребно да се добие поголем детал на кривината во траекторијата што се постигнувало со зголемување на фреквенцијата на снимање (Mortimer, 1997). Фракционата димензија (FD) се пресметувала како степен во кој линијата ја исполнува рамнината во која се наоѓа. Доколку таа е права, вредноста за фракционата димензија изнесувала 1 поради тоа што таа зафаќа само една димензија (должина). Доколку линијата започне да се искачува или симнува, тогаш оваа вредност може да биде меѓу 1 и 2, бидејќи завзема повеќе простор во две димензии, иако станува збор за линија. Слично, доколку линијата започне да се искривува и превиткува кон својата почетна точка, тогаш се воведува концептот на длабочина, па фракталната вредност би била поголема од 2 (Katz и George, 1985). Фракталната вредност ја опишувала траекторијата на сперматозоидот по својата комплексност, па пониските вредности имплицирале повеќе права, а повисоките вредности повеќе искривена и извртена траекторија. Ова својство било припишано на хиперактивираните сперматозоиди од човек кои се разликувале од неактивираните сперматозоиди (Mortimer и сор., 1996).

4.3.2. Дефинирање на хиперактивираниите сперматозоиди според CASA кинематичките параметри

Хиперактивираната мотилност, најпрво била опишана кај *in-vitro* капацитирани сперматозоиди од златен хамстер (Yanagimachi, 1970). Високата амплитуда на флагеларното движење и енергичното движење на сперматозоидот биле двете карактеристики со кои се опишувала неговата „активација“. Ваков облик на движење бил забележан и во *in-situ* услови во ампуларното проширување на јајцеводот кај женки од истиот вид на животни, што индицирало дека е неопходен за процесот на оплодување. Нешто подоцна, овој начин на мотилност била опишана како хиперактивација (Yanagimachi, 1981) со цел да се избегне погрешно разбирање на терминот „активација“ кој може да го означува активирањето на незрелите сперматозоиди во тестисите по нивниот контакт со СП или медиумот за култивација. Оттогаш, биле направени бројни истражувања на различни видови цицачи, меѓу кои и за овните (Cummins, 1982). И покрај тоа што постојат голем број на сличности во хиперактивацијата мотилност кај сперматозоидите од различни видови цицачи, сепак, научната литература дефинира некои специфичности. Така на пример кај зајациите, мотилноста на сперматозоидите има циклично преминување од не-хиперактивациско во хиперактивациско (Johnson и сор, 1981), а кај морските прасиња и хамстерите хиперактивацијата мотилност има неколку фази, започнувајќи со високоамплитудни флагеларни движења кои се менуваат со други, кои имаат различен начин на аксијално искривување (Katz и Yanagimachi, 1980). Кај сперматозоиди од хамстери била забележана преодна фаза на хиперактивација која имала прогресивна карактеристика во флагеларното аксијално искривување со повремено и нагло свртување на главата од сперматозоидот (Suarez, 1988). Со детално набљудување на аксијалното искривување на флагелумот од зајаци кај хиперактивирани сперматозоиди, биле забележани разлики во однос на постејакулаторните сперматозоиди кои не биле хиперактивирани (Suarez, 1988). Хиперактивираниите сперматозоиди кои биле земени од ампуларното проширување на јајцеводите имале циркуларно движење кое било последица на асиметричното аксијално искривување, во однос на не-хиперактивираниите кои имале линеарно движење и симетрично аксијално искривување на флагелумот. Ефектот на аксијалното искривување бил индициран како примарен причинител за промената на мотилноста, наместо губењето на акрозомската обвивка која претходно се сметало дека придонесува за ваквата промена преку хидродинамички ефект (Katz и George, 1985). Биле користени различни термини за

опишување на хиперактивациската мотилност на сперматозоидите, но било неопходно да се воведат одреден термин со кој би се избегнувала забуна при опишувањето на други слични карактеристики кај различни видови на животни. За таа цел, биле истражувани можности за квантифицирање на мотилните карактеристики за хиперактивираниите сперматозоиди. Мерењето на брановите должини и амплитуди на флагеларните бранови било невозможно поради тоа што не можеле да се генерализираат за цел флагелум. Како алтернативен начин, бил предложен опис за флагеларното закривување кај сперматозоиди од хамстери (FCR) (Katz и Yanagimachi, 1980). Аголот на флагеларното закривување има примарен ефект врз движењето на спојот помеѓу главата и почетниот дел на флагелумот. Првичните CASA системи го следеле движењето на главата, а не на флагелумот, па поради тоа хиперактивациската мотилност била дефинирана врз основа на траекторијата на главата. Дополнително, било забележано дека ширината на главената обвивка и степенот на аголно закривување на флагелумот имаат висока заедничка корелација со мотилноста на сперматозоидите, при што хиперактивираниите сперматозоиди имале повисоки вредности во однос на не-хиперактивираниите. Со користење на овие карактеристики, можноста за грешка при дефинирањето на хиперактивациска мотилност била сведена до 4% (Cooper, 1984). Првото карактеризирање на хиперактивациска мотилност било изведено за сперматозоиди од глувци (Neil и Olds-Clarke, 1987), каде фреквенцијата на снимање била 30 Hz, а траекторијата за точката во спојот помеѓу главата и флагелумот имала $WOB < 56\%$, и $VCL < 169 \mu\text{m/s}$. Подоцнежни студии на сперматозоиди од глувци прикажале различни вредности: $LIN < 34\%$, $VCL > 170 \mu\text{m/s}$; или $LIN < 42\%$ и $VCL < 125 \mu\text{m/s}$ (Neil и Olds-Clarke, 1987). Кај зајациите, хиперактивацијата на сперматозоидите била дефинирана со $WOB \leq 69\%$ и $VCL \geq 55 \mu\text{m/s}$, анализирани на 30 Hz фреквенција на снимање (Young и Bodt, 1944). Заеднички заклучок во сите овие студии за хиперактивирани сперматозоиди е постоењето на високи вредности за VCL и ALH, а ниски за LIN и WOB. Тоа покажува дека, генерално, кај сите сите видови цицачи, хиперактивациската мотилност на сперматозоидите се карактеризира со поголема амплитуда на аксијално извиткување кое е проследено со зголемена флексибилност на проксималниот дел од флагелумот.

III. ЦЕЛИ

Главната цел на ова истражување беше постигнување на повисок криопрезервациски капацитет на класичен ејакулатен медиум за криопрезервација (tris-hydorymethyl-aminomethane) на сперматозоиди од овчеполска праменка. Очекуваниот ефект на оваа цел беше зголемување на оплодувачкиот капацитет на криопрезервираните ејакуланти од овчеполска праменка со што значително би се придонело кон конзервирањето на овој автохтон вид и сој на овца.

Поради постоењето на контрадикторности во научната литература за употребата на GSH и HSP во tris-криопрезервациски медиуми, и за нивните ефекти на криопрезервираните сперматозоиди од овни суспендирани во пред- и после-криопрезервацискиот период, беше неопходно да се направи индивидуално испитување и валидирање на нивниот ефект, но истовремено и да се процени нивното комбинирано користење. Успехот на криопрезервацијата беше проценуван според степенот на задржување на структурниот, морфолошкиот интегритет и прекапацитираната (нехиперактивирана) мотилност на криопрезервираните овнешки сперматозоиди во течен азот. Со цел да се процени оптималниот начин на суспендирање, беше направена проценка на криопрезервацискиот успех при суспендирање на ејакуланти во пред- и во после-криопрезервацискиот период. Со цел да се идентификува временската зависност помеѓу одмрзнувањето и времето на оптимално дејство на криопрезервациските медиуми, примероците беа анализирани во две временски точки на 0-часа и 3-часа од инкубацијата (37°C). Со цел да се утврди иницијацијата на оптималниот ефект врз криопрезервацискиот успех беше неопходно да се генерираат анализи на примероци суспендирани исклучиво во пред- или во пред-после криопрезервацискиот период. Следствено на ова, за елиминирање на тип-1 статистичка грешка, беше неопходно да се изврши споредување на сперматозоидните популации помеѓу контролните групи од двата методи на суспендирање.

Сумираните цели на ова истражување беа:

1. Да се процени криопрезервацискиот успех на свежи ејакуланти од овчеполска праменка суспендирани исклучиво во пред-криопрезервацискиот период или заедно во пред- и во после-криопрезервацискиот период со tris-криопрезервациски медиум кој не содржи редуциран глутатион и хомологна семинална плазма;

2. Да се процени криопрезервацискиот успех на свежи ејакулати од овчеполска праменка суспендирани исклучиво во пред-криопрезервацискиот период со tris-криопрезервациски медиуми кои содржат хомологна семинална плазма и/или редуциран глутатион, и медиум кој не ги содржи овие компоненти;
3. Да се процени криопрезервацискиот успех на свежи ејакулати од овчеполска праменка суспендирани во пред- и во после-криопрезервацискиот период со tris-криопрезервациски медиуми кои содржат хомологна семинална плазма и/или редуциран глутатион, и медиум кој не ги содржи овие компоненти;
4. Да се процени криопрезервацискиот успех на свежи ејакулати од овчеполска праменка суспендирани исклучиво во пред-, или заедно во пред-после-криопрезервацискиот период со tris-криопрезервациски медиуми кои содржат хомологна семинална плазма и/или редуциран глутатион;
5. Да се процени дејството на инкубационото време во оптимално манифестирање на ефектите врз криопрезервацијата на одмрзнатите и суспендираните ејакулати од овчеполска праменка.

IV. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

1. Експериментална постапка

Хомогенизираниот волумен на ејакулати (3.0 ml) беше поделен на пет аликвоти (Alq 1-5) кои беа суспендирани (растворени) во еден од приготвените криопрезервациски медиуми, до постигнување на соодветна клеточна концентрација:

1. Прв аликвот (Alq-1) = E + C (100×10^6 клетки/ml);
2. Втор аликвот (Alq-2) = E + C (50×10^6 клетки/ml);
3. Трет аликвот (Alq-3) = E + E1 (50×10^6 клетки/ml);
4. Четврт аликвот (Alq-4) = E + E2 (50×10^6 клетки/ml);
5. Петти аликвот (Alq-5) = E + E3 (50×10^6 клетки/ml),

каде, E – Свеж ејакулат, C – Контролен КМ, E1-3 - Експериментални КМ: E1 – КМ + GSH (5 mM); E2 – КМ + HSP (20%); E3 – КМ + GSH (5mM) + HSP (20%). Волуменот на секој од суспендираните аликвоти на свежи ејакулати беше распределен во еднакви волуменски фракции од 0,5 ml ($n=30 \times 4$) кои беа процесирани на СТ. Непосредно после одмрзнувањето, примероците од Alq 1 ($n=30 \times 4$) беа групирани во 4 групи, а потоа суспендирани со истите КМ како и Alq 2-5 (1:1). Овој метод на суспендирање беше означен како b-СТ метод. Примероците од Alq 2-5 не беа суспендирани со КМ медиуми после одмрзнувањето, што беше означено како a-СТ метод на суспендирање. Непосредно после одмрзнувањето, сите примероци беа сместени во услови на инкубација (температура, $T=37^\circ\text{C}$, и релативна влажност $\text{RH}=90\%$), и беа анализирани во две временски точки: 0 и 3 часови. Во зависност од типот на КМ и временската точка на анализирање, анализите од Alq 2-5 (a-СТ метод) беа групирани во: C-a-0 и C-a-3, E1-a-0, E1-a-3, E2-a-0, E2-a-3, E3-a-0 и E3-a-3, а анализите од Alq 1 (b-СТ метод) беа групирани во: C-b-0 и C-b-3, E1-b-0, E1-b-3, E2-b-0, E2-b-3, E3-b-0 и E3-b-3. На овој начин беа добиени 16 групи, секоја со по 30 идентични примероци (репликати) од кои беа земени аналити за проценување на потребните параметри. Структурата на сперматозоидната популација од секој анализ беше анализирана и класифицирана според структурниот интегритет на плазмената и акрозомската мембрана, како и врз основа на клеточната морфологија, проценувани со изготвување на спермална размаска (Hancock-2 метод). Сперматозоидната популација од секој анализ беше дополнително проценувана и класифицирана според CASA параметри со кои беше утврдена морфологијата на траекторијата и брзината на мотилност. Во зависност од структурата на сперматозоидните популации според претходно опишаните параметри, тие беа

означувани како позитивно или негативно афектирани од СТ. Дијаграматски приказ на експерименталната постапка е прикажан во прилог 1.

2. Мострирање на ејакулати

За потребите на експерименталните постапки беа користени ејакулати од сојот/раса овчеполска праменка. Ејакулатите беа прибавени од стадо овни (N=10), во сопственост на институтот за репродукција и биомедицина при Факултетот за Ветеринарна Медицина во Скопје (ФВМС). Амбиентални услови и одгледувачите на животни беа исти во период од најмалку 2 години пред фазата на собирање на свежи ејакулати. Животните беа привикнати за волна ејакулација во вештачка вагина со рутинска процедура (1-2/неделно) која беше спроведувана во текот на неколку последователни години. Нивната здравствена состојба, репродуктивната активност и благосостојбата беа предмет на постојан мониторинг од страна на персоналот. Истите животни биле користени и во претходни научноистражувачки цели, со позитивни андролошки и сперматолошки наоди (Nikolovski и сор., 2014). Целокупната методологија за мострирање на ејакулатите беше утврдена според ЕУ директивата 2016/63/EU.

Мострирањето на примероци (ејакулати) по пат на вештачка вагина беше изведено со опрема која ја поседува лабораторијата за асистирани репродукција при ФВМС. Просторот помеѓу надворешната и внатрешната гума на вештачката вагина беше исполнет со топла вода ($T \approx 55^{\circ}\text{C}$) која во внатрешниот канал достигнуваше до 39°C . Истовремено, притисокот од водата врз внатрешниот канал овозможуваше поттикнување на ејакулаторен рефлекс кај животното. Непосредно пред употребата, на едниот крај од вагината беа поставувани загреани стаклени садови (спермособирачи) во кои беа собирани примероците при ејакулацијата. Во текот на процедурата за мострирање беа користени термоизолациони обвивки со цел да се превенира појавата на термален шок кај сперматозоидите.

Овните беа припуштани индивидуално на овца која беше сместена во посебен бокс. При заскокнувањето, на расплодникот му се приложуваше вештачката вагина во која ја извршуваше ејакулацијата. Во боксот беа присутни двајца одгледувачи од кои едниот ја фиксираше овцата која служи за заскокнување, а другиот го вршеше собирањето на ејакулатите со вештачката вагина. Истите извршители учествуваа во мострирањето на сите примероците кои беа користени за ова истражување. Непосредно по ејакулацијата,

спермособирачите беа пренесувани во андролошка лабораторија во период од околу 30 секунди и беа сместувани во водена бања сè до СТ (T=30°C и RH=90%).

3. Квалитативна и квантитативна хомогенизација на свежите ејакулати во збирен изворен примерок

Примероците на свежи ејакулати беа проценувани според следните квалитативни карактеристики (Bucak и сор. 2007):

- * минимален волумен $\geq 1,00$ ml,
- * густина на ејакулатот ≥ 4 (градациски систем 1-5)
- * вкупна мотилност $\geq 80\%$
- * мембрански интегритет $\geq 60\%$
- * концентрација на сперматозоиди $\geq 2,5 \times 10^9$ /ml.

Со цел формирање на збирен хомоген изворен примерок (HPS), овие критериуми беа условни за свежите ејакулати да бидат вклучени во експерименталната постапка. Со претходно мерење на процентуалниот сооднос на сперматозоидниот и ејакулатниот волумен (сперматокрит – Sct), беше извршена квантитативна хомогенизација на ејакулатите во HPS со следната пресметка:

$$Ve (\%) = (S / Si) / \sum_{i=1}^n (S / Si) \times 100$$

каде, „Ve“ е процентуално учество на ејакулатот во збирниот волумен, „Si“ е вредноста на сперматокритот на секој ејакулат, а „S“ е нивната средната вредност. На овој начин, во HPS беше постигнат приближно еднаков број на сперматозоиди од секој овен, со слични квалитативни карактеристики.

4. Експериментални компоненти и ејакулатни раствори

4.1. Хомологна семинална плазма (HSP)

Ејакулатите кои беа користени за добивање на HSP се мострираа во две последователни сесии на ејакулација од истите овни во истражувањето. Непосредно по мострирањето, свежите ејакулати беа разладени на T=4°C (30 min), а потоа беа двофазно центрифугирани: I – 2000 x g, 4°C, 20 min.; II- 2500 x g, 4°C, 30 min. Издвоените супернатанти беа филтрирани низ микрофилтер (0,22 μ m), а потоа складирани во крио-епрувети и замрзнати на T=-20°C сè до нивна употреба (Ghaoui и сор., 2007). Пред

употребата, криоепруветите со HSP беа одмрзнати на собна температура ($T=21-23^{\circ}\text{C}$), а потоа беа групирани во заеднички волумен согласно нивните Sct вредности.

4.2. Антиоксидативна компонента

Редуцираниот глутатион (GSH – γ -L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine; cell culture tested, $\geq 98,0\%$, powder; Sigma Aldrich[®]), беше подготвен од комерцијален препарат во прашкаста форма, со молекуларна маса од $307,32 \text{ g/mol}$. Беа изготвени три волумени на стерилна вода (SW), еден без GSH и два со различни концентрации на GSH:

Стерилна вода 1 (SW1) – $(0,00 \text{ mM GSH})$

Стерилна вода 2 (SW2) - $0,040 \text{ g GSH}/20,0 \text{ ml H}_2\text{O}$ ($6,25 \text{ mM GSH}$);

Стерилна вода 3 (SW3) - $0,051 \text{ g GSH}/22,0 \text{ ml H}_2\text{O}$ ($7,50 \text{ mM GSH}$).

4.3. Ејакулатни криопрезервациски медиуми

Контролниот КМ (C) беше на основа на *Tris* (tris-hydorymethyl-aminomethane) (Cx) кој не содржеше GSH и протеини од семинална плазма. Овој КМ беше приготвен со петкратно разредување со стерилна вода (1:5), постигнувајќи специфична маса (γ) од 1,039. HSP беше додавана во волуменски однос од 20%. Без оглед на додадените компоненти, целната специфична маса за сите раствори беше $\gamma=1,039$:

Контролен КМ (C) = Cx (32 ml) + SW1 (128 ml) ($\gamma=1,039$);

Експериментален КМ 1 (E1) = Cx (4 ml) + SW2 (16 ml) ($\gamma=1,039$);

Експериментален КМ 2 (E2) = C (12 ml) + HSP (3 ml), ($\gamma=1,039$);

Експериментален КМ 3 (E3) = Cx (4 ml) + SW3 (16 ml) + HSP (4 ml), ($\gamma=1,039$).

4.4. Ејакулатни суспензии

Целната клеточна концентрација на ејакулатните суспензии пред СТ беше 100- (Alq 1), односно $50 \times 10^6/\text{ml}$ (Alq 2-5). Врз основа на клеточната концентрација на HPS ($4,00 \times 10^9/\text{ml}$), беа направени $\times 50$ и $\times 100$ разредувања на аликвоти од HPS:

Alq1 = C ($58.800 \mu\text{L}$) + E ($1.200 \mu\text{L}$) = $60.000 \mu\text{L}$ ($100 \times 10^6/\text{ml}$);

Alq2 = C (14.850 μ L) + E (150 μ L) = 15.000 μ L (50 x10⁶/ml);

Alq3 = E1 (14.850 μ L) + E (150 μ L) = 15.000 μ L (50 x10⁶/ml);

Alq4 = E2 (14.850 μ L) + E (150 μ L) = 15.000 μ L (50 x10⁶/ml);

Alq5 = E3 (14.850 μ L) + E (150 μ L) = 15.000 μ L (50 x10⁶/ml).

На овој начин беа формирани волумени од секој Alq со цел добивање на доволен број репликати непоходни за експерименталната постапка. Така, за Alq 1 беа добиени 120, а за Alq 2-5 по 30 репликати.

5. Криотретман - замрзнување на ејакулатните суспензии во течен азот (-196°C)

Волуменот од секој Alq беше спакуван во пластични паети за СТ (n=30, 0,5 ml), кои беа затворени на двата спротивни краевии. Процесот на СТ беше изведен со програмиран протокол на замрзнување (Ice Cube 15M):

1. -1,6°C/min до -4,0°C (10 min);
2. -4,0°C еквилибрација (120 min);
3. -5,0°C/min до -6,0°C (2 min);
4. -6,0°C еквилибрација (1 min);
5. -4,0°C/min до -10,0°C (1 min);
6. -3,33°C/min до -20,0°C (3 min);
7. -60,0°C/min до -80,0°C (1 min);
8. -80,0°C еквилибрација (3 min); -20,0°C/min до -100,0 °C (1min);
9. -100,0°C еквилибрација (1 min);
10. -10,0°C/min (2 min);
11. -196,0°C (6 месеци).

6. После криотретман

Непосредно после одмрзнувањето (T=38°C, 30 s), примероците од Alq 1 (n=30 x 4) беа групирани во 4 групи, а потоа суспендирани со истите КМ како и Alq 2-5 (1:1) до постигнување на крајна клеточна концентрација од 50 x10⁶/ml. Овој метод на суспендирање беше означен како b-СТ метод. Примероците од Alq 2-5 не беа

суспендирани со КМ медиуми после одмрзнувањето, што беше означено како а-СТ метод на суспендирање. Сите аликвоти имаа завршна клеточна концентрација од $50 \times 10^6/\text{ml}$. Инкубирањето на репликатите алоцирани во соодветните групи, беше изведено во атмосфера со $T=37^\circ\text{C}$ и $\text{RH}=90\%$, до 180 минути. Подолу е даден преглед на после-СТ групирањето на аликвотите во зависност од КМ, начинот на суспендирање и времето на мострирање на анализот:

C-a-0 / C-a-3 (n=30) – Alq2 (0,5 ml);

E1-a-0 / E1-a-3 (n=30) – Alq3 (0,5 ml);

E2-a-0 / E2-a-3 (n=30) – Alq4 (0,5 ml);

E3-a-0 / E3-a-3 (n=30) – Alq5 (0,5 ml);

C-b-0 / C-b-3 (n=30) - Alq1 (0,5 ml) + C (0,5 ml);

E1-b-0 / E1-b-3 (n=30) - Alq1 (0,5 ml) + E1 (0,5 ml);

E2-b-0 / E2-b-3 (n=30) - Alq1 (0,5 ml) + E2 (0,5 ml);

E3-b-0 / E3-b-3 (n=30) - Alq1 (0,5 ml) + E3 (0,5 ml).

7. Лабораториска анализа на примероците

Анализите за одредување на ејакулатен волумен и густина, сперматозоидна брановидна подвижност и клеточна концентрација беа наменети за свежите ејакулати, додека проценката на мембранскиот и морфолошкиот клеточен интегритет, и CASA параметрите беа наменети како за свежите ејакулати и за репликатите во после СТ фазата од експерименталната постапка. Анализите на свежите ејакулати беа изведувани во услови со $T=30^\circ\text{C}$, додека анализата на репликатите после СТ во услови со $T=37^\circ\text{C}$.

7.1. Одредување на ејакулатниот волумен

Одредувањето на ејакулатниот волумен се вршеше со калибриран автоматски аспирационен пипетор (10-100 μL) со кој се одмеруваа бројот на аликвоти од свежите ејакулати во спермособирачите кои се префрлаа во стерилни, стаклени и претходно

загреани епрувети, сè до целосно исцрпување на волуменот. Со броење на аликвоти од 100 μL беше одреден вкупниот волумен на свежите ејакулати.

7.2. Проценка на ејакулатната густина

Ејакулатната густина беше проценувана според следната градациска скала (WHO, 2010):

- (1) – воденеста конзистенција ($400 - 1.000 \times 10^6$ сперматозоиди/ml);
- (2) – бледа млечна конзистенција ($1.000 - 2.500 \times 10^6$ сперматозоиди/ml);
- (3) – воденесто - кремаста конзистенција ($2.500 - 3.500 \times 10^6$ сперматозоиди/ml);
- (4) – кремаста конзистенција ($3.500 - 4.500 \times 10^6$ сперматозоиди/ml); и
- (5) густа кремаста конзистенција ($4.000 - 6.000 \times 10^6$ сперматозоиди/ml).

7.3. Проценка на сперматозоидната брановидна подвижност

Брановидната подвижност беше проценувана според следната градациска скала (WHO, 2010):

- (1) – многу слаба (10% од сперматозоидите со мотилна активност, многу слабо движење);
- (2) – слаба (нема бранови од сперматозоиди, но постои одредена подвижност на клетките);
- (3) – средна (околу 45-65% од сперматозоидите се подвижни и повремено формираат ретки бранови);
- (4) – добра (постои добра подвижност на најголем дел од сперматозоидите и тие создаваат густи бранови); и
- (5) – одлична (95% од сперматозоидите се одлично подвижни и тие создаваат брзи и густи бранови).

7.4. Одредување на клеточната концентрација

Клеточната концентрација на сперматозоидите се одредуваше со помош на хемцитометар (Neubauer). За оваа цел, секој примерок на свеж ејакулат беше

разредуван 200 пати со 3 % NaCl, а броењето на клетките се вршеше во дупли примероци, во определен волумен од комората (WHO, 2010). Во првиот примерок, се вршеше броење на најмалку 200 клетки, а бројот на полиња и нивниот волумен (n) беа забележувани. Во вториот примерок се вршеше броење во истите полиња (n) на Нојбаеровата мрежа како и за првиот примерок, без оглед на бројот на опфатени клетки. Пресметувањето на клеточната концентрација (C_s) се вршеше според следната формула: $C_s \text{ (nL)} = (N/n) \times (1/20) \times D$, каде D претставува степен на разредување. Стандардната грешка (SE) на изброените клетки (N) беше пресметана според Поисоновата дистрибуција (Poisson distribution). Интервалот на доверба (CI) за 95% беше пресметан според формулата: $N \pm 19.96 \times \sqrt{N}$ (или за поприближна пресметка $2 \times \sqrt{N}$), а процентот на грешка со формулата: $100 \times (\sqrt{N}/N)$. Според прирачникот за анализа на ејакулати на Светската Здравствена Организација (WHO, 2010), беа земени во предвид дозволените разлики во двете последователни броења (прилог 2), за задржување на CI нивото. Во услови кога разликите во последователните броења не беа во согласност со дозволените опсежи, процедурата беше повторувана.

7.5. Проценка на мембранскиот и морфолошкиот интегритет на сперматозоидите

Интегритетот на протоплазматската и акрозомската мембрана се одредуваше со помош на суправитално бојење HancocK-2 (HancocK, 1951), со користење на нигрозин-еозин. Методот со суправитално бојење се изведуваше на тој начин што со автоматски пипетор се одмеруваа два еднакви аликвоти од примерокот и од бојата (10 μ L), кои се поставуваа на претходно загреано предметно стакло (30°C) и се мешаа сè до постигнување на еднаква суспензија. Потоа, со друго предметно стакло под агол од 30° се вршеше развлекување на претходно измешаната суспензија. По сушењето, препаратот се набљудуваше под микроскоп со 1.000 пати зголемување. Во броењето се опфаќаа најмалку 200 клетки кои беа проценувани според пенетрација на бојата во пределот на сперматозоидната глава и опашката, а беа изразувани во процентуални вредности од вкупниот број. Нарушениот интегритет беше утврден со увидување на пенетрацијата на бојата во внатрешниот дел на клетката. Структурниот интегритет (вијабилност-VIAB) на клетките беше проценуван според плазмената (Pm), акрозомската мембрана (Ac) и морфологијата (Mo), па во зависност од нивниот статус ('+' непроменет или '-' променет) тие беа класирани во една од следните категории:

VIAB1 – Pm+, Ac+, Mo+;

VIAB2 – Pm+, Ac-, Mo+;

VIAB3 – Pm-, Ac+, Mo+;

VIAB4 – Pm-, Ac-, Mo+; и

VIAB5 – Pm-, Ac-, Mo-.

7.6. Проценка на кинетичките карактеристики на сперматозоидите

Проценката на кинетичките карактеристики за свежите ејакулати и суспендираните аликвоти се вршеше на компјутерски анализатор (CASA – Hamilton Thorne). За таа цел, капка од 6,5 μL на претходно суспендиран примерок со клеточна концентрација од $20\text{--}50 \times 10^6$ клетки/ml беше поставен на загреано предметно стакло ($T=37^\circ\text{C}$) (22 mm x 12 mm), а потоа беше покриен со покривно стакло (22mm x 22 mm). Согласно со препораките на прирачникот за анализа на ејакулати според WHO (WHO, 2010), соодносот на овие димензии на покривно стакло (484 mm^2) и волуменот на капка од испитуваниот примерок (6,5 μL), овозможуваат формирање на висина помеѓу покривното и предметното стакло од 20,7 μm , во која се овозможува слободно ротационо движење на сперматозоидите. На точно утврдена координатна точка од покривното стакленце (централен квадрант), беше вршено снимање на 2-5 видни полиња (0,2 mm растојание), сè до отчитување на најмалку 500 клетки.

Беа користени следните софтверски подесувања на CASA софтверот:

- Слики во секунда (FPS) – 60 Hz
- Број на снимања (frames) – 30 слики
- Минимален праг на контраст за детекција на клетки – 60
- Минимална големина на клетки за детекција – 5 pix;
- Критериуми за прогресивна подвижност – $VAP \geq 75 \mu\text{m/s}$ и $STR \geq 80\%$;
- Критериум за статични клетки – $VAP \leq 21,9 \mu\text{m/s}$ и $VSL \leq 6 \mu\text{m/s}$.

Добиените фреквенции на дистрибуција на сперматозоидите во десет вредносни категории за секој параметар беа класирани во потесни вредносни категории согласно референтните вредности за сперматозоиди од овни (Mortimer and Maxwell, 1999):

- **EL** - Индекс на елонгација на сперматозоидна глава (однос помеѓу ширината и должината на сперматозоидната глава) – CASA вредносна скала од 0-100 % во интервали од 10 %:

EL1 - 0-30%;

EL2 - 31-50%; и

EL3 - 51-100%.

- **VCL** - Брзина на криволиниска траекторија – CASA вредносна скала од 0-450 $\mu\text{m/s}$ во интервали од 50 $\mu\text{m/s}$:

VCL1 - 0-150 $\mu\text{m/s}$;

VCL2 - 151-250 $\mu\text{m/s}$; и

VCL3 - 251-450 $\mu\text{m/s}$.

- **LIN** – Праволиниски индекс на траекторија – CASA вредносна скала од 10-100 % во интервали од 10 %:

LIN1 - 0-30 %;

LIN2 - 31-50 %; и

LIN3 - 51-100 %.

- **ALH** - Амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија – CASA вредносна скала од 0-18 μm во интервали од 2 μm :

ALH1 - (0-6 μm);

ALH2 (7-12 μm); и

ALH3 (13-30 μm).

Вторите категории го опфаќаа референтниот, првата понискиот, а третата повисокиот опсег на вредности за сперматозоиди од овни (Mortimer and Maxwell, 1999).

- **VEL** – Мотилна брзина на сперматозоидите:

- VEL1 - Брзи ($VAP \geq 75.0 \mu\text{m/s}$);
- VEL2 - Средно брзи ($VAP \leq 75.0 \mu\text{m/s}$ и $\geq 21.9 \mu\text{m/s}$);
- VEL3 - Спори ($VAP \leq 21.9 \mu\text{m/s}$) и;
- VEL4 - Статични ($VAP \approx 0 \mu\text{m/s}$).

8. Статистичка обработка на податоците

Податоците кои беа добиени при анализирањето на репликатите имаа категориски карактер. Бројот на сперматозоиди во параметарските категории беа изразени како фреквенции на дистрибуција во табели на контингенција со соодветни степени на слобода (df). За утврдување на значителните отстапувања од теоретската (очекуваната) дистрибуција за секоја од групите, беше применет χ^2 Пирсоновиот тест на независност (непараметарски тест). Критичната вредност за одбивање на нулта хипотезата (α) беше подесена во зависност од сензитивноста на тестот за секоја анализа посебно (табела 3). Сензитивноста беше одредена според *a priori* анализа изведена со статистички софтвер (G*Power v.3.1), согласно со предодредените вредности за df, ацентралниот параметар (λ), кој ја рефлектира оддалеченоста на најдената дистрибуциона фреквенција во однос на очекуваната, и статистичката моќност ($1-\beta$), чија вредност ја покажува сигурноста за отфрлање на тип-1 статистичка грешка. Согласно овие критериуми беше изведена интерпретација на статистичката значајност на омнибусната χ^2 вредност за секоја анализа, земајќи ги во предвид *post hoc* критичните вредности за α и χ^2 . Во следната фаза од анализата, беа утврдени граничните прилагодени-резидуали (z_{crit}) во зависност од df (Beasley, T.M. and Schumacker, R.E., 1995). На овој начин, фреквенцијата на индивидуалните категории во табелите на контингенција беше проценувана како повисока (z^+ / f^+) или пониска (z^- / f^-) од χ^2 очекуваната фреквенција. Завршниот дел од секоја анализа опфаќаше пресметување на релативни-индекси-на-придонес (RCI) кој го рефлектираа соодносот помеѓу индивидуалната и омнибусната χ^2 вредност (Beasley, T.M. and Schumacker, R.E., 1995). Оваа вредност беше коригирана-урамнотежена во зависност од фреквенцијата на дистрибуција на сумата на редовите во табелите на контингенција и прилагодените-резидуали. На овој начин беше идентификувано и квантифицирано влијанието на категориите кои имаат значителен придонес во омнибусната χ^2 вредност. Поради субјективната природа на претходно опишаните

параметри, ефектот на КМ во однос на криопрезервацискиот успех беше проценуван според следните критериуми: позитивен доколку, $p < \alpha$, високи RCI вредности за f_+ во VIAB1, EL1/EL2, VCL1/VCL2, ALH1/ALH2, LIN2/LIN3 и VEL1/VEL2, или високи RCI за f_- во преостанатите категории на секој параметар; негативен доколку, $p < \alpha$, високите RCI вредности се однесуваат за f_+ и f_- во спротивен сооднос на претходниот критериум.

Статистичката анализа беше организирана во седум сесии, согласно целите на ова истражување, достапни на Harvard Dataverse објавени под <https://doi.org/10.7910/DVN/WLCSMI>

1. Описна статистика на квалитативните и квантитативните карактеристики на свежите ејакулати во HPS;
2. Статистичка сензитивност на одделните анализи;
3. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните КМ за анализите на 0- часови од инкубацијата;
4. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните КМ за анализите на 3- часови од инкубацијата;
5. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните и експерименталните КМ во а-СТ методот, за анализите на 0- и 3- часови часови од инкубацијата;
6. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните и експерименталните КМ во б-СТ методот, за анализите на 0- и 3- часови часови од инкубацијата;
7. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај експерименталните КМ во а-СТ и б-СТ

V. РЕЗУЛТАТИ

1. Описна статистика на квалитативните и квантитативните карактеристики на свежите ејакулати во HPS

Квалитативните параметри на свежите ејакулати се прикажани во табела 1. Описната статистика за секој параметар опфаќа опсег на вредности, средна вредност и стандардна девијација. Волуменот на свежите ејакулати беше во опсегот помеѓу 1,0 и 3,0 ml, ($1,68 \pm 0,64$). Концентрацијата на сперматозоиди беше во опсегот од 2,22 до $6,12 \times 10^6/\text{ml}$, ($4,00 \pm 1,18$). Сперматокритот имаше опсег на вредности од 18 до 48 % ($36,07 \pm 7,89$). Девет ејакулати имаа густина со оценка 5 (90 %), а само еден беше оценет со 4 (10 %). Вкупната мотилност на сперматозоидите по ејакулат, имаше опсег на вредности од 83 до 99 % ($92,70 \pm 4,47$). Клеточниот мембрански интегритет во популацијата на сперматозоиди се движеше помеѓу 77,78 % и 93,00 % ($84,62 \% \pm 4,29$).

Квантитативните карактеристики на свежите ејакулати во збирниот примерок, изразени преку парцијалниот волумен, во функција на сперматокритот, се прикажани во табела 2. Просечната вредност на парцијалниот волумен за ејакулатите изнесуваше $10,0 \text{ ml} \pm 3,14$, а опсегот на вредности се движеше меѓу 209 и $552 \mu\text{L}$.

2. Статистичка сензитивност на одделните анализи

Во табела 3 се претставени добиените α , χ^2 и Z_{crit} гранични вредности добиени според степенот на слобода (df), ацентралниот параметар (λ), и моќноста на тестот ($1-\beta$).

3. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните КМ за аналитите на 0-часови од инкубацијата

Во анализата на фреквенциите на дистрибуција за аналитите од контролните КМ во а-СТ и b-СТ методот на суспендирање, на 0 часа од инкубирањето, $p < \alpha$ беа забележани за VIAB, VCL и VEL параметрите, додека EL, LIN и ALH анализите беа со $p > \alpha$.

Во VIAB анализата, најголем процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во VIAB1 (48,84 %), помал во VIAB3 (26,08 %) и VIAB4 (20,17 %), а најмал во VIAB5 (4,10 %) и VIAB2 (3,82 %). Подетален приказ на фреквенциите на дистрибуција на сперматозоидите е прикажана во графикон 1. Значајни z^+ вредности ($\text{RCI} \geq 0,04$) за

омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=92,66$) беа утврдени за C-a-0 во VIAB5 ($f_+=6,82$ %, RCI=0,31) и во VIAB3 ($f_+=28,41$ %, RCI=0,04), и за C-b-0 во VIAB1 ($f_+=50,05$ %, RCI=0,08) и во VIAB2 ($f_+=4,99$ %, RCI=0,07). Значајни z^- вредности (RCI $\geq 0,03$) беа утврдени за C-b-0 во VIAB5 ($f_-=1,84$ %, RCI=0,26) и во VIAB3 ($f_-=24,13$ %, RCI=0,03), и за C-a-0 во VIAB1 ($f_-=40,78$ %, RCI=0,10) и VIAB2 ($f_-=2,40$ %, RCI=0,09).

Во VCL анализата, највисок процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во VCL3 (56,10 %), а понизок во VCL2 (22,63 %) и VCL1 (21,27 %). Подетален приказ на фреквенциите на дистрибуција на сперматозоидите е прикажана во графикон 3. Значајни z^+ вредности (RCI $\geq 0,03$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=120,29$) беа утврдени за C-a-0 во VCL1 ($f_+=25,68$ %, RCI=0,37) и за C-b-0 во VCL3 ($f_+=59,88$ %, RCI=0,09) и во VCL2 ($f_+=23,93$ %, RCI=0,03). Значајни z^- вредности (RCI $\geq 0,02$) беа утврдени за C-b-0 во VCL1 ($f_-=16,19$ %, RCI=0,42), и за C-a-0 во VCL3 ($f_-=52,82$ %, RCI=0,08) и во VCL2 ($f_-=21,50$ %, RCI=0,02).

Во VEL анализата, највисок процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во VEL1 (42,98 %) и VEL4 (33,63 %), а понизок во VEL3 (13,47 %) и VEL2 (9,92 %). Подетален приказ на фреквенцијата на дистрибуција на сперматозоидите е прикажана во графикон 6. Значајни z^+ вредности (RCI $\geq 0,02$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=1.009,58$) беа утврдени за C-b-0 во VEL4 ($f_+=43,64$ %, RCI=0,26), и за C-a-0 во VEL2 ($f_+=14,01$ %, RCI=0,13), VEL3 ($f_+=17,36$ %, RCI=0,09) и во VEL1 ($f_+=45,93$ %, RCI=0,02). Значајни z^- вредности (RCI $\geq 0,01$) беа утврдени за C-a-0 во VEL4 ($f_-=22,70$ %, RCI=0,28), и за C-b-0 во VEL2 ($f_-=6,17$ %, RCI=0,12), VEL3 ($f_-=9,91$ %, RCI=0,08) и VEL1 ($f_-=40,28$ %, RCI=0,01).

4. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните КМ за анализите на 3-часови од инкубацијата

Во анализата на фреквенциите на дистрибуција за анализите од контролните КМ во а-СТ и б-СТ методот на суспендирање, на 3 часа од инкубирањето, $p < \alpha$ беа забележани за VIAB, VCL LIN, ALH и VEL анализите, додека EL анализата беше со $p > \alpha$.

Во VIAB анализата, најголем процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во VIAB1 (43,05 %), помал во VIAB3 (27,26 %), VIAB4 (16,21 %) и VIAB2 (10,81 %), а најмал во VIAB5 (2,67 %). Подетален приказ на фреквенциите на дистрибуција на

сперматозоидите е прикажана во графикон 7. Единствено значајни z^+ и z^- вредности вредност за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=17,51$) беа утврдени во VIAB3 за C-b-3 ($f_+=30,08$ %, RCI=0,31) и во C-a-3 ($f_-=23,69$ %, RCI=0,39), последователно.

Во VCL анализата, највисок процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во VCL2 (53,70 %), помал во VCL3 (34,57 %), а најмал во VCL1 (11,73 %). Подетален приказ на фреквенциите на дистрибуција на сперматозоидите е прикажана во графикон 9. Значајни z^+ вредности (RCI $\geq 0,02$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=384,77$) беа утврдени за C-b-3 во VCL3 ($f_+=46,00$ %, RCI=0,35), и за C-a-3 во VCL2 ($f_+=61,96$ %, RCI=0,14) и во VCL1 ($f_+=13,25$ %, RCI=0,02). Значајни z^- вредности (RCI $\geq 0,02$) беа утврдени за C-a-3 во VCL3 ($f_-=24,79$ %, RCI=0,30), и за C-b-3 во VCL2 ($f_-=44,04$ %, RCI=0,16) и во VCL1 ($f_-=9,96$ %, RCI=0,03).

Во LIN анализата, највисок процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во LIN2 (87,19 %), а најмал во LIN3 (7,75 %) и во LIN1 (5,06 %). Подетален приказ на фреквенциите на дистрибуција на сперматозоидите е прикажан во графикон 10. Единствено значајни z^+ и z^- вредности вредност за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=17,84$) беа утврдени во LIN3 за C-b-3 ($f_+=9,07$ %, RCI=0,45) и во C-a-3 ($f_-=6,63$ %, RCI=0,38), последователно.

Во ALH анализата, највисок процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во ALH2 (53,54 %) и во ALH3 (44,16 %), а најмал во ALH1 (2,30 %). Подетален приказ на фреквенциите на дистрибуција на сперматозоидите е прикажан во графикон 11. Значајни z^+ вредности за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=98,78$) беа утврдени за C-b-3 во ALH3 ($f_+=50,68$ %, RCI=0,29) и за C-a-3 во ALH2 ($f_+=59,19$ %, RCI=0,21). Значајни z^- вредности беа утврдени за C-a-3 во ALH3 ($f_-=38,46$ %, RCI=0,26) и за C-b-3 во ALH2 ($f_-=47,07$ %, RCI=0,24).

Во VEL анализата, највисок процент на сперматозоидите беа дистрибуирани во VEL4 (46,09 %) и во VEL1 (42,11 %), а помал во VEL3 (7,67 %) и во VEL2 (4,13 %). Подетален приказ на фреквенциите на дистрибуција на сперматозоидите е прикажан во графикон 12. Значајни z^+ вредности (RCI $\geq 0,04$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=457,87$) беа утврдени за C-b-3 во VEL4 ($f_+=53,71$ %, RCI=0,25), и за C-a-3 во VEL1 ($f_+=48,33$ %, RCI=0,16), VEL3 ($f_+=9,17$ %, RCI=0,05), и во VEL2 ($f_+=5,15$ %, RCI=0,04). Значајни z^- вредности (RCI $\geq 0,04$) беа утврдени за C-a-3 во VEL4 ($f_-=37,35$ %, RCI=0,28), и за C-b-3

во VEL1 ($f=36,67$ %, RCI=0,14), VEL2 ($f=3,25$ %, RCI=0,04) и VEL3 ($f=6,36$ %, RCI=0,04).

5. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните и експерименталните КМ во а-СТ методот, за анализите на 0- и 3-часови часови од инкубацијата

Најголем процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во VIAB1 (41,51 %) и VIAB2 (11,61 %), а помал во VIAB3 (23,52 %), VIAB4 (20,36 %), и VIAB5 (3,01 %). Фреквенцијата на дистрибуција на сперматозоидите, подетално е прикажана во табела 4.

Најголем дел од RCI (49 %) на z^+ вредностите беа дистрибуирани во VIAB1 (12 %) и VIAB2 (37 %), а значително помал во останатите категории (9 %). Најголем дел од RCI (37 %) на z^- вредностите беа дистрибуирани во VIAB1 (17 %) и VIAB2 (20 %), а значително помал во останатите категории (4 %). Најзначајни z^+ вредности (RCI $\geq 0,12$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=1.750,37$) беа утврдени за E2-a-3 во VIAB2 ($f_+=28,88$ %, RCI=0,25), и за E3-a-3 во VIAB2 ($f_+=24,05$ %, RCI=0,12). Останати z^+ вредности (RCI $\leq 0,06$) беа забележани за E2-a-0 во VIAB1 ($f_+=57,50$ %, RCI=0,06), E3-a-0 во VIAB1 ($f_+=57,16$ %, RCI=0,05), C-a-0 во VIAB5 ($f_+=6,82$ %, RCI=0,04) и VIAB3 ($f_+=28,41$ %, RCI=0,01), E3-a-3 во VIAB4 ($f_+=28,34$ %, RCI=0,03) и за E1-a-0 во VAIB1 ($f_+=46,57$ %, RCI=0,01). Најзначајни z^- вредности (RCI $\geq 0,07$) беа утврдени за E2-a-3 во VIAB1 ($f_-=21,89$ %; RCI=0,09), E3-a-3 во VIAB1 ($f_-=23,07$ %; RCI=0,08), и за C-a-0 во VIAB2 ($f_-=2,40$ %; RCI=0,07). Останати z^- вредности (RCI $\leq 0,05$) беа утврдени за E2-a-0 во VIAB2 ($f_-=3,76$ %; RCI=0,05), E3-a-0 во VIAB2 ($f_-=3,56$ %; RCI=0,05) и VIAB4 ($f_-=14,45$ %, RCI=0,02), E2-a-0 во VIAB2 ($f_-=6,67$ %, RCI=0,05) и во VIAB4 ($f_-=14,00$ %, RCI=0,02), и за E1-a-0 во VIAB2 ($f_-=5,17$ %, RCI=0,03).

Според EL анализата, најголем процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во EL2 (62,88 %), а во значително помал процент во EL3 (31,90 %) и EL1 (5,22 %). Фреквенцијата на дистрибуција на сперматозоидите во EL категориите се прикажани во табела 5.

Најголем процент од RCI на z^+ вредностите беа дистрибуирани во EL3 (28 %), а помал во EL2 (14 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите беа дистрибуирани во EL3 (29 %), а помал во EL2 (14 %) и EL1 (6 %).

Најзначајни z^+ вредности ($RCI \geq 0,09$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=194,76$) беа утврдени за C-a-0 во EL3 ($f_+=36,89$ %; $RCI=0,19$), E1-a-0 во EL3 ($f_+=35,58$ %; $RCI=0,09$), и за E3-a-0 во EL2 ($f_+=67,60$ %; $RCI=0,09$). Останати z^+ вредности ($RCI \leq 0,02$) беа забележани за E2-a-3 во EL2 ($f_+=66,61$ %, $RCI=0,02$), и за E3-a-3 во EL2 ($f_+=66,23$ %, $RCI=0,02$). Најзначајни z^- вредности ($RCI \geq 0,10$) беа утврдени за E3-a-0 во EL3 ($f_-=27,28$ %; $RCI=0,18$) и за C-a-0 во EL2 ($f_-=57,69$ %; $RCI=0,10$). Останати z^- вредности ($RCI \leq 0,06$) беа утврдени за E2-a-3 за EL3 ($f_-=27,57$ %; $RCI=0,06$), C-a-3 за EL1 ($f_-=4,05$ %; $RCI=0,06$), E3-a-3 за EL3 ($f_-=28,26$ %; $RCI=0,05$) и E1-a-0 за EL2 ($f_-=59,53$ %; $RCI=0,04$).

Во VCL анализата, сперматозоидите беа дистрибуирани помеѓу вредносните категории во следниот редослед: VCL2 (39,97 %), VCL1 (30,79 %), и VCL3 (29,24 %). Фреквенцијата на дистрибуција по групи и VCL категории подетално е прикажана во табела 6.

Најголем процент од RCI на z^+ вредностите (47 %) беа дистрибуирани во VCL3 (25 %) и VCL1 (22%), а помал во VCL2 (3 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите беа дистрибуирани во VCL3 (23 %), а помал во VCL1 (11 %) и VCL2 (9 %).

Најзначајни z^+ вредности ($RCI \geq 0,09$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=6,186,63$) беа утврдени за E3-a-3 во VCL1 ($f_+=68,35$ %, $RCI=0,19$), C-a-0 во VCL3 (52,82 %, $f_+=0,15$), C-a-3 во VCL2 ($f_+=61,96$ %, $RCI=0,08$) и за E1-a-0 во VCL3 ($f_+=48,01$ %, $RCI=0,08$). Останати z^+ вредности ($RCI \leq 0,02$) беа забележани за E2-a-0 во VCL3 ($f_+=39,80$ %, $RCI=0,02$), E1-a-3 во VCL1 ($f_+=41,73$ %, $RCI=0,02$), E1-a-3 во VCL1 ($f_+=38,65$ %, $RCI=0,01$) и во VCL2 ($f_+=52,67$ %, $RCI=0,01$), и за E3-a-0 во VCL2 ($f_+=46,16$ %, $RCI=0,01$). Позначителни z^- вредности ($RCI \geq 0,06$) беа лоцирани за E3-a-3 во VCL3 ($f_-=1,59$ %, $f_-=0,11$), C-a-3 во VCL1 ($f_-=13,25$ %, $RCI=0,07$), C-a-0 во VCL2 ($f_-=21,50$ %, $RCI=0,07$), и за E1-a-3 во VCL3 ($f_-=11,64$ %, $RCI=0,06$). Останати z^- вредности ($RCI \leq 0,04$) беа утврдени за E2-a-3 во VCL3 ($f_-=8,68$ %, $RCI=0,04$), E1-a-0 во VCL1 ($f_-=20,69$ %, $RCI=0,02$), E3-a-0 во VCL3 ($f_-=20,53$ %, $RCI=0,02$), E1-a-0 во VCL2 ($f_-=31,30$ %, $RCI=0,01$), E2-a-0 во VCL1 ($f_-=24,83$ %, $RCI=0,01$), и за E3-a-3 во VCL2 ($f_-=30,07$ %, $RCI=0,01$).

Во LIN анализата, сперматозоидите беа преобладајно дистрибуирани во LIN2 (76,10 %), а во значително помал процент во LIN3 (16,73 %) и во LIN1 (7,17%). Фреквенцијата на дистрибуција на сперматозоидите подетално е прикажана во табела 7.

Најголем процент од RCI на z^+ вредностите беа дистрибуирани во LIN3 (20 %), помал во LIN2 (14 %), а најмал во LIN1 (10 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите беа дистрибуирани во LIN3 (36 %), а помал во LIN2 (9 %) и LIN1 (8 %).

Најзначајни z^+ вредности ($RCI \geq 0,06$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=885,41$) беа утврдени за C-a-3 во LIN2 ($f_+=87,94$ %, $RCI=0,09$), C-a-0 во LIN1 ($f_+=10,17$ %, $RCI=0,07$) и LIN3 ($f_+=21,33$ %, $RCI=0,07$), E1-a-0 во LIN3 ($f_+=21,73$ %, $RCI=0,07$), и за E2-a-0 во LIN3 ($f_+=22,32$ %, $RCI=0,06$). Останати z^+ вредности ($RCI \leq 0,03$) беа забележани за E1-a-0 во LIN1 ($f_+=9,20$ %, $RCI=0,03$), E2-a-3 во LIN2 ($f_+=86,41$ %, $RCI=0,03$), и за E3-a-3 во LIN2 ($f_+=82,67$ %, $RCI=0,02$). Позначителни z^- вредности ($RCI \geq 0,04$) беа утврдени за Ca-3-0 во LIN3 ($f_-=6,63$ %, $RCI=0,29$), E2-a-3 во LIN3 ($f_-=8,35$ %, $RCI=0,09$), C-a-0 во LIN2 ($f_-=68,50$ %, $RCI=0,04$), и за E3-a-3 во LIN1 ($f_-=4,01$ %, $RCI=0,04$). Останатите z^- вредности ($RCI \leq 0,03$) беа лоцирани за E1-a-0 во LIN2 ($f_-=69,07$ %, $RCI=0,03$), C-a-3 во LIN1 ($f_-=5,43$ %, $RCI=0,02$), E2-a-0 во LIN2 ($f_-=69,92$ %, $RCI=0,02$), E3-a-3 во LIN3 ($f_-=13,33$ %, $RCI=0,02$), E2-a-3 во LIN1 ($f_-=5,24$ %, $RCI=0,01$), и за E3-a-0 во LIN1 ($f_-=5,95$ %, $RCI=0,01$).

Во ALH анализата, најголем дел од сперматозоидите имаа ALH вредности во опсегот на ALH2 (59,51 %), помал дел во ALH3 (35,04 %), и најмал во ALH1 (5,44 %). Фреквенцијата на дистрибуција на сперматозоидите е подетално прикажана во табела 8.

Најголем процент од RCI на z^+ вредностите беа дистрибуирани во ALH3 (22 %) и ALH2 (18 %), а најмал во ALH1 (4 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите беа дистрибуирани во ALH3 (35 %), а помал во ALH2 (12 %) и ALH1 (7 %). Најзначајни z^+ вредности ($RCI \geq 0,06$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=1.009,97$) беа утврдени за C-a-0 во ALH3 ($f_+=48,66$ %, $RCI=0,18$), E3-a-0 во ALH2 ($f_+=74,97$ %, $RCI=0,12$), и за E3-a-3 во ALH2 ($f_+=76,78$ %, $RCI=0,06$). Останати z^+ вредности ($RCI \leq 0,02$) беа забележани за E1-a-0 во ALH1 ($f_+=7,19$ %, $RCI=0,02$) и во ALH3 ($f_+=39,44$ %, $RCI=0,02$), E2-a-3 во ALH2 ($f_+=69,21$ %, $RCI=0,02$), C-a-3 во ALH3 ($f_+=38,46$ %, $RCI=0,01$), E1-a-3 во ALH1 ($f_+=6,93$ %, $RCI=0,01$) и во ALH3 ($f_+=38,30$ %, $RCI=0,01$), и за E2-a-0 во ALH1 ($f_+=7,20$ %, $RCI=0,01$). Позначителни z^- вредности ($RCI \geq 0,06$) беа утврдени за E3-a-0 во ALH3 ($f_-=18,55$ %, $RCI=0,22$), E3-a-3 во ALH3 ($f_-=18,20$ %, $RCI=0,10$), C-a-0 во ALH2 ($f_-=47,00$ %, $RCI=0,09$),

и за C-a-3 во LIN1 ($f=2,35$ %, RCI=0,06). Останатите z^- вредности (RCI $\leq 0,03$) беа лоцирани за E2-a-3 во ALH3 ($f=26,11$ %, RCI=0,03), E1-a-0 во ALH2 ($f=53,37$ %, RCI=0,02), и за E1-a-3 во ALH2 ($f=54,78$ %, RCI=0,01).

Во VEL анализата, најголем дел од сперматозоидите беа дистрибуирани во VEL4 (39,24 %) и VEL1 (34,18 %), а помал во VEL3 (16,05 %) и во VEL2 (10,53 %). Подетално, фреквенцијата на дистрибуција на сперматозоидите е прикажана во табела 9.

Најголем процент од RCI на z^+ вредностите беа дистрибуирани во VEL1 (19 %), а помал во VEL4 (8 %), VEL2 (4 %) и VEL3 (3 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите беа дистрибуирани во VEL1 (24 %), а помал во VEL2 (8 %), VEL3 (6 %), и VEL4 (4 %). Најзначајни z^+ вредности (RCI $\geq 0,06$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=5.700,80$) беа утврдени за E2-a-3 во VEL4 ($f_+=55,20$ %, RCI=0,09), E3-a-3 во VEL4 ($f_+=54,82$ %, RCI=0,08), C-a-3 во VEL1 ($f_+=48,33$ %, RCI=0,08), и за C-a-0 во VEL1 ($f_+=45,93$ %, RCI=0,06). Останати z^+ вредности (RCI $\leq 0,04$) беа утврдени за E1-a-0 во VEL1 ($f_+=43,77$ %, RCI=0,04), E3-a-3 во VEL2 ($f_+=15,61$ %, RCI=0,03), C-a-0 во VEL2 ($f_+=14,01$ %, RCI=0,02), E1-a-3 во VEL2 ($f_+=14,75$ %, RCI=0,02), E2-a-3 во VEL3 ($f_+=21,02$ %, RCI=0,02), E2-a-0 во VEL4 ($f_+=45,35$ %, RCI=0,01), и за E3-a-0 во VEL1 ($f_+=38,79$ %, RCI=0,01) и во VEL3 ($f_+=19,16$ %, RCI=0,01). Позначајни z^- вредности (RCI $\geq 0,04$) беа утврдени за E3-a-3 во VEL1 ($f_-=16,80$ %, RCI=0,12), E2-a-3 во VEL1 ($f_-=17,53$ %, RCI=0,11), C-a-0 во VEL4 ($f_-=22,70$ %, RCI=0,10), и за C-a-3 во VEL2 ($f_-=5,15$ %, RCI=0,04) и во VEL3 ($f_-=9,17$ %, RCI=0,04). Останатите z^- вредности (RCI $\leq 0,03$) беа утврдени за E3-a-0 во VEL4 ($f_-=30,10$ %, RCI=0,03), E2-a-0 во VEL2 ($f_-=6,84$ %, RCI=0,02), E2-a-3 во VEL2 ($f_-=6,26$ %, RCI=0,02), E1-a-0 во VEL3 ($f_-=13,28$ %, RCI=0,01) и во VEL4 ($f_-=33,46$ %, RCI=0,01), E2-a-0 во VEL1 ($f_-=29,97$ %, RCI=0,01), и за E3-a-3 во VEL3 ($f_-=12,77$ %, RCI=0,01).

6. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните и експерименталните КМ во b-CT методот, за анализите на 0- и 3-часови часови од инкубацијата

Во VIAB анализата, најголем дел од сперматозоидите беа дистрибуирани во VIAB1 (64,64 %), помал во VIAB3 (25,26 %) и VIAB4 (20,83 %), а најмал во VIAB2 (9,80 %) и VIAB5 (2,47 %). Подетален приказ на фреквенцијата на дистрибуција на сперматозоидите по групи е прикажана во табела 10.

Најголем дел од RCI (40 %) на z^+ вредностите беа дистрибуирани во VIAB1 (10 %) и VIAB2 (30 %), а значително помал во останатите категории (14 %). Најголем дел од RCI (32 %) на z^- вредностите беа дистрибуирани во VIAB1 (13 %) и VIAB2 (19 %), а значително помал во останатите категории (10 %). Најзначајни z^+ вредности ($RCI \geq 0,05$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=842,26$) беа утврдени за E2-b-3 во VIAB2 ($f_+=18,26$ %, $RCI=0,18$), E3-b-3 во VIAB2 ($f_+=16,62$ %, $RCI=0,12$), E2-b-3 во VIAB4 ($f_+=27,86$ %, $RCI=0,06$), и за E3-b-3 во VIAB4 ($f_+=27,57$ %, $RCI=0,05$). Останати z^+ вредности ($RCI \leq 0,04$) беа утврдени за C-b-0 во VIAB1 ($f_+=50,05$ %, $RCI=0,04$), C-b-3 во VIAB4 ($f_+=15,57$ %, $RCI=0,03$), E2-b-0 во VIAB1 ($f_+=48,94$ %, $RCI=0,03$), и за E1-b-3 во VIAB3 ($f_+=28,19$ %, $RCI=0,01$). Позначајни z^- вредности ($RCI \geq 0,05$) беа утврдени за E2-b-3 во VIAB1 ($f_-=29,67$ %, $RCI=0,09$), E1-b-0 во VIAB2 ($f_-=4,79$ %, $RCI=0,06$), E2-b-0 во VIAB2 ($f_-=5,00$ %, $RCI=0,06$), и за C-b-0 во VIAB2 ($f_-=4,99$ %, $RCI=0,05$). Останатите z^- вредности ($RCI \leq 0,04$) беа утврдени за E3-b-3 во VIAB1 ($f_-=33,72$ %, $RCI=0,04$) и VIAB3 ($f_-=19,50$ %, $RCI=0,03$), C-b-3 во VIAB4 ($f_-=15,57$ %, $RCI=0,03$), E3-b-0 во VIAB2 ($f_-=7,00$ %, $RCI=0,02$) и во VIAB4 ($f_-=16,77$ %, $RCI=0,02$), E2-b-0 во VIAB4 ($f_-=26,02$ %, $RCI=0,01$), и за E2-b-3 во VIAB4 ($f_-=21,73$ %, $RCI=0,01$).

Во EL анализата, најголем дел од сперматозоидите беа дистрибуирани во EL2 (63,14 %), помал во EL3 (32,20 %), а најмал во EL1 (4,66 %). Фреквенцијата на дистрибуција на сперматозоидите е подетално прикажана во табела 11.

Најголем процент од RCI на z^+ вредностите беа дистрибуирани во EL3 (18 %), а помал во EL2 (12 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите беа дистрибуирани во EL3 (26 %), а помал во EL2 (12%). Најзначајни z^+ вредности ($RCI \geq 0,05$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=87,12$) беа утврдени за C-b-0 во EL3 ($f_+=35,69$ %, $RCI=0,18$), E2-b-3 во EL2 ($f_+=66,57$ %, $RCI=0,07$), и за E1-b-3 во EL2 ($f_+=66,05$ %, $RCI=0,05$). Значајни z^- вредности ($RCI \geq 0,11$) беа утврдени за E1-b-3 во EL3 ($f_-=28,71$ %, $RCI=0,15$), C-b-0 во EL2 ($f_-=59,17$ %, $RCI=0,12$), и за E2-b-3 во EL3 ($f_-=29,20$ %, $RCI=0,11$).

Во VCL анализата, најголем дел од сперматозоидите беа дистрибуирани во VCL2 (42,62 %) и VCL3 (38,28 %), а помал дел во VCL1 (19,10 %). Подетален приказ на фреквенцијата на дистрибуција на сперматозоидите по групи е прикажана во табела 12.

Најголем процент од RCI на z^+ вредностите (41 %) беа дистрибуирани во VCL3 (22 %) и VCL2 (19 %), а помал во VCL1 (7 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите (48 %) беа дистрибуирани во VCL3 (34 %) и VCL2 (11 %), а најмал во VCL1 (3 %). Најзначајни z^+

вредности ($RCI \geq 0,07$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=5.300,43$) беа утврдени за E2-b-3-во VCL2 ($f_+=69,07$ %, $RCI=0,11$), C-b-0 во VCL3 ($f_+=59,88$ %, $RCI=0,10$), E1-b-0 во VCL3 ($f_+=58,56$ %, $RCI=0,08$) и за E3-b-3 во VCL1 ($f_+=32,76$ %, $RCI=0,07$). Останати z^+ вредности ($RCI \leq 0,04$) беа утврдени за E1-b-3 во VCL2 ($f_+=59,00$ %, $RCI=0,04$), E3-b-3 во VCL2 ($f_+=57,86$ %, $RCI=0,04$), C-b-3- во VCL3 ($f_+=46,00$ %, $RCI=0,01$), и за E2-b-0 во VCL3 ($f_+=46,80$ %, $RCI=0,01$). Најзначајни z^- вредности ($RCI \geq 0,06$) беа утврдени за E3-b-3 во VCL3 ($f_-=9,38$ %, $RCI=0,16$), E2-b-3 во VCL3 ($f_-=10,70$ %, $RCI=0,13$) и за C-b-0 во VCL2 ($f_-=23,93$ %, $RCI=0,06$). Останатите z^- вредности ($RCI \leq 0,05$) беа утврдени за E1-b-0 во VCL2 ($f_-=25,24$ %, $RCI=0,05$), E1-b-3 во VCL3 ($f_-=20,85$ %, $RCI=0,05$), C-b-3 во VCL1 ($f_-=9,96$ %, $RCI=0,03$), E2-b-0 во VCL2 ($f_-=32,54$ %, $RCI=0,02$), и за E3-b-0 во VCL2 ($f_-=35,48$ %, $RCI=0,01$).

Во LIN анализата, најголем дел од сперматозоидите беа дистрибуирани во LIN2 (77,33 %), помал во LIN3 (16,90 %), а најмал во LIN1 (5,77 %). Подетален приказ за фреквенцијата на дистрибуција на сперматозоидите по групи е прикажан во табела 13.

Најголем процент од RCI на z^+ вредностите беа дистрибуирани во LIN3 (31 %), помал во LIN2 (10 %), а најмал во LIN1 (9 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите беа дистрибуирани во LIN3 (33 %), а помал во LIN2 (11 %) и LIN1 (3 %). Најзначајни z^+ вредности ($RCI \geq 0,07$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=1.229,56$) беа утврдени за E1-b-0 во LIN3 ($f_+=26,33$ %, $RCI=0,16$), и за C-b-0 во LIN3 ($f_+=23,71$ %, $RCI=0,09$) и во LIN1 ($f_+=9,17$ %, $RCI=0,07$). Останати z^+ вредности ($RCI \leq 0,05$) беа утврдени за E2-b-3 во LIN2 ($f_+=89,45$ %, $RCI=0,05$), E3-b-0 во LIN3 ($f_+=20,92$ %, $RCI=0,04$), C-b-3 во LIN2 ($f_+=86,30$ %, $RCI=0,03$), E2-b-0 во LIN1 ($f_+=7,95$ %, $RCI=0,02$) и во LIN3 ($f_+=20,25$ %, $RCI=0,02$), E1-b-3 во LIN2 ($f_+=82,73$ %, $RCI=0,01$) и за E3-b-3 во LIN2 ($f_+=82,53$ %, $RCI=0,01$). Најзначајни z^- вредности ($RCI \geq 0,05$) беа утврдени за E2-b-3 во LIN3 ($f_-=6,20$ %, $RCI=0,19$), C-b-3 во LIN3 ($f_-=9,07$ %, $RCI=0,11$), и за C-b-0 во LIN2 ($f_-=67,11$ %, $RCI=0,05$). Останати z^- вредности ($RCI \leq 0,05$) беа утврдени за E1-b-0 во LIN2 ($f_-=57,88$ %, $RCI=0,04$), E1-b-3 во LIN3 ($f_-=12,43$ %, $RCI=0,03$), E3-b-3 во LIN3 ($f_-=13,09$ %, $RCI=0,03$) и во LIN1 ($f_-=4,38$ %, $RCI=0,01$), C-b-3 во LIN1 ($f_-=4,63$ %, $RCI=0,01$), E2-b-0 во LIN2 ($f_-=71,80$ %, $RCI=0,01$), E2-b-3 во LIN1 ($f_-=4,36$ %, $RCI=0,01$), и за E3-b-0 во LIN2 ($f_-=74,16$ %, $RCI=0,01$).

Во ALH анализата, најголем дел од сперматозоидите беа дистрибуирани во ALH2 (55,24 %) и ALH3 (39,38 %), а најмал во ALH1 (5,38 %). Подетален приказ на фреквенцијата на дистрибуција на сперматозоидите е прикажан во табела 14.

Најголем процент од RCI на z^+ вредностите беа дистрибуирани во ALH2 (24 %) и ALH3 (21 %), а најмал во ALH1 (4 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите беа дистрибуирани во ALH3 (28 %), а помал во ALH2 (13 %) и ALH1 (7 %). Најзначајни z^+ вредности (RCI $\geq 0,08$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=1.147,98$) беа утврдени за E2-b-3 во ALH2 ($f_+=71,35$ %, RCI=0,12), E3-b-3 во ALH2 ($f_+=70,33$ %, RCI=0,11), C-b-3 во ALH3 ($f_+=50,68$ %, RCI=0,09), и за C-b-0 во ALH3 ($f_+=50,11$ %, RCI=0,08). Останати z^+ вредности (RCI $\leq 0,03$) беа утврдени за E3-b-0 во ALH1 ($f_+=7,62$ %, RCI=0,03), E2-b-0 во ALH3 ($f_+=45,83$ %, RCI=0,02), E1-b-0 во ALH3 ($f_+=45,01$ %, RCI=0,02) и во ALH1 ($f_+=6,84$ %, RCI=0,01), и за E1-b-3 во ALH2 ($f_+=59,60$ %, RCI=0,01). Најзначајни z^- вредности (RCI $\geq 0,06$) беа утврдени за E3-b-3 во ALH3 ($f_-=24,84$ %, RCI=0,14), E2-b-3 во ALH3 ($f_-=25,13$ %, RCI=0,13), и за C-b-0 во ALH2 ($f_-=44,22$ %, RCI=0,06). Останати z^- вредности (RCI $\leq 0,05$) беа утврдени за C-b-3 во ALH1 ($f_-=2,25$ %, RCI=0,05) и ALH2 ($f_-=47,07$ %, RCI=0,03), E1-b-0 во ALH2 ($f_-=48,15$ %, RCI=0,02), E2-b-0 во ALH2 ($f_-=47,81$ %, RCI=0,02), E2-b-3 во ALH1 ($f_-=3,52$ %, RCI=0,02), и за E1-b-3 во ALH3 ($f_-=35,16$ %, RCI=0,01).

Во VEL анализата најголем процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во VEL4 (49,20 %) и во VEL1 (36,59%), а помал во VEL3 (8,94 %) и во VEL2 (5,28 %). Подетален приказ на Фреквенцијата на дистрибуција е прикажан во табела 15.

Најголем процент од RCI на z^+ вредностите беа дистрибуирани во VEL1 (19 %), а помал во VEL3 (14 %), VEL3 (14 %) и VEL2 (6 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите беа дистрибуирани во VEL4 (22 %), а помал во VEL3 (11 %), VEL2 (10 %), и VEL1 (9 %). Најзначајни z^+ вредности (RCI $\geq 0,11$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=1.194,64$) беа утврдени за E3-b-0 во VEL1 ($f_+=45,24$ %, RCI=0,16), и за E2-b-0 во VEL3 ($f_+=12,52$ %, RCI=0,11). Останати z^+ вредности (RCI $\leq 0,05$) беа утврдени за E2-b-3 во VEL4 ($f_+=54,68$ %, RCI=0,05), E1-b-3 во VEL4 ($f_+=54,48$ %, RCI=0,04), E3-b-3 во VEL2 ($f_+=6,57$ %, RCI=0,03), C-b-3 во VEL4 ($f_+=53,71$ %, RCI=0,03), E3-b-0 во VEL3 ($f_+=10,27$ %, RCI=0,02), E2-b-0 во VEL2 ($f_+=6,45$ %, RCI=0,02), и за C-b-0 во VEL1 ($f_+=40,28$ %, RCI=0,03), VEL2 ($f_+=6,17$ %, RCI=0,01) и во VEL3 ($f_+=9,91$ %, RCI=0,01). Најзначајни z^- вредности (RCI $\geq 0,06$) беа утврдени за E3-b-0 во VEL4 ($f_-=38,79$ %, $f_-=0,17$), и за C-b-3 во

VEL2 ($f=3,25$ %, RCI=0,06) и во VEL3 ($f=6,36$ %, RCI=0,06). Останати z^- вредности (RCI $\leq 0,05$) беа утврдени за C-b-0 во VEL4 ($f=43,64$ %, RCI=0,04), E2-b-0 во VEL1 ($f=32,22$ %, RCI=0,04), E2-b-3 во VEL2 ($f=3,66$ %, RCI=0,04), VEL1 ($f=33,85$ %, RCI=0,02) и VEL3 ($f=7,81$ %, RCI=0,01), во E1-b-3- во VEL3 ($f=6,85$ %, RCI=0,04) и во VEL1 ($f=3,40$ %, RCI=0,02), и за E3-b-3 во VEL1 ($f=34,76$ %, RCI=0,01).

7. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај експерименталните КМ во а-СТ и б-СТ

Во VIAB анализата, најголем процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во VIAB1 (40,68 %). Помала застапеност имаше во останатите категории: VIAB3 (23,82 %), VIAB4 (21,37 %), VIAB2 (11,64 %) и VIAB5 (2,49 %). Подетален приказ на фреквенцијата на дистрибуција е прикажан во табела 16.

Најголем дел од RCI на z^+ вредностите на анализите суспендирано со а-СТ методот беа дистрибуирани во VIAB2 (30 %) и VIAB1 (11 %), а значително помал во VIAB4 (3 %). Најголем дел од RCI на z^+ вредностите на анализите суспендирано со б-СТ методот беа дистрибуирани во VIAB2- (6 %), а останатите категории имаа помали вредности: VIAB4 (4 %), VIAB1 (3 %) и VIAB3 (2 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите на анализите суспендирано со а-СТ методот беа дистрибуирани во VIAB1 (13 %) и VIAB2 (11 %), а значително помал во VIAB5 (4 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите на анализите суспендирано со б-СТ методот беа дистрибуирани во VIAB2 (9 %) и VIAB1 (4 %), а значително помал во VIAB3 (1 %) и VIAB4 (1 %). Најзначајни z^+ вредности (RCI $\geq 0,05$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=2.182,22$) беа утврдени за E2-a-3 во VIAB2 ($f_+=28,88$ %, RCI=0,20), E3-a-3 во VIAB2 ($f_+=24,05$ %, RCI=0,10), E2-a-0 во VIAB1 ($f_+=57,50$ %, RCI=0,05) и за E3-a-0 во VIAB1 ($f_+=57,16$ %, RCI=0,05). Останати z^+ вредности (RCI $\leq 0,04$) беа утврдени за E2-b-3 во VIAB2 ($f_+=18,26$ %, RCI=0,04) и во VIAB4 ($f_+=27,86$ %, RCI=0,02), E3-b-3 во VIAB2 ($f_+=16,62$ %, RCI=0,02) и во VIAB4 ($f_+=27,57$ %, RCI=0,02), E2-b-0 во VIAB1 ($f_+=48,95$ %, RCI=0,02), E1-a-0 во VIAB1 ($f_+=46,57$ %, RCI=0,01), E2-a-3 во VIAB4 ($f_+=14,45$ %, RCI=0,01), E1-b-0 во VIAB3 ($f_+=27,93$ %, RCI=0,01), и за E3-b-0 во VIAB1 ($f_+=48,25$ %, RCI=0,01). Најзначајни z^- вредности (RCI $\geq 0,06$) беа утврдени за E2-a-3 во VIAB1 ($f_-=21,89$ %, RCI=0,07), и за E3-a-3 во VIAB1 ($f_-=23,07$ %, RCI=0,06). Останати z^- вредности (RCI $\leq 0,05$) беа утврдени за E1-b-0 во VIAB2 ($f_-=4,79$ %, RCI=0,04), E2-a-0 во VAIB2 ($f_-=3,67$ %, RCI=0,04) и во VIAB4 ($f_-=14,00$ %, RCI=0,02), E3-a-0 во

VIAB2 ($f=3,56\%$, $RCI=0,04$) и во VIAB4 ($f=14,45\%$, $RCI=0,02$), E2-b-0 во VIAB2 ($f=5,00\%$, $RCI=0,03$), E2-b-3 во VIAB1 ($f=29,67\%$, $RCI=0,03$), E3-b-0 во VIAB2 ($f=7,00\%$, $RCI=0,02$) и во VIAB4 ($f=16,77\%$, $RCI=0,01$), и за E3-b-3 во VIAB1 ($f=33,72\%$, $RCI=0,01$) и во VIAB3 ($f=19,50\%$, $RCI=0,01$).

Во EL анализата, најголем процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во EL2 (63,91 %). Помала застапеност имаше во EL3 (31,06 %), а најмала во EL1 (5,03 %). Подетален приказ на фреквенцијата на дистрибуција е прикажан во табела 17.

Најголем дел од RCI на z^+ вредностите за анализите суспендирани со а-СТ методот беа дистрибуирани во EL3 (16 %), а помал во EL1 (6 %) и EL2 (6 %). Најголем дел од RCI на z^+ вредностите за анализите суспендирани во b-СТ методот беа дистрибуирани во EL3 (6 %), а помал во EL2 (2 %). RCI на z^- вредностите за анализите суспендираин со а-СТ методот беа дистрибуирани во EL3 (18 %) и EL2 (10 %). За z^- вредностите за анализите суспендирани со b-СТ методот не беа утврдени RCI вредности.

Највисока z^+ вредност за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=172,74$) беше утврдена за E1-a-0 во EL3 ($f_+=35,58\%$, $RCI=0,16$). Останати z^+ вредности ($RCI \leq 0,06$) беа утврдени за E1-a-3 во EL1 ($f_+=6,19\%$, $RCI=0,06$), E3-a-0 во EL2 ($f_+=67,60\%$, $RCI=0,06$), E3-b-0 во EL3 ($f_+=33,72\%$, $RCI=0,06$), и за E2-b-3 во EL2 ($f_+=66,57\%$, $RCI=0,02$). Најзначајни z^- вредности ($RCI \geq 0,07$) беа утврдени за E3-a-0 во EL3 ($f_-=27,28\%$, $RCI=0,14$), и за E1-a-0 во EL2 ($f_-=59,53\%$, $RCI=0,07$). Останати z^- вредности ($RCI \leq 0,05$) беа утврдени за E2-a-3 во EL3 ($f_-=27,57\%$, $RCI=0,04$), и за E1-a-3 во EL2 ($f_-=60,81\%$, $RCI=0,03$).

Во VCL анализата, најголем процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во VCL2 (43,07 %), а помал во VCL3 (29,09 %) и во VCL1 (27,84 %). Подетален приказ на Фреквенцијата на дистрибуција е прикажана во табела 18.

Најголем дел од RCI на z^+ вредностите за анализите суспендирани со а-СТ методот беа дистрибуирани во VCL1 (20 %), а помал во VCL3 (7 %). Најголем дел од RCI на z^+ вредностите за анализите суспендирани со b-СТ методот беа дистрибуирани во VCL3 (32 %), а помал во VCL2 (10 %). RCI на z^- вредностите за анализите суспендирани со а-СТ методот беа дистрибуирани во VCL3 (15 %), VCL2 (2 %) и VCL1 (1 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите за анализите суспендирани со b-СТ методот беа дистрибуирани во VCL3 (11 %), а помал во VCL1 (7 %) и VCL2 (5 %).

Најзначајни z^+ вредности ($RCI \geq 0,12$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=9.395,95$) беа утврдени за E3-a-3 во VCL1 ($f_+=68,35$ %, $RCI=0,16$), и за E1-b-0 во VCL3 ($f_+=58,56$ %, $RCI=0,12$). Останати z^+ вредности ($RCI \leq 0,06$) беа утврдени за E1-a-0 во VCL3 ($f_+=48,01$ %, $RCI=0,06$), E2-b-3 во VCL2 ($f_+=69,07$ %, $RCI=0,06$), E3-b-0 во VCL3 ($f_+=47,53$ %, $RCI=0,06$), E2-b-0 во VCL3 ($f_+=46,80$ %, $RCI=0,04$), E1-a-3 во VCL1 ($f_+=41,73$ %, $RCI=0,03$), E1-b-3 во VCL2 ($f_+=59,00$ %, $RCI=0,02$), E3-b-3 во VCL2 ($f_+=57,86$ %, $RCI=0,02$), E2-a-0 во VCL3 ($f_+=39,80$ %, $RCI=0,01$), и за E2-a-3 во VCL1 ($f_+=38,65$ %, $RCI=0,01$). Најзначајни z^- вредности ($RCI \geq 0,04$) беа утврдени за E3-a-3 во VCL3 ($f_-=1,59$ %, $RCI=0,07$), E3-b-3 во VCL3 ($f_-=9,38$ %, $RCI=0,06$), E1-a-3 во VCL3 ($f_-=11,64$ %, $RCI=0,04$), и за E2-b-3- во VCL3 ($f_-=10,70$ %, $RCI=0,04$). Останати z^- вредности ($RCI \leq 0,03$) беа утврдени за E2-a-3 во VCL3 ($f_-=8,68$ %, $RCI=0,03$), E1-b-0 во VCL2 ($f_-=25,24$ %, $RCI=0,03$) и VCL1 ($f_-=16,20$ %, $RCI=0,02$), E3-b-0 во VCL1 ($f_-=16,99$ %, $RCI=0,02$) и во VCL2 ($f_-=35,48$ %, $RCI=0,01$), E1-a-0 во VCL1 ($f_-=20,69$ %, $RCI=0,01$) и VCL2 ($f_-=31,30$ %, $RCI=0,01$), E3-a-0 во VCL3 ($f_-=20,53$ %, $RCI=0,01$), E3-a-3 во VCL2 ($f_-=30,07$ %, $RCI=0,01$), E1-b-3 во VCL1 ($f_-=20,15$ %, $RCI=0,01$) и VCL3 ($f_-=20,85$ %, $RCI=0,01$), E2-b-0 VCL1 ($f_-=20,66$ %, $RCI=0,01$) и VCL2 ($f_-=32,54$ %, $RCI=0,01$), и за E2-b-3 во VCL1 ($f_-=20,23$ %, $RCI=0,01$).

Во LIN анализата, најголем процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во LIN2 (76,21 %), а помал во LIN3 (17,29 %) и во LIN1 (6,00 %). Подетален приказ на фреквенцијата на дистрибуција е прикажан во табела 19.

Најголем дел од RCI на z^+ вредностите на анализите суспендирани со а-СТ методот беа дистрибуирани во LIN1 (7 %), и LIN3 (7 %), а помал во LIN2 (3 %). Најголем дел од RCI на z^+ вредностите на анализите суспендирани со б-СТ методот беа дистрибуирани во LIN3 (19 %), а помал во LIN2 (8 %) и LIN1 (2 %). RCI на z^- вредностите на анализите суспендирани со а-СТ методот беа дистрибуирани во LIN3 (9 %), LIN2 (4 %) и LIN1 (1 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите на анализите суспендирани со б-СТ методот беа дистрибуирани во LIN3 (27 %), а помал во LIN2 (4 %) и LIN1 (3 %). Најзначајни z^+ вредности ($RCI \geq 0,06$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=1.195,46$) беа утврдени за E1-b-0 во LIN3 ($f_+=26,33$ %, $RCI=0,15$), E1-a-0 во LIN1 ($f_+=9,20$ %, $RCI=0,06$), и за E2-b-3 во LIN2 ($f_+=89,45$ %, $RCI=0,06$). Останати z^+ вредности ($RCI \leq 0,04$) беа утврдени за E1-a-0 во LIN3 ($f_+=21,73$ %, $RCI=0,04$), E2-a-0 во LIN3 ($f_+=22,32$ %, $RCI=0,03$) и во LIN1 ($f_+=7,76$ %, $RCI=0,01$), E3-b-0 во LIN3 ($f_+=20,92$ %, $RCI=0,03$), E2-a-3 во LIN2 ($f_+=86,41$ %, $RCI=0,02$), E2-b-0 во LIN1 ($f_+=7,95$ %, $RCI=0,02$) и во LIN3 ($f_+=20,25$ %, $RCI=0,01$), E3-a-3 во LIN2 ($f_+=82,67$ %, $RCI=0,01$), E1-b-3 во LIN2 ($f_+=82,73$ %, $RCI=0,01$), и за E3-b-3

во LIN2 ($f_+ = 82,53$ %, RCI=0,01). Најзначајни z^- вредности (RCI $\geq 0,07$) беа утврдени за E2-b-3 во LIN3 ($f^- = 6,20$ %, RCI=0,20) и за E2-a-3 во LIN3 ($f^- = 8,35$ %, RCI=0,07). Останати z^- вредности (RCI $\leq 0,04$) беа утврдени за E1-b-3 во LIN3 ($f^- = 12,43$ %, RCI=0,04), E1-a-0 во LIN2 ($f^- = 69,07$ %, RCI=0,03), E1-b-0 во LIN2 ($f^- = 67,88$ %, RCI=0,03), E3-b-3 во LIN3 ($f^- = 13,09$ %, RCI=0,03) и во LIN1 ($f^- = 4,38$ %, RCI=0,01), E3-a-3 во LIN3 ($f^- = 13,33$ %, RCI=0,02) и во LIN1 ($f^- = 4,01$ %, RCI=0,01), E2-b-0 во LIN2 ($f^- = 71,80$ %, RCI=0,01), E2-b-3 во LIN1 ($f^- = 4,36$ %, RCI=0,01), и за E3-b-0 во LIN1 ($f^- = 4,91$ %, RCI=0,01).

Во ALH анализата, најголем процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во ALH2 (60,30 %), а помал во ALH3 (33,57 %) и во ALH1 (6,13 %). Подетален приказ на фреквенцијата на дистрибуција е прикажан во табела 20.

Најголем дел од RCI на z^+ вредностите на аналитите суспендирани со а-СТ методот беа дистрибуирани во ALH2 (13 %), а помал во ALH3 (4 %). Најголем дел од RCI на z^+ вредностите на аналитите суспендирани со б-СТ методот беа дистрибуирани во ALH3 (20 %), а помал во ALH2 (8 %) и ALH1 (1 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите на аналитите суспендирани со а-СТ методот беа дистрибуирани во ALH3 (24 %), а помал во ALH2 (3 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите на аналитите суспендирани со б-СТ методот беа дистрибуирани во ALH2 (13 %) и ALH3 (10 %), а помал во ALH1 (2 %). Најзначајни z^+ вредности (RCI $\geq 0,08$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2 = 1.332,75$) беа утврдени за E1-b-0 во ALH3 ($f_+ = 45,01$ %, RCI=0,09), E2-b-0 во ALH3 ($f_+ = 45,83$ %, RCI=0,09) и за E3-a-0 во ALH2 ($f_+ = 74,97$ %, RCI=0,08). Останати z^+ вредности (RCI $\leq 0,04$) беа утврдени за E3-a-3 во ALH2 ($f_+ = 76,78$ %, RCI=0,04), E2-b-3 во ALH2 ($f_+ = 71,35$ %, RCI=0,04), E3-b-3 во ALH2 ($f_+ = 70,33$ %, RCI=0,04), E1-a-0 во ALH3 ($f_+ = 39,44$ %, RCI=0,03), E3-b-0 во ALH3 ($f_+ = 37,76$ %, RCI=0,02) и во ALH1 ($f_+ = 7,62$ %, RCI=0,01), E1-a-3 во ALH3 ($f_+ = 38,30$ %, RCI=0,01), и за E2-a-3 во ALH2 ($f_+ = 69,21$ %, RCI=0,01). Најзначајни z^- вредности (RCI $\geq 0,05$) беа утврдени за E3-a-0 во ALH3 ($f^- = 18,55$ %, RCI=0,15), E3-a-3 во ALH3 ($f^- = 18,20$ %, RCI=0,07), E1-b-0 во ALH2 ($f^- = 48,15$ %, RCI=0,06), E2-b-0 во ALH2 ($f^- = 47,81$ %, RCI=0,05), E2-b-3 во ALH3 ($f^- = 25,13$ %, RCI=0,05), и за E3-b-3 во ALH3 ($f^- = 24,84$ %, RCI=0,05). Останати z^- вредности (RCI $\leq 0,02$) беа утврдени за E1-a-0 во ALH2 ($f^- = 53,37$ %, RCI=0,02), E2-a-3 во ALH3 ($f^- = 26,11$ %, RCI=0,02), E2-b-3 во ALH1 ($f^- = 3,52$ %, RCI=0,02), E3-b-0 во ALH2 ($f^- = 54,62$ %, RCI=0,02), и за E1-a-3 во ALH2 ($f^- = 54,78$ %, RCI=0,01).

Во VIAB анализата, најголем процент од сперматозоидите беа дистрибуирани во VIAB4 (46,16 %) и во VIAB1 (33,14 %), а помал во VIAB3 (12,77 %) и во VIAB2 (7,93 %). Подетален приказ на фреквенцијата на дистрибуција е прикажан во табела 21.

Најголем дел од RCI на z^+ вредностите на анализите суспендирани со а-СТ методот беа дистрибуирани во VEL2 (16 %), и VEL3 (14 %), а помал во VEL1 (5 %) и VEL4 (4 %). RCI на z^+ вредностите на анализите суспендирани со а-СТ методот беа дистрибуирани во VEL1 (6 %) и VEL4 (5 %). RCI на z^- вредностите на анализите суспендирани со а-СТ методот беа дистрибуирани во VEL1 (17 %) и VEL3 (13 %). Најголем дел од RCI на z^- вредностите на анализите суспендирани со а-СТ методот беа дистрибуирани во VEL3 (10 %), а помал во VEL2 (6 %) и VEL4 (2 %). Најзначајни z^+ вредности (RCI $\geq 0,06$) за омнибусната χ^2 вредност ($\chi^2=7.037,72$) беа утврдени за E3-a-3 во VEL2 ($f_+=15,61$ %, RCI=0,08), E1-a-3 во VEL2 ($f_+=14,75$ %, RCI=0,06), и за E3-b-0 во VEL1 ($f_+=45,24$ %, RCI=0,06). Останати z^+ вредности (RCI $\leq 0,04$) беа утврдени за E1-a-0 во VEL1 ($f_+=43,77$ %, RCI=0,04), E1-a-3 во VEL3 ($f_+=17,78$ %, RCI=0,02), E3-a-0 во VEL3 ($f_+=19,16$ %, RCI=0,04), VEL2 ($f_+=11,94$ %, RCI=0,02) и VEL1 ($f_+=38,79$ %, RCI=0,01), E3-a-3 во VEL4 ($f_+=54,82$ %, RCI=0,02), E1-b-3 во VEL4 ($f_+=54,48$ %, RCI=0,02), E2-b-3 во VEL4 ($f_+=54,68$ %, RCI=0,02), и за E3-b-3 во VEL4 ($f_+=50,33$ %, RCI=0,01). Најзначајни z^- вредности (RCI $\geq 0,06$) беа утврдени за E3-a-3 во VEL1 ($f_-=16,80$ %, RCI=0,09), E2-a-3 во VEL1 ($f_-=17,53$ %, RCI=0,08), E3-a-0 во VEL4 ($f_-=30,10$ %, RCI=0,06), и за E3-b-0 во VEL1 ($f_-=45,24$ %, RCI=0,06). Останати z^- вредности (RCI $\leq 0,04$) беа утврдени за E1-a-0 во VEL4 ($f_-=33,46$ %, RCI=0,04), E1-a-3 во VEL4 ($f_-=35,89$ %, RCI=0,03), E1-b-3 во VEL4 ($f_-=54,48$ %, RCI=0,02), E2-b-3 во VEL4 ($f_-=54,68$ %, RCI=0,02), E1-b-0 во VEL2 ($f_-=5,11$ %, RCI=0,01) и VEL3 ($f_-=9,55$ %, RCI=0,01), и за E3-b-3 во VEL4 ($f_-=50,33$ %, RCI=0,01).

VI. ДИСКУСИЈА

1. Квалитативни и квантитативни карактеристики на свежите ејакулати

Квалитативните карактеристики на свежите ејакулати (табела 1) беа во согласност со утврдените критериуми (Vucak и сор. 2007) кои беа зададени како услов за нивно вклучување во збирниот примерок. Целта на овој услов беше да се обезбеди квалитативна хомогеност на секој ејакулат, што би ја исклучила можноста за индивидуално влијание (овен) во збирниот примерок. Со групирање на свежите ејакулати во HPS според вредноста на сперматокритот беше обезбедена квантитативна хомогеност. Бројот на сперматозоиди од секој ејакулат беше со приближно еднаков број, исклучувајќи ја можноста за бијасно влијание на еден или повеќе овни на набљудуваните ефекти (табела 2). Генерално, научните истражувања во кои се употребуваат ејакулати од различни единки не ја декларираат квантитативната (Bernardini и сор. 2011; Pérez-Pé и сор., 2002; de Graaf, 2007) или квалитативна хомогеност (de Graaf, 2007; Mataveia и сор., 2010). Зависно од експерименталните цели, во одредени истражувања каде квантитативната хомогеност не е суштинска, ваквиот пристап нема значителни бијасни ефекти, но во сите останати истражувачки модели каде е потребно да се докаже влијанието на одреден фактор на ниво на сперматозоиди, тогаш ова мора да биде земено во предвид. Дополнително, користењето на ејакулати од исто животно мострирани во различен период (час, ден, недела) (de Graaf, 2007; Mataveia и сор., 2010), може да произведе грешки во интерпретацијата на резултатите доколку истите се сублимираат. Составот на ејакулатите кај цицачите може значително да варира во зависност од одредени амбиентални (температура, влажност, светлина и сл.), интериндивидуални (вид, раса, сој, животно) и интраиндивидуални фактори (исхрана, физиолошки статус, возраст и сл.). Покрај овие објективни фактори, постојат и субјективни кои многу посуптилно влијаат врз појавата на квалитативната варијабилност на ејакулатите. Активноста и концентрацијата на ензимите од СП, метаболитичката активност на сперматозоидите, ејакулаторната фреквенција, циркадијалниот интервал на хормонската активност како и експресијата на одредени генетски фактори, се дел од овие механизми кои може да произведат значителни варијации на мострираните примероци.

Методот со кој ејакулатите за ова истражување беа групирани, ги елиминираше овие бијасни фактори и придонесе за повисока објективност во проценувањето на

експерименталните фактори. Сите примероци за анализа потекнуваа од една сесија на собирање ејакулати, што подразбираше унифицирање на сезоната, времето, последователноста на ејакулацијата кај животните и сл.

2. Сензитивност на статистички модел

Пирсоновиот χ^2 тест на независност беше избран како статистички модел за процесирање и интерпретирање на непараметарските податоци добиени во експерименталните постапки. Овој тест најчесто е употребуван во случаи каде податоците (фреквенцијата) во колоните или редовите потекнуваат од индивидуални и засебни популации (Beasley, T.M. и Schumacker, R.E., 1995). Нул-хипотезата декларира дека пропорционалната дистрибуција на добиените фреквенции (π) во однос на категориите не се разликува помеѓу индивидуалните (k) примероци ($H_0: \pi_1 = \pi_2 \dots = \pi_k$). За спроведување на овој тест, користевме табели на контингенција, во кои групите беа сместени во колони, а параметриските категории во редови. Употребата и интерпретацијата на овој тест е опишана во ревијално истражување (Beasley, T.M. и Schumacker, R.E., 1995). Добиените вредности (фреквенции на дистрибуција) не можат да дадат информација за врската помеѓу факторите, туку само за прифаќањето или отфрлањето на нулта хипотезата. Со ова се ограничува понатамошното (*post hoc*) анализирање на вредностите во случаи каде $p < \alpha$. Омнибусната природа на χ^2 вредноста, наложува користење на дополнителни статистички модели со цел да се идентификуваат значајните фактори во анализата. Во нашите анализи, го користевме методот за прилагодени стандардни остаточни (резидуални) вредности (z) со кој се означуваат разликите помеѓу очекуваните и утврдените фреквенции на дистрибуција. Сепак, овој метод бил критикуван за неговата мала дискриминирачка моќ, па поради тоа, во нашите анализи беше надополнет со метод за релативен индекс на придонес (RCI) (Beasley, T.M. и Schumacker, R.E., 1995). Со овие два методи, ни беше овозможено да добиеме векторска димензија на индивидуалните граfi од табелата. Преку „ z “ ја утврдувавме позитивната или негативната разлика помеѓу утврдените и очекуваните фреквенции на дистрибуција, а со RCI добивме квантитативна информација за влијанието на графата од табелата на контингенција во однос на омнибусната χ^2 вредност. Во интерпретирањето на RCI вредностите, во предвид ја земавме просечната фреквенција на соодветните категории. Во табела 3 се прикажани параметрите за утврдување на сензитивноста на индивидуалните тестови. Прагот за тип-1 грешка (α) се разликуваше

зависно од df , и λ , додека очекувана моќност беше еднаква за сите анализи ($1-\beta=0,99$). На овој начин, добивме прилагодени и урамнотежени нивоа на α и Z_{crit} , зависно од обемот на тестот, но и од критичната χ^2 вредност.

3. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните криопрезервациски медиуми за анализите на 0- и 3-часови од инкубацијата

Целта на оваа анализа беше да се процени ефектот на додавање контролен КМ пред или после криотретманот за да се елиминира тип-1 грешка при проценувањето на анализите суспендирани со експерименталните КМ. Проценувањето на двата методи на суспендирање (a-CT vs b-CT) беше изведено под претпоставката дека категориите имаат просечна фреквенција на дистрибуција $\geq 34\%$, а придонесот на поединечната χ^2 вредност во однос на омнибусната да биде $\geq 15\%$ ($RCI \geq 0,15$). На овој начин, евентуално утврдените отстапувања во фреквенциите на дистрибуција за одделните категории беа урамнотежени во однос на целокупната сперматозоидна популација. Така, доколку беше утврдено значително повисока фреквентност на одредена група за одредена категорија која имала ниска застапеност во однос на целокупната сперматозоидна популација, придонесот (RCI) беше коригиран (намален) во однос на омнибусниот ефект. Поради незначителниот процентуален удел на сперматозоиди, таквата категорија би имала статистички значајно отстапување, но сепак, нејзиниот ефект би бил занемарлив во однос на целокупната популација.

Во проценувањето на анализите суспендирани со контролните КМ на 0-часови од инкубацијата (a-CT vs b-CT) (графикон 1-6), постоеше значајно отстапување во VEL4 (a-CT < b-CT). Во проценувањето на анализите на 3-часа од инкубирањето (графикон 7-12) беа утврдени значителни отстапувања во следните категории: VCL2 (a-CT > b-CT), VCL3 (a-CT < b-CT), ALH2 (a-CT > b-CT), ALH3 (a-CT < b-CT), VEL1 (a-CT > b-CT) and VEL4 (a-CT < b-CT). Оттука, беше евидентно дека b-CT методот на суспендирање со контролни КМ предизвикува значително повисоко отстапување на фреквенциите на дистрибуција кај статичните сперматозоиди и сперматозоидите кои се карактеризираа со капацитирана мотилна активност. Ефектот на хиперактивација и/или намалена мотилност во сперматозоидните популации е претходно опишана од Salamon и Maxwell, 2000 како резултат на дополнителното суспендирање непосредно после одмрзнувањето.

4. Проценка на криопрезервацискиот успех кај контролните и експерименталните КМ во а-СТ методот, за анализите на 0- и 3-часови часови од инкубацијата

Целта на оваа анализа беше да се процени ефектот на пред-криопрезервациско суспендирање на анализите со контролни и експериментални КМ на 0- и 3-часа од инкубацијата. Сите анализи беа суспендирани со клеточна концентрација од 50×10^6 /ml пред СТ.

Во VIAB анализата (табела 4) на 0-часови од а-СТ методот, најзначајни влијанија на f_+ беа забележани за E2 и E3 медиумите во VIAB1. Овие медиуми имаа речиси еднакво влијание на f_- во VIAB2 и во VIAB4. Кај анализите на 3-часови од инкубацијата, единствено значајни влијанија на f_+ беа забележителни за E2 и E3 медиумите во категоријата која вклучуваше сперматозоиди со оштетен акрозом (VIAB2), а нешто помали RCI вредности беа забележителни и за VIAB4. Истовремено тие имаа изразено високи RCI вредности во VIAB1. Оттука, произлегува дека E2 и E3 медиумите имаат непосреден ефект во зголемување на фреквентноста на категоријата сперматозоиди со задржан структурен интегритет и морфологија. Ова ја потврдува превентивната улога на HSP и GSH во криолошките оштетувања на структурата на сперматозоидите опишана и во други истражувања (Perez-Pe и соp., 2001; Bernardini и соp. 2011). Ефектот на HSP би можел да се припише на специфични протеински фракции кои се идентификувани како RSP-14 и RSP-20 и кои имаат способност за адсорпција на површината од клеточната мембрана, репарирајќи ги евентуалните оштетувања кои настануваат во текот на криопрезервацијата (Bergeron-Annick и соp., 2005).

Во EL анализата (табела 5) на 0-часови од инкубацијата, највисоко влијание на f_+ во категоријата со највисок опсег на вредности (EL3) беше утврден за C и E1 медиумите, кои истовремено имаа значителни RCI вредности и на f_- во референтниот опсег на вредности за сперматозоиди од овни (EL2). Споредбено со нив, E3 медиумот имаше единствен и највисок ефект на f_+ во EL2 и на f_- во EL3. На 3-часа од инкубацијата, E2 и E3 покажаа еднаков и релативно помал ефект на f_+ во EL2 и речиси ист ефект на f_- во EL3. C и E1 во овој временски период, немаа значителни влијанија. Оттука, следи дека GSH и HSP експерименталните компоненти додадени во предкриопрезервацискиот период, непосредно после одмрзнувањето влијаат на појавата на повисок број сперматозоиди кои имаат повеќе изразена елипсовидност на главата, а исто така ја намалуваат фреквентноста на оние сперматозоиди со помалку изразена елипсовидност.

Ефектот на E3 врз EL може да се рефлектира со зголемена оплодувачка способност на сперматозоидите и ејакулатите, со оглед на тоа што морфологијата на главата е високо поврзана со нивната мотилност (Maroto-Morales, A., и соp., 2015; Gomendio, M. и Roldan, E.R.S., 2008). Земајќи го во предвид ефектот на E1 медиумот, би можело да се заклучи дека E3 медиумот, примарно влијае преку HSP компонентата, а не преку GSH.

Во VCL анализата (табела 6) на 0-часа од инкубацијата, C- и E1-медиумите имаа највисоко влијание на f_+ во VCL3, каде RCI во C-a-0 имаше двојно поголема вредност во однос на E1-a-0. Истовремено, разликата на RCI на f_- во VCL2 беше со трикратна разлика во корист на C-a-0. На 3-часа од инкубацијата, C-медиумот имаше изразено висок ефект во појавата на f_+ во VCL2 и на f_- во VCL1, додека E1-, E2- и E3-медиумите имаа изразен ефект на f_- во VCL3. E3-a-3 групата имаше најдоминантно влијание во f_+ на VCL1, додека кај E1 и E2 беа забележливи мали RCI на f_+ во VCL1 и VCL2 кои немаа значаен омнибусен ефект. Земајќи го во предвид ефектот на GSH-медиумот на 3-часа од инкубацијата, би можело да се потврди дека увидениот ефект на E3-a-3 групата во зголемената фреквентност на VCL1 примарно се должи на HSP-компонентата, додека намалената фреквентност на VCL3 категоријата, се должи на GSH. Со ова би можеле да заклучиме дека комбинираниот ефект на GSH и HSP дадоа најголем придонес во задржувањето на повисок процент на сперматозоиди кои имаа низок опсег на VCL вредности што би значело дека се потенцијално нехиперактивирани. Улогата на овие експериментални компоненти во задржување на мотилните карактеристики на некапацитирани сперматозоиди и фертилната способност се претходно елаборирани и прикажани од други автори (Perez-Pe и соp., 2001; Martin и соp., 2007; Martin и соp., 2007).

Во ALH анализата (табела 8) на 0-часови од инкубацијата, најдоминантни влијанија на f_+ во категоријата со највисок опсег на вредности за ALH (ALH3), кој условува карактеризирање на неправолиниска мотилност во популацијата на сперматозоиди беше забележано за C- и E3-медиумите. Кај C-медиумот беше забележано значително влијание за појава на f_- во ALH2, додека за E3, покрај f_+ во ALH3 постоеше и помало но значително влијание и во ALH2. E1- и E2-медиумите имаа значително помало изразено влијание врз категориите, кое беше речиси занемарливо споредбено со претходно споменатите KM. На 3-часа од инкубацијата, E3 медиумот доминираше со своето влијание во појавата на f_+ во ALH2 и ALH3, кое беше речиси еднакво. Со речиси 95% фреквенција на дистрибуција на сперматозоидите во ALH2 (59,51%) и ALH3 (35,04%),

омнибусниот ефект можеше единствено да се припише на С- и Е3-медиумите на 0- часови, и на Е3-медиумот на 3-часови од инкубацијата. Следствено на ова, сметавме дека GSH и HSP компонентите, истовремено придонесуваа за зголемување на бројот на сперматозоиди кои имаа некапацитирачка и капацитирачка мотилност, но споредбено со С-медиумот, нивниот ефект беше значително повеќе поволен во однос на мотилноста. Оваа констатација беше во прилог со претходно наведените научни извори (Perez-Pe и сор., 2001; Martin и сор., 2007; Martin и сор., 2007).

Во LIN анализата (табела 7) на 0-часови од инкубација, С-, Е1- и Е2-медиумите имаа речиси еднакво влијание на f_+ во LIN1 и од повисоко кон помало влијание, на f_- во LIN2, редоследно. На 3-часа од инкубацијата, редоследно за С-, Е2- и Е3-медиумите беа забележани од највисоки до најниски RCI вредности на f_+ во LIN2 и на f_- во LIN1. Од овие наоди беше воочливо дека непосредно после одмрзнувањето, сите медиуми, со исклучок на Е3, имаа воедначен ефект во зголемената фреквентност на категоријата со високо линеарни сперматозоиди (LIN1) кои беа потенцијално не-капацитирани. На 3- часа, С-медиумот беше највисоко влијателен во зголемената фреквентност во категоријата со референтен опсег на вредности во однос на Е2 и Е3 кои имаа значително помало омнибусно влијание.

Во VEL анализата (табела 9), значително повисоки фреквенции беа забележани во VEL1 за С-медиумот на 0- и 3-часа, и за Е1 на 0-часа од инкубацијата. Највисоки влијанија за повисоките фреквенции на VEL4 категоријата беа утврдени за Е2- и Е3-медиумите на 3- часа од инкубацијата кои истовремено имаа и доминантни влијанија за најниските фреквенции. Ваквиот ефект на Е2 и Е3 медиумите можеше да се објасни со хиперактивациските својства на HSP кој на 3-часа доведуваа до целосно исцрпување на сперматозоидната мотилност. GSH компонентата придонесе за повисока фреквентност на сперматозоидите со повисоки VAP вредности во однос на Е2- и Е3-медиумите, и таа би можела да се посочи како фактор кој придонесуваше за разликите помеѓу овие два КМ на 0-часови од инкубацијата. Овие наоди беа во согласност со тврдењата на автори кои го истражувале превентивниот ефект на GSH во однос на мотилните карактеристики на одмрзнатите сперматозоиди (Bucak и сор., 2007; Barrios и сор., 2000; Perez-Pe и сор., 2001).

Заклучно со податоците од табелите 4-9, ефектот на групите (факторите) од а-СТ методот врз криопрезервацискиот успех беше рефлектиран на следниот начин:

C-a-0 анализите имаа високо-негативен ефект во EL, VCL и ALH, и ниско-негативен на VIAB. Ниско-позитивни ефекти беа утврдени за LIN, а средно-позитивни за VEL. Сперматозоидната популација беше доминантно карактеризирана со оштетен структурен интегритет, намалена елипсоидност на сперматозоидната глава, високи вредности за брзината на мотилните клетки и висока девијација на траекторијата што ги класифицира како хиперактивирани (капацитирани).

C-a-3 анализите немаа значаен ефект на VIAB и EL. Високо-позитивни ефекти беа утврдени за LIN и VEL, додека умерено-позитивни за VCL. Ниско-негативни ефекти беа забележани за ALH. Во оваа група, сперматозоидите предоминантно имаа линеарна траекторија на мотилност, без значителни ефекти на структурниот интегритет, морфологијата и елонгацијата на главата. Не постоеја индикации за хиперактивирана мотилност на доминантната популација сперматозоиди.

E1-a-0 анализите имаа ниско-позитивен ефект во VAIB, LIN и VEL. Умерено-негативни ефекти беа забележителни за EL и VCL, а ниско-негативни за ALH. Овие анализи имаа доминантна сперматозоидна популација која се карактеризираше со помала елипсоидност на главениот дел, неоштетен структурен интегритет и морфологија, и афектирана линеарност на траекторијата. Хиперактивираната мотилност беше забележителна, но не во ист степен како и кај C-a-0.

E-1-3 анализите немаа позначителни ефекти на VIAB, EL и LIN. Ниско-позитивни ефекти беа забележителни за VCL и VEL. Ниско-негативни ефекти беа забележителни за LIN, и до одреден степен за VEL. Оваа сперматозоидна популација беше карактеризирана со статични или ниско-мотилни сперматозоиди за кои не постоеше карактеристична хиперактивациска мотилност.

E2-a-0 анализите немаа значаен ефект на EL и ALH. Високо-позитивни ефекти беа забележителни за VIAB, а ниско-позитивни за LIN. Ниско-негативни ефекти беа утврдени за VCL и VEL. Оваа сперматозоидна популација беше структурно и морфолошки неафектирана, без значителни девијации на линеарноста во траекторијата, но повисока застапеност на статичните клетки. Оваа популација не ги исполнуваше условите за дефинирање на хиперактивирана мотилност.

E2-a-3 анализите имаа високо-негативен ефект врз VIAB и VEL. Умерено-позитивни ефекти беа утврдени за LIN, а ниско-позитивни за EL, VCL и ALH. Оваа сперматозоидна популација доминантно имаше оштетен акрозом, но задржана морфологија, и намалена

елипсовидност на главениот дел. Линеарноста на траекторијата на беше афектирана, а најголем дел од сперматозоидите беа амотилни. Оваа популација немаше доминантно присуство на хиперактивирани сперматозоиди.

E3-a-0 анализите имаа високо-позитивен ефект врз VIAB, EL и ALH, и умерено-негативни врз VCL и VEL. Високо-негативни ефекти беа утврдени за ALH. Не постоеја значителни ефекти за LIN. Оваа сперматозоидна популација доминантно имаше нештетен структурен интегритет и морфологија, добро изразена елипсовидност на главениот дел и линеарност на траекторијата кај мотилните сперматозоиди. Поради ниските вредности за брзината на мотилните сперматозоиди, не постоеја индикации за хиперактивација кај мнозинството од популацијата.

E3-a-3 имаа високо-негативни ефекти за VEL, и умерено-негативни за VIAB и ALH. Ниско-позитивни ефекти беа утврдени за EL и LIN. Оваа група, доминантно имаше сперматозоиди со оштетен акрозом, изразена елипсовидност на главениот дел и статична мотилност. Не постоеја индикации за доминирање на хиперактивациска мотилност.

5. Проценка на ефектите врз криопрезервацискиот успех кај контролните и експерименталните КМ во b-СТ методот, за анализите на 0- и 3-часови часови од инкубацијата

Целта на оваа анализа беше да се процени ефектот на после-криопрезервациско суспендирање на анализите со контролни и експериментални КМ на 0- и 3-часа од инкубацијата. Анализите пред-криопрезервацијата беа суспендирани со контролни-КМ до постигнување на клеточна концентрација од 100×10^6 /ml, а после-криопрезервацијата беа суспендирани со контролни и експериментални КМ во однос 1:1, до постигнување на клеточна концентрација од 50×10^6 /ml.

Во VIAB анализата (табела 10), на 0-часа од инкубација, беше утврдено речиси еднакво влијание на C-, E2- и E3-медиумите во појавата на f_+ во VIAB1 категоријата. E1 медиумот имаше единствено влијание врз појавата на f_+ во VIAB2 категоријата, без позначително влијание врз останатите категории. Кај C-, E2- и E3-медиумите беше констатирано влијание на f_- за VIAB2. На 3-часа од инкубацијата, C- и E1-медиумите имаа влијание врз f_+ на VIAB3 категоријата, додека E2- и E3-медиумите имаа доминантно влијание на f_+ во VIAB2 и VIAB4 категориите. Во овие медиуми беше

високо изразен ефектот и на f - во VIAB1, каде E2-медиумот имаше два пати поголемо влијание во однос на E3. Оттука произлегува дека на 0-часови од инкубацијата, E2- и E3-медиумите немаа значителна разлика во однос на контролниот ејакулатен медиум кај зголемената фреквентност на категоријата со неоштетен клеточен интегритет. На 3-часа од инкубацијата, тие придонесуваа за зголемена фреквентност на категориите сперматозоиди со нарушен интегритет на акрозомот и/или клеточната мембрана, што ги класифицираше во групата на потенцијално капацитирани сперматозоиди. Овие наоди беа во согласност со тврдењата на други автори кои ја отфрлиле хипотезата за постоење на репаративен ефект на GSH и/или HSP додадени во после криопрезервацискиот период (de Graaf, 2007; Ledesma и сop. 2005).

Во EL анализата на 0-часови од инкубацијата (табела 11), единствено значајно влијание беше забележано за C-медиумот кое беше изразено преку f_+ во EL3 и f - во EL2. На 3-часа од инкубацијата, E1- и E2-медиумите имаа слично влијание во појавата на f_+ во EL2 и на f - во EL3. Земајќи ги во предвид RCI вредностите, можеше да се утврди дека E2- и E1-медиумот влијаеа во повисок, односно во понизок степен врз појавата на повисоки фреквенции на сперматозоиди кои имаа референтен опсег на вредности за елонгација на главениот дел и кои можеа да се дефинираат како клетки со презервирана морфологија. C-медиумот, придонесуваше за зголемен процент на популацијата на сперматозоиди која имаше повисок опсег на вредности за EL, дефинирајќи ги како клетки со променета морфологија на главата. Овие наоди беа во согласност со претходни истражувања кои ги констатирале позитивните ефекти на GSH и HSP во задржување на морфологијата на сперматозоидите после одмрзнувањето (Bucak и сop., 2007; Barríos и сop., 2000).

Во VCL анализата на 0-часови од инкубацијата (табела 12), можеше да се забележи повисокото влијание на C- и E1- медиумите во појавата на f_+ во VCL3 и на f - во VCL2, споредбено со E2- и E3-медиумите. На 3-часови од инкубацијата, единствено C-медиумот имаше минимално влијание врз појавата на f_+ во VCL3, додека E2 имаше за 2,5 пати поголема RCI вредност на f_+ во VCL2, споредбено со E1- и E3-медиумот. E3 беше повеќе значаен поради тоа што покрај претходно споменатото влијание во VCL2, тој имаше и забележлива RCI врз f_+ на VCL1 категоријата. Врз основа на овие наоди можеше да се потврди дека E1-, E2- и E3-медиумите, на 3-часа инкубација имаа поголем придонес за задржување на некапацитирачка мотилност кај одмрзнатите сперматозоиди, споредбено со C-медиумот. Земајќи ги во предвид просечните дистрибуциони

фреквенции на категориите, највисок ефект беше алоциран кај HSP-компонентата во E2-медиумот што ја потврдуваше хипотезата на претходни научни истражувања (García, E.M., и сор., 2006; Barríos и сор., 2000).

Во ALH анализата (табела 14) на 0-часови од инкубацијата, C-медиумот имаше доминантно влијание врз појавата на f_+ во ALH3 и на f_- во ALH2, споредбено со E1- и E2-медиумите. На 3-часа од инкубацијата, C-медиумот имаше ист ефект како и на 0-часови, со нешто помало влијание на f_- во ALH2. E2- и E3-медиумите имаа доминантно влијание врз појавата на f_+ во ALH2 и на f_- во ALH3 категоријата. Следствено на ова, можеше да се потврди дека C-медиум, споредбено со експерименталните медиуми, имаше значително висок придонес во појавата на сперматозоиди со висок опсег на ALH вредности кои потенцијално беа класифицирани како хиперактивирани. И во овој случај, ефектот на HSP и/или GSH се манифестираше после 3-часа инкубирање, што беше во согласност со претходно реферираните хипотези (García, E.M., и сор., 2006; Barríos и сор., 2000).

Во LIN анализата (табела 13) на 0-часови од инкубацијата, E1- и C-медиумите имаа изразен ефект во појавата на f_+ во LIN1 и на f_- во LIN2, споредбено со E2- и E3-медиумите. На 3-часа од инкубацијата, E2- и C-медиумите имаа најизразен ефект во појавата на f_+ во LIN2 и на f_- во LIN1, споредбено со E1- и E3-медиумите. Соодносот помеѓу E1-b-0 и C-b-0, како и помеѓу E2-b-3 и C-b-3 беше двојно повисок во корист на првиот медиум. E1-b-0 и E2-b-3 имаа за пет пати повисоки RCI вредности во однос на останатите два медиуми. Овие наоди посочуваа дека GSH компонентата додадена веднаш после одмрзнувањето на ејакулатите имаше значаен удел во зголемување на бројот на сперматозоиди со линеарна траекторија, додека на 3-часа, овој ефект можеше да се припише главно на E2-медиумот, односно на HSP компонентата, согласно наодите од други истражувања (Maxwell и сор., 2007). Краткорочниот ефект на GSH можеше да се објасни со неговата брза автооксидација која очекувано се случувала во текот на после-СТ инкубацијата, како што е претходно опишано и во друго истражување (Bilodeau и сор., 2000).

Во VEL анализата (табела 15) на 0-часови од инкубација, највисоко влијание врз појавата на f_+ во категоријата која ги содржеше сперматозоидите со највисоки вредности за VAP (VEL1), беше утврдено за E3-медиумот, а значително помало и за C-медиумот. Овие групи, истовремено имаа и соодветно влијание врз појавата на f_- во статичната категорија

на сперматозоиди кое беше за речиси четири пати повисоко изразено во E3- споредбено со C-медиумот. Највисоката дистрибуциона фреквенција во овие две категории, укажуваше на тоа дека овие раствори немаа изразен омнибусен ефект врз сперматозоидната популација на 0-часови од инкубацијата. На 3-часа од инкубацијата, сите ејакулатни медиуми, со исклучок на E3, имаа речиси слично влијание врз појавата на f_+ во статичната категорија (VEL4), и на f_- во мотилните категории (VEL1, VEL2, и VEL3). E3 имаше единствено влијание на f_+ во VEL2 категоријата, но со оглед на нејзината мала фреквентност споредбено со VEL1 и VEL4, омнибусниот ефект врз СТ сперматозоидите беше минимален или занемарлив. Сепак, несомнено, овој медиум имаше минимален ефект врз појавата на f_- во VEL1, што споредбено со останатите медиуми го издвојуваше со најпозитивен ефект врз фреквентноста на мотилните категории на сперматозоиди на 3-часа од инкубацијата. Следствено на овие наоди, можеше да се заклучи дека GSH и HSP компонентите додадени во после-СТ периодот имаа моментален ефект во задржување на високата мотилност на сперматозоидите кој постепено исчезнуваше, заклучно со третиот час од инкубацијата. Ова можеше да се објасни првенствено поради намалување на GSH концентрацијата поради автооксидативните аеробни процеси (Bilodeau и сор., 2000), но и поради стабилизирачкиот ефект на HSP во однос на мотилноста дури и 3-часа после инкубацијата (Maxwell и сор., 2007; Ghaoui и сор., 2007; Mataveia и сор., 2010).

Заклучно со податоците од табелите 10-15, ефектот на групите (факторите) од b-СТ методот врз криопрезервацискиот успех беше рефлектиран на следниот начин:

C-b-0 анализите имаа високо-позитивен ефект за VIAB, умерено-позитивен за LIN, и ниско-позитивен за VEL. Високо-негативен ефект беше утврден за EL, VCL и ALH. Сперматозоидната популација на овие анализи беше доминантно со неоштетен структурен интегритет и морфологија, но помалку изразена елипсовидност на главениот дел и девијатност на траекторијата на мотилност. Мотилните клетки, несомнено имаа карактеристична траекторија на хиперактивирани сперматозоиди, но сепак, најдоминантни беа оние кои имаа ниски вредности за VAP.

C-b-3 анализите имаа умерено-негативен ефект врз VIAB и VCL, и високо-негативен за ALH и VEL. Не постоеше значајно влијание за EL. Оваа сперматозоидна популација се карактеризираше со афектиран структурен интегритет и морфологија, хиперактивирана мотилност, и претежно статични клетки.

E1-b-0 анализите имаа умерено-негативен ефект врз VIAB и ALH, и високо-негативен за VCL. Високо-позитивен ефект беше утврден за LIN. Оваа група немаше значајни ефекти за EL и VEL. Сперматозоидната популација се карактеризираше со оштетен структурен интегритет и морфологија. Не постоеја индикации за хиперактивирана мотилност.

E1-b-3 анализите имаа умерено-негативен ефект за VIAB и високо-негативен за VEL. Позитивни ефекти беа забележани за EL, VCL, ALH и LIN. Сперматозоидната популација беше доминантно статична со оштетен структурен интегритет, но добро изразена елипсовидност на главениот дел.

E2-b-0 анализите имаа високо-позитивен ефект за VAIB и ниско-позитивен за VEL. Негативни ефекти беа забележливи за VCL, ALH и во помал степен за LIN. Немаше значајно влијание за EL. Оваа сперматозоидна популација се карактеризираше со неоштетен структурен интегритет и морфологија и хиперактивирана мотилност.

E2-b-3 анализите имаа високо-позитивен ефект за EL, VCL, ALH и LIN, а негативен за VIAB и VEL. Сперматозоидната популација доминантно се карактеризираше со добро изразена елипсовидност на главениот дел и оштетен акрозом. Траекторијата на мотилните сперматозоиди беше со задржана линеарност, но мотилната брзина беше значително негативно афектирана поради доминантното присуство на статични сперматозоиди.

E3-b-0 анализите имаа високо-позитивен ефект за VIAB и VEL, и умерено-позитивен за ALH и за LIN. Постоеше ниско-негативен ефект за VCL. Најголем дел од сперматозоидите имаа неоштетен клеточен интегритет и морфологија, се карактеризираа со висока мотилност и неафектирана линеарност на траекторијата. Ваквата структура на популацијата не индицираше на постоење на хиперактивирана мотилност.

E3-b-3 анализите имаа високо-негативни ефекти за VIAB, и високо-позитивни ефекти за VCL и ALH. Умерено-позитивни ефекти беа утврдени за LIN и VEL, додека за EL не беа забележани значителни ефекти. Доминантната сперматозоидна популација се карактеризираше со оштетен акрозом, неафектирана линеарност на траекторијата и мотилност. Не постоеја индикации за хиперактивирана мотилност.

6. Проценка на ефектите врз криопрезервацискиот успех кај експерименталните КМ во а-СТ и б-СТ методот, за аналитите на 0- и 3-часови часови од инкубацијата

Целта на оваа анализа беше да се процени ефектот на пред- и после-криопрезервациско суспендирање на аналитите со експериментални КМ на 0- и 3-часа од инкубацијата. Аналитите суспендирани со б-СТ методот пред-криопрезервацискиот имаа клеточна концентрација од 100×10^6 /ml, а после-криопрезервацискиот 50×10^6 /ml. Аналитите суспендирани со а-СТ пред- и после-криопрезервацискиот имаа клеточна концентрација од 50×10^6 /ml.

Од приложените резултати во табела 16, беше воочлив значаен придонес на Е2- и Е3-медиумите во појавата на омнибусните разлики во фреквенциите на дистрибуција преку VIAB1 и VIAB2 категориите. И покрај статистички значајниот придонес на VIAB4 и VIAB5, ефектот врз целокупната сперматозоидна популација беше занемарлив. RCI вредностите на Е2- и Е3-медиумите на f_+ во VIAB1 на 0-часови, се разликуваа за три пати помеѓу двата методи, каде а-СТ > б-СТ. Во VIAB2 категоријата не беа забележливи вакви разлики на f_- . Аналитите од Е3-медиумот на 3-часа од инкубацијата имаа за пет пати различни RCI вредности кај двата методи на f_- во VIAB1 и VIAB2. Кај Е2, разлика од ист степен на RCI на f_+ беше воочлива во VIAB2, додека RCI на f_- во VIAB1 беше за половина пониска. Овие наоди индицираа дека а-СТ методот на суспендирање имаше повисок придонес во зголемената фреквентност на сперматозоидни категории со неоштетен структурен интегритет и морфологија непосредно после одмрзнувањето согласно други научни истражувања (Maxwell и сор., 2007; Ghaoui и сор., 2007; Mataveia и сор., 2010). Овој ефект не беше задржан на анализираниите примероци после тричасовна инкубација. Во овие аналити, беше утврдено зголемување на фреквентноста на сперматозоиди со нарушена структура на акрозмоската мембрана, што е еден од индикаторите за нивна капацитација.

Во однос на степенот на елонгација на главата (EL) (табела 17), а-СТ методот имаше изразен ефект во појавата на повисока фреквентност на сперматозоиди со референтен опсег на EL вредности. Е1-медиумот на 0-часови имаше единствено и највисоко влијание во а-СТ преку своите RCI вредности на f_+ во EL3 и на f_- во EL2. Во истиот метод, на 3-часа, RCI вредноста на f_- во EL2 беше речиси за половина помала. Е2-медиумот во а-СТ методот имаше RCI на f_- во EL3, додека во б-СТ на f_+ во EL2. И во двата методи, овој КМ имаше позитивен придонес во популацијата на сперматозоиди со референтен

опсег на EL. Кај Е3-медиумот беше забележлива контрастна разлика во двата методи на суспендирање. Во а-СТ методот, тој имаше висока RCI вредност на f_+ во EL2 и на f_- во EL3, но во б-СТ единствената RCI вредност беше на f_+ во EL3.

Следствено на ова, додавањето на HSP и на GSH/HSP во KM пред-СТ придонесуваше за повисока фреквенција на сперматозоидна популација со неоштетен структурен интегритет и морфологија. Значително малиот придонес на Е1- медиумот на 0-часови од одмрзнувањето во а-СТ методот на суспендирање, имплицираше на тоа дека HSP беше главниот атрибут на Е2- и на Е3-медиумите. Овие својства на HSP се претходно елаборирани во студии кои ги проучувале ефектите на фракции од семиналната плазма (Bergeron-Annick и сор., 2005; Perez-Pe, и сор., 2001). Анализите суспендирани со Е1-медиумите со а-СТ методот имаа негативен придонес на криопрезервацијата преку поттикнување на повисока застапеност на сперматозоиди со ниско изразена елиптичност на главениот дел кој беше индикативен за ниска оплодувачка способност (Maroto-Morales, A., и сор., 2015; Gomendio, M. и Roldan, E.R.S., 2008). Поради отсуството на значаен ефект кај Е2-медиумот во а-СТ методот, воочениот ефект на EL беше припишан на комбинираното дејство на GSH и HSP во Е3-медиумот. Содејствувањето и меѓузависноста на семиналните протеини и антиоксидативната активност на СП се опишувани во други научни студии (Maxwell и сор., 2007; Ghaoui и сор., 2007; Mataveia и сор., 2010).

Од приложените резултати во табела 18, б-СТ методот имаше повисоко влијание на омнибусниот ефект во однос на а-СТ. Анализите од Е1-медиумот на 0-часови покажаа повисоки RCI вредности на f_+ во VCL3 и на f_- во VCL1 и VCL2 категориите за б-СТ анализите. Анализите од Е1-медиумот суспендирани со а-СТ методот, на 3-часа од инкубацијата покажаа повисоки RCI вредности на f_+ во VCL1 и на f_- во VCL3 во однос на б-СТ. Анализите од Е1-медиумот суспендирани со б-СТ методот имаа единствена RCI за f_+ во VCL2. Кај Е2 медиумот на 0-часови, RCI вредноста за f_+ во VCL3 беше за три пати повисока во б-СТ методот, но на 3-часа имаше значително висока RCI на f_+ во VCL2 и на f_- во VCL3. Кај Е3 медиумот, Е3-б-0 имаше повеќе изразени отстапувања, со акцент на f_+ во VCL3 споредбено со Е3-а-0. Е3-а-3, доминираше во придонесот на омнибусните разлики, особено преку f_+ во VCL1 и f_- во VCL3. GSH-компонентата, непосредно после одмрзнувањето влијаеше врз појавата на повисока фреквенција на сперматозоиди со висок опсег на VCL вредности кои индицираа на хиперактивирана мотилност, особено кога суспендирањето се изведуваше двократно (б-СТ). Ова беше

забележливо за сите E медиуми на 0-часови, суспендирани во b-CT методот. Овој податок ја потврди нашата хипотеза, но истовремено беше и во согласност со претходни истражувања кои го потенцирале ефектот на хиперактивација и капацитација на сперматозоидите при додавање на СП во периодот после одмрзнување (Rovegno и сор., 2015; Cormier и Bailey, 2003). Можеше да се потврди дека a-CT методот на 0-часови имаше помалку изразен ефект во појавата на повисоки фреквенции на сперматозоиди со висок опсег на VCL вредности за E1- и E2-медиумите, додека на 3-часа, имаше значајно влијание во појавата на повисоки фреквенции на сперматозоиди со референтен опсег на VCL вредности. Сепак, E3-медиумот во a-CT методот на 3 часа можеше да се издвои како најдоминантен придонесител во појавата на повисока фреквентност на VCL1 категоријата со која би се имплицирало на група сперматозоиди со нехиперактивирана мотилност. Ова повторно ја потврди хипотезата дека HSP со нејзините протеински фракции додадени во предкриопрезервацискиот период, имаше позитивен придонес во одржување на мотилноста кај одмрзнатите сперматозоиди (Ghaoui и сор., 2007; Mataveia и сор., 2010).

Од приложените резултати во табела 20, E1-b-0 имаше за околу четири пати повисок ефект на f_+ во ALH3 и три пати повисок на f_- во ALH2, во однос на E-a-0. На 3-часа од инкубацијата не беа забележани позначителни разлики. Кај E2-b-0 беше забележан сличен ефект како и за E1-b-0, но E1-b-3 имаше за 3 пати повисок ефект на f_+ во ALH2 и на f_- во ALH3. E3-a-0 имаше изразено висок ефект на f_+ во ALH2 и на f_- во ALH3, во однос на E3-b-0 каде беше забележан ефект на f_+ во ALH3 и на f_- во ALH2. Кај анализите од E3-a-3 и E3-b-3 беа забележани слични ефекти во појавата на f_+ во ALH2 и на f_- во ALH3. Анализите суспендирани со a-CT методот на 0- и 3-часа од инкубацијата, имаа значително повисок и омнибусно доминантен ефект во повисоката фреквентност на категоријата на сперматозоиди со референтен опсег на вредности изразена преку E2-медиумот. HSP компонентата беше главен фактор кој придонесуваше за пониската застапеност на ALH категоријата со висок опсег на вредности. Ваквото својство на HSP е претходно опишано во други научни истражувања (Ghaoui и сор., 2007; Mataveia и сор., 2010).

Од приложените резултати во табела 19 за LIN анализата, E1-b-0 имаше за четири пати повисок ефект во f_+ на LIN3 во однос на E1-a-0. Анализите од двете групи имаа сличен ефект на f_- во LIN2. E1-b-3 имаше значителен ефект на f_+ во LIN2 и на f_- во LIN3. Кај анализите од E1-a-3 не беше забележан значаен ефект. GSH компонентата во E1-

медиумот кај b-CT методот на суспендирање, на 0-часови од инкубацијата имаше неколкукратно повисок ефект во зголемената фреквенција на сперматозоиди со висока линеарна мотилност. Овој ефект беше задржан после 3-часа инкубација на категоријата сперматозоиди со референтен опсег на LIN вредности во b-CT методот. E2-a-0 имаше повисоко изразен ефект во f_+ на LIN3 и на f_- во LIN2 во однос на E2-b-0. После 3-часа инкубација, E2-b-3 анализите имаа изразено висок ефект на f_+ во LIN2 и на f_- во LIN3. Ова индицираше на тоа дека E2-медиумот кој се користеше за суспендирање на сперматозоидите на 3-часа после одмрзнувањето, имаше најизразен ефект во појавата на висока застапеност на сперматозоиди со референтен опсег на LIN вредности. Земајќи ја во предвид просечната дистрибуција на сперматозоидите по категории, овој ејакулатен медиум истовремено го имаше најизразениот омнибусен ефект. Кај E3 ејакулатните медиуми беше забележан сличен ефект во појавата на f_+ во LIN2 и на f_+ во LIN3, и во двата методи на суспендирање, со нешто повисоки RCI вредности за b-CT.

Од приложените резултати во табела 21, E1-a-0 имаше значаен придонес во појавата на f_+ сперматозоиди со VEL1 и на f_- со VEL4 опсег на вредности. Овој наод индицираше дека GSH компонентата имаше повисок ефект во зголемениот сооднос на штотуку одмрзнати сперматозоиди со релативно високи вредности на VAP ($> 75 \mu\text{m/s}$), при негово додавање во ејакулатните медиуми пред CT, што е во согласност со наодите на друго истражување (Вусак и сор., 2007). E1-a-3 имаше висок придонес во појавата на f_+ сперматозоиди со VEL4 опсег на вредности, слично како и E1-b-3, но исто така влијаеше и на f_- за сперматозоиди со VEL2 и VEL3 опсези на VAP вредности. Ова покажуваше дека GSH компонентата додадена во ејакулатните медиуми пред CT, имаше повисок ефект врз појавата на зголемен однос на сперматозоиди со VEL4 опсег на VAP вредности (статични), но исто така и со VEL2 и VEL3 опсег на VAP вредности, споредбено со истоветниот ејакулатен медиум во b-CT методот (E1-b-3). Ваквиот ефект на GSH би можел да се објасни преку ефектот на автооксидација во аеробни услови, претходно опишан од Bilodeau и сор., 2000. E2-a-0 имаше мало влијание во појавата на f_+ сперматозоиди со VEL3 опсег на VAP вредности, споредбено со E2-b-0, која немаше значајно различна дистрибуциона фреквенција во однос на просечната. E2-a-3 и E2-b-3 имаа речиси еднакво влијание во појавата на f_+ во VEL4 категоријата. Сепак, E2-a-3 имаше поголем придонес во повисокиот сооднос на мотилни сперматозоиди со мал опсег на VAP вредности поради неговото влијание на f_+ во VEL3 категоријата. Ова посочуваше дека HSP ејакулатниот медиум може да има одредено мало влијание во

појавата на сперматозоиди со мал опсег на VAP вредности, непосредно после одмрзнувањето (0-часа после-СТ), или повисоко во однос на категориите со VEL3 и VEL4 опсег на вредности. E3-a-0 имаше значително помало влијание во f_+ за мотилните категории (VEL1, VEL2 и VEL3), но особено високо за f_+ во VEL4, споредбено со E3-b-0 кој имаше значително високо влијание на f_+ во VEL1 и на f_+ во VEL4 што е согласно со наодите за хиперактивацискиот ефект на HSP додаден во после-СТ период (Rovegno и сор., 2015). Кај E3-a-3 беше забележливо значително доминантно влијание на f_+ во VEL1 и релативно помало на f_+ во VEL2 и VEL4. Споредбено со оваа група, кај E3-b-3 можеше да се забележи значително мал ефект на f_+ во VEL4 и на f_+ во VEL3. Оттука, би можело да се издвои дека во а-СТ методот непосредно после одмрзнувањето беа забележливи поголеми отстапувања во f_+ на мотилните категории, споредбено со b-СТ, согласно со претходни истражувања кои го демонстрираше превентивниот наспроти репаративниот ефект на СП (Maxwell и сор., 2007; Ghaoui и сор., 2007; Mataveia и сор., 2010). На 3-часа од инкубацијата, без оглед на методот на суспендирање, ефектот на f_+ во статичната категорија на сперматозоиди, беше воедначен, што укажуваше дека дејството на HSP е исклучиво во периодот непосредно после одмрзнувањето. Сепак, анализирајќи го целокупниот ефект на сперматозоидната популација во одмрзнатите примероци, E3-медиумот на 0-часа од инкубацијата имаше доминантен ефект врз појавата на повисоко од очекувана фреквенција на сперматозоиди со $VAP \geq 75,0 \text{ um/s}$ (VEL1) во b-СТ методот, што беше очекувано поради непосредните хиперактивациски својства на HSP врз одмрзнатите сперматозоиди (Rovegno и сор., 2015) На 3-часа, овој ефект беше повеќе изразен во а-СТ методот што ги потврдува превентивните својства на HSP кои се забележливи и после одредено време од одмрзнувањето (Vadnais и сор., 2005). E3 имаше повеќе поволен ефект врз појавата на мотилни сперматозоиди со повисок опсег на VAP вредности во а-СТ методот. Оттука следи, дека GSH компонентата која беше додадена во а-СТ методот, имаше значително поволен ефект во појавата на сперматозоиди со задржана висока мотилност, непосредно после одмрзнувањето. Комбинираниот ефект на GSH и HSP додадени во пред СТ периодот, индицираше на повисока нагласеност на оваа категорија сперматозоиди (VEL1) во а-СТ методот на 0- и 3-часови од инкубацијата, што е во согласност со претходно наведените научни извори (Maxwell и сор., 2007; Ghaoui и сор., 2007; Mataveia и сор., 2010). Присуството на GSH и HSP придонесува за задржување на мотилните карактеристики на одмрзнатите сперматозоиди поради заштитното антиоксидативно дејство на GSH и

адсорпционото и репаративно дејство на HSP (Bucak и сор., 2007; Vadnais и сор., 2005; Manjunath и сор., 2002).

Заклучно со податоците од табелите 16-21, ефектот на групите (факторите) од а-СТ и б-СТ методот врз криопрезервацискиот успех беше рефлектиран на следниот начин:

E1-a-0 имаше ниско-позитивен ефект на VIAB и LIN. Умерено-позитивен ефект беше утврден за за VEL. Високо-негативен ефект беше забележан за EL, VCL и ALH. Оваа сперматозоидна популација се карактеризираше со умерено неафектиран структурен интегритет и морфологија, намалена елипсовидност на главениот дел, и висока девијација на траекторијата на мотилините сперматозоиди. Мотилноста доминантно беше карактеризирана како хиперактивирана.

E1-a-3 нема позначителни ефекти на VIAB и LIN. Ниско- и умерено-позитивни ефекти беа утврдени за EL и VCL, последователно. Ниско- и умерено-негативни ефекти беа утврдени за ALH и VEL, последователно. Оваа сперматозоидна популација беше карактеризирана со нормално изразена елипсовидност на главениот дел, мала девијација на траекторијата кај мотилните сперматозоиди и висока застапеност на статични сперматозоиди. Поради оваа причина, не можеше да биде јасно дефиниран хиперактивираниот профил на мотилност.

E2-a-0 немаше значајни ефекти на EL и ALH. Ниско-негативни ефекти беа забележани за VCL, LIN и VEL. Високо-позитивни ефекти беа утврдени за VIAB. Оваа сперматозоидна популација беше дефинирана како неоштетена во однос на структурниот и морфолошкиот интегритет и со забележлива девијација на траекторијата кај мотилните сперматозоиди. Хиперактивираниот профил на мотилност беше забележлив и покрај високата застапеност на статични клетки.

E2-a-3 имаше ниско-позитивни ефекти на EL, VCL и ALH, и умерено-позитивни на LIN. Умерено- и високо-позитивни ефекти бе утврдени за VEL и VIAB, последователно. Оваа сперматозоидна популација беше дефинирана со високо афектиран акрозом, нормално изразена елипсовидност, неафектирана линеарност на траекторијата, но висока застапеност на статични сперматозоиди.

E3-a-0 имаше високо-позитивен ефекти за VIAB, EL и ALH, и ниско-позитивен ефект за VCL и VEL. Сперматозоидната популација беше карактеризирана со неоштетен структурен интегритет и морфологија, и нормално изразена елипсовидност на главениот

дел. Линеарноста на траекторијата беше неафектирана, а мотилната брзина високо изразена. Не постоеја индикации за хиперактивирана мотилност кај оваа популација на сперматозоиди.

E3-a-3 имаше високо-позитивен ефект за VCL и VEL, умерено-позитивен за ALH, и ниско-позитивен за LIN. Умерено-негативен ефект беше забележлив за VIAB. Не постоеше значаен ефект за EL. Оваа сперматозоидна популација беше со неафектирана линеарност на траекторијата и мотилноста, така што не постоеја индикации за хиперактивациски профил на мотилност. Структурниот интегритет беше афектиран преку акрозомот.

E1-b-0 немаше значајни ефекти за EL. Високо-позитивен ефект беше утврден за LIN. Високо-негативен ефект беше забележлив за VCL и ALH, а ниско-негативен за VIAB и VEL. Сперматозоидната популација беше доминантно статична, со афектиран структурен интегритет и изразена девијација на траекторијата кај мотилните сперматозоиди. Хиперактивациски профил на мотилност беше забележлив во одреден степен, но сепак, не преодминаше во однос на целата сперматозоидна популација.

E1-b-3 немаше значајни ефекти за EL и ALH. Високо-негативни ефекти беа утврдени за VEL, а ниско-негативни за VIAB. Ниско-позитивни ефекти беа забележливи за VCL и LIN. Мнозинството на сперматозоиди од оваа популација имаше оштетен структурен интегритет, без афектираност на линеарноста на траекторијата кај мотилните сперматозоиди. Не беше забележана хиперактивирана мотилност кај мотилните сперматозоиди.

E2-b-0 немаше значаен ефект за EL и VEL. Умерено-позитивен ефект беше забележлив за VIAB. Високо-негативен ефект беше утврден за ALH, додека ниско-негативен за VCL и LIN. Мнозинската популација на сперматозоиди имаше неоштетен структурен интегритет и морфологија, но изразена девијација на линеарноста на траекторијата кај мотилните сперматозоиди. Хиперактивацискиот профил на мотилност беше забележлив.

E2-b-3 имаше ниско-негативен ефект за VIAB. Високо- и ниско-негативен ефект беше утврден за VEL и VIAB, последователно. Високо-позитивен ефект беше утврден за LIN, умерено-позитивен за EL, VCL и ALH. Мнозинската сперматозоидна популација имаше нормално изразена елипсоидност на главениот дел но афектиран структурен

интегритет. Мотилноста беше исклучително ниска, но линеарноста на траекторијата не беше афектирана. Не беше утврден хиперактивациски профил на мотилност.

E3-b-0 имаше умерено-позитивен ефект за VIAB и VEL. Умерено-негативен ефект беше забележлив за EL и VCL, додека ниско-негативен за ALH и LIN. Сперматозоидната популација генерално имаше неоштетен структурен интегритет, намалена елипсовидност на главениот дел, добро изразена мотилност, но изразена девијација на линеарноста на траекторијата. Оваа популација се карактеризираше со хиперактивациски профил на мотилност.

E3-b-3 немаше значајни ефекти на EL. Умерено-позитивни ефекти беа утврдени за VCL и ALH, а ниско-позитивни за LIN. Ниско-негативни ефекти беа забележливи за VIAB и VEL. Мнозинската сперматозоидна популација имаше афектиран структурен интегритет, статична мотилност, но неафектирана линеарност на траекторијата кај мотилните сперматозоиди. Не беше забележлив хиперактивациски профил на мотилност кај малцинската група на сперматозоиди.

7. Резиме на дискусијата

Со споредување на индивидуалните ефекти на E1-, E2- и E3-медиумите на 0-часови од инкубацијата во а-СТ и б-СТ методот, беше утврдено дека дејството на HSP беше највлијателно во манифестирањето на E3-медиумот. Експерименталните резултати од ова истражување посочуваа дека поединечното додавање на GSH или HSP во tris-медиумите за криопрезервација со а-СТ или б-СТ методот, не резултираше со значително зголемување на криопрезервацискиот успех на ејакулатите од овчеполска праменка. Сепак, содејството на GSH и HSP во E3-медиумот не можеше да биде игнорирано во постигнување на повисокиот криопрезервациски успех. Ова истражување не ги опфаќаше механизмите на дејствување на СП, но хипотезата се потпираше врз научни наоди кои ги припишуваат позитивните ефекти на СП врз криопрезервираните сперматозоиди на две специфични протеински фракции (RSP-14 и RSP-20) (Perez-Pe и сор., 2001; Bernardini и сор. 2011). Поради нивната видова специфичност, СП од овни не може да биде употребена за ејакулати од друг вид на животни (пр. бикови) за постигнување на истата цел (García, E.M., и сор., 2006). Ефектот се постигнува преку нивна интеракција со мембранските фосфолипиди на сперматозоидите, особено на региони кои имаат структурни оштетувања, причинети од термички фактори (Bergeon-

Annick и сор., 2005). Комплементарниот ефект на GSH и HSP е дополнително објаснет преку интеракцијата на RSP-14 и RSP-20 со семиналните антиоксидативните компоненти, како што е глутатион-редуктазата која е неопходна за нормална активност на GSH (Garcia, E.M., и сор., 2006; Marti и сор., 2007). Отсуството на позитивни ефекти кај групите кои содржеа GSH беше објаснето преку автооксидативните карактеристики на GSH кој е високо нестабилен при аеробни инкубациски услови (Bilodeau и сор., 2000).

Од аспект на структурниот интегритет на сперматозоидите, наодите на ова истражување беа во согласност со претходнонаведените научни наоди. Во однос на мотилноста кај сперматозоидите, резултатите покажаа дека додавањето на HSP и кај двата методи на суспендирање иницираа хиперактивирано движење, непосредно после одмрзнувањето. Овие процеси беа прогресивни, со оглед на нивната повисока изразеност на 3-часа од инкубирањето. Хиперактивирната мотилност во научната литература е поврзана со таканаречената лажна-капацитација (Cormier и Bailey, 2003), која е иницирана од зголемената концентрација на оксидативни радикали или капацитирачки компоненти на криопрезервацискиот медиум. Кај овие сперматозоиди, траекторијата на движење е нелинеарна (непрогресивна), со зголемено трошење на метаболичка енергија и иницирање на акрозомска реакција, оневозможувајќи ја нивната оплодувачка способност во понатамошната употреба при осемнување (de Graaf, 2007; Ledesma и сор. 2005). Капацитирачката способност на HSP беше објаснета преку неговите својства да предизвика ефлукс на мембранските фосфолипиди и холестерол кои се есенцијални за стабилноста на акрозомската и плазмената мембрана (Manjunath и Therien, 2002). Следствено на ова, нашите наоди беа во спротивност со истражување кое декларирало позитивни ефекти на HSP (Vadnais и сор., 2005), а беа во согласност со истражување кои декларирало негативни ефекти на HSP во криопрезервацијата на сперматозоиди од овни (Cormier и Bailey, 2003). Разликите на овие истражувања може да се должи во различните експерименталните поставки.

Заклучно со ова, комбинираното користење на GSH (5 mM) и HSP (20%) во tris-криопрезервациски медиум употребен во пред-криопрезервацискиот период за сперматозоиди од овчеполска праменка, резултираше со значително повисок криопрезервациски капацитет на одмрзнатите сперматозоиди од овчеполска праменка во споредба со оние кои одделно содржеа GSH (5 mM) или HSP (20%). Инкубационото време во после-криопрезервацискиот период го зголемуваше бројот на оштетени и хиперактивирани сперматозоиди, а додавањето на криопрезервацискиот медиум со овие

компоненти во после-криопрезервацискиот период значително го зголеми процентот на акрозомски-активирани клетки. Наодите на ова истражување не декларираат постигнување на повисока оплодувачка способност на одмрзнатите ејакулати, но не ја исклучуваат теоретската можност, за што е неопходно е да се валидираат со понатамошни испитувања. Валидирањето на резултатите од ова истражување не би требало да биде фокусирано само во однос на повисокиот криопрезервациски успех постигнат во *in-vitro* услови, туку и во однос на повисокиот степен на *in-vivo* оплодување. Резултатите и наодите од ова истражување очекуваме да дадат свој значителен придонес во ветеринарната криобиологија и сперматологија, преку модифицирање и валидирање на методот за криопрезервирање на гаметни клетки (сперматозоиди). Земајќи ја во предвид практичноста и економичноста на криопрезервацијата во конзервирањето и дистрибуирањето на генетскиот материјал од загорени видови и соејевни на животни, сметаме дека наодите на ова истражување ќе придонесат за создавање на постабилни крио-банки на сперматозоиди.

VII. ЗАКЛУЧОЦИ

- Ејакулатите од овчеполска праменка суспендирани во пред-после криопрезервацискиот период со *tris*-криопрезервациски медиум без HSP и/или GSH, имаа низок криопрезервациски успех во однос на ејакулатите суспендирани со истиот медиум исклучиво во пред-криопрезервацискиот период;
- Ејакулатите од овчеполска праменка суспендирани во пред-криопрезервацискиот период со *tris*-криопрезервациски медиум без HSP и/или GSH, имаа низок криопрезервациски успех во однос на ејакулатите суспендирани со други медиуми кои содржеа HSP и/или GSH;
- Ејакулатите од овчеполска праменка суспендирани во пред-криопрезервацискиот период со *tris*-криопрезервациски медиум кој содржеше HSP/GSH, имаа висок криопрезервациски успех во однос на ејакулатите суспендирани во истиот период со другите медиуми кои не ги содржеа, или поединечно ги содржеа двете компоненти;
- Ејакулатите од овчеполска праменка суспендирани во пред-после криопрезервацискиот период со *tris*-криопрезервациски медиум кој содржеше HSP/GSH, имаа висок криопрезервациски успех во однос на ејакулатите суспендирани во истиот период со другите медиуми кои не ги содржеа или поединечно ги содржеа двете компоненти;
- Ејакулатите од овчеполска праменка суспендирани во пред-криопрезервацискиот период со *tris*-криопрезервациски медиум кој содржеше HSP/GSH, имаа висок криопрезервациски успех во однос на ејакулатите суспендирани во пред-после криопрезервацискиот период со истиот медиум;
- Ејакулатите од овчеполска праменка суспендирани во пред-криопрезервацискиот период со *tris*-криопрезервациски медиуми кој содржеа HSP или GSH, имаа висок криопрезервациски успех во однос на ејакулатите суспендирани во пред-криопрезервацискиот период со *tris*-криопрезервациски медиум без HSP и/или GSH;
- Ејакулатите од овчеполска праменка суспендирани во пред-после криопрезервацискиот период со *tris*-криопрезервациски медиуми кој содржеа HSP или GSH, немаа значаен придонес во криопрезервацискиот успех во однос на ејакулатите суспендирани во пред-после криопрезервацискиот период со *tris*-криопрезервациски медиум без HSP и/или GSH;

- Инкубацијата од 3-часа на одмрзнатите ејакулати од овчеполска праменка, без оглед на методот на суспендирање и типот на криопрезервацискиот медиум, резултираше со значително негативно влијание врз криопрезервацискиот успех на сперматозоидите;
- Суспендирањето на одмрзнатите ејакулати од овчеполска праменка во пред-после криопрезервацискиот период резултираше со значително намалување на криопрезервацискиот успех во однос на суспендирањето исклучиво во пред-криопрезервацискиот период;
- Наодите на ова истражување не декларираат постигнување на повисока оплодувачка способност на одмрзнатите ејакулати, но не ја исклучуваат теоретската можност, што би се потврдило со *in-vivo* валидација.
- Очекувањата на целите од ова истражување беа целосно исполнети со што се овозможи повисок криопрезервациски капацитет на tris-криопрезервациските медиуми за сперматозоиди од овни, истовремено понудувајќи модифициран методолошки пристап во ветеринарната криобиологија и сперматологија кој би можел да биде основа за понатамошни истражувања во овие научни области.

VIII. СПИСОК НА ЛИТЕРАТУРА И ДРУГИ ИЗВОРИ

1. Abdi-Benemar, H., Jafaroghli, M., Khalili, B., Zamiri, M. J., Ezazi, H., & Shadparvar, A. A. (2015). Effects of DHA supplementation of the extender containing egg yolk and α -tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen. *Small Ruminant Research*, 130, 166–170.
2. Aboagla, E. M. E., & Terada, T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of reproduction*, 69(4), 1245-1250.
3. Afzelius, B. A. (1988). On the numbering of peripheral doublets in cilia and flagella. *Tissue and Cell*, 20(3), 473-475.
4. Agrawal, Y. P., & Vanha- Perttula, T. (1988). Glutathione, L- glutamic acid and γ -glutamyl transpeptidase in the bull reproductive tissues. *International journal of andrology*, 11(2), 123-131.
5. Ahmad, E., Naseer, Z., Aksoy, M., Küçük, N., Uçan, U., Serin, I., & Ceylan, A. (2015). Trehalose enhances osmotic tolerance and suppresses lysophosphatidylcholine- induced acrosome reaction in ram spermatozoon. *Andrologia*, 47(7), 786-792.
6. Aisen, E. G., Medina, V. H., Venturino, A. (2002). Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, 57(7), 1801-1808.
7. Aitken, J., & Fisher, H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, 16(4), 259-267.
8. Allamaneni, S. S. R., Naughton, C. K., Sharma, R. K., Thomas, A. J., & Agarwal, A. (2004). Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. *Fertility and Sterility*, 82(6), 1684–1686.
9. Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1989). Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Research*, 23(1), 77–90.
10. Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1989). Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete research*, 23(1), 77-90.
11. Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L., Storey, B.T. (1987). Spontaneous Lipid Peroxidation and Production of Hydrogen Peroxide and Superoxide in Human Spermatozoa Superoxide Dismutase as Major Enzyme Protectant Against Oxygen Toxicity. *Journal of Andrology*, 8(5), 338–348.

12. Anzalone, D. A., Palazzese, L., Iuso, D., Martino, G., & Loi, P. (2018). Freeze-dried spermatozoa: An alternative biobanking option for endangered species. *Animal Reproduction Science*, 190, 85–93.
13. Argov-Argaman, N., Mahgrefthe, K., Zeron, Y., & Roth, Z. (2013). Season-induced variation in lipid composition is associated with semen quality in Holstein bulls. *REPRODUCTION*, 145(5), 479–489.
14. Armstrong, J. S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W. ., & Sikka, S. C. (1999). Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8), 869–880.
15. Ashworth, P. J., Harrison, R. A., Miller, N. G., Plummer, J. M., & Watson, P. F. (1994). Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reproduction, fertility and development*, 6(2), 173-180.
16. Baccetti, B., Pallini, V., & Burrini, A. G. (1976). The accessory fibers of the sperm tail: III. High-sulfur and low-sulfur components in mammals and cephalopods. *Journal of ultrastructure research*, 57(3), 289-308.
17. Baccetti, B., Porter, K. R., & Ulrich, M. (1985). High voltage electron microscopy of sperm axoneme. *Journal of submicroscopic cytology*, 17(2), 171-176.
18. Barbas, J. P., Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*, 10:49–62.
19. Barrios, B., Fernández- Juan, M., Muiño- Blanco, T., & Cebrián- Pérez, J. A. (2005). Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *Journal of Andrology*, 26(4), 539-549. Barrios, B., Fernández- Juan, M., Muiño- Blanco, T., & Cebrián- Pérez, J. A. (2005). Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *Journal of Andrology*, 26(4), 539-549.
20. Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tato, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., & Cebrián- Pérez, J. A. (2000). Seminal Plasma Proteins Revert the Cold-Shock Damage on Ram Sperm Membrane1. *Biology of Reproduction*, 63(5), 1531–1537.
21. Beasley, T. M., & Schumacker, R. E. (1995). Multiple Regression Approach to Analyzing Contingency Tables: Post Hoc and Planned Comparison Procedures. *The Journal of Experimental Education*, 64(1), 79–93.

22. Benard, O., & Balasubramanian, K. A. (1995). Effect of oxidized glutathione on intestinal mitochondria and brush border membrane. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 27(6), 589-595.
23. Bergeron, A., Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P. (2005). Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* 2005 Aug;71(4):461-70.
24. Bernardini, A., Hozbor, F., Sanchez, E., Fornes, M.W., Alberio, R.H., Cesari, A. (2011). Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. *Theriogenology* 76 (2011) 436–447.
25. Bielski, B. H., Arudi, R. L., Sutherland, M. W. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂- with unsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*, 258(8), 4759-4761.
26. Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A., & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 55(3), 282-288.
27. Boyers, S. P., Davis, R. O. and Katz, D. F. (1989) Automated semen analysis. *Curr. Prob. Obstet. Gynecol. Fertil.*, 12, 167–200.
28. Brokaw, C. J. (1980). Elastase digestion of demembrated sperm flagella. *Science*, 207(4437), 1365-1367.
29. Brokaw, C. J. (1996). Microtubule sliding, bend initiation, and bend propagation parameters of Ciona sperm flagella altered by viscous load. *Cell motility and the cytoskeleton*, 33(1), 6-21.
30. Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varişlı, Ö., Yüce, A., Tekin, N., Akçay, A. (2007). The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. *Theriogenology*, 67(5), 1060-1067.
31. Cardozo, J. A., Fernández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muiño-Blanco, T., & Cebrián-Pérez, J. A. (2006). Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, 66(4), 841–850.
32. Cardozo, J., Fernández-Juan, M., Cebrián-Pérez, J., & Muiño-Blanco, T. (2007). Identification of RSVP14 and RSVP20 Components by Two-dimensional Electrophoresis and Western-blotting. *Reproduction in Domestic Animals*, 43:15-21.
33. Catt, S. L., O'Brien, J. K., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (1997). Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry. *Reproduction in Domestic Animals (Germany)*.

34. Chanapiwat, P., Kaeoket, K., & Tummaruk, P. (2009). Effects of DHA-enriched hen egg yolk and L-cysteine supplementation on quality of cryopreserved boar semen. *Asian Journal of Andrology*, 11(5), 600–608.
35. Chandonnet, L., Roberts, K. D., Chapdelaine, A., & Manjunath, P. (1990). Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, 26(4), 313–318.
36. Chapsky, L., & Rubinsky, B. (1997). Kinetics of antifreeze protein- induced ice growth inhibition. *FEBS letters*, 412(1), 241-244.
37. Chen, S.-S., Chang, L. S., & Wei, Y.-H. (2001). Oxidative damage to proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(11), 1328–1334.
38. Chou, K. C. (1992). Energy-optimized structure of antifreeze protein and its binding mechanism. *Journal of molecular biology*, 223(2), 509-517.
39. Colás, C., Junquera, C., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. A., & Muiño-Blanco, T. (2009). Ultrastructural study of the ability of seminal plasma proteins to protect ram spermatozoa against cold-shock. *Microscopy Research and Technique*, 72(8), 566–572.
40. Cooper, T. G. (1984). The onset and maintenance of hyperactivated motility of spermatozoa from the mouse. *Gamete research*, 9(1), 55-74.
41. Cormier, N., & Bailey, J. L. (2003). A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. *Biology of reproduction*, 69(1), 177-185.
42. Cross, N. L. (2003). Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biology of reproduction*, 69(2), 529-534.
43. Crowe, J. H., Crowe, L. M., Oliver, A. E., Tsvetkova, N., Wolkers, W., & Tablin, F. (2001). The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, 43(2), 89-105.
44. Cseh, S., Faigl, V., Amiridis, G. S. (2012). Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Anim Reprod Sci*, 130:187–192.
45. Cummins, J.M. (1982) Hyperactivated motility patterns of ram spermatozoa recovered from the oviducts of mated ewes. *Gamete Res.*, 6, 53–63.
46. Curry, A. M., & Rosenbaum, J. L. (1993). Flagellar radial spoke: a model molecular genetic system for studying organelle assembly. *Cell motility and the cytoskeleton*, 24(4), 224-232.
47. D'Alessandro, A.G., Martemucci, G. (2003). Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Animal Reproduction Science* 79 (2003) 93–102.

48. Daunter, B., Hill, R., Hennessey, J., & Mackay, E. V. (1981). Seminal plasma biochemistry I: Preliminary report: A possible mechanism for the liquefaction of human seminal plasma and its relationship to spermatozoal motility. *Andrologia*, 13(2), 131-141.
49. Davis, R. O., Niswander, P. W., & Katz, D. F. (1992). New measures of sperm motion I. Adaptive smoothing and harmonic analysis. *Journal of andrology*, 13(2), 139-152.
50. De Graaf, S. P., Evans, G., Gillan, L., Guerra, M. M. P., Maxwell, W. M. C., & O'Brien, J. K. (2007). The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology*, 67(2), 217–227.
51. Denehy, M.A., Herbison-Evans, D. and Denehy, B.V. (1975) Rotational and oscillatory components of the tailwave in ram spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 13, 289–297.
52. Derin-Bennett, A., Poulos, A., White, I.G. (1973). The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull and boar spermatozoa. *Aust J Biol Sci*, 26(6):1409-20.
53. DeVries, A. L., & Wohlschlag, D. E. (1969). Freezing resistance in some Antarctic fishes. *Science*, 163(3871), 1073-1075.
54. Díaz, R., Torres, M. A., Bravo, S., Sanchez, R., & Sepúlveda, N. (2015). Determination of fatty acid profile in ram spermatozoa and seminal plasma. *Andrologia*, 48(6), 723–726.
55. Dostálová, Z., Calvete, J. J., Sanz, L., Hettel, C., Riedel, D., Schöneck, C., ... & Töpfer-Petersen, E. (1994). Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein (aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacitated bull spermatozoa. *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 375(7), 457-462.
56. Drobnis, E. Z., Crowe, L. M., Berger, T., Anchordoguy, T.J., Overstreet, J. W., Crowe, J. H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool*. 265(4):432-7.
57. Drobnis, E. Z., Yudin, A. I., Cherr, G. N., & Katz, D. F. (1988). Kinematics of hamster sperm during penetration of the cumulus cell matrix. *Gamete research*, 21(4), 367-383.
58. Dzabirski, V., & Andonov, S. (1998). Sheep and goat husbandry in the Former Yugoslav Republic of Macedonia. In: Kukovisc, S. (Ed.). *Sheep and goat production in central and eastern european countries* (pp. 159-162). Budapest, Hungary.
59. El- Hajj Ghaoui, R., Thomson, P. C., Leahy, T., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2007). Autologous Whole Ram Seminal Plasma and its Vesicle- free Fraction Improve Motility Characteristics and Membrane Status but not In Vivo Fertility of Frozen–Thawed Ram Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(5), 541-549.

60. Eroglu, A., Lawitts, J. A., Toner, M., & Toth, T. L. (2003). Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development. *Cryobiology*, 46(2), 121-134.
61. Esmaeili, V., Shahverdi, A. H., Moghadasian, M. H., & Alizadeh, A. R. (2015). Dietary fatty acids affect semen quality: a review. *Andrology*, 3(3), 450–461.
62. Faigl, V., Vass, N., Javor, A., Kulcsar, M., Amiridis, M., Cseh, S. (2012). Artificial insemination of small ruminants—A review. *Acta Vet Hung*, 60:115–129.
63. Fawcett, D. W. (1975). The mammalian spermatozoon. *Developmental biology*, 44(2), 394-436.
64. Foote, R. H. (2002). The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J Anim Sci*, 80(E-Suppl_2):1–10.
65. Gagnon, C. (1995). Regulation of sperm motility at the axonemal level. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 847-855.
66. Garcia, E. M., Vázquez, J. M., Calvete, J. J., Sanz, L., Caballero, I., Parrilla, I., ... & Martinez, E. A. (2006). Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSP- I/PSP- II on boar sperm functionality. *Journal of andrology*, 27(3), 434-443.
67. García-López, N., Ollero, M., Cebrián-Pérez, J. A., & Muiño-Blanco, T. (1996). Reversion of thermic-shock effect on ram spermatozoa by adsorption of seminal plasma proteins revealed by partition in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 680(1-2), 137–143.
68. Ghaoui, R. E.-H., Gillan, L., Thomson, P. C., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2006). Effect of Seminal Plasma Fractions From Entire and Vasectomized Rams on the Motility Characteristics, Membrane Status, and In Vitro Fertility of Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 28(1), 109–122.
69. Gholami, H., Chamani, M., Towhidi, A., & Fazeli, M. H. (2010). Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. *Theriogenology*, 74(9), 1548–1558.
70. Gibbons, I. R. (1965). Chemical dissection of cilia. *Archives de biologie*, 76(2), 317-352.
71. Gibbons, I.R. (1974) Mechanisms of flagellar motility. In Afzelius, B.A. (ed.), *The Functional Anatomy of the Spermatozoon*. Pergamon Press, Oxford and New York, pp. 127–140.
72. Gillan, L., & Maxwell, W. M. (1999). The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 54, 271-283.

73. Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2000). The interaction of fresh and frozen-thawed ram spermatozoa with oviducal epithelial cells in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 12(6), 237-244.
74. Gillan, L., Maxwell, W. C., & Evans, G. (2004). Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), 447-454.
75. Gomendio, M., & Roldan, E. R. S. (2008). Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *The International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 439-447.
76. Gomez, E., Buckingham, D. W., Brindle, J., Lanzafame, F., Irvine, D. S., & Aitken, R. J. (1996). Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *Journal of andrology*, 17(3), 276-287.
77. Green, C. E., & Watson, P. F. (2001). Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*, 122(6), 889-898.
78. Griveau, J. F., Dumont, E., Renard, P., Callegari, J. P., & Le Lannou, D. (1995). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Reproduction*, 103(1), 17-26.
79. Guraya, S. S. (2000). Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in spermatozoa. *Review of Cytology* 199 1-64.
80. Hakan Bozkurt, H., & Woolley, D. M. (1993). Morphology of nexin links in relation to interdouplet sliding in the sperm flagellum. *Cell motility and the cytoskeleton*, 24(2), 109-118.
81. Hammerstedt, R. H., Graham, J. K., & Nolan, J. P. (1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of andrology*, 11(1), 73-88.
82. Hancock, J. L. (1951). A staining technique for the study of temperature-shock in semen. *Nature*, 167(4243), 323.
83. Holt, W. V. (1984). Membrane heterogeneity in the mammalian spermatozoon. In *International review of cytology* (Vol. 87, pp. 159-194). Academic Press.
84. Holt, W. W. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim Reprod Sci*, 62:3-22.
85. Hopkins, J. M. (1970). Subsidiary components of the flagella of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of cell science*, 7(3), 823-839.
86. Huszar, G., & Vigue, L. (1994). Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *Journal of andrology*, 15(1), 71-77.

87. Iqbal, S., Andrabi, S. M. H., Riaz, A., Durrani, A. Z., & Ahmad, N. (2016). Trehalose improves semen antioxidant enzymes activity, post-thaw quality, and fertility in Nili Ravi buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 85(5), 954-959.
88. Ishiguro, H., & Rubinsky, B. (1994). Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification. *Cryobiology*, 31(5), 483-500.
89. Jafaroghli, M., Khalili, B., Farshad, A., & Zamiri, M. J. (2011). The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small ruminant research*, 96(1), 58-63.
90. Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure and field fertility. *Theriogenology*, 60:743–758.
91. Jimenez, C., Ghyselinck, N. B., Depeiges, A., & Dufaure, J.-P. (1990). Immunochemical localization and association with spermatozoa of androgen-regulated proteins of MR 24000 secreted by the mouse epididymis. *Biology of the Cell*, 68(2), 171–174.
92. John Aitken, R., Clarkson, J. S., Fishel, S. (1989). Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biology of reproduction*, 41(1), 183-197.
93. Johnson, L. L., Katz, D. F., & Overstreet, J. W. (1981). The movement characteristics of rabbit spermatozoa before and after activation. *Gamete research*, 4(4), 275-282.
94. Jouannet, P., Escaller, D., Serres, C., & David, G. (1983). Motility of human sperm without outer dynein arms. *Journal of submicroscopic cytology*, 15(1), 67-71.
95. Juyena, S. N. , Stelletta, C. (2012). Seminal Plasma: An Essential Attribute to Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 33(4):536-551.
96. Kaeoket, K., Sang-urai, P., Thamniyom, A., Chanapiwat, P., & Techakumphu, M. (2008). Effect of Docosahexaenoic Acid on Quality of Cryopreserved Boar Semen in Different Breeds. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(3), 458–463.
97. Kaka, A., Haron, W., Yusoff, R., Yimer, N., Khumran, A. M., Sarsaifi, K., ... Ebrahimi, M. (2017). Effect of docosahexanoic acid on quality of frozen–thawed bull semen in BioXcell extender. *Reproduction, Fertility and Development*, 29(3), 490.
98. Kanous, K.S., Casey, C. and Lindemann, C.B. (1993) Inhibition of microtubule sliding by Ni²⁺ and Cd²⁺: Evidence for a differential response of certain microtubule pairs within the bovine sperm axoneme. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 26, 66–76.
99. Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Tibary, A., Pelzer , K. (2011). Effect of semen extenders on sperm parameters of ram semen during liquid storage at 4 C. *Small Ruminant Res*, 99:208–213.

100. Katz, D. F., & Yanagimachi, R. (1980). Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. *Biology of reproduction*, 22(4), 759-764.
101. Katz, M. J., & George, E. B. (1985). Fractals and the analysis of growth paths. *Bulletin of mathematical biology*, 47(2), 273-286.
102. Kiernan, M., Fahey, A. G., & Fair, S. (2013). The effect of the in vitro supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(6), 947.
103. Knight, C. A., De Vries, A. L., & Oolman, L. D. (1984). Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice. *Nature*, 308(5956), 295.
104. Knight, C. A., Hallett, J., & DeVries, A. L. (1988). Solute effects on ice recrystallization: an assessment technique. *Cryobiology*, 25(1), 55-60.
105. Koehler, J. K. (1983). Structural heterogeneity of the mammalian sperm flagellar membrane. *Journal of submicroscopic cytology*, 15(1), 247.
106. Koshimoto, C., & Mazur, P. (2002). Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology*, 45(1), 49-59.
107. Ledesma, A., Manes, J., Ríos, G., Aller, J., Cesari, A., Alberio, R., & Hozbor, F. (2015). Effect of Seminal Plasma on Post-Thaw Quality and Functionality of Corriedale Ram Sperm Obtained by Electroejaculation and Artificial Vagina. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(3), 386–392.
108. Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L., Dondero, F. (1996). Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*, 2(3): 246–256.
109. Li, T. K. (1975). The glutathione and thiol content of mammalian spermatozoa and seminal plasma. *Biology of Reproduction*, 12(5), 641-646.
110. Linck, R. W. (1979). Advances in the ultrastructural analysis of the sperm flagellar axoneme. *The spermatozoon*, 99-115.
111. Lindemann, C. B. (1994a). A model of flagellar and ciliary functioning which uses the forces transverse to the axoneme as the regulator of dynein activation. *Cell motility and the cytoskeleton*, 29(2), 141-154.
112. Lindemann, C. B. (1994b). A "geometric clutch" hypothesis to explain oscillations of the axoneme of cilia and flagella. *Journal of theoretical biology*, 168(2), 175-189.
113. Lindemann, C. B. (1996). Functional significance of the outer dense fibers of mammalian sperm examined by computer simulations with the geometric clutch model. *Cell motility and the cytoskeleton*, 34(4), 258-270.

114. Lindemann, C. B., Orlando, A. N. G. E. L. A., & Kanous, K. S. (1992). The flagellar beat of rat sperm is organized by the interaction of two functionally distinct populations of dynein bridges with a stable central axonemal partition. *Journal of Cell Science*, 102(2), 249-260.
115. Liu, Z., Foote, R. H., & Brockett, C. C. (1998). Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology*, 37(3), 219-230.
116. Love, C. C., Thompson, J. A., Brinsko, S. P., Rigby, S. L., Blanchard, T. L., & Varner, D. D. (2002). Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. *Theriogenology*, 58(2-4), 221-224.
117. Macleod, I. C., & Irvine, D. S. (1995). Andrology: The predictive value of computer-assisted semen analysis in the context of a donor insemination programme. *Human reproduction*, 10(3), 580-586.
118. Mandelbrot, B. B. (1983). *The fractal geometry of nature/Revised and enlarged edition*. New York, WH Freeman and Co., 1983, 495 p.
119. Manjunath, P., & Thérien, I. (2002). Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of reproductive immunology*, 53(1-2), 109-119.
120. Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., & Ménard, M. (2002). Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, 67(4), 1250-1258.
121. Manjunath, P., Nauc, V., Bergeron, A., & Ménard, M. (2002). Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biology of Reproduction*, 67(4), 1250-1258. *Biology of Reproduction* 67 1250-1258.
122. Mara, L., Casu, S., Carta, A., & Dattena, M. (2013). Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Animal Reproduction Science*, 138(1-2), 25–38.
123. Marchese-Ragona, S. P., & Johnson, K. A. (1990). Structural and biochemical studies of the dynein ATPase. *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. CRC Press, Boca Raton, 203-217.
124. Maroto-Morales, A., Ramón, M., García-Álvarez, O., Montoro, V., Soler, A. J., Fernández-Santos, M. R., ... Garde, J. J. (2015). Sperm head phenotype and male fertility in ram semen. *Theriogenology*, 84(9), 1536–1541.
125. Marti, E., Mara, L., Marti, J.I., Muino-Blanco, T., Cebrian-Perez, J.A. (2007). Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology* 67 (2007) 1446–1454.

126. Marti, E., Marti, J. I., Muino-Blanco, T., & Cebrian-Perez, J. A. (2008). Effect of the Cryopreservation Process on the Activity and Immunolocalization of Antioxidant Enzymes in Ram Spermatozoa. *Journal of Andrology*, 29(4), 459–467.
127. Martínez-Soto, J. C., Landeras, J., & Gadea, J. (2012). Spermatozoa and seminal plasma fatty acids as predictors of cryopreservation success. *Andrology*, 1(3), 365–375.
128. Mataveia, G. A., Terblanche, S. J., Nöthling, J. O., & Gerber, D. (2010). Effect of heterologous seminal plasma and semen extenders on motility of frozen-thawed ram spermatozoa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 81(3), 139-142.
129. Matsuoka, T., Imai, H., Kohno, H., Fukui, Y. (2006). Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *J Reprod Dev*, 52:675–683.
130. Maxwell, W. M. C. (1986). Artificial insemination of ewes with frozen thawed semen at a synchronised oestrus: II. Effect of dose of spermatozoa and site of intrauterine insemination on fertility. *Anim Reprod Sci*, 10:309–316.
131. Maxwell, W. M. C., & Hewitt, L. J. (1986). A comparison of vaginal, cervical and intrauterine insemination of sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 106(1), 191-193.
132. Maxwell, W. M. C., & Johnson, L. A. (1997). Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. *Theriogenology*, 48(2), 209-219. *Theriogenology* 48 209-219.
133. Maxwell, W. M. C., & Johnson, L. A. (1999). Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, 52(8), 1353-1362.
134. Maxwell, W. M. C., De Graaf, S. P., Ghaoui, R. E., & Evans, G. (2007). Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, 64, 13.
135. Maxwell, W. M. C., Evans, G., Mortimer, S. T., Gillan, L., Gellatly, E. S., & McPhie, C. A. (1999). Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen–thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*, 11(2), 123-126.
136. Maxwell, W. M. C., Evans, G., Mortimer, S. T., Gillan, L., Gellatly, E. S., & McPhie, C. A. (1999). Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen–thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*, 11(2), 123-126.
137. Maxwell, W.M.C., Stojanov, T. (1996). Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8, 1013-20.
138. Medeiros, C. M. O., Forell, F., Oliveira, A. T. D., & Rodrigues, J. L. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327–344.

139. Molinia, F. C., Evans, G., Casares, P. Q., & Maxwell, W. M. C. (1994). Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 36(1-2), 113-122.
140. Moore, A. I., Squires, E. L., & Graham, J. K. (2005). Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology*, 63(9), 2372-2381.
141. Mortimer, D., Mortimer, S. T., Shu, M. A., & Swart, R. (1990). A simplified approach to sperm-cervical mucus interaction testing using a hyaluronate migration test. *Human Reproduction*, 5(7), 835-841.
142. Mortimer, D., Pandya, I. J., & Sawers, R. S. (1986). Relationship between human sperm motility characteristics and sperm penetration into human cervical mucus in vitro. *Reproduction*, 78(1), 93-102.
143. Mortimer, S. T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human reproduction update*, 3(5), 403-439.
144. Mortimer, S. T., & Maxwell, W. M. C. (1999). Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reproduction, Fertility and Development*, 11(1), 25.
145. Mortimer, S. T., Swan, M. A., & Mortimer, D. (1996). Fractal analysis of capacitating human spermatozoa. *Human Reproduction*, 11(5), 1049-1054.
146. Muiño-Blanco, T., Pérez-Pé, R., & Cebrián-Pérez, J. (2008). Seminal Plasma Proteins and Sperm Resistance to Stress. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 18–31.
147. Myles, D. G., Primakoff, P., & Bellvé, A. R. (1981). Surface domains of the guinea pig sperm defined with monoclonal antibodies. *Cell*, 23(2), 433-439.
148. Neill, J.M. and Olds-Clarke, P. (1987) A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete Res.*, 18, 121–140.
149. Nicolson, G. L., & Yanagimachi, R. (1974). Mobility and the restriction of mobility of plasma membrane lectin-binding components. *Science*, 184(4143), 1294-1296.
150. Nikolovski, M., Mickov, L., Dovenska, M., Petkov, V., Atanasov, B., & Dovenski, T. (2014). Influence of glutathione on kinetic parameters of frozen-thawed spermatozoa from Ovchepolian Pramenka rams. *Macedonian Veterinary Review*, 37(2), 121-128.
151. Nikolovski, Martin, 2019, "Dataset RDA-ES-Apr-2019-0206", <https://doi.org/10.7910/DVN/MOGKCD>, Harvard Dataverse, V1, <https://dataverse.harvard.edu/dataset.xhtml?persistentId=doi%3A10.7910%2FDVN%2FMOGKCD>
152. Ochse Dorf, F. R., Buhl, R., Bästlein, A., & Beschmann, H. (1998). Glutathione le spermatozoa and seminal plasma of infertile men. *Human Reproduction*, 13(2), 353-359.

153. Okamura, N., Iwaki, Y., Hiramoto, S., Tamba, M., Bannai, S., Sugita, Y., ... Dacheux, J.-L. (1997). Molecular cloning and characterization of the epididymis-specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. *Biochim Biophys Acta*, 1336(1), 99–109.
154. Ollero, M., Cebrian-Perez, J. A., & Muino-Blanco, T. E. R. E. S. A. (1997). Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. *Journal of andrology*, 18(6), 732-739.
155. Ollero, M., Muiño-Blanco, T., López-Pérez, M.J., Cebrián-Pérez, J.A. (1996). Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *International Journal of Andrology*, 19(5), 287–292.
156. Olson, G. E., & Sammons, D. W. (1980). Structural chemistry of outer dense fibers of rat sperm. *Biology of reproduction*, 22(2), 319-332.
157. Panida Chanapiwat. (2012). Improvement of the frozen boar semen quality by docosahexaenoic acid (DHA) and L-cysteine supplementation. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 11(15).
158. Pasqualotto, F. F., Sharma, R. K., Kobayashi, H., Nelson, D. R., & Agarwal, A. (2001). Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. *Journal of andrology*, 22(2), 316-322.
159. Paulenz, H., Söderquist, L., Ådnøy, T., Nordstoga, A. B., & Berg, K. A. (2005). Effect of vaginal and cervical deposition of semen on the fertility of sheep inseminated with frozen-thawed semen. *Veterinary record*, 156(12), 372-375.
160. Payne, S. R., Oliver, J. E., & Upreti, G. C. (1994). Effect of antifreeze proteins on the motility of ram spermatozoa. *Cryobiology*, 31(2), 180-184.
161. Pedersen, H. (1970). Observations on the axial filament complex of the human spermatozoon. *Journal of ultrastructure research*, 33(5-6), 451-462.
162. Pereira, R. M., Marques, C. C. (2008). Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell and tissue banking*, 9(4), 267-277.
163. Perez-Pe, R., Barrios, B., Muino-Blanco, T., & Cebrian-Perez, J. A. (2001). Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 760(1), 113-121.
164. Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J.A., Muiño-Blanco, T. (2001a). Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, 56(3):425-34.
165. Pérez-Pé, R., Grasa, P., Fernández-Juan, M., Peleato, M. L., Cebrián-Pérez, J. Á., & Muiño-Blanco, T. (2002). Seminal plasma proteins reduce protein tyrosine phosphorylation in the plasma membrane of cold-shocked ram spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2), 226–233.

166. Potts, R. J., Jefferies, T. M., & Notarianni, L. J. (1999). Antioxidant capacity of the epididymis. *Human Reproduction*, 14(10), 2513–2516.
167. Prathalingam, N. S., Holt, W. V., Revell, S. G., Mirczuk, S., Fleck, R. A., & Watson, P. F. (2006). Impact of antifreeze proteins and antifreeze glycoproteins on bovine sperm during freeze-thaw. *Theriogenology*, 66(8), 1894-1900.
168. Prentice, J. R., & Anzar, M. (2011). Cryopreservation of Mammalian Oocyte for Conservation of Animal Genetics. *Veterinary Medicine International*, 2011, 1–11.
169. Pursel, V. G., & Johnson, L. A. (1975). Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of animal science*, 40(1), 99-102.
170. Quan, G. B., Hong, Q. H., Shao, Q. Y., Yang, H. Y., Wu, S. S. (2012). The effects of trehalose and sucrose on frozen spermatozoa of Yunnan semi-fine wool sheep during a non-mating season. *CryoLetters*, 33(4), 307-317.
171. Quan, G. B., Wu, S. S., Lan, Z. G., Yang, H. Y., Shao, Q. Y., & Hong, Q. H. (2013). The effects of 1, 4-cyclohexanediol on frozen ram spermatozoa. *CryoLetters*, 34(3), 217-227.
172. Reinert, M., Calvete, J. J., Sanz, L., Mann, K., & Töpfer- Petersen, E. (1996). Primary structure of stallion seminal plasma protein HSP- 7, a zona- pellucida- binding protein of the spermadhesin family. *European journal of biochemistry*, 242(3), 636-640.
173. Rooke, J., Shao, C., Speake, B., 2001. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction* 121, 315–322.
174. Rovegno, M., Feitosa, W. B., Rocha, A. M., Mendes, C. M., Visintin, J. A., & D’Avila Assumpção, M. E. O. (2012). Assessment of post-thawed ram sperm viability after incubation with seminal plasma. *Cell and Tissue Banking*, 14(2), 333–339.
175. Rubinsky, B., Arav, A., & Devries, A. L. (1992). The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes. *Cryobiology*, 29(1), 69-79.
176. Rubinsky, B., Arav, A., & Fletcher, G. L. (1991). Hypothermic protection—a fundamental property of “antifreeze” proteins. *Biochemical and biophysical research communications*, 180(2), 566-571.
177. Salamon, S., & Maxwell, W. M. C. (1995). Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, 37(3-4), 185-249.
178. Salamon, S., and Maxwell, W. M. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 77–111.
179. Samadian, F., Towhidi, A., Rezayazdi, K., & Bahreini, M. (2010). Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. *Animal*, 4(12), 2017–2022.

180. Satpathy, G. R., Török, Z., Bali, R., Dwyre, D. M., Little, E., Walker, N. J., ... & Tsvetkova, N. M. (2004). Loading red blood cells with trehalose: a step towards biostabilization. *Cryobiology*, 49(2), 123-136.
181. Serres, C., Escalier, D., & David, G. (1984). Ultrastructural morphometry of the human sperm flagellum with a stereological analysis of the lengths of the dense fibres. *Biology of the Cell*, 49(2), 153-161.
182. Sharma, R. K., & Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48(6), 835–850.
183. Souza, C. E. A., Moura, A. A., Monaco, E., & Killian, G. J. (2008). Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Animal Reproduction Science*, 105(1-2), 72–89.
184. Stephens, D. T., & Hoskins, D. D. (1990). Computerized quantitation of flagellar motion in mammalian sperm. *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*. CRC Press, Boca Raton, 251-260.
185. Stephens, R. E. (1970). Isolation of nexin-the linkage protein responsible for maintenance of the nine-fold configuration of flagellar axonemes. *Biol Bull*, 139, 438.
186. Strzezek, J., Fraser, L., Kuklinska, M., Dziekonska, A., & Lecewicz, M. (2004). Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reprod Biol*, 4(3), 271-287.
187. Strzeżek, J., Łapkiewicz, S., & Lecewicz, M. (1999). A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Animal Science Papers and Reports*, 17(4), 181-188.
188. Suarez, S. S. (1988). Hamster sperm motility transformation during development of hyperactivation in vitro and epididymal maturation. *Gamete research*, 19(1), 51-65.
189. Sukcharoen, N., Keith, J., Irvine, D. S., & Aitken, R. J. (1996). Prediction of the in-vitro fertilization (IVF) potential of human spermatozoa using sperm function tests: the effect of the delay between testing and IVF. *Human Reproduction*, 11(5), 1030-1034.
190. Suzuki- Toyota, F., Itoh, Y., & Naito, K. (2000). Reduction of intramembranous particles in the periacrosomal plasma membrane of boar spermatozoa during in vitro capacitation: a statistical study. *Development, growth & differentiation*, 42(3), 265-273.
191. Swan, M. A., Linck, R. W., Ito, S., & Fawcett, D. W. (1980). Structure and function of the undulating membrane in spermatozoan propulsion in the toad *Bufo marinus*. *The Journal of cell biology*, 85(3), 866-880.
192. Taghilou, P., Rostami, B., Masoumi, R., & Mirzaei-Alamouti, H. (2017). Effects of supplementation of the Tris-egg yolk extender with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on frozen-thawed ram semen characteristics. *Small Ruminant Research*, 155, 1–5.

193. Taylor, M., Song, Y., & Brockbank, K. (2004). 22 Vitrification in Tissue Preservation: New Developments. *Life in the Frozen State*, BJ Fuller, N. Lane, and EE Benson, eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 604-641.
194. Tedeschi, G., Oungre, E., Mortarino, M., Negri, A., Maffeo, G., & Ronchi, S. (2000). Purification and primary structure of a new bovine spermadhesin. *European journal of biochemistry*, 267(20), 6175-6179.
195. Töpfer- Petersen, E., Romero, A., Varela, P. F., Ekhlas- Hundrieser, M., Dostalova, Z., Sanz, L., & Calvete, J. J. (1998). Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, 30(4- 5), 217-224.
196. Troedsson, M. H. T., Desvovsge, A., Alghamdi, A. S., Dahms, B., Dow, C. A., Hayna, J., ... Buhi, W. C. (2005). Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4), 171–186.
197. Tuncer, P. B., Taşdemir, U., Büyükleblebici, S., Özgürtaş, T., Coşkun, E., Erol, H., ... & Gürcan, İ. S. (2013). Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen–thawed Angora buck semen. *Small Ruminant Research*, 113(2-3), 383-389.
198. Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D. S., & Aitken, R. J. (1998). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(6), 1429-1436.
199. Vadnais, M. L., Kirkwood, R. N., Tempelman, R. J., Sprecher, D. J., & Chou, K. (2005). Effect of cooling and seminal plasma on the capacitation status of fresh boar sperm as determined using chlortetracycline assay. *Animal reproduction science*, 87(1-2), 121-132.
200. Van Klaveren, R. J., Demedts, M., & Nemery, B. (1997). Cellular glutathione turnover in vitro, with emphasis on type II pneumocytes. *European Respiratory Journal*, 10(6), 1392-1400.
201. Varela, P. F., Romero, A., Sanz, L., Romão, M. J., Töpfer-Petersen, E., & Calvete, J. J. (1997). The 2.4 Å resolution crystal structure of boar seminal plasma PSP-I/PSP-II: a zona pellucida-binding glycoprotein heterodimer of the spermadhesin family built by a CUB domain architecture. *Journal of Molecular Biology*, 274(4), 635–649.
202. Villemure, M., Lazure, C., & Manjunath, P. (2003). Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 39.
203. Walker, P. M. (1988). *Chambers science and technology dictionary*. Cambridge University Press.

204. Wang, H. Y., Inada, T., Funakoshi, K., & Lu, S. S. (2009). Inhibition of nucleation and growth of ice by poly (vinyl alcohol) in vitrification solution. *Cryobiology*, 59(1), 83-89.
205. Wathes, D. C., Abayasekara, D. R. E., & Aitken, R. J. (2007). Polyunsaturated Fatty Acids in Male and Female Reproduction1. *Biology of Reproduction*, 77(2), 190–201.
206. Watson, P. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 481–492.
207. White, I.G., Goh, P., Voglmayr, J.K. (1987). Effect of male reproductive tract fluids and proteins on the metabolism and motility of ram spermatozoa. *Arch Androl.* 1987;19(2):115-25.
208. Wolfe, C. A., James, P. S., Gunning, A. P., Ladha, S., Christova, Y., & Jones, R. (2001). Lipid dynamics in the plasma membrane of ram and bull spermatozoa after washing and exposure to macromolecules BSA and PVP. *Molecular reproduction and development*, 59(3), 306-313.
209. Woolley, D. M., & Nickels, S. N. (1985). Microtubule termination patterns in mammalian sperm flagella. *Journal of ultrastructure research*, 90(3), 221-234.
210. World Health Organization (2010). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen. In: Cooper, T.G. (Ed.). Standard procedures (pp. 37). WHO Press
211. Wowk, B., & Fahy, G. M. (2002). Inhibition of bacterial ice nucleation by polyglycerol polymers. *Cryobiology*, 44(1), 14-23.
212. Wowk, B., Leitl, E., Rasch, C. M., Mesbah-Karimi, N., Harris, S. B., & Fahy, G. M. (2000). Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*, 40(3), 228-236.
213. Yanagimachi, R. (1970). The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Reproduction*, 23(1), 193-196.
214. Yanagimachi, R. (1981). Mechanisms of fertilization in mammals. In *Fertilization and embryonic development in vitro* (pp. 81-182). Springer, Boston, MA.
215. Yeagle, P. L. (1991). Modulation of membrane function by cholesterol. *Biochimie*, 73(10), 1303-1310.
216. Yeung, C. (1998). Studies on the origin of redox enzymes in seminal plasma and their relationship with results of in-vitro fertilization. *Molecular Human Reproduction*, 4(9), 835–839.
217. Young, R. J., & Bodt, B. A. (1994). Development of computer- directed methods for the identification of hyperactivated motion using motion patterns developed by rabbit sperm during incubation under capacitation conditions. *Journal of andrology*, 15(4), 362-377.
218. Younis, A. I., Rooks, B., Khan, S., & Gould, K. G. (1998). The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa. *Journal of andrology*, 19(2), 207-214.

219. Zhang, B. R., Larsson, B., Lundeheim, N., Rodriguez-Martinez, H. (1998). Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy bulls. *Int J Androl*, 21:207–216.
220. Zubkova, E. V., & Robaire, B. (2004). Effect of Glutathione Depletion on Antioxidant Enzymes in the Epididymis, Seminal Vesicles, and Liver and on Spermatozoa Motility in the Aging Brown Norway Rat1. *Biology of Reproduction*, 71(3), 1002–1008.

IX. ТАБЕЛИ И ГРАФИКОНИ

Табела 1. Квалитативни карактеристики на свежите овнешки ејакулати

Овен	Vol	Spz	Sct	Den	tMot	VIAB
N	ml	(n x 10 ⁶ /ml)	%	(1-5)	%	%
1	1,0	4,32	33	5	97	82,69
2	1,2	2,22	18	4	97	77,78
3	1,3	3,54	37	5	91	83,41
4	2,0	5,88	37	5	93	89,47
5	1,1	3,54	38	5	99	87,02
6	1,1	4,02	32	5	91	82,94
7	1,5	3,60	35	5	93	84,95
8	2,2	3,40	48	5	91	81,55
9	3,0	6,12	43	5	83	93,00
10	2,2	3,40	39	5	92	83,33

Vol – волумен на ејакулат, Spz – број на сперматозоиди во ејакулат, Sct – сперматокрит, Den – густина на ејакулат во градациски систем од 1 до 5 (1- најниска-, 5- највисока густина), tMot – број на мотилни сперматозоиди (%), VIAB – број на сперматозоиди со интактна структура и морфологија

Табела 2. Квантитативни карактеристики на свежите овнешки ејакулати при нивно вклучување во збирниот изворен примерок

Овен	Vol	H-Sct	H-Spz	Sct	M-Sct/Sct	pVol	pVol
N	(ml)	(cm)	(cm)	%		%	μL
1	1,0	6,0	2,0	33	1,08	10,12	304
2	1,2	6,0	1,1	18	1,95	18,40	552
3	1,3	6,0	2,2	37	0,98	9,20	276
4	2,0	6,0	2,2	37	0,98	9,20	276
5	1,1	6,0	2,3	38	0,93	8,80	264
6	1,1	6,0	2,2	37	0,98	9,20	276
7	1,5	6,0	1,9	32	1,13	10,66	320
8	2,2	6,0	2,1	35	1,02	9,64	289
9	3,0	6,0	2,9	48	0,74	6,98	209
10	2,2	6,0	2,6	43	0,83	7,79	234

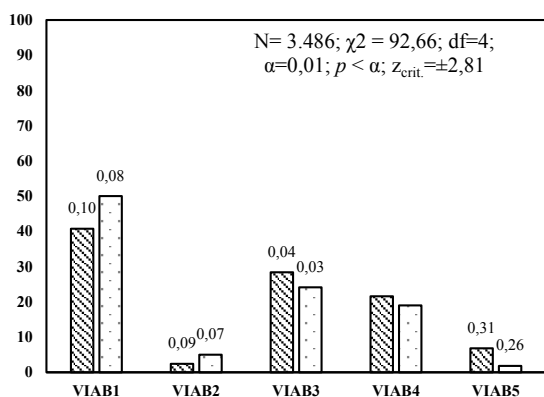
Vol – волумен на ејакулат, H-Sct – висина на сперматокритен столб, H-Spz – висина на сперматозонден столб, Sct – сперматокрит, M-Sct – средна вредност на сперматокрит од ејакулати, pVol – парцијален волумен на ејакулат во збирен изворен примерок

Табела 3. Параметри на сензитивност на χ^2 тестови на независност според степени на слобода, ацентрален параметар и статистичка моќност

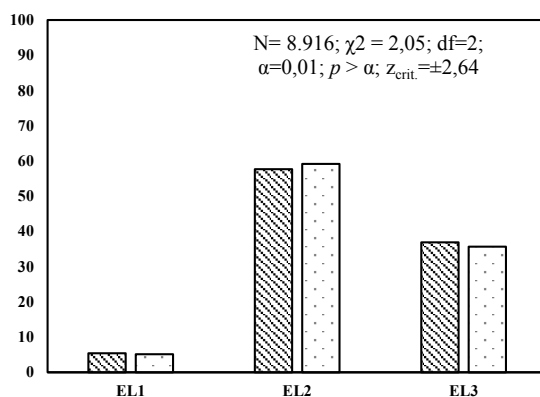
N	df	<i>A priori</i>			<i>Post hoc</i>	
		λ	1- β	α	$z_{crit.}$	χ^2
1	44	76,84	0,99	0,001	± 3,34	78,75
2	33	69,89	0,99	0,001	± 3,28	63,87
3	28	66,34	0,99	0,001	± 3,23	56,89
4	22	50,51	0,99	0,001	± 3,20	40,29
5	21	49,78	0,99	0,01	± 3,16	38,93
6	14	44,02	0,99	0,01	± 3,08	29,14
7	4	31,79	0,99	0,01	± 2,81	13,28
8	3	23,52	0,99	0,05	± 2,73	7,81
9	2	27,41	0,99	0,01	± 2,64	9,21

df - степени на слобода; λ – ацентрален параметар; 1- β – статистичка моќност на тестот; α – критична вредност на p за прифаќање на алтернативна хипотеза; $z_{crit.}$ – критична вредност за прилагодена остаточна вредност; χ^2 – критична вредност за χ^2 вредност на тестот на независност за прифаќање на алтернативна хипотеза

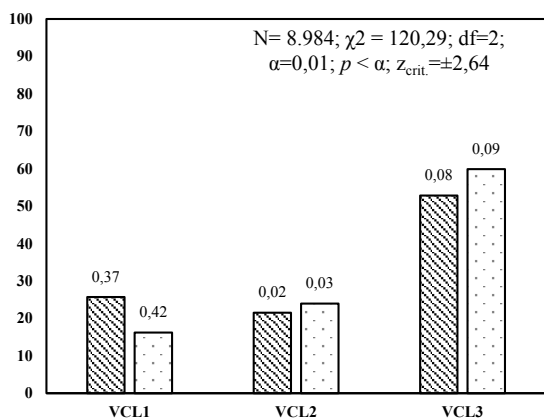
Графикон 1



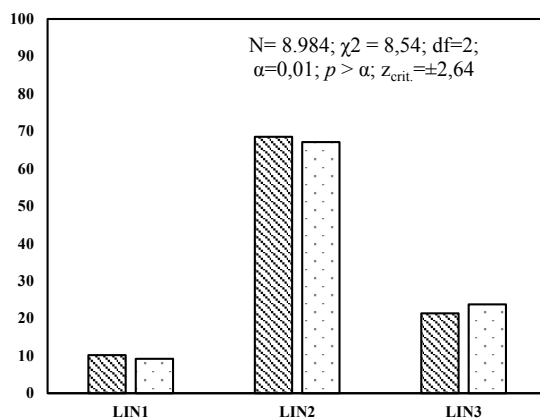
Графикон 2



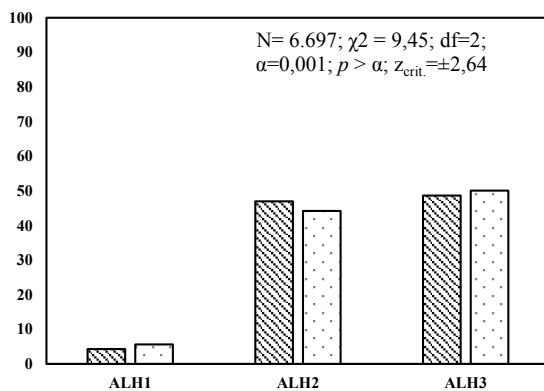
Графикон 3



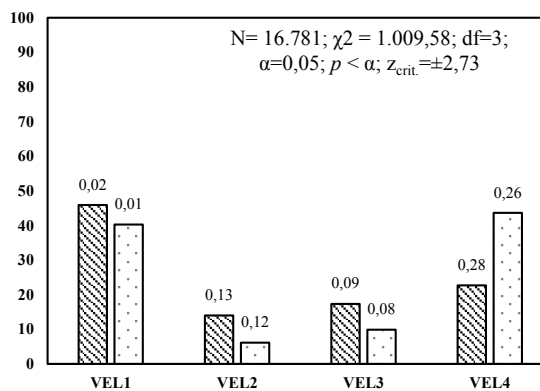
Графикон 4



Графикон 5



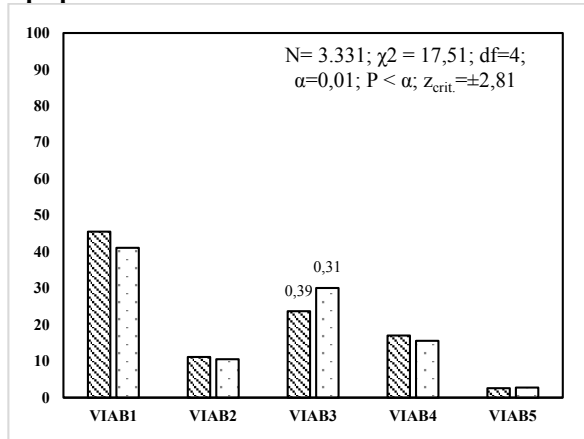
Графикон 6



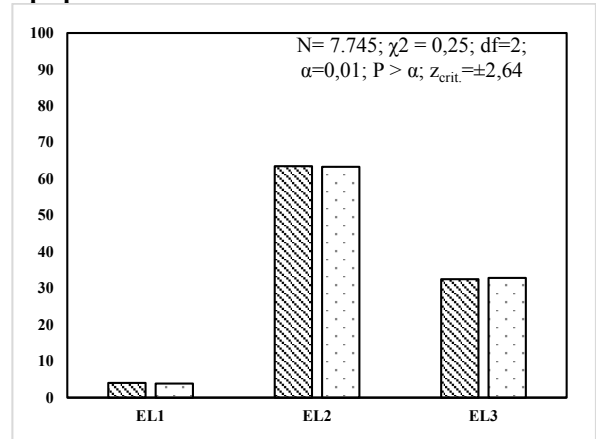
C-a-0 C-b-0

Графикон 1-6. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди (%) во категории според: 1. структурен и морфолошки интегритет (VIAB), 2. индекс на елонгација на сперматозоидна глава (EL), 3. брзина на криволиниска траекторија (VCL), 4. праволиниски индекс на траекторија (LIN), 5. амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH) и 6. мотилна брзина (VEL), при додавање на контролен криопрезервативски медиум (C) пред (a-CT) и после криотретман (b-CT), за анализи на 0-часа од инкубација. N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, $z_{crit.}$ – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес (прикажан над секој столб за $z > z_{crit.}$); df – степени на слобода.

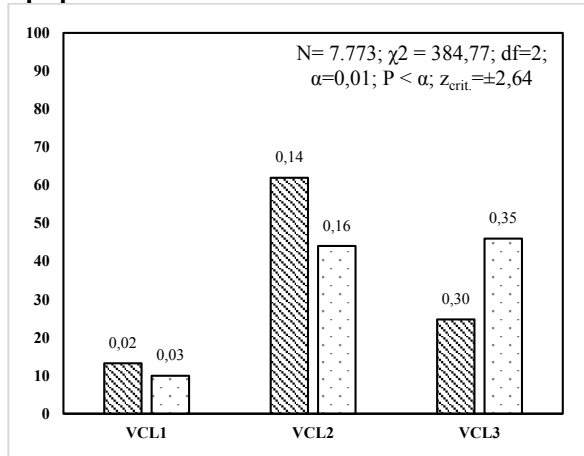
Графикон 7



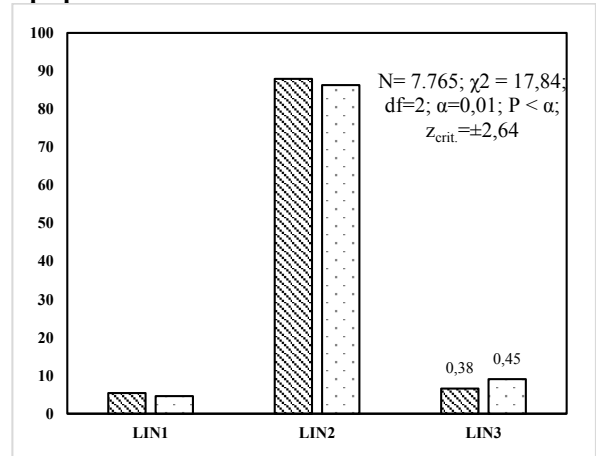
Графикон 8



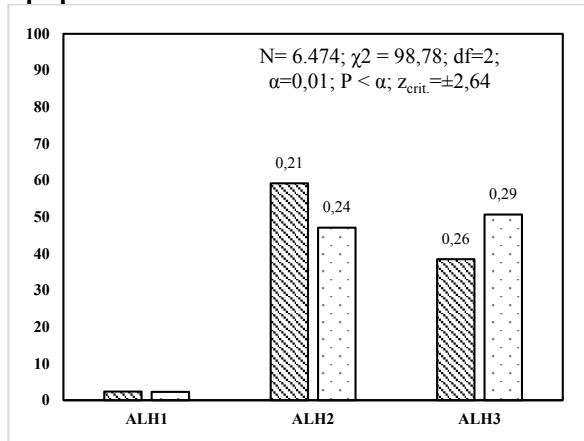
Графикон 9



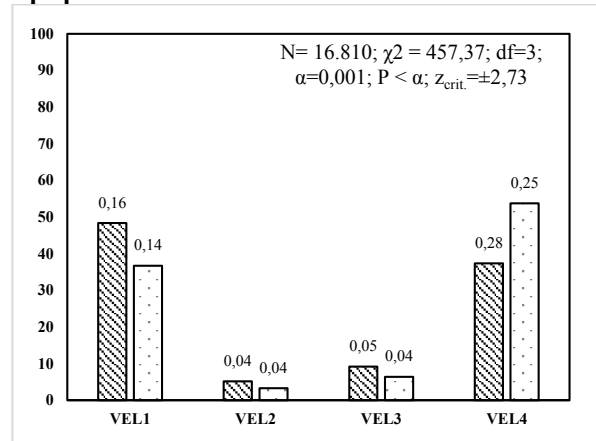
Графикон 10



Графикон 11



Графикон 12



C-a-3 C-b-3

Графикон 7-12. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди (%) во категории според: 1. структурен и морфолошки интегритет (VIAB), 2. елонгација на сперматозоидна глава (EL), 3. брзина на криволиниска траекторија (VCL), 4. праволиниски индекс на траекторија (LIN), 5. амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH) и 6. мотилна брзина (VEL), при додавање на контролен криопрезервативски медиум (C) пред (a-CT) и после криотретман (b-CT), за анализи на 3-часа од инкубација. N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, $z_{crit.}$ – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес (прикажан над секој столб за $z > z_{crit.}$); df – степени на слобода.

Табела 4. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според структурен и морфолошки интегритет (VIAB) за анализи суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми пред криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		C-a-0	C-a-3	E1-a-0	E1-a-3	E2-a-0	E2-a-3	E3-a-0	E3-a-3	Σ row %	χ^2 на независност
Категории											
VIAB1	%	40,78	45,54	46,57	42,27	57,50	21,89	57,16	23,07	41,51	N=12.612
	z	-0,63	3,34	4,31	0,65	13,79	-17,57	13,32	-16,21		$\chi^2=1.750,37$
	RCI	0,00	0,00	0,01	0,00	0,06	0,09	0,05	0,08		df=28
VIAB2	%	2,40	11,16	5,17	12,03	3,67	28,88	3,56	24,05	11,61	$\alpha=0,001$
	z	-12,24	-0,57	-8,43	0,56	-10,52	23,79	-10,53	16,83		$p < \alpha$
	RCI	0,07	0,00	0,03	0,00	0,05	0,25	0,05	0,12		$z_{crit}=\pm 3,23$
VIAB3	%	28,41	23,69	24,13	23,04	22,42	20,76	23,07	22,83	23,52	
	z	4,91	0,17	0,60	-0,47	-1,10	-2,87	-0,44	-0,70		
	RCI	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
VIAB4	%	21,59	17,02	21,28	19,67	14,00	25,56	14,45	28,34	20,36	
	z	1,30	-3,39	0,96	-0,73	-6,72	5,70	-6,15	8,58		
	RCI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,02	0,03		
VIAB5	%	6,82	2,59	2,85	2,99	2,41	2,91	1,75	1,71	3,01	
	z	9,51	-1,00	-0,39	-0,03	-1,49	-0,26	-3,08	-3,28		
	RCI	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01		

Групи на анализи суспендирани во пред-криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: контролни (C-a-0 / C-a-3) KM без GSH и HSP; експериментални-1 (E1-a-0 / E1-a-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-a-0 / E2-a-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-a-0 / E3-a-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според статусот (оштетен '-' / неоштетен '+') на плазмена (Pm), акрозомска мембрана (Ac) и морфологија (Mo): VIAB1 (Pm+, Ac+, Mo+); VIAB2 (Pm+, Ac-, Mo+); VIAB3 (Pm-, Ac+, Mo+); VIAB4 (Pm-, Ac-, Mo+); и VIAB5 (Pm-, Ac-, Mo-). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани со χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 5. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според индекс на елонгација на сперматозоидна глава (EL) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми пред криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		C-a-0	C-a-3	E1-a-0	E1-a-3	E2-a-0	E2-a-3	E3-a-0	E3-a-3	Σ row %	χ^2 на независност
Категории											
EL1	%	5,43	4,05	4,89	6,19	5,38	5,82	5,12	5,52	5,22	N=29.135
	z	0,71	-3,66	-1,05	2,79	0,42	1,20	-0,34	0,70		$\chi^2=194,76$
	RCI	0,00	0,06	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00		df=14
EL2	%	57,69	63,47	59,53	60,81	64,41	66,61	67,60	66,23	62,88	$\alpha=0,01$
	z	0,10	0,00	0,04	0,01	0,01	0,02	0,09	0,02		$p < \alpha$
	RCI	0,07	0,00	0,03	0,00	0,05	0,25	0,05	0,12		$Z_{crit}=\pm 3,08$
EL3	%	36,89	32,48	35,58	33,00	30,21	27,57	27,28	28,26	31,90	
	z	8,06	0,86	5,60	1,50	-2,04	-4,10	-7,88	-4,09		
	RCI	0,19	0,00	0,09	0,01	0,01	0,06	0,18	0,05		

Групи на аналити суспендирани во пред-криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: контролни (C-a-0 / C-a-3) KM без GSH и HSP; експериментални-1 KM (E1-a-0 / E1-a-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-a-0 / E2-a-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-a-0 / E3-a-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според индексот на елонгација на сперматозоидна глава (EL): EL1 (0-30 %); EL2 (31-50 %) и EL3 (51-100 %). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, Z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 6. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според брзина на криволиниска траекторија (VCL) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми пред криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		C-a-0	C-a-3	E1-a-0	E1-a-3	E2-a-0	E2-a-3	E3-a-0	E3-a-3	Σ row %	χ^2 на независност
Категории											
VCL1	%	25,68	13,25	20,69	41,73	24,83	38,65	33,31	68,35	30,79	N=28.175
	z	-8,43	-26,65	-15,64	15,23	-7,26	7,53	3,75	42,81		$\chi^2=6.186,63$
	RCI	0,01	0,07	0,02	0,02	0,01	0,01	0,00	0,19		df=14
VCL2	%	21,50	61,96	31,30	46,62	35,37	52,67	46,16	30,07	39,97	$\alpha=0,01$
	z	-28,71	31,49	-12,66	8,72	-5,29	11,48	8,70	-10,64		$p < \alpha$
	RCI	0,07	0,08	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01		$Z_{crit}=\pm 3,08$
VCL3	%	52,82	24,79	48,01	11,64	39,80	8,68	20,53	1,59	29,24	
	z	39,47	-6,87	29,51	-24,85	13,06	-20,01	-13,18	-31,99		
	RCI	0,15	0,00	0,08	0,06	0,02	0,04	0,02	0,11		

Групи на аналити суспендирани во пред-криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: контролни (C-a-0 / C-a-3) KM без GSH и HSP; експериментални-1 KM (E1-a-0 / E1-a-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-a-0 / E2-a-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-a-0 / E3-a-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според брзина на криволиниска траекторија (VCL): VCL1 (0-150 $\mu\text{m/s}$); VCL2 (151-250 $\mu\text{m/s}$); VCL3 (251-450 $\mu\text{m/s}$). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, Z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 7. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според праволиниски индекс на траекторија (LIN) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми пред криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		C-a-0	C-a-3	E1-a-0	E1-a-3	E2-a-0	E2-a-3	E3-a-0	E3-a-3	Σ row %	χ^2 на независност
Категории											
LIN1	%	10,17	5,43	9,20	6,89	7,76	5,24	5,95	4,01	7,17	N=28,169
	z	8,83	-4,73	5,61	-0,71	1,27	-3,32	-3,27	-6,46		$\chi^2=885,41$
	RCI	0,07	0,02	0,03	0,00	0,00	0,01	0,01	0,04		df=14
LIN2	%	68,50	87,94	69,07	75,88	69,92	86,41	76,19	82,67	76,10	$\alpha=0,01$
	z	-13,57	19,46	-11,78	-0,32	-8,16	10,70	0,15	8,10		$p < \alpha$
	RCI	0,04	0,09	0,03	0,00	0,02	0,03	0,00	0,02		$z_{crit}=\pm 3,08$
LIN3	%	21,33	6,63	21,73	17,23	22,32	8,35	17,86	13,33	16,73	
	z	9,40	-18,96	9,58	0,86	8,44	-9,93	2,09	-4,79		
	RCI	0,07	0,29	0,07	0,00	0,06	0,09	0,00	0,02		

Групи на аналити суспендирани во пред-криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: контролни (C-a-0 / C-a-3) KM без GSH и HSP; експериментални-1 KM (E1-a-0 / E1-a-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-a-0 / E2-a-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-a-0 / E3-a-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според праволиниски индекс на траекторија (LIN): LIN1 (0-30 %); LIN2 (31-50 %); LIN3 (51-100 %). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 8. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми пред криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		C-a-0	C-a-3	E1-a-0	E1-a-3	E2-a-0	E2-a-3	E3-a-0	E3-a-3	Σ row %	χ^2 на независност
Категории											
ALH1	%	4,34	2,35	7,19	6,93	7,20	4,68	6,48	5,03	5,44	N=20.009
	z	-3,09	-8,82	4,85	3,26	3,85	-1,27	2,67	-0,67		$\chi^2=1.009,97$
	RCI	0,01	0,06	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00		df=14
ALH2	%	47,00	59,19	53,37	54,78	56,93	69,21	74,97	76,78	59,51	$\alpha=0,01$
	z	-16,21	-0,42	-7,86	-4,81	-2,61	7,44	18,41	12,86		$p < \alpha$
	RCI	0,09	0,00	0,02	0,01	0,00	0,02	0,12	0,06		$z_{crit}=\pm 3,08$
ALH3	%	48,66	38,46	39,44	38,30	35,87	26,11	18,55	18,20	35,04	
	z	18,15	4,62	5,78	3,40	0,86	-7,05	-20,21	-12,91		
	RCI	0,18	0,01	0,02	0,01	0,00	0,03	0,22	0,10		

Групи на аналити суспендирани во пред-криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: контролни (C-a-0 / C-a-3) KM без GSH и HSP; експериментални-1 KM (E1-a-0 / E1-a-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-a-0 / E2-a-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-a-0 / E3-a-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH): ALH1 (0-6 μ m); ALH2 (7-12 μ m); ALH3 (13-30 μ m). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 9. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според мотилна брзина (VEL) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми пред криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		C-a-0	C-a-3	E1-a-0	E1-a-3	E2-a-0	E2-a-3	E3-a-0	E3-a-3	Σ row %	χ^2 на независност
Категории											
VEL1	%	45,93	48,33	43,77	31,58	29,97	17,53	38,79	16,80	34,18	N=62.590
	z	23,76	28,23	19,02	-5,17	-8,34	-32,91	9,30	-34,53		$\chi^2=5.700,80$
	RCI	0,06	0,08	0,04	0,00	0,01	0,11	0,01	0,12		df=21
VEL2	%	14,01	5,15	9,49	14,75	6,84	6,26	11,94	15,61	10,53	$\alpha=0,01$
	z	10,89	-16,59	-3,17	12,97	-11,29	-13,04	4,41	15,60		$p < \alpha$
	RCI	0,02	0,04	0,00	0,02	0,02	0,02	0,00	0,03		$Z_{crit}=\pm 3,16$
VEL3	%	17,36	9,17	13,28	17,78	17,84	21,02	19,16	12,77	16,05	
	z	3,43	-17,74	-7,11	4,43	4,59	12,68	8,12	-8,43		
	RCI	0,00	0,04	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01		
VEL4	%	22,70	37,35	33,46	35,89	45,35	55,20	30,10	54,82	39,24	
	z	-32,50	-3,66	-11,14	-6,46	11,75	30,63	-17,90	30,07		
	RCI	0,10	0,00	0,01	0,00	0,01	0,09	0,03	0,08		

Групи на аналити суспендирани во пред-криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: контролни (C-a-0 / C-a-3) KM без GSH и HSP; експериментални-1 KM (E1-a-0 / E1-a-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-a-0 / E2-a-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-a-0 / E3-a-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според мотилна брзина (VEL): VEL1 ($\geq 75,0 \mu\text{m/s}$); VEL2 (30,0-74,9 $\mu\text{m/s}$); VEL3 (0,1-21,9 $\mu\text{m/s}$), VEL4 ($< 0,1 \mu\text{m/s}$). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, Z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 10. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според структурен и морфолошки интегритет (VIAB) за анализи суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		C-b-0	C-b-3	E1-b-0	E1-b-3	E2-b-0	E2-b-3	E3-b-0	E3-b-3	Σ row %	χ^2 на независност
Категории											
VIAB1	%	50,05	41,08	43,60	38,84	48,95	29,67	48,25	33,72	64,64	N=16.090
	z	7,92	-0,52	1,91	-2,74	7,09	-11,94	6,57	-7,86		$\chi^2=842,26$
	RCI	0,04	0,00	0,00	0,00	0,03	0,09	0,03	0,04		df=28
VIAB2	%	4,99	10,53	4,79	10,50	5,00	18,26	7,00	16,62	9,80	$\alpha=0,001$
	z	-7,51	1,12	-8,10	1,13	-7,73	13,99	-4,62	11,21		$p < \alpha$
	RCI	0,05	0,00	0,06	0,00	0,06	0,18	0,02	0,12		$z_{crit}=\pm 3,23$
VIAB3	%	24,13	30,08	27,93	28,19	26,02	21,73	25,11	19,50	25,26	
	z	-1,20	5,09	2,96	3,25	0,84	-3,99	-0,17	-6,48		
	RCI	0,00	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00	0,03		
VIAB4	%	18,98	15,57	21,90	19,07	17,98	27,86	16,77	27,57	20,83	
	z	-2,11	-5,93	1,27	-2,08	-3,35	8,53	-4,89	8,12		
	RCI	0,00	0,03	0,00	0,00	0,01	0,06	0,02	0,05		
VIAB5	%	1,84	2,74	1,78	3,40	2,05	2,47	2,87	2,59	2,47	
	z	-1,89	0,78	-2,15	2,88	-1,31	0,00	1,27	0,38		
	RCI	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00		

Групи на анализи суспендирани во после-криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: контролни (C-b-0 / C-b-3) KM без GSH и HSP; експериментални-1 KM (E1-b-0 / E1-b-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-b-0 / E2-b-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-b-0 / E3-b-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според статусот (оштетен '-' / неоштетен '+') на плазмена (Pm), акрозомска мембрана (Ac) и морфологија (Mo): VIAB1 (Pm+, Ac+, Mo+); VIAB2 (Pm+, Ac-, Mo+); VIAB3 (Pm-, Ac+, Mo+); VIAB4 (Pm-, Ac-, Mo+); и VIAB5 (Pm-, Ac-, Mo-). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани со χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 11. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според индекс на елонгација на сперматозоидна глава (EL) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		C-b-0	C-b-3	E1-b-0	E1-b-3	E2-b-0	E2-b-3	E3-b-0	E3-b-3	Σ row %	χ ² на независност
Категории											
EL1	%	5,14	3,86	4,83	5,24	5,08	4,23	4,10	4,82	4,66	N=30.434
	z	1,60	-2,40	0,55	1,76	1,25	-1,24	-1,95	0,52		χ ² =87,12
	RCI	0,02	0,06	0,00	0,03	0,02	0,01	0,04	0,00		df=14
EL2	%	59,17	63,31	62,06	66,05	62,25	66,57	62,18	64,60	63,14	α=0,01
	z	-5,72	0,22	-1,48	3,81	-1,15	4,40	-1,47	2,02		p < α
	RCI	0,12	0,00	0,01	0,05	0,01	0,07	0,01	0,02		z _{crit} =±3,08
EL3	%	35,69	32,83	33,11	28,71	32,68	29,20	33,72	30,58	32,20	
	z	5,18	0,85	1,28	-4,73	0,63	-3,98	2,40	-2,31		
	RCI	0,18	0,00	0,01	0,15	0,00	0,11	0,04	0,04		

Групи на аналити суспендирани во пред-криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: контролни (C-b-0 / C-b-3) KM без GSH и HSP; експериментални-1 KM (E1-b-0 / E1-b-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-b-0 / E2-b-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-b-0 / E3-b-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според индексот на елонгација на сперматозоидна глава (EL): EL1 (0-30 %); EL2 (31-50 %) и EL3 (51-100 %). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ² тест на независност; χ² – вредност од χ² тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ² вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 12. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според брзина на криволиниска траекторија (VCL) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		C-b-0	C-b-3	E1-b-0	E1-b-3	E2-b-0	E2-b-3	E3-b-0	E3-b-3	Σ row %	χ ² на независност
Категории											
VCL1	%	16,19	9,96	16,20	20,15	20,66	20,23	16,99	32,76	19,10	N=30.595
	z	-5,15	-14,83	-4,90	1,69	2,48	1,77	-3,98	23,15		χ ² =5.300,43
	RCI	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07		df=14
VCL2	%	23,93	44,04	25,24	59,00	32,54	69,07	35,48	57,86	42,62	α=0,01
	z	-26,28	1,84	-23,32	21,03	-12,75	33,20	-10,68	20,55		p < α
	RCI	0,06	0,00	0,05	0,04	0,02	0,11	0,01	0,04		z _{crit} =±3,08
VCL3	%	59,88	46,00	58,56	20,85	46,80	10,70	47,53	9,38	38,28	
	z	30,90	10,12	27,69	-22,76	10,97	-35,21	14,09	-39,63		
	RCI	0,10	0,01	0,08	0,05	0,01	0,13	0,02	0,16		

Групи на аналити суспендирани во после-криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: контролни (C-b-0 / C-b-3) KM без GSH и HSP; експериментални-1 KM (E1-b-0 / E1-b-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-b-0 / E2-b-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-b-0 / E3-b-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според брзина на криволиниска траекторија (VCL): VCL1 (0-150 μm/s); VCL2 (151-250 μm/s); VCL3 (251-450 μm/s). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ² тест на независност; χ² – вредност од χ² тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ² вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 13. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според праволиниски индекс на траекторија (LIN) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		C-b-0	C-b-3	E1-b-0	E1-b-3	E2-b-0	E2-b-3	E3-b-0	E3-b-3	Σ row %	χ^2 на независност
Категории											
LIN1	%	9,17	4,63	5,79	4,84	7,95	4,36	4,91	4,38	5,77	N=30.685 $\chi^2=1.229,56$ df=14
	z	10,15	-3,11	0,06	-2,53	5,78	-3,76	-2,77	-3,96		
	RCI	0,07	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,01		
LIN2	%	67,11	86,30	67,88	82,73	71,80	89,45	74,16	82,53	77,33	$\alpha=0,01$ $p < \alpha$ $z_{crit}=\pm 3,08$
	z	-16,96	13,65	-14,98	8,20	-8,17	17,96	-5,71	8,27		
	RCI	0,05	0,03	0,04	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01		
LIN3	%	23,71	9,07	26,33	12,43	20,25	6,20	20,92	13,09	16,90	
	z	12,64	-13,32	16,70	-7,59	5,53	-17,72	8,10	-6,77		
	RCI	0,09	0,11	0,16	0,03	0,02	0,19	0,04	0,03		

Групи на аналити суспендирани во после-криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: контролни (C-b-0 / C-b-3) KM без GSH и HSP; експериментални-1 KM (E1-b-0 / E1-b-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-b-0 / E2-b-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-b-0 / E3-b-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според праволиниски индекс на траекторија (LIN): LIN1 (0-30 %); LIN2 (31-50 %); LIN3 (51-100 %). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 14. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		C-b-0	C-b-3	E1-b-0	E1-b-3	E2-b-0	E2-b-3	E3-b-0	E3-b-3	Σ row %	χ^2 на независност
Категории											
ALH1	%	5,67	2,25	6,84	5,24	6,36	3,52	7,62	4,84	5,38	N=24.948 $\chi^2=1.147,98$ df=14
	z	0,80	-8,13	3,88	-0,35	2,37	-4,74	6,77	-1,42		
	RCI	0,00	0,05	0,01	0,00	0,00	0,02	0,03	0,00		
ALH2	%	44,22	47,07	48,15	59,60	47,81	71,35	54,62	70,33	55,24	$\alpha=0,01$ $p < \alpha$ $z_{crit}=\pm 3,08$
	z	-13,74	-9,63	-8,53	5,00	-8,17	18,65	-0,84	17,92		
	RCI	0,06	0,03	0,02	0,01	0,02	0,12	0,00	0,11		
ALH3	%	50,11	50,68	45,01	35,16	45,83	25,13	37,76	24,84	39,38	
	z	13,61	13,56	6,89	-4,93	7,23	-16,79	-2,27	-17,58		
	RCI	0,08	0,09	0,02	0,01	0,02	0,13	0,00	0,14		

Групи на аналити суспендирани во после-криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: контролни (C-b-0 / C-b-3) KM без GSH и HSP; експериментални-1 KM (E1-b-0 / E1-b-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-b-0 / E2-b-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-b-0 / E3-b-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH): ALH1 (0-6 μ m); ALH2 (7-12 μ m); ALH3 (13-30 μ m). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 15. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според мотилна брзина (VEL) за аналити суспендирани со контролни и експериментални криопрезервациски медиуми после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		C-b-0	C-b-3	E1-b-0	E1-b-3	E2-b-0	E2-b-3	E3-b-0	E3-b-3	Σ row %	χ^2 на независност
Категории											
VEL1	%	45,93	48,33	43,77	31,58	29,97	17,53	38,79	16,80	36,59	N=72.827
	z	23,76	28,23	19,02	-5,17	-8,34	-32,91	9,30	-34,53		$\chi^2=1.196,64$
	RCI	0,06	0,08	0,04	0,00	0,01	0,11	0,01	0,12		df=21
VEL2	%	14,01	5,15	9,49	14,75	6,84	6,26	11,94	15,61	5,28	$\alpha=0,01$
	z	10,89	-16,59	-3,17	12,97	-11,29	-13,04	4,41	15,60		$p < \alpha$
	RCI	0,02	0,04	0,00	0,02	0,02	0,02	0,00	0,03		$Z_{crit}=\pm 3,16$
VEL3	%	17,36	9,17	13,28	17,78	17,84	21,02	19,16	12,77	8,94	
	z	3,43	-17,74	-7,11	4,43	4,59	12,68	8,12	-8,43		
	RCI	0,00	0,04	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01		
VEL4	%	22,70	37,35	33,46	35,89	45,35	55,20	30,10	54,82	49,20	
	z	-32,50	-3,66	-11,14	-6,46	11,75	30,63	-17,90	30,07		
	RCI	0,10	0,00	0,01	0,00	0,01	0,09	0,03	0,08		

Групи на аналити суспендирани во после-криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: контролни (C-a-0 / C-a-3) KM без GSH и HSP; експериментални-1 KM (E1-b-0 / E1-b-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-b-0 / E2-b-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-b-0 / E3-b-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според мотилна брзина (VEL): VEL1 ($\geq 75,0 \mu\text{m/s}$); VEL2 (30,0-74,9 $\mu\text{m/s}$); VEL3 (0,1-21,9 $\mu\text{m/s}$), VEL4 ($< 0,1 \mu\text{m/s}$). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, Z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 16. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според структурен и морфолошки интегритет (VIAB) за анализи суспендирани со експериментални криопрезервациски медиуми пред и после криотретман, моистрирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		E1-a-0	E1-a-3	E2-a-0	E2-a-3	E3-a-0	E3-a-3	E1-b-0	E1-b-3	E2-b-0	E2-b-3	E3-b-0	E3-b-3	Σ row %
Категории														
VIAB1	%	46,57	42,27	57,50	21,89	57,16	23,07	43,60	38,84	48,95	29,67	48,25	33,72	40,68
	z	4,89	1,33	14,13	-16,35	13,67	-15,06	2,80	-1,78	7,90	-10,81	7,40	-6,80	
	RCI	0,01	0,00	0,05	0,07	0,05	0,06	0,00	0,00	0,02	0,03	0,01	0,01	
VIAB2	%	5,17	12,03	3,67	28,88	3,56	24,05	4,79	10,50	5,00	18,26	7,00	16,62	11,64
	z	-8,23	0,50	-10,25	22,98	-10,26	16,26	-10,08	-1,69	-9,73	9,95	-6,96	7,44	
	RCI	0,03	0,00	0,04	0,20	0,04	0,10	0,04	0,00	0,03	0,04	0,02	0,02	
VIAB3	%	24,13	23,04	22,42	20,76	23,07	22,83	27,93	28,19	26,02	21,73	25,11	19,50	23,82
	z	0,29	-0,75	-1,36	-3,07	-0,72	-0,98	4,55	4,85	2,43	-2,37	1,45	-4,86	
	RCI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	
VIAB4	%	21,28	19,67	14,00	25,56	14,45	28,34	21,90	19,07	17,98	27,86	16,77	27,57	21,37
	z	-0,09	-1,70	-7,42	4,38	-6,87	7,14	0,61	-2,65	-3,88	7,65	-5,39	7,26	
	RCI	0,00	0,00	0,02	0,01	0,02	0,02	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,02	
VIAB5	%	2,85	2,99	2,41	2,91	1,75	1,71	1,78	3,40	2,05	2,47	2,87	2,59	2,49
	z	0,93	1,32	-0,22	1,14	-1,94	-2,09	-2,15	2,76	-1,33	-0,05	1,19	0,32	
	RCI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

χ^2 на независност: N=21.885; $\chi^2=2.185,22$; df=44; $\alpha=0,001$; $p < \alpha$; $z_{crit}=\pm 3,34$

Групи на анализи суспендирани во пред и после криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на моистрирање: експериментални-1 KM (E1-a-0, E1-b-0 / E1-a-3, E1-b-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-a-0, E2-b-0 / E-a-3, E2-b-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-a-0, E3-b-0 / E3-a-3, E3-b-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според статусот (оштетен ‘-’/неоштетен ‘+’) на плазмена (Pm), акрозомска мембрана (Ac) и морфологија (Mo): VIAB1 (Pm+, Ac+, Mo+); VIAB2 (Pm+, Ac-, Mo+); VIAB3 (Pm-, Ac+, Mo+); VIAB4 (Pm-, Ac-, Mo+); и VIAB5 (Pm-, Ac-, Mo-). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани со χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, z_{crit} – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 17. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според индекс на елонгација на сперматозоидна глава (EL) за аналити суспендирани со експериментални криопрезервациски медиуми пред и после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		E1-a-0	E1-a-3	E2-a-0	E2-a-3	E3-a-0	E3-a-3	E1-b-0	E1-b-3	E2-b-0	E2-b-3	E3-b-0	E3-b-3	Σ row %
Категории														
EL1	%	4,89	6,19	5,38	5,82	5,12	5,52	4,83	5,24	5,08	4,23	4,10	4,82	5,03
	z	-0,45	3,32	0,89	1,58	0,32	1,15	-0,59	0,60	0,14	-2,21	-3,07	-0,62	
	RCI	0,00	0,06	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02	0,05	0,00	
EL2	%	59,53	60,81	64,41	66,61	67,60	66,23	62,06	66,05	62,25	66,57	62,18	64,60	63,91
	z	-6,30	-4,02	0,58	2,46	5,91	2,49	-2,49	2,77	-2,12	3,37	-2,59	0,94	
	RCI	0,07	0,03	0,00	0,01	0,06	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,00	
EL3	%	35,58	33,00	30,21	27,57	27,28	28,26	33,11	28,71	32,68	29,20	33,72	30,58	31,06
	z	6,75	2,61	-1,02	-3,30	-6,28	-3,13	2,86	-3,16	2,13	-2,45	4,14	-0,68	
	RCI	0,16	0,02	0,00	0,04	0,14	0,04	0,03	0,04	0,02	0,02	0,06	0,00	

χ^2 на независност: N=42.908; $\chi^2=172,74$; df=22; $\alpha=0,01$; $p < \alpha$; $z_{crit.}=\pm 3,20$

Групи на аналити суспендирани во пред и после криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: експериментални-1 KM (E1-a-0, E1-b-0 / E1-a-3, E1-b-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-a-0, E2-b-0 / E-a-3, E2-b-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-a-0, E3-b-0 / E3-a-3, E3-b-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според индексот на елонгација на сперматозоидна глава (EL): EL1 (0-30 %); EL2 (31-50 %) и EL3 (51-100 %). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, $z_{crit.}$ – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 18. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според брзина на криволиниска траекторија (VCL) за аналити суспендирани со експериментални криопрезервациски медиуми пред и после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		E1-a-0	E1-a-3	E2-a-0	E2-a-3	E3-a-0	E3-a-3	E1-b-0	E1-b-3	E2-b-0	E2-b-3	E3-b-0	E3-b-3	Σ row %
Категории														
VCL1	%	20,69	41,73	24,83	38,65	33,31	68,35	16,20	20,15	20,66	20,23	16,99	32,76	27,84
	z	-11,08	19,45	-3,71	10,55	8,17	46,80	-16,91	-10,70	-9,85	-10,37	-17,51	7,17	
	RCI	0,01	0,03	0,00	0,01	0,00	0,16	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,00	
VCL2	%	31,30	46,62	35,37	52,67	46,16	30,07	25,24	59,00	32,54	69,07	35,48	57,86	43,07
	z	-16,50	4,51	-8,59	8,49	4,19	-13,60	-23,44	20,07	-13,08	32,05	-11,07	19,53	
	RCI	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03	0,02	0,01	0,06	0,01	0,02	
VCL3	%	48,01	11,64	39,80	8,68	20,53	1,59	58,56	20,85	46,80	10,70	47,53	9,38	29,09
	z	28,93	-24,10	13,03	-19,67	-12,63	-31,36	42,24	-11,32	23,98	-24,71	29,35	-28,37	
	RCI	0,06	0,04	0,01	0,03	0,01	0,07	0,12	0,01	0,04	0,04	0,06	0,06	

χ^2 на независност: N=42,013; $\chi^2=9.395,95$; df=22; $\alpha=0,01$; $p < \alpha$; $z_{crit.}=\pm 3,20$

Групи на аналити суспендирани во пред и после криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: експериментални-1 KM (E1-a-0, E1-b-0 / E1-a-3, E1-b-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-a-0, E2-b-0 / E-a-3, E2-b-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-a-0, E3-b-0 / E3-a-3, E3-b-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според брзина на криволиниска траекторија (VCL): VCL1 (0-150 $\mu\text{m/s}$); VCL2 (151-250 $\mu\text{m/s}$); VCL3 (251-450 $\mu\text{m/s}$). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, $z_{crit.}$ – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 19. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според праволиниски индекс на траекторија (LIN) за аналити суспендирани со експериментални криопрезервациски медиуми пред и после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		E1-a-0	E1-a-3	E2-a-0	E2-a-3	E3-a-0	E3-a-3	E1-b-0	E1-b-3	E2-b-0	E2-b-3	E3-b-0	E3-b-3	Σ row %
Категории														
LIN1	%	9,20	6,89	7,76	5,24	5,95	4,01	5,79	4,84	7,95	4,36	4,91	4,38	6,00
	z	9,36	2,36	4,09	-1,40	-0,15	-4,35	-0,57	-3,05	4,99	-4,22	-3,37	-4,45	
	RCI	0,06	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	
LIN2	%	69,07	75,88	69,92	86,41	76,19	82,67	67,88	82,73	71,80	89,45	74,16	82,53	76,71
	z	-12,55	-1,23	-8,88	10,04	-0,82	7,30	-13,60	8,90	-7,06	18,39	-4,44	8,99	
	RCI	0,03	0,00	0,01	0,02	0,00	0,01	0,03	0,01	0,01	0,06	0,00	0,01	
LIN3	%	21,73	17,23	22,32	8,35	17,86	13,33	26,33	12,43	20,25	6,20	20,92	13,09	17,29
	z	8,15	-0,10	7,36	-10,34	1,02	-5,43	15,56	-8,04	4,76	-17,90	7,08	-7,26	
	RCI	0,04	0,00	0,03	0,07	0,00	0,02	0,15	0,04	0,01	0,20	0,03	0,03	

χ^2 на независност: N=42.105; $\chi^2=1.195,46$; df=22; $\alpha=0,01$; $p < \alpha$; $z_{crit.}=\pm 3,20$

Групи на аналити суспендирани во пред и после криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: експериментални-1 KM (E1-a-0, E1-b-0 / E1-a-3, E1-b-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-a-0, E2-b-0 / E-a-3, E2-b-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-a-0, E3-b-0 / E3-a-3, E3-b-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според праволиниски индекс на траекторија (LIN): LIN1 (0-30 %); LIN2 (31-50 %); LIN3 (51-100 %). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, $z_{crit.}$ – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Табела 20. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH) за аналити суспендирани со експериментални криопрезервациски медиуми пред и после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		E1-a-0	E1-a-3	E2-a-0	E2-a-3	E3-a-0	E3-a-3	E1-b-0	E1-b-3	E2-b-0	E2-b-3	E3-b-0	E3-b-3	Σ row %
Категории														
ALH1	%	7,19	6,93	7,20	4,68	6,48	5,03	6,84	5,24	6,36	3,52	7,62	4,84	6,13
	z	2,70	1,63	2,18	-2,24	0,84	-1,65	1,76	-2,08	0,52	-6,16	4,16	-3,13	
	RCI	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,01	
ALH2	%	53,37	54,78	56,93	69,21	74,97	76,78	48,15	59,60	47,81	71,35	54,62	70,33	60,30
	z	-8,59	-5,50	-3,35	6,77	16,99	12,16	-14,64	-0,81	-13,80	12,82	-7,77	11,92	
	RCI	0,02	0,01	0,00	0,01	0,08	0,04	0,06	0,00	0,05	0,04	0,02	0,04	
ALH3	%	39,44	38,30	35,87	26,11	18,55	18,20	45,01	35,16	45,83	25,13	37,76	24,84	33,57
	z	7,53	4,88	2,36	-5,87	-18,03	-11,76	14,27	1,90	14,03	-10,15	5,93	-10,76	
	RCI	0,03	0,01	0,00	0,02	0,15	0,07	0,09	0,00	0,09	0,05	0,02	0,05	

χ^2 на независност: N=31.786; $\chi^2=1.332,75$; df=22; $\alpha=0,01$; $p < \alpha$; $z_{crit.}=\pm 3,20$

Групи на аналити суспендирани во пред и после криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: експериментални-1 KM (E1-a-0, E1-b-0 / E1-a-3, E1-b-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-a-0, E2-b-0 / E-a-3, E2-b-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-a-0, E3-b-0 / E3-a-3, E3-b-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според амплитуда на латерално застранување од просечна траекторија (ALH): ALH1 (0-6 μm); ALH2 (7-12 μm); ALH3 (13-30 μm). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, $z_{crit.}$ – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

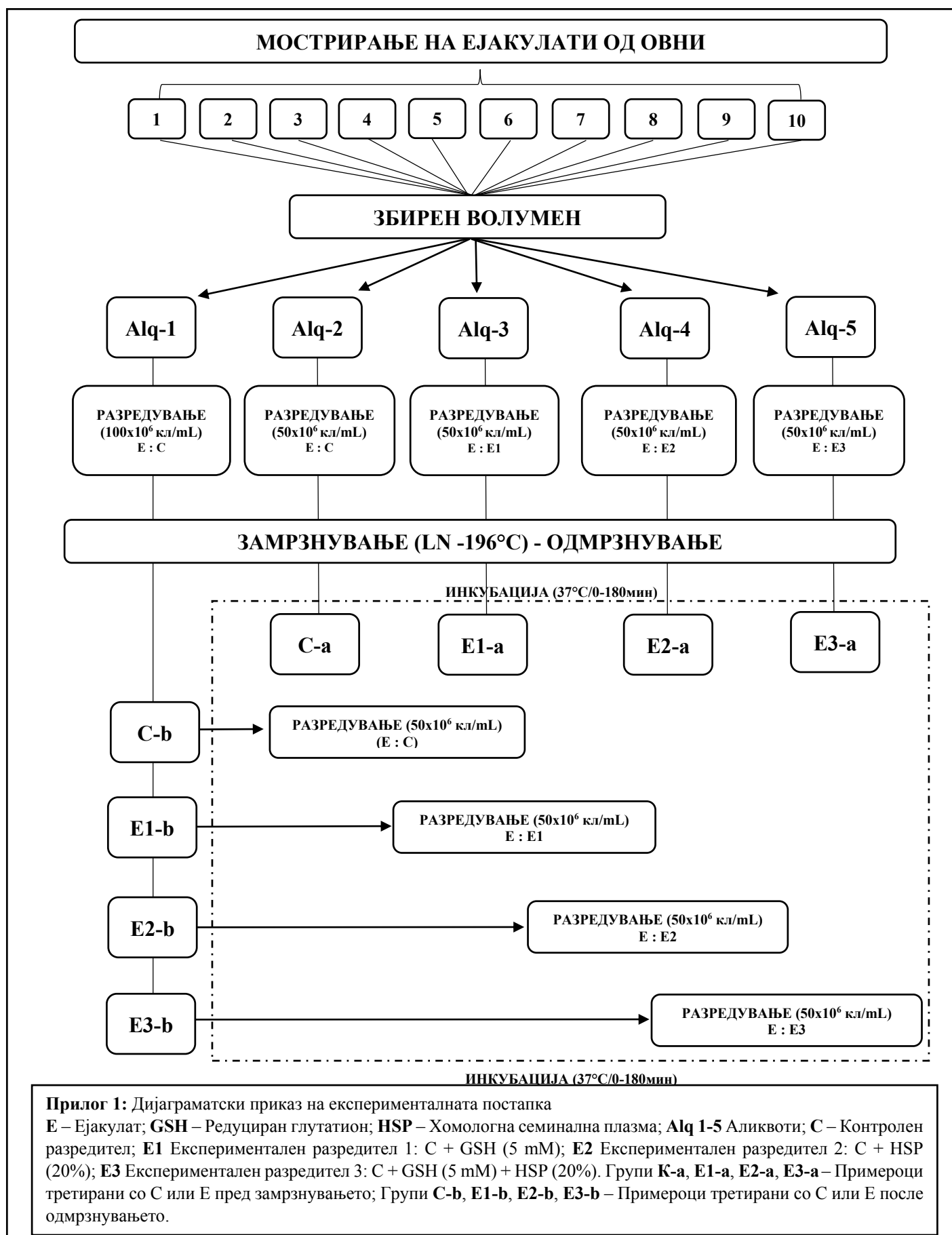
Табела 21. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според мотилна брзина (VEL) за аналити суспендирани со експериментални криопрезервациски медиуми пред и после криотретман, мострирани на 0- и 3-часа инкубација

Групи		E1-a-0	E1-a-3	E2-a-0	E2-a-3	E3-a-0	E3-a-3	E1-b-0	E1-b-3	E2-b-0	E2-b-3	E3-b-0	E3-b-3	Σ row %
Категории														
VEL1	%	43,77	31,58	29,97	17,53	38,79	16,80	36,43	33,40	32,22	33,85	45,24	34,76	33,14
	z	20,69	-3,05	-6,17	-30,29	11,17	-31,86	7,05	0,55	-1,95	1,49	25,73	3,50	
	RCI	0,04	0,00	0,00	0,08	0,01	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	
VEL2	%	9,49	14,75	6,84	6,26	11,94	15,61	5,11	5,27	6,45	3,66	5,70	6,57	7,93
	z	5,31	23,17	-3,68	-5,64	13,83	26,09	-10,52	-9,91	-5,41	-15,78	-8,27	-5,09	
	RCI	0,00	0,06	0,00	0,00	0,02	0,08	0,01	0,01	0,00	0,03	0,01	0,00	
VEL3	%	13,28	17,78	17,84	21,02	19,16	12,77	9,55	6,85	12,52	7,81	10,27	8,33	12,77
	z	1,39	13,75	13,90	22,55	17,83	-0,02	-9,76	-17,88	-0,77	-14,87	-7,49	-13,53	
	RCI	0,00	0,02	0,02	0,06	0,04	0,00	0,01	0,04	0,00	0,02	0,01	0,02	
VEL4	%	33,46	35,89	45,35	55,20	30,10	54,82	48,90	54,48	48,81	54,68	38,79	50,33	46,16
	z	-23,34	-18,88	-1,49	16,56	-29,98	15,95	5,57	16,82	5,29	17,10	-14,80	8,52	
	RCI	0,04	0,03	0,00	0,02	0,06	0,02	0,00	0,02	0,00	0,02	0,02	0,01	

χ^2 на независност: N=101.826; $\chi^2=7.037,72$; df=33; $\alpha=0,001$; $p < \alpha$; $z_{crit.}=\pm 3,28$

Групи на аналити суспендирани во пред и после криопрезервацискиот период, според типот на криопрезервацискиот медиум (KM) и инкубационото време на мострирање: експериментални-1 KM (E1-a-0, E1-b-0 / E1-a-3, E1-b-3) контролен KM со GSH (5 mM); експериментални-2 (E2-a-0, E2-b-0 / E-a-3, E2-b-3) контролни KM со HSP (20 %); експериментални-3 (E3-a-0, E3-b-0 / E3-a-3, E3-b-3) контролен KM со GSH (5 mM) и HSP (20 %), каде GSH е редуциран глутатион, а HSP е хомологна семинална плазма. Категории на сперматозоиди според мотилна брзина (VEL): VEL1 ($\geq 75,0 \mu\text{m/s}$); VEL2 (30,0-74,9 $\mu\text{m/s}$); VEL3 (0,1-21,9 $\mu\text{m/s}$), VEL4 ($< 0,1 \mu\text{m/s}$). N – вкупен број на сперматозоиди анализирани во χ^2 тест на независност; χ^2 – вредност од χ^2 тест на независност, α – гранична вредност за индекс на веројатност за χ^2 вредност, z – прилагодена вредност на резидуал, $z_{crit.}$ – гранична вредност за z, RCI – релативен индекс на придонес; df – степени на слобода.

Х. ПРИЛОЗИ И СЛИКИ



Прилог 2. Дозволена вредност за разликата помеѓу две последователни мерења во хемоцитометар, базирано врз интервал на доверба од 95% (превземено до WHO, 2010)

N_1+N_2	Дозволена разлика	N_1+N_2	Дозволена разлика
144 - 156	24	329 - 346	36
157 - 169	25	347 - 366	37
170 - 182	26	367 - 385	38
183 - 196	27	386 - 406	39
197 - 211	28	407 - 426	40
212 - 226	29	427 - 448	41
227 - 242	30	449 - 470	42
243 - 258	31	471 - 492	43
259 - 274	32	493 - 515	44
275 - 292	33	516 - 538	45
293 - 309	34	539 - 562	46
310 - 328	35	563 - 587	47

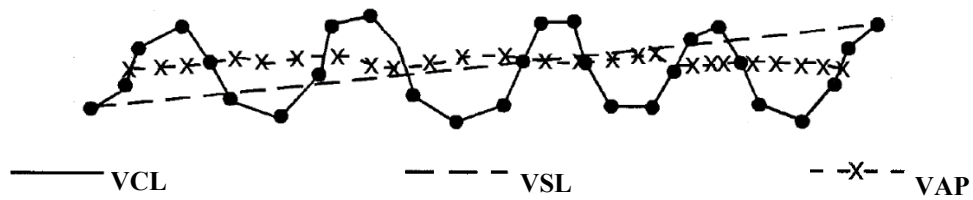
Прилог 3. Средна вредност на GSH во сперматозоиди кај различни видови на цицачи

Животински вид	Концентрација на GSH	Извор од научна литература
Овен	$0,45 \pm 1,4 \text{ nmol}/10^9$ клетки	Li, 1975
Бик	$2,93 \text{ nmol}/10^8$ клетки	Agrawal и Vanha-Perttula, 1988
Нерез	$0,03 \text{ nmol}/10^8$ клетки	Li, 1975
Куче	$0,53 \pm 0,11 \text{ nmol}/10^8$ клетки	Li, 1975
Глушец	$90 \text{ nmol}/10^8$ клетки	Alvarez и Storey, 1989
Зајак	$0,01 \text{ nmol}/10^8$ клетки	Li, 1975
Човек	$0,53 \pm 0,22 \text{ nmol}/10^9$ клетки	Li, 1975
	$6,7 \pm 0,4 \text{ nmol}/10^8$ клетки	Alvarez и Storey, 1989
	$6.2 \pm 0.6 \text{ nmol}/10^8$ клетки	Griveau и соp., 1995
	$3.49 \pm 0.87 \text{ nmol}/10^8$ клетки	Ochsendorf и соp., 1998

Прилог 4. Средна вредност на GSH во семинална плазма кај различни видови на цицачи

Животински вид	Концентрација на GSH	Извор од научна литература
Пастув	$77,27 \pm 48,00 \text{ mg}/100 \text{ ml}$	Strzezek и соp., 1999
Бик	13 - 19 μM	Agrawal и Vanha-Perttula, 1988
Нерез	$185,8 \pm 46,7 \mu\text{M}$	Strzezek и соp., 1999
Човек	0,5 - 2,0 μM	Li, 1975
	$0,19 \pm 0,11 \mu\text{M}$	Daunter и соp., 1989
	0,2 - 1,4 μM	Ochsendorf и соp., 1998

Слика 1. Криволиниска (VCL), праволиниска (VSL) и просечна траекторија (VAP) на сперматозоид (превземено од Mortimer, 1997)



Должината на секоја од траекториите се изразува во единица должина/време (um/s).

Слика 2. Методи кои се користеле за изведување на амплитудата на латерално застранување од просечната траекторија на сперматозоидот (ALH) (превземено од Mortimer, 1997)

а-Метод на средна точка



б-Метод на перпендикуларно растојание



с-Перпендикуларен геометриски метод



д-Метод на CASA софтверски алгоритми



—●— VCL
- - - VSL
- -x- - VAP

Првите три методи (а, б и с) се користеле за математичко пресметување на ALH, додека последниот е применуван во CASA софтверските алгоритми