



ЛЕСОТЕХНИЧЕСКИ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛТЕТ „ВЕТЕРИНАРНА МЕДИЦИНА“
Катедра „Хирургия, рентгенология, акушерство
и гинекология“



ЦВЕТА БОГОМИЛОВА ГЕОРГИЕВА

**ПРОУЧВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА РАСТИТЕЛНИ ЕКСТРАКТИ
ВЪРХУ СЕМЕННА ТЕЧНОСТ ОТ КОЧОВЕ, ПРИЛОЖЕНИ
В СЪСТАВА НА СПЕРМОРАЗРЕДИТЕЛЯ**

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на образователна
и научна степен „доктор“

Област на висше образование: 6. Аграрни науки и ветеринарна медицина

Професионално направление: 6.4. Ветеринарна медицина

Научна специалност: „Акушерство и гинекология на животните и болести на
новородени животни“

Научен ръководител: доц. д-р Калин Христов

София, 2025

Дисертационният труд съдържа 169 страници, включително 6 таблици и 22 фигури, оформени в увод, литературен обзор, цел и задачи, материал и методи, резултати, обсъждане, изводи, приноси, препоръки за практиката, научни публикации, свързани с дисертационния труд и установени цитирания, както и литературен указател, състоящ се от 348 заглавия, от които 16 на кирилица и 332 на латиница.

Защитата на дисертационния труд ще се проведе на 03.07.2025 г. от 10.30 ч. в зала „Акад. Мако Даков“ в сграда А на Лесотехническия университет, гр. София, бул. „Климент Охридски“ № 10 на открито заседание на Научно жури утвърдено със заповед № ЗПС-248/05.05.2025 г. в състав:

Председател: доц. д-р Надя Златева-Панайотова

Членове: проф. д-р Пламен Георгиев – рецензент
доц. д-р Иван Фасулков – рецензент
доц. Анатоли Атанасов
проф. д-р Красимира Генова

Материалите по защитата (дисертационен труд, автореферат, рецензии и становища на научното жури) са на разположение в Деканата на ФВМ, гр. София, бул. „Климент Охридски“ № 10 и са публикувани на сайта на Лесотехническия университет (www.ltu.bg).

I. ВЪВЕДЕНИЕ

Изкуственото осеменяване при домашните и селскостопанските животни от години се налага в практиката на ветеринарния лекар, особено когато говорим за интензивно животновъдство. С еякулат с високи биологични качества, от един разплодник могат да бъдат осеменени много женски животни. Освен това еякулатът може да бъде съхраняван за неопределено дълго време при ултраниска температура, дори и след смъртта на разплодника. Контролът на половопредаваните инфекции позволява елиминиране на някои икономически важни заболявания от животновъдната практика, такива, които биха били потенциално опасни и за човек.

Сперморазредителите се утвърждават като основен консуматив за изкуствено осеменяване още в самото начало на осеменителната практика. Изпробват се непрестанно нови комбинации от соли разтвори, различни въглехидратни източници и антимикробни агенти. В последното десетилетие в медицината и репродукцията навлиза употребата на природни съставки като неантибиотични стимулатори на растежа, фитобиотици, влияещи негативно върху растежа на патогенни бактерии. Метаболитите на растенията, микро- и макроелементите, които се съдържат в тях, витамините и провитамините имат висок антиоксидантен капацитет и могат да потенцират действието на ензимните системи на организма за неутрализация на свободните радикали, да бъдат катализатори в реакцията на удвояване на свободни електрони или директно да улавят несдвоени електрони. Фитобиотиците могат да бъдат и пребиотици, доставяйки необходими за жизнената функция на някои полезни бактерии субстрати. Добавянето на високоефективни антиоксидантни съставки в утвърдени вече рецепти сперморазредители е широкозастъпена тенденция в последните 10 години. Едни автори препоръчват растителни екстракти, водорасли и техни производни, други утвърждават рецепти на сперморазредители, като добавят към тях продукти от жизнения цикъл на някои насекоми, най-често пчели, трети експериментират със синтетични форми на витамин Е и витамин А. Въпреки напредъка в разработването на сперморазредители и прилаганите технологии за съхранение на семенен материал, все още съществуват редица предизвикателства, свързани със запазване на високата оплодителна способност на сперматозоидите при краткосрочно и дъл-

госрочно съхранение. Най-голямата пречка е оксидативният стрес, възникващ в резултат на повишената концентрация на реактивни форми на кислорода (ROS) по време на съхранението.

С оглед на нарастващата резистентност на микроорганизмите към конвенционалните антибиотици, както и тенденцията за ограничаване на употребата на синтетични добавки, включително в репродуктивните технологии, интересът към природни антиоксиданти и фитобиотици нараства. Те могат да действат синергично с компонентите на сперморазредителите, осигурявайки по-добра протекция на сперматозоидите при съхранение.

Настоящото изследване е провокирано от необходимостта за прилагане на устойчиви и биологично съобразни решения при съхранение на семенна течност от коч, като включването на екстракти от типично български лечебни растения има потенциал да съчетае традиционни познания с модерни биотехнологични подходи. Нашето проучване е ориентирано към изследване на различни екстракти от лечебни растения, добавени към сперморазредител за семенна течност от кочове. Чрез проследяване на определени параметри при краткотрайно съхранение на семенната течност, оценяваме антиоксидантния им потенциал.

II. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

ЦЕЛ

Да се оцени и сравни антиоксидантният ефект на пет растителни екстракти, включени в състава на сперморазредител 6А, чрез анализ на кинематични и биохимични показатели в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност от коч.

ЗАДАЧИ

За осъществяването на поставената цел конкретизирахме и разработихме следните **задачи**:

1. Определяне на антиоксидантната активност на растителни екстракти от кръвен здравец (*Geranium sanguineum*), див пелин (*Artemisia annua*), бабини зъби (*Tribulus terrestris*), цикория (*Cichorium intybus*) и смрадлика (*Cotinus coggygria*).
2. Изследване ефекта на добавените растителни екстракти, приложени в сперморазредителя, върху основните кинематични и морфологични показатели на сперматозодите в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност от коч.
3. Изследване ефекта на добавените растителни екстракти, приложени в сперморазредителите, върху антиоксидантната защита на семенната течност чрез определяне концентрацията на неензимния антиоксидант глутатион (GSH) в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност от коч.
4. Изследване ефекта на добавените растителни екстракти, приложени в сперморазредителя, върху антиоксидантната защита на семенната течност чрез определяне концентрацията на нивата на липидна пероксидация (LPO) в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност от коч.
5. Изследване ефекта на добавените растителни екстракти в сперморазредителя върху активността на ензимите лактат дехидрогеназа (LDH), алкална фосфатаза (ALP), аланинаминотрансфераза (ALAT), аспартатаминотрансфераза (ASAT), гама-глутамилтрансфераза (GGT) в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност от коч.

III. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

1. Използвани животни и условия на отглеждане

Изследването беше проведено с участието на 6 клинично здрави коча с нормално развити полови органи, които бяха подбрани и изравнени по възраст (1,5 – 2-годишни мъжки разплодници) и телесно състояние, с телесна маса в диапазона 80 – 90 kg, с цел осигуряване на еднородност на групата. Две от животните бяха от породата „Ил дьо Франс“ и четири от породата „Синтетична популация Българска млечна“. Отглеждаха се в животновъден обект, собственост на Института по животновъдни науки – Костинброд. Кочовете бяха отглеждани при стандартни за породата и производствената система условия, с контролирано хранене, обгрижване и полова експлоатация, в съответствие с нормативните изисквания за хуманно отношение и репродуктивно здраве при разплодници.

Определянето на общото здравословно състояние на животните беше извършено по утвърден план за изследване, включващо: измерване на вътрешна телесна температура, пулс, брой дихателни движения в минута, инспекция на конюнктиви, лимфни възли. Животните бяха подложени на редовна профилактика, включваща ваксинации и обезпаразитяване, с цел осигуряване на тяхното здравословно състояние. **Андрологично изследване** беше проведено по общоприетия план, включващ: инспекция и палпация на скротална торба, семенници, надсеменници, пенис и препуциум. Животни с отклонения в общото здравословно състояние и нормалните параметри на изследваните части от половия апарат бяха изключени от експеримента.

Климатични условия. Получаването на пробите беше извършено през месец юли. Климатичните условия през този период се характеризират с високи дневни температури (около и над 30°C), което създава предпоставки за топлинен стрес. За минимизиране на неблагоприятните ефекти върху репродуктивната функция, животните бяха отглеждани в помещения с добра вентилация и осигурен достъп до открити сенчести площи.

Хранене и режим на полово натоварване. През осеменителната кампания кочовете бяха получавали целево балансирана дажба, съобразена с физиологичните им нужди през репродуктивния период – фуражи с повишено съдържание на протеин, допълнително добавени

витамин А и минерали под формата на минерално-витаминни блокчета, подходящи за кочове, както и за други дребни преживни животни. Минерално-витаминните блокчета обикновено са част от програми за допълнително подхранване, особено при интензивно използвани разплодници или в периоди на дефицит с доказано положително влияние върху сперматогенезата, либидото и цялостното репродуктивно представяне на мъжките животни. В хода на кампанията кочовете бяха допускани до естествено покриване на еструсни овце веднъж в рамките на сезона. Тази практика имаше за цел поддържане на физиологично активното полово поведение (*libido sexualis*) и създаване на естествена стимулация за поддържане на репродуктивния потенциал.

2. Получаване на семенна течност

Получаването на еякулатите беше извършено по метода на изкуствената вагина, широко утвърден при дребни преживни животни поради минималната травматичност и възможността за получаване на сперма с високо качество. Кочовете бяха предварително обучени за работа с изкуствена вагина, като процедурата включваше стимулиране чрез женски животни в еструс. По време на получаването мъжките животни бяха обезопасени с препуционални престилки, предотвратяващи контаминация на еякулатите и осигуряващи хигиенна чистота на пробите. Получени бяха шест първи еякулати от шестте коча, като предходните два дни животните са имали полова почивка.

Всички етапи на получаване и първична обработка на семенната течност бяха проведени при стриктно спазване на санитарно-хигиенните изисквания за работа със семенен материал. Използваха се индивидуални стерилни съдове и консумативи за всяко животно, като пробите бяха етикирани и съхранявани при контролирана температура от 37°C до провеждане на лабораторните анализи.

3. Разреждане и подготовка на семенните проби. Разпределение на опитните групи

След събирането, получените еякулати бяха подложени на стандартна оценка, която включваше макроскопски и микроскопски параметри. Бяха определени обемът, гъстотата, цветът и консистенцията на еякулата. Шестте еякулата бяха със сходен обем, който измерихме

по скалата на градуирания спермосъбирателен съд, с цвят и консистенция, референтна за вида. За стандартизиране на пробите беше извършено първоначално разреждане в съотношение 1:3 с кристалоиден сперморазредител 6А. Разредителят съдържаеше 100.0 cm³ дестилирана вода, 2.8 g натриев цитрат, 0.4 g захароза и 0.4 g лактоза, което осигури оптимална среда за стабилизиране на сперматозоидите. На temperирано микроскопско стъкло (37°C) поставихме по една капка – 0.05 ml от семенния материал, поставихме покривно стъкло и оценихме еякулата чрез изследване с микроскоп, снабден с микротермостат на масичката, за да поддържа оптималната температура по време на стандартната оценка. Шестте еякулата бяха със сходни параметри (концентрация >2.5×10⁹ сперматозоиди/ml, прогресивна подвижност >70%), и бяха включени в по-нататъшната обработка. След първичното разреждане еякулатите бяха транспортирани до лабораторията при контролирана температура (37°C). В лабораторни условия пробите бяха подложени на допълнително разреждане до 1:12, за да се уеднакви концентрацията на сперматозоиди и да се минимизират индивидуалните вариации между отделните еякулати.

Всеки разреден еякулат беше разделен на 6 части. Едната част беше определена за контролна група, съдържаща само сперморазредител 6А. По този начин отделихме 6 контролни проби (по една от всеки коч). Към останалите 5 части от разредената семенна течност от всеки коч добавихме различен растителен екстракт: кръвен здравец (*Geranium sanguineum*), див пелин (*Artemisia annua*), бабини зъби (*Tribulus terrestris*), цикория (*Cichorium intybus*) и смрадлика (*Cotinus coggygria*). По този начин за всеки коч получихме 5 опитни проби с екстракти, а общо опитните проби бяха 30 (5 проби × 6 коча). Общият брой проби беше 36 (6 контролни + 30 опитни).

Всяка от тези 36 проби беше изследвана в 4 различни опитни постановки:

- изследване на кинематичните и морфологичните параметри на сперматозоидите чрез CASA система;
- определяне на нивата на неензимния антиоксидант глутатион;
- измерване на нивата на липидна пероксидация;
- определяне на нивата на 5 ензима в семенната плазма. В резултат за последната опитна постановка бяха извършени общо 180 измествания (36 проби × 5 ензима).

Всички проби бяха изследвани в деня на получаване (свежа-разредена семенна течност) и след 24 часа при 4°C, в хладилни условия (охладена-съхранена семенна течност).

4. Изследвани екстракти от лечебни растения

Алкохолната екстракция е един от най-често използваните методи за извличане на биологично активни вещества от растителни суровини. Методът се основава на способността на етиловия алкохол (етанол) да разтваря широк спектър от полярни и неполярни съединения, включително полифеноли, флавоноиди, алкалоиди, терпеноиди и други метаболити с доказан антиоксидантен, антимикробен и протективен ефект. Процесът на екстракция включва мацерация или перколация на изсушената и фино смляна растителна маса с водно-алкохолен разтвор с определена концентрация на етанол (обикновено в диапазона 50 – 80%). Алкохолът прониква в растителните тъкани, разтваря целевите биологично активни съединения и ги извежда в екстракта. Получените сурови екстракти впоследствие могат да бъдат изсушени до сухо вещество или допълнително пречистени в зависимост от приложението им.

Предимствата на алкохолната екстракция включват висока ефективност при извличане на биоактивни вещества, стабилност на получените екстракти и широк спектър на приложение. Методът е широко използван при получаване на екстракти за фармацевтичната, козметичната и хранителната индустрия, както и в научни изследвания с цел изследване на антиоксидантни и протективни свойства на растителни продукти. Използваните екстракти са от *Geranium sanguineum*, *Artemisia annua*, *Tribulus terrestris*, *Cichorium intybus* и *Cotinus coggygria*, като типични представители на българската флора. За гарантиране на качеството на крайния продукт, при добива и преработката са спазени изискванията на БДС EN ISO 22000:2018 и свързаните с него национални и европейски стандарти, регламентиращи добрите производствени практики при работа с растителни суровини, предназначени за научни цели, хранителната индустрия и фуражните добавки.

5. *In vitro* методи за изследване на антиоксидантната активност на растителните екстракти като самостоятелна франкция

- ◆ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazylradical (DPPH) анализ за отстраняване на радикали. Измерването на DPPH активността на отстраняване на радикали се извършва по метода на Brand-Williams (1995). Принцип на метода: тестваните вещества в различни концентрации реагират със стабилния разтвор на DPPH в метанол. Намалването на DPPH• до DPPHH води до промени в цвета (от наситено виолетово до светложълто), което се отчита при 517 nm след 30 минути инкубиране при стайна температура. Смес от метанол и проба служи като празна проба, а смес от разтвор на метанол и DPPH радикал служи като контрола. Процентът на прочистваща активност (AA%) се определя, както следва: $AA\% = 100 - [(Abs(проба) - Abs(празно) \times 100) / Abs(контрола)]$.
- ◆ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) анализ по метода на Re et al.(1999), базиран на инхибирането на ABTS (2,2'-азино-бис (3-етилбензтиазолин-6-сулфонова киселина)) окисление до катионен радикал (ABTS•+) от антиоксидант, при абсорбция 743 nm. За стандарт се използва Trolox и резултатите се изразяват като TEAC% (Trolox equivalent antioxidant capacity).
- ◆ Тест за намаляване на антиоксидантната сила на желязо – Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP), по метода на Benzie and Strain, 1996 с някои модификации. Абсорбцията се измерва при дължина на вълната 593 nm. За стандарт се използва $FeSO_4$ и резултатът се представя като $\mu M FeSO_4$ equivalent/1g extract.
- ◆ Тест за намаляване на антиоксидантния капацитет (CUPric Reducing Antioxidant Capacity) – CUPRAC по метода на Aрак et al. (2004) с някои модификации. Методът се основава на реакцията на Cu(II)-неокупроинов комплекс (CUPRAC реактив, Cu(II)-Nc) с антиоксидант, което води до жълто-оранжев продукт, Cu(I)-неокупроинов хелатен комплекс и абсорбционен максимум при 450 nm. За стандартната крива се използва Trolox в различни концентрации, вариращи в диапазона от 0.1 mM до 1.0 mM и резултатите се изразяват като CUPRAC [μM Trolox)/g екстракт].

6. Спермален анализ на получените проби

Подвижността и кинетичните параметри на сперматозоидите се анализираха чрез компютърен-спермоанализатор SCA (Microptic System, Spain), като се използваша настройките на софтуера, препоръчани от производителя, за анализ на семенен материал от съответния животински вид.

6.1. Определяне на мотилитета:

- Обща подвижност (TM, %)
- Прогресивна подвижни (PM, %)
- Непрогресивно движение (NPM, %)
- Неподвижни сперматозоиди (Immotile, %).

6.2. Определяне на кинематичните (скоростни) параметри на сперматозоидите:

- бързоподвижни сперматозоиди (Rapid, %);
- умереноподвижни (Medium, %);
- бавноподвижни сперматозоиди (Slow, %);
- криволинейна скорост (VCL, $\mu\text{m.s}^{-1}$) – средната скорост на движение на сперматозоида по неговата действителна траектория;
- средна скорост на пътя (VAP, $\mu\text{m.s}^{-1}$) – средната скорост на движение на сперматозоида по средната му траектория;
- праволинейна скорост (VSL, $\mu\text{m.s}^{-1}$) – средната скорост на движение на сперматозоида по права линия от първата до последната му позиция;
- индекс на праволинейност (STR, %) – праволинейност на средно изминато разстояние между т. А и т. Б (VSL/VAP);
- Индекс на линейност (LIN, %) – линейност на реалната траектория на пътя;
- индекс на осцилация (WOB, %) – степен на осцилация на реалната траектория на сперматозоида (VSL/VCL);
- амплитуда на странично изместване на главата (AHL, $\mu\text{m.s}^{-1}$) – дефинирана като два пъти максималното изместване на главата на сперматозоида от неговата монтирана подвижна ос в сегмент на следата;

- честота на биене (BCF, Hz) – дефинирана като честота, с която главата на сперматозоида се движи през средната равнина на „изправената“ траектория.

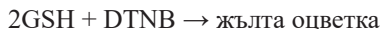
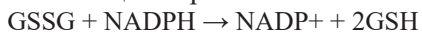
6.3 Морфологично изследване на сперматозоидите

То бе проведено чрез компютърен спермоанализатор Microptic Systms (Spain) и отчетено със софтуера на SCA, Morphology. За провеждане на изследването се подготвят натривки, оцветени по протокол:

- фиксирани в етилов алкохол за 10 min;
- изсъхват на стайна температура;
- 0.5% Еозин за 5 min;
- промиване с dH_2O ;
- изсъхват на стайна температура;
- 0,5% Конгорот за 5 min;
- промиване с dH_2O ;
- изсъхват на стайна температура;
- 0.5% Генцианвиолет 3x3s;
- изсъхват на стайна температура.

7. Определяне на активността на тотален глутатион (GSH) по метода на Tietze

Определяне на общото количество глутатион, като в началото на опита се прави референтен стандарт. Реакцията се стартира с NADPH, който превръща окисления глутатион (GSSG) в редуциран (GSH) в присъствието на глутатион редуктаза. GSH взаимодейства с DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid), при което се получава цветно съединение с пик на поглъщане при 412 nm:



Начин на определяне: В кювета се накапва реакционна смес (общ $V = 1.5 \text{ ml}$), съдържаща 0.6 mM DTNB, 50 μl проба и 0.5 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ глутатион редуктаза в 100 mM калиево фосфатен буфер, към който се добавя 5 mM EDTA, pH 7.5, след което реакцията се стартира с NADPH. Получава се жълта оцветка. Интензивността на оцветяването е пропорционална на концентрацията на глутатиона. Количеството на глутатиона се изчислява спрямо референтната проба и се изразява в ng/брой сперматозоиди.

8. Определяне нивата на липидна пероксидация (LPO)

Липидната пероксидация на сперматозоидите се измерва чрез реакцията на тиобарбитуровата киселина (ТВА) с малонов диалдехид (MDA), краен продукт на липидната пероксидация (Hunter et al. 1963). Аликвотни части от сперматозоиди (1 ml) се нагряват при 100°C в продължение на 15 min след добавяне на 0.6 ml от смес, съдържаща 2.8% трихлороцетна киселина : 5N HCl : 2% тиобарбитурова киселина в 50 mM NaOH (2:1:2 v/v). Абсорбцията на получения цветен комплекс се отчита при $\lambda = 532 \text{ nm}$. Резултатите бяха изразени като nmoles MDA/10x10⁶ sp., използвайки коефициент на моларен екстинкция от $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

9. Определяне ензимната активност

Семенната течност беше центрофугирана на 3500 оборота за 15 минути чрез центрофуга Centrifuge 5424 R и по този начин сепарирахме семенната плазма от клетъчната компонента, която се утаи на дъното. Биохимичният анализ беше извършен чрез получаване автоматичен биохимичен анализатор Mindray BA-88A. За всеки ензим беше използван съответният реактив, като определено количество от семенната плазма беше смесван с препоръчаното количество реактив в отделна епендорфна епруветка и в последствие пробата беше подавана на машината.

♦ LDH (LDH-P) по DGKC метод : UV кинетичен метод

400 μl LDH FL R1 + 100 μl LDH FL R2 + 50 μl семенна плазма

Лактат дехидрогеназата (LDH) е ензим, състоящ се от пет различни изоензими, които катализират редукцията на пируват до L-лактат. Намалението на абсорбцията на NADH при 340 nm поради преобразуването му в NAD⁺ е пряко пропорционално на активността на LDH в пробата.

♦ ALP: UV кинетичен метод

400 μl ALP DGKC R1 + 100 μl DGKC R2 + 10 μl семенна плазма

Алкалната фосфатаза присъства практически в почти всички телесни тъкани и е ензим, извършващ ортофосфорна моноестерна фосфохидролаза, хидролизира 4-NPP, освобождавайки 4-NP. Скорост на образуване може да бъде измерена спектрофотометрично при 405 nm, за да се определи количествено активността на ALP в пробата.

◆ AST: UV кинетичен метод

400 µl GOT R1+ 100 µl GOT R2 + 50 µl семенна плазма

Ензимът аспартат аминотрансфераза (ASAT, AST) катализира трансаминирането между L-аспартат и алфа-кетоглутарат. Образуваният 2-оксалоацетат се редуцира до малат в присъствието на MDH. С протичането на реакцията NADH се окислява до NAD. Консумацията на NADH в единица време се наблюдава чрез измерване на намаляването на абсорбцията при 340 nm. Този метод е формулиран съгласно препоръките на IFCC (2002).

◆ ALAT: UV кинетичен метод

400 µl GPT R1+ 100 µl GPT R2 + 50 µl семенна плазма

Ензимът аланин аминотрансфераза (ALAT, ALT) катализира трансaminaзната реакция между L-аланин и 2-оксоглутарат. Образуваният пируват се редуцира до лактат в присъствието на LDH. С протичането на реакциите NADH се окислява до NAD. Изчезването на NADH за единица време е последвано от измерване на намаляването на абсорбцията при 340 nm.

◆ GGT: UV кинетичен метод

400 µl GAMMA GT FL R1+ 100 µl GAMMA GT FL R2 + 10 µl семенна плазма

Гама-глутамил трансферазата (γGT) катализира прехвърлянето на глутаминовата група от субстрат към глицилглицин. Този процес води до освобождаване на 5-амино-2-нитробензоат, който проявява пикова абсорбция при 405 nm. Увеличаването на абсорбцията при тази дължина на вълната е пряко свързано с активността на γGT.

10. Статистическа обработка на данните

За статистическата обработка на данните използвахме софтуерната програма SPSS 19.0, инструмент за анализ и манипулиране на данни в графична среда. Тази програма предлагаше опции за работа с различни статистически методи, които могат да отговорят на множество изследователски нужди в различни области като икономика, медицина и социология.

Описателна статистика (Descriptives). Беше използвана процедура за описателна статистика, която генерира обобщени резултати за различни променливи в една единна таблица. Тя включваше изчисле-

ния на стандартизирани стойности (z -оценки) и даваше възможност за сортиране на променливите по различни критерии. Резултатите от описателната статистика включваха: минимална стойност – най-ниската стойност на числена променлива; максимална стойност – най-високата стойност на числена променлива; средна стойност и стандартна грешка на средната стойност ($S.E. \text{ mean}$) – колко се отклонява средната стойност в различни извадки от същото разпределение. Това показва вариационността на средното число и се използва за сравнение с хипотетични стойности. Показател за достоверност (p стойност) – измерва точността на резултатите, като показва вероятността за грешка при отхвърляне на нулевата хипотеза.

Т-тестове за независими извадки (Independent-Samples T Test). При извършване на Т-тестове за независими извадки бяха сравнени средните стойности между две групи. Идеята е, че групите трябва да бъдат случайно разпределени, така че разликите в резултатите да се дължат единствено на изследвания фактор, а не на други влияния. Основният изход на теста е Significance (значимост), който показва вероятността от грешка при отхвърляне на нулевата хипотеза. Ако стойността на тази вероятност е малка, нулевата хипотеза може да бъде отхвърлена като невярна.

Проверка на хипотезата и доверителен интервал. Резултатите от проверката на нулевата хипотеза зависят от зададения доверителен интервал (Confidence Interval), който по подразбиране е 95%. Това означава, че допустимата вероятност за грешка е 5%. Ако стойността на вероятността за грешка е под 0.05, нулевата хипотеза може да бъде отхвърлена.

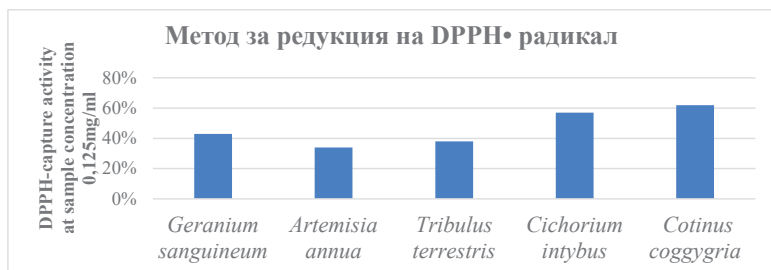
Тест за равенство на дисперсиите (Levene's Test). Използвахме теста на Левин за проверка на равенството на дисперсиите между групите. Тестът на Левин проверява дали дисперсиите на данните в различните групи са еднакви. Ако стойността на теста е под 0.05, това означава, че разликата между дисперсиите е статистически значима и нулевата хипотеза за равенство на дисперсиите може да бъде отхвърлена.

IV. РЕЗУЛТАТИ

1. *In vitro* определяне на антиоксидантната активност на екстракти от лечебните растения кръвен здравец (*Geranium sanguineum*), див пелин (*Artemisia annua*), бабини зъби (*Tribulus terrestris*), цикория (*Cichorium intybus*) и смрадлика (*Cotinus coggygia*)

За да бъде определена *in vitro* антиоксидантната активност, всички екстракти бяха разтворени в дестилирана вода и тествани по четирите метода с една и съща начална концентрация – 1 mg/1 ml дестилирана вода.

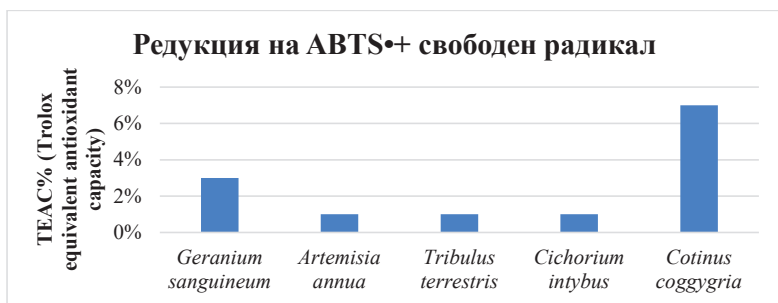
На Фиг. 2 са представени резултатите за установаване на антиоксидантна активност на петте екстракта от лечебни растения на база редукция на DPPH• радикал.



Фиг. 2. Метод за редукция на DPPH• радикал

По този метод най-висока антиоксидантна активност демонстрира екстрактът от смрадлика (*Cotinus coggygia*) с 62%, следван от цикория (*Cichorium intybus*) с 57%, кръвен здравец (*Geranium sanguineum*) с 43%, бабини зъби (*Tribulus terrestris*) с 38% и див пелин (*Artemisia annua*) с 34%.

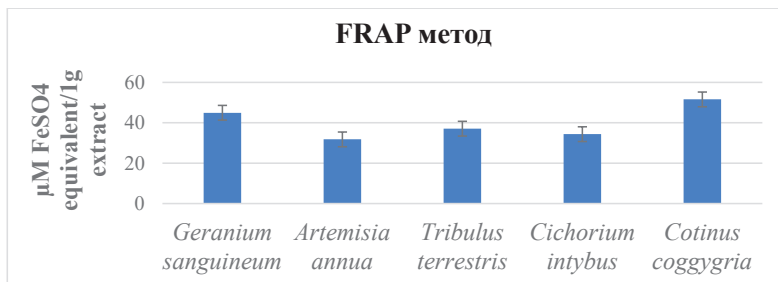
На Фиг. 3 са представени резултатите от втория метод за установаване на антиоксидантна активност на петте екстракта от лечебни растения на база способност за редукция на ABTS•+ свободен радикал.



Фиг. 3. Способност за редукция на ABTS•+ свободен радикал

Резултатите на Фиг. 3 са изразени спрямо TEAC % (Trolox еквивалентен антиоксидантен капацитет вит. Е). Най-висока е антиоксидантната активност на екстракта от смрадлика (*Cotinus coggygia*) с 6.845%, последван от екстракта от кръвен здравец (*Geranium sanguineum*) с активност 3.108%, следван от цикория (*Cichorium intybus*) с активност 0.975%, див пелин (*Artemisia annua*) – 0.667%, последно място заема (*Tribulus terrestris*) – 0.549%.

На Фиг. 4 са представени резултатите от третия метод за установяване на антиоксидантна активност на петте екстракта от лечебни растения чрез радикал редукция на тривалентно желязо по метода FRAP.

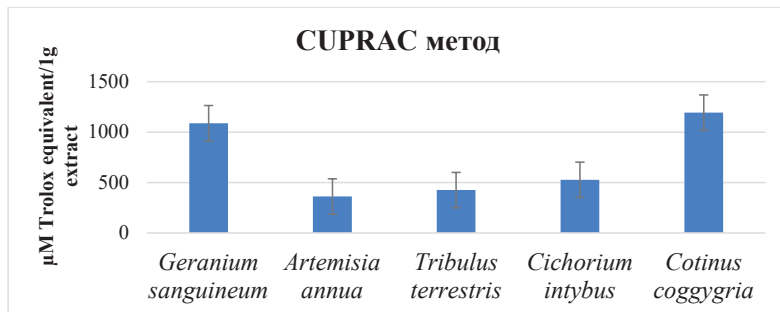


Фиг. 4. Радикал редукция на тривалентно желязо по метода FRAP

Резултатите, изразени като μM FeSO₄ еквивалент на 1 g екстракт, показват най-висока антиоксидантна активност при екстракт от смрадлика (*Cotinus coggygia*) ($51.58 \pm 0.0057 \mu\text{M FeSO}_4$), следвани от екстракта от кръвен здравец (*Geranium sanguineum*) ($44.96 \pm 0.037 \mu\text{M FeSO}_4$), бабини зъби (*Tribulus terrestris*) ($37.08 \pm 0.015 \mu\text{M FeSO}_4$), цикория

(*Cichorium intybus*) ($34.37 \pm 0.028 \mu\text{M FeSO}_4$) и дивия пелин (*Artemisia annua*) ($31.78 \pm 0.018 \mu\text{M FeSO}_4$).

На Фиг. 5 са представени резултатите от последния метод за установяване на антиоксидантна активност на петте екстракта от лечебни растения – редуциране на куприйони (Cu^{2+}) до купройони (Cu^{1+}) по метода CUPRAC.



Фиг. 5. Редуциране на куприйони (Cu^{2+}) до купройони (Cu^{1+}) по метода CUPRAC

Резултатите, изразени като TEAC % (Trolox еквивалентен антиоксидантен капацитет спрямо витамин Е) показват, че екстрактът от смрадлика (*Cotinus coggygia*) има най-висока стойност – $1193.565 \pm 0.124 \mu\text{M}$ Trolox еквивалент/1 mg екстракт. След него се нареждат екстрактът от кръвен здравец (*Geranium sanguineum*) с активност $1088.83 \pm 0.317 \mu\text{M}$ Trolox еквивалент/1 mg екстракт, цикория (*Cichorium intybus*) със стойност $527.217 \pm 0.111 \mu\text{M}$ Trolox еквивалент/1 g екстракт, бабини зъби (*Tribulus terrestris*) с $425.217 \pm 0.076 \mu\text{M}$ Trolox еквивалент/1 g екстракт и див пелин (*Artemisia annua*) с $361.87 \pm 0.026 \mu\text{M}$ Trolox еквивалент/1 g екстракт.

2. Изследване на спермалните показатели при свеж еякулат и съхранен за 24 ч. при 4°C, разреден със сперморазредител 6А самостоятелно като контролна проба и с 6А + петте растителни екстракта, представени като пет различни опитни постановки

2.1. Определяне на мотилитета на сперматозоидите (TM%, PM%, NPM%, Imm%)

В Табл. 1 са представени средните стойности на процентно разпределение на сперматозоидите спрямо вида на подвижност.

Таблица 1. Процентно разпределение на сперматозоидите спрямо вида на подвижност

Опитни постановки – групи	Свежи еякулати X ± SE				Съхранени 24 ч. при 4°C X ± SE			
	TM %	PM %	NPM %	Imm %	TM %	PM %	NPM %	Imm %
6А	74.40 ±1.58	16.35 ±0.94	58.05 ±1.79	25.6 ±1.58	59.4 ±5.16	1.05 ±0.34	58.4 ±5.37	40.53 ±5.16
6А + <i>Geranium sanguineum</i>	84.40* ±2.47	20.93 ±3.32	63.49 ±2.87	15.59* ±2.59	75.21* ±1.9	4.35* ±1.08	70.85 ±2.77	24.79* ±1.9
6А + <i>Artemisia annua</i>	77.71 ±1.54	23.14* ±3.44	53.48 ±4.26	22.29 ±1.54	61.38 ±1.01	3.2 ±1.42	57.4 3±0.89	38.62 ±1.01
6А + <i>Tribulus terrestris</i>	78.38* ±2.37	23.14** ±0.63	55.22 ±2.53	21.68* ±2.41	67.06 ±2.13	1.99* ±0.11	65.06 ±2.21	32.99 ±2.15
6А + <i>Cichorium intybus</i>	88.74** ±1.87	42.01** ±2.91	46.72* ±1.83	11.27** ±1.87	76.11 ±3.92	11.33*** ±0.83	64.29 ±4.23	23.89* ±3.92
6А + <i>Cotinus coggygria</i>	79.68 ±4.55	8.58* ±1.73	68.60 ±3.2	22.82 ±2.72	42.39 ±4.83	0.37 ±0.16	42.02 ±4.95	57.61 ±4.83

(Стойностите в колоната се различават при * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$)

При свежа семенна течност се отчита повишена подвижност на сперматозоидите във всички опитни групи спрямо контролата. Дословно покачване се наблюдава при кръвен здравец (*Geranium sanguineum*), бабини зъби (*Tribulus terrestris*) и смрадлика (*Cichorium intybus*). По отношение на прогресивната подвижност, значимо по-високи стойности са отчетени при дивия пелин (*Artemisia annua*), бабини зъби (*Tribulus terrestris*) и цикория (*Cichorium intybus*). Смрадликата (*Cotinus coggygria*) показва отрицателен ефект върху този параметър.

2.2. Определяне на кинематичните (скоростните) параметри (Rapid%, Medium%, Slow%, VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB), както и на амплитуда на странично изместване на главата (AHL, $\mu\text{m.s}^{-1}$) и честотата на биене (BCF, Hz) на сперматозоидите

Таблица 2. Процентно разпределение на сперматозоидите спрямо тяхната скорост

Опитни постановки – групи	Свежи еякулати X $\pm$ SE			Съхранени 24 ч. при 4°C X $\pm$ SE		
	Rapid %	Medium %	Slow %	Rapid %	Medium %	Slow %
6A	11.81 ± 1.61	16.25 ± 2.08	46.34 ± 3.39	1.07 ± 0.63	4.77 ± 1.02	53.64 ± 4.57
6A + <i>Geranium Sanguineum</i>	13.18 ± 1.59	18.55 ± 0.88	52.54 ± 2.89	5.14* ± 1.11	14.72* ± 1.32	55.35 ± 2.93
6A + <i>Artemisia annua</i>	12.08 ± 1.6	15.19 ± 4.32	50.44 ± 6.85	4.13 ± 1.15	6.92 ± 1.4	50.34 ± 1.26
6A + <i>Tribulus terrestris</i>	12.32 ± 1.56	19.66 ± 1.71	46.33 ± 2.02	5.09* ± 1.08	15.26* ± 1.87	46.64 ± 2.75
6A + <i>Cichorium intybus</i>	25.23* ± 4.71	25.48 ± 3.4	38.03 ± 3.9	6.76*** ± 0.49	18.91** ± 2.08	50.19 ± 3.93
6A + <i>Cotinus coggygia</i>	5.11 ± 1.20	15.68 ± 1.46	58.89* ± 2.31	0.28 ± 0.12	1.09 ± 0.41	41.02 ± 5.13

(Стойностите в колоната се различават при * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$)

Добавянето на екстракт от цикория (*Cichorium intybus*) води до най-значимо покачване на бързодвижещите се сперматозоиди (Rapid %) както в свежите проби – $25.23 \pm 4.71\%$ ($p \leq 0.05$), така и след 24-часово съхранение $6.76 \pm 0.49\%$ ($p \leq 0.001$) спрямо контролната група. При приложение на екстракт от кръвен здравец (*Geranium sanguineum*), див пелин (*Artemisia annua*) и бабини зъби (*Tribulus terrestris*) се отчита умерено, но положително повишение на бързодвижещите се сперматозоиди. Само при използването на смрадлика (*Cotinus coggygia*) се наблюдава значително понижение както при свежи (5.11 ± 1.20), така и при съхранени еякулати (0.28 ± 0.12). При групата с *Cichorium intybus* се установява още увеличение на сперматозоидите със средна скорост (Medium %) и намаление на бавнодвижещите се (Slow %), което допъл-

нително подчертава благоприятния ефект на този растителен екстракт върху качеството на сперматозоидите.

Таблица 3. Процентно разпределение на сперматозоидите спрямо скоростните параметри (VCL $\mu\text{m.s}^{-1}$, VSL $\mu\text{m.s}^{-1}$, VAP $\mu\text{m.s}^{-1}$)

Опитни постановки - групи	Свежи еякулати X $\pm$ SE			Съхранени 24 ч. при 4°C X $\pm$ SE		
	VCL $\mu\text{m/s}$	VSL $\mu\text{m/s}$	VAP $\mu\text{m/s}$	VCL $\mu\text{m/s}$	VSL $\mu\text{m/s}$	VAP $\mu\text{m/s}$
6A	41.35 ± 4.22	29.83 ± 3.6	35.19 ± 1.91	25.18 ± 1.86	12.48 ± 1.63	17.19 ± 1.50
6A + <i>Geranium Sanguineum</i>	42.64 ± 4.82	27.32 ± 2.27	32.99 ± 3.51	24.26 ± 2.23	18.70 ± 2.6	21.15 ± 2.17
6A + <i>Artemisia annua</i>	42.8 ± 4.08	32.69 ± 3.22	32.21 ± 4.01	29.25 ± 2.51	16.58 ± 1.95	20.20 ± 1.74
6A + <i>Tribulus terrestris</i>	45.27 ± 2.65	24.02 ± 4.04	32.68 ± 3.28	23.71 ± 1.23	13.87 ± 1.66	16.66 ± 2.07
6A + <i>Cichorium intybus</i>	56.44** ± 4.66	35.77 ± 2.01	42.09 ± 4.09	37.00* ± 1.72	20.64 ± 1.43	24.44 ± 1.19
6A + <i>Cotinus coggygria</i>	34.27 ± 1.13	22.79* ± 2.01	26.48*** ± 1.85	19.21 ± 1.18	8.52 ± 0.70	12.82 ± 0.49

(Стойностите в колоната се различават при * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$)

В деня на получаване на пробите се отчита покачване на стойностите на трите кинематични маркера (VCL, VSL, VAP) при четири опитни постановки спрямо контролната, като най-достоверно е повишението при цикорията (*Cichorium intybus*). Само в опитната постановка със смядлика (*Cotinus coggygria*) отчитаме спад в параметрите. След 24 часа тенденцията се запазва – в групата с добавен екстракт с цикория (*Cichorium intybus*) се установява повишаване на кинематичните параметри с достоверни разлики спрямо контрола, докато групата с добавена смядлика (*Cotinus coggygria*) показва достоверно по-ниски стойности.

Таблица 4. Кинематични показатели за индекс на линейност, индекс праволинейност и осцилация (трептене) (LIN, STR и WOB) на сперматозоидите в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност

Опитни постановки – групи	Свежи еякулати X ± SE			Съхранени 24 ч. при 4°C X ± SE		
	LIN %	STR %	WOB %	LIN %	STR %	WOB %
6A	63.64 ±3.24	71.47 ±3.27	79.12 ±1.95	55.39 ±1.90	68.66 ±1.61	74.81 ±1.39
6A + <i>Geranium Sanguineum</i>	60.34 ±4.31	74.16 ±3.35	74.99 ±3.03	68.35 ±4.78	77.19 ±3.14	84.15* ±2.64
6A + <i>Artemisia annua</i>	68.30 ±3.07	75.02 ±3.35	81.39 ±4.24	50.91 ±7.06	64.95 ±4.38	70.68 ±6.60
6A + <i>Tribulus terrestris</i>	49.54* ±3.39	58.42 ±5.88	70.49 ±2.28	53.88 ±2.37	56.15 ±8.3	69.97 ±5.55
6A + <i>Cichorium intybus</i>	59.86 ±7.18	71.60 ±5.28	77.41 ±4.46	69.76** ±1.43	70.41 ±3.10	77.81 ±2.68
6A + <i>Cotinus coggygia</i>	57.86 ±4.34	68.34 ±2.76	79.58 ±69.25	48.56** ±2.96	68.72 ±1.89	69.25 ±3.76

(Стойностите в колоната се различават при * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$)

При изследване на свежа-разредена семенна течност се установи, че екстрактът от див пелин (*Artemisia annua*) води до повишаване на индексите LIN, STR и WOB спрямо контролата. При изследване на охладена-съхранена семенна течност най-добри резултати се демонстрират в опитна постановка с екстракт от кръвен здравец (*Geranium sanguineum*) с достоверно повишение на WOB, докато добавянето на екстракт от див пелин води до спад на стойностите за всички индекси спрямо контролната проба.

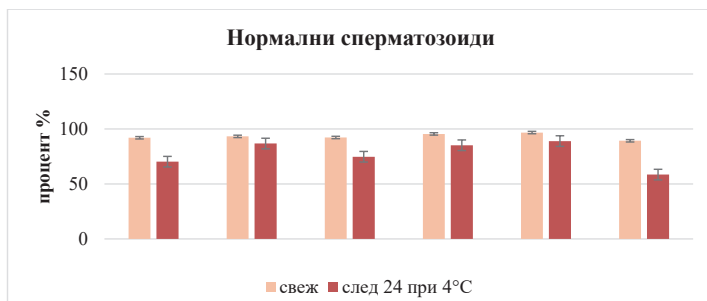
Таблица 5. Амплитуда на странично изместване на главата (AHL, $\mu\text{m.s}^{-1}$) и честота на биене (BCF, Hz) на сперматозоидите

Опитни постановки – групи	Свежи еякулати X $\pm$ SE		Съхранени 24 ч. при 4°C X $\pm$ SE	
	AHL, $\mu\text{m/s}$	BCF, Hz	AHL, $\mu\text{m/s}$	BCF, Hz
6A	1.72 ± 0.11	4.38 ± 0.56	1.36 ± 0.07	3.29 ± 0.38
6A + <i>Geranium anguineum</i>	1.61 ± 0.26	4.05 ± 0.13	1.27 ± 0.08	4.23* ± 0.55
6A + <i>Artemisia annua</i>	1.60 ± 0.19	5.22 ± 0.68	1.66 ± 0.17	3.23 ± 0.77
6A + <i>Tribulus terrestris</i>	2.10 ± 0.12	3.74* ± 0.37	1.48 ± 0.04	2.95 ± 0.40
6A + <i>Cichorium intybus</i>	2.06 ± 0.28	5.10 ± 0.17	1.63* ± 0.20	4.87 ± 0.87
6A + <i>Cotinus coggygria</i>	1.76 ± 0.19	3.89 ± 0.34	1.26* ± 0.10	2.55 ± 0.53

(Стойностите в колоната се различават при * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$)

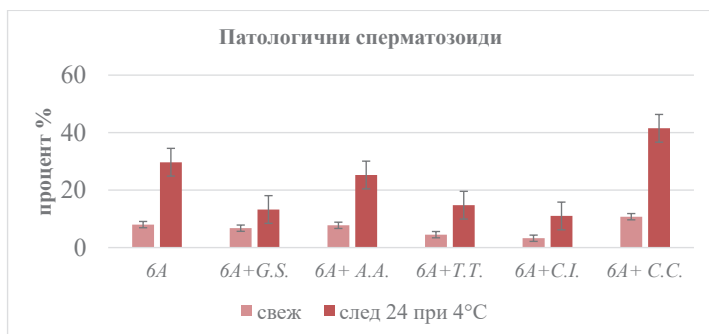
Разглеждайки едновременно AHL и BCF при свежа-разредена семенна течност екстрактът от цикория (*Cichorium intybus*) води до повишение и на двата параметъра спрямо контролната проба, особено изразено при BCF. Екстрактът от бабините зъби (*Tribulus terrestris*) повишава AHL, но води до достоверно намаление на BCF. След охлаждане и съхранение, цикорията (*Cichorium intybus*) отново демонстрира повишени стойности и при двата показателя, с достоверна разлика при AHL. Екстрактът от смрадлика (*Cotinus coggygria*) показва най-ниски стойности, с достоверно понижение при AHL спрямо контролата.

2.3. Морфологичен статус на сперматозоидите в деня на получаване на еякулата и преценка на следващия ден след съхранение в хладилни условия



Фиг. 6. Нормални сперматозоиди при свежа-разредена и съхранена охладена семенна течност

При свежа-разредената семенна течност отчитаме стойности, както следва: 6А контрола 92 ± 0.82 ; 6А + кръвен здравец (*Geranium sanguineum*) 93.25 ± 1.10 ; 6А + див пелин (*Artemisia annua*) 92.25 ± 0.85 ; 6А + бабини зъби (*Tribulus terrestris*) $95.50 \pm 0.65\%$ ($p \leq 0.01$); 6А + цикория (*Cichorium intybus*) 96.75 ± 0.75 ($p \leq 0.01$); 6А + смрадлика (*Cotinus coggygria*) 89.25 ± 1.93 ($p \leq 0.05$). В четири от опитните постановки наблюдаваме повишаване на стойностите, като при опитна група с добавен екстракт от бабини зъби (*Tribulus terrestris*) и цикория (*Cichorium intybus*) отчитаме достоверно повишен процент на сперматозоиди с правилна морфология. При опитната постановка с екстракт от смрадлика (*Cotinus coggygria*) отчитаме по-нисък процент от контролния. След изследване на опитните групи след съхранение отчитаме положителния ефект на четирите екстракта кръвен здравец (*Geranium sanguineum*), див пелин (*Artemisia annua*), бабини зъби (*Tribulus terrestris*), цикория (*Cichorium intybus*). При опитната постановка с добавен екстракт от смрадлика (*Cotinus coggygria*) стойността е по-ниска от контролната.



Фиг. 7. Патологични сперматозоиди при свежа-разредена и съхранена-охладена семенна течност

При анализиране на резултатите са съпоставени процентните средни стойности на сперматозоиди с абнормална морфология, изследвани в деня на получаване на свежи еякулати и след съхранение в хладилник при 4°C. В деня на получаване отчитаме стойности, както следва: 6A контрола 8.00 ± 0.82 ; 6A + кръвен здравец (*Geranium sanguineum*) 6.75 ± 1.10 ; 6A + див пелин (*Artemisia annua*) 7.75 ± 0.85 ; 6A + бабини зъби (*Tribulus terrestris*) 4.5 ± 0.65 ($p \leq 0.05$); 6A+ цикория (*Cichorium intybus*) 3.25 ± 0.75 ($p \leq 0.01$); 6A + смрадлика (*Cotinus coggygia*) 10.75 ± 1.93 . В четири от опитните постановки наблюдаваме понижаване на стойностите. Само при опитната постановка с *Cotinus coggygia* отчитаме по-висок процент от контролния. На 24-ия час отчитаме стойности, както следва: 6A контрола 29.75 ± 3.56 ; 6A + *Geranium sanguineum* 13.25 ± 1.25 , ($p \leq 0.05$); 6A + *Artemisia annua* $25.25 \pm 1.65\%$; 6A + *Tribulus terrestris* 14.75 ± 1.37 ($p \leq 0.05$); 6A + *Cichorium intybus* 11.00 ± 1.47 ($p \leq 0.05$); 6A + *Cotinus coggygia* 41.50 ± 1.55 ($p \leq 0.05$).

В Таблица 6 са представени средни стойности на общия процент патологични сперматозоиди и подразделението им спрямо локацията на дефекта в клетката: увреждане в главата, увреждане в средна част на опашката, увреждане на крайната част на опашката.

Таблица 6. Процентно разпределение на различните морфологични дефекти

Опитни постановки – групи	Свежи еякулати X ± SE				Съхранени 24 ч. при 4°C X ± SE			
	Абнормални, %	Увр. в глава, %	Увр. в ср. част, %	Увр. в опашка, %	Абнормални, %	Увр. в глава, %	Увр. в ср. част, %	Увр. в опашка, %
6A	8 ±0.82	1.25 ±0.25	2.00 ±0.41	4.75 ±0.25	29.75 ±3.56	4.00 ±0.40	10.5 ±1.19	15.25 ±2.86
6A + <i>Geranium Sanguineum</i>	6.75 ±1.1	0.75 ±0.47	0.75 ±0.47	5.25 ±1.10	13.25* ±1.25	1.50** ±0.28	3.00** ±0.40	8.75 ±1.03
6A + <i>Artemisia annua</i>	7.75 ±0.85	1.25 ±0.48	1.50 ±0.29	5.00 ±0.17	25.25 ±1.65	4 ±0.40	6.50* ±0.64	14.75 ±1.03
6A + <i>Tribulus terrestris</i>	4.50* ±0.65	0.25 ±0.25	0.25* ±0.25	4.00 ±0.82	14.75* ±1.37	1.75* ±0.47	2.50** ±0.50	10.50 ±0.86
6A + <i>Cichorium intybus</i>	3.25** ±0.75	0.25 ±0.25	0.50* ±0.28	2.50** ±0.28	11.00* ±1.47	1.00** ±0.40	1.75** ±0.25	8.25 ±1.10
6A + <i>Cotinus coggygia</i>	10.75 ±1.93	1.00 ±0.41	2.25 ±0.63	7.50 ±1.19	41.50* ±1.55	6.50 ±0.64	11.75 ±1.49	23.25** ±1.49

(Стойностите в колоната се различават при * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$)

При изследване на свежа-разредената семенна течност се установява повишаване на процента дефекти в крайната част на опашката, съпроводено с намаление на дефектите в главата, в шийната област и в централната част на опашката. Тази тенденция е наблюдавана при всички опитни групи, третирани с екстракти от смрадлика (*Cotinus coggygia*), кръвен здравец (*Geranium sanguineum*), цикория (*Cichorium intybus*) и бабини зъби (*Tribulus terrestris*), като разликите в разпределението на морфологичните дефекти варират в зависимост от използвания растителен екстракт. При охладена-съхранена семенна течност се отчита цялостно увеличение на процента на дефектни сперматозоиди, с повишение основно в областта на главата и шийната зона. Всички екстракти, с изключение на смрадликата (*Cotinus coggygia*), проявяват положителен, протективен ефект, като при някои се установява статистически достоверна разлика. Най-отчетлив е ефектът при 6A + *Cichorium intybus*: дефекти в областта на гла-

вата – 1.00 ± 0.40 ($p \leq 0.01$); шия и централна част на опашката – 1.75 ± 0.25 ($p \leq 0.01$); крайна част на опашката – 8.25 ± 1.10 , спрямо контролната проба: 4.00 ± 0.40 ; 10.5 ± 1.19 и 15.25 ± 2.86 .

На Фиг. 8 е представен микроскопски препарат със сперматозоиди с нормална морфология. На Фиг. 9 и Фиг. 10 са представени сперматозоиди с дефекти в областта на главата. На Фиг. 11 – гамети с откъснати глави, без опашки, на Фиг. 12 – сперматозоиди с откъснати глави и дефекти в различни части на опашката: три сперматозоида с откъснати глави; сперматозоид с окъсната глава и такъв с прекъсната опашка в средната ѝ част; навита крайна част на опашката на сперматозоид с нормална глава. На фиг. 13, 14 и 15 са представени сперматозоиди с дефекти в различни части на опашката.



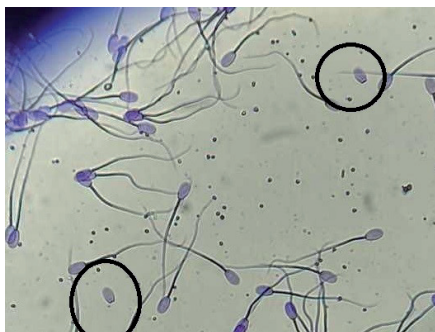
Фиг. 8. Микроскопски препарат на сперматозоиди с нормална морфология (100 ×)



Фиг. 9. Микроскопски препарати на сперматозоид с дефект във формата на главата (100 ×)



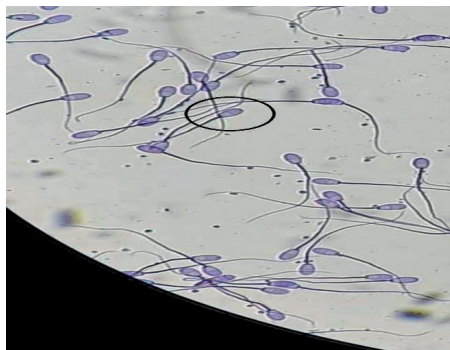
Фиг. 10. Микроскопски препарати със сперматозоид с по-малка глава по размер спрямо останалите на снимката (микроцефалия) (100 ×)



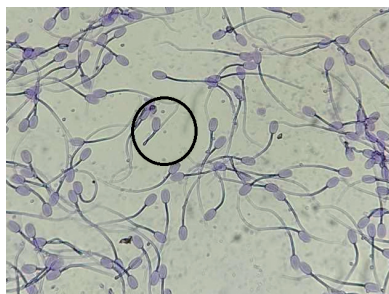
Фиг. 11. Микроскопски препарат със сперматозоиди с откъснати глави (100 ×)



Фиг. 12. Микроскопски препарат със сперматозоиди с откъснати глави и дефекти в различни части на опашката: 1 – три сперматозоида с откъснати глави; 2 – сперматозоид с окъсната глава и такъв с прекъсната опашка в средната ѝ част; 3 – навита крайна част на опашката на сперматозоид с нормална глава (100 ×).



Фиг. 13. Микроскопски препарат със сперматозоид с дефект в шийната област. Вижда се, че опашката не излиза от центъра на главата, а от дясната ѝ част (100 ×)



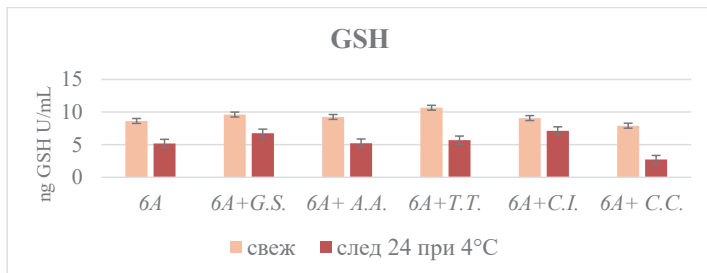
Фиг. 14. Микроскопски препарат със сперматозоид с дефект в средната част на опашката (100 ×)



Фиг. 15. Микроскопски препарат със сперматозоид с дефект на нивата опашка (100 ×)

3. Определяне на активността на тотален глутатион (GSH) по метода на Tietze

Общата активност на глутатион (GSH) в контролната и опитните групи, определен по метода на Tietze в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност, е представена на Фиг. 16.



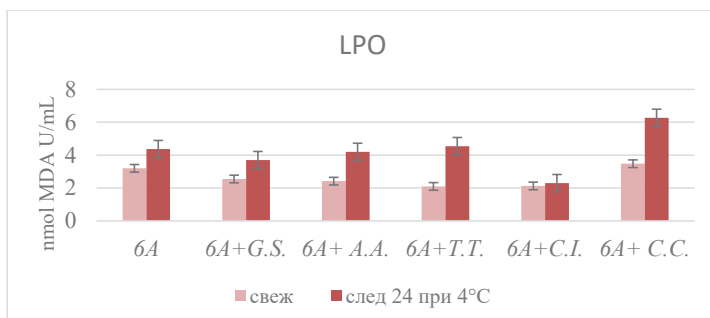
Фиг. 16. Нива на GSH в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност

Резултатите, изразени като ng GSH U.ml^{-1} , показват, че при свежа-разредена семенна течност всички растителни екстракти, с изключение на смрадлика (*Cotinus coggygria*), водят до повишаване на нивата на глутатион (GSH), като най-значими разлики са отчетени при кръвен здравец (*Geranium sanguineum* 9.62 ± 0.43 ($p \leq 0.01$)) и бабини зъби (*Tribulus terrestris*) 10.66 ± 0.68 ($p \leq 0.01$) спрямо контролната стойност 8.64 ± 0.32 . При охладена-съхранена семенна течност нивата на GSH спадат в контролната група 5.19 ± 0.69 . Въпреки това, в присъствие-

то на кръвен здравец (*Geranium sanguineum*) 6.75 ± 0.57 , бабини зъби (*Tribulus terrestris*) 5.69 ± 0.62 и смрадлика (*Cichorium intybus*) 7.11 ± 0.68 се наблюдават по-високи стойности от контролната, което показва задържане на антиоксидантната активност. Екстрактът от смрадлика (*Cotinus coggygia*) води до най-ниски нива и при двата режима на съхранение.

4. Определяне нивата на липидна пероксидация (LPO)

Нива на липидна пероксидация на сперматозоидите в свежа-разредена и охладена-съхранена в хладилник при 4°C семенна течност определени по метода на Tietze, е представена на Фиг. 17.



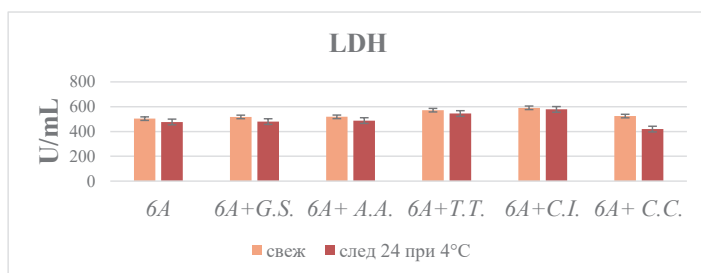
Фиг. 17. Нивата на липидна пероксидация в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност

Резултатите са изразени като nmoles MDA/10x10⁶ sp., малондиалдехид (MDA) краен продукт на липидите пероксидация с използване на моларен коефициент на екстинкция от $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. При свежа-разредена семенна течност всички растителни екстракти, с изключение на смрадликата (*Cotinus coggygia*), водят до намаляване на нивата на малондиалдехид (MDA) спрямо контролната група (3.2 ± 0.16), като най-ниски стойности са отчетени при бабини зъби (*Tribulus terrestris*) (2.1 ± 0.15) и смрадлика (*Cichorium intybus*) (2.13 ± 0.2). При изследване на охладена-съхранена семенна течност се наблюдава повишаване на MDA в контролната група (4.37 ± 0.17), докато добавянето на екстракт от кръвен здравец (*Geranium sanguineum*) (3.7 ± 0.15), див пелин (*Artemisia annua*) (4.2 ± 0.13) и цикория (*Cichorium intybus*) (2.3 ± 0.17)

задържа или понижава стойностите спрямо контролната. Екстрактът от бабини зъби (*Tribulus terrestris*) показва минимално увеличение (4.55 ± 0.17), а *Cotinus coggygia* води до най-високи нива на липидна пероксидация (6.27 ± 0.19).

5. Изследване ефекта на растителните екстракти в сперморазредителите върху активността на ензимите LDH, ALP, ALT, AST, GGT преди и след съхранение за 24 ч при 4°C

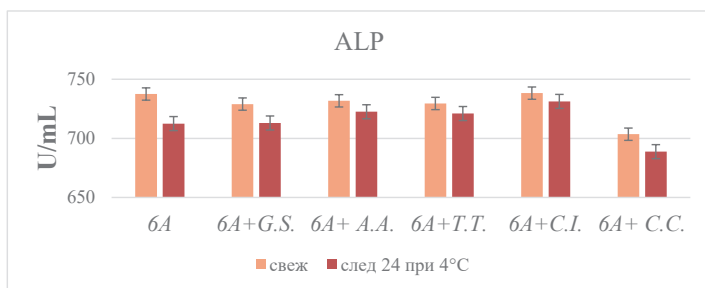
На Фиг. 18 са представени резултатите от изследването на активността на лактат дехидрогеназа в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност.



Фиг. 18. Активност на лактат дехидрогеназа в свежа-разредена и съхранена-охладена семенна плазма

При изследване на свежа-разредена семенна течност след добавянето на екстрактите, отчитаме повишаване на активността на ензима във всички експериментални групи спрямо контролната, като най-високите стойности се откриват при добавка на цикория (*Cichorium intybus*) и бабини зъби (*Tribulus terrestris*). При изследване на охладена-съхранена семенна течност най-добри резултати отчитаме отново при цикория, докато опитната група със смрадлика демонстрира най-ниски стойности, дори под контролната група.

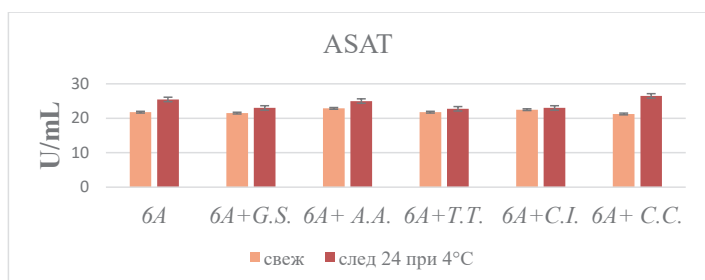
На Фиг. 19 е представен сравнителен анализ на активността на алкална фосфатаза в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност.



Фиг. 19. Активност на алкална фосфатаза в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност

При изследване на активността на ензима в свежа-разредена семенна течност стойностите са сходни в повечето експериментални групи, като по-ниска стойност се отчита при опитна група с екстракт от смрадлика (*Cotinus coggygia*). При охладена-съхранена семенна течност най-високите стойности се наблюдават в групите с добавка на цикория (*Cichorium intybus*) и див пелин (*Artemisia annua*), докато в опитната група със смрадликата (*Cotinus coggygia*) отчитаме най-ниски стойности на активността.

На Фиг. 20 е представен сравнителен анализ на активността на ASAT в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност.

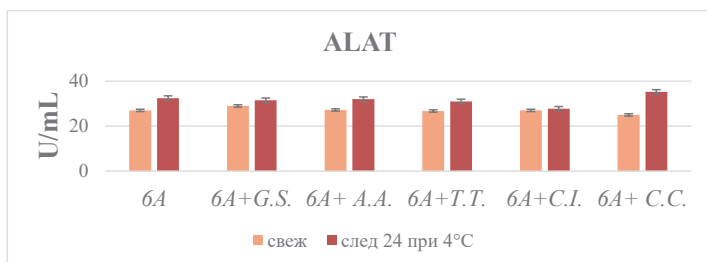


Фиг. 20. Активност на аспартат аминотрансферазата в семенната плазма в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност

След изследване на свежа-разредената семенна течност активността на ASAT в контролната група е 21.77 U.ml^{-1} . Резултатите за активността в опитните групи варират в зависимост от добавените растителни екстракти, като най-ниската активност на ензима се отчита при групата

със смядлика (*Cotinus coggygia*) (21.25 U.ml⁻¹), а най-висока – при групата с див пелин (*Artemisia annua*) (22.87 U.ml⁻¹). След изследване на охладена-съхранена семенна течност активността на ASAT е по-висока във всички групи спрямо резултатите от предния ден. Контролната група показва стойност от 25.47 U.ml⁻¹, ($p \leq 0.01$), като в групата със смядлика (*Cotinus coggygia*) се отчита най-висока активност (26.50 U.ml⁻¹), а най-ниска – при групата с бабини зъби (*Tribulus terrestris*) (22.75 U.ml⁻¹).

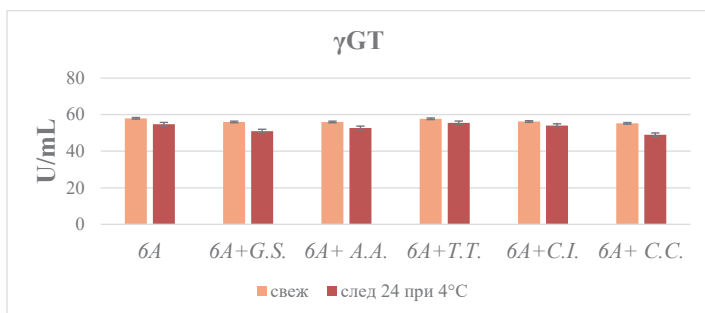
На Фиг. 21 е представен сравнителен анализ на активността на ALAT в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност.



Фиг. 21. Активност на аланинаминотрансфераза в в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност

След изследване на активността на ензима в свежа-разредена семенна течност, резултатите в контролната група са 27.00 U.ml⁻¹, като се наблюдава повишаване в групите с добавен екстракт от кръвен здравец (*Geranium sanguineum*) и смядлика (*Cotinus coggygia*), съответно 29.00 и 32.50 U.ml⁻¹ ($p \leq 0.05$). Най-ниските стойности на активност в свежия еякулат се наблюдават при опитни постановки с цикория (*Cichorium intybus*) и див пелин (*Artemisia annua*). След изследване на активността на ензима в охладена-съхранена семенна течност се наблюдава повишаване на активността в групите с кръвен здравец (*Geranium sanguineum*), див пелин (*Artemisia annua*) и смядлика (*Cotinus coggygia*). Най-висока активност е отчетена в опитна група с екстракт от смядлика – 35.25 U.ml⁻¹ ($p \leq 0.05$), а най-ниска – в опитна група с екстракт от цикория – 27.75 U.ml⁻¹.

На Фиг. 22 е представен сравнителен анализ на активността на γ GT в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност.



Фиг. 22. Активност на гама-глутамил трансфераза (γ GT) в свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност

След изследване на активността на ензима в свежа-разредена семенна течност, в контролната група резултатът е 58.00 U.ml^{-1} , като стойностите в групите с добавен екстракт от див пелин (*Artemisia annua*) и цикория (*Cichorium intybus*) са значително по-ниски – 56.00 U.ml^{-1} ($p \leq 0.01$) и 56.25 U.ml^{-1} . Най-ниска стойност за активност е отчетена в опитна постановка с екстракт от смрадлика (*Cotinus coggygria*) – 55.25 U.ml^{-1} ($p \leq 0.05$). След изследване на активността на ензима в охладена-съхранена семенна течност най-ниска стойност е отчетена в опитна постановка със смрадлика 49.00 U.ml^{-1} ($p \leq 0.001$), докато най-висока е активността на ензима в опитна постановка с екстракт от бабини зъби (*Tribulus terrestris*) 55.50 U.ml^{-1} .

V. ИЗВОДИ

Получените данни при разработването на настоящия дисертационен труд ни позволяват да направим следните изводи:

1. Добавянето на подходящи растителни екстракти в сперморазредителя води до подобряване на качествени и количествени показатели на сперматозоидите при свежа-разредена и охладена-съхранена семенна течност от кочове.
2. От изследваните растителни екстракти *in vitro* екстрактът от смрадлика (*Cotinus coggygia*) показва най-висока антиоксидантна активност. Въпреки това той проявява неблагоприятно въздействие върху параметрите на семенната течност, в резултат на проявения „антиоксидантен парадокс“.
3. Екстрактът от цикория (*Cichorium intybus*), добавен към сперморазредителя, значително подобрява подвижността и жизнеспособността на сперматозоидите както при свежо-разредена, така и при съхранена-охладена семенна течност.
4. Морфологичната структура на сперматозоидите се подобрява ефективно от добавянето на екстракти от цикория (*Cichorium intybus*) и бабини зъби (*Tribulus terrestris*).
5. Екстрактът от цикория (*Cichorium intybus*) повишава нивата на глутатион и потиска нивата на липидна пероксидация, като намалява нивата на оксидативен стрес, за разлика от екстракта от смрадлика (*Cotinus coggygia*), водещ до увеличаване на оксидативните промени в семенната течност.
6. Екстрактът от цикория (*Cichorium intybus*) най-ефективно стабилизира ензимния профил в семенната течност на кочове, докато екстрактът от смрадлика (*Cotinus coggygia*) индуцира повишение на ензимните нива на LDH, ALP, ALAT, ASAT, GGT, което е индикатор за увреждане на клетъчната цялост.
7. Направеното изследване и получените от него резултати доказват потенциала на изследваните растителни екстракти като антиоксидантни добавки в сперморазредителя – цикория (*Cichorium intybus*), кръвен здравец (*Geranium sanguineum*), див пелин (*Artemisia Annua*), бабини зъби (*Tribulus Terrestris*).

VI. ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Оригинални приноси

1. За пръв път в България е проучен ефектът от добавянето на екстракти от кръвен здравец (*Geranium sanguineum*), див пелин (*Artemisia annua*), бабини зъби (*Tribulus terrestris*), цикория (*Cichorium intybus*), смрадлика (*Cotinus coggygria*) в сперморазредителя върху качествените и количествените параметри на свежа-разредена и съхранена-охладена семенна течност от коч.

Потвърдителни приноси

1. Потвърден е антиоксидантен капацитет на пет растителни екстракти – кръвен здравец (*Geranium sanguineum*), див пелин (*Artemisia annua*), бабини зъби (*Tribulus terrestris*), цикория (*Cichorium intybus*), смрадлика (*Cotinus coggygria*) по четири различни метода (редукция на DPPH• радикал, редукция на ABTS•+, FRAP метод, CUPRAC метод в еднаква изходна концентрация).
2. Проучени са детайлно промените в кинематичните параметри на сперматозоидите в свежа-разредена и съхранена-охладена семенна течност от коч, базирани на антиоксидантния ефект на растителните екстракти.
3. Определени са нивата на оксидативен стрес чрез два основни маркера – глутатион (GSH) и липидна пероксидация (LPO), под въздействие на растителни антиоксиданти в свежа-разредена и съхранена-охладена семенна течност.
4. Оценена е ензимната активност на семенната плазма (LDH, ALP, ALAT, ASAT, GGT) при свежа-разредена и съхранена-охладена семенна течност от кочове.
5. Доказана е възможността за поддържане на ензимния баланс в семенната течност чрез целенасочено приложение на растителни екстракти в състава на сперморазредителите.

VII. ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА

1. Добавянето на растителни екстракти от кръвен здравец (*Geranium sanguineum*), див пелин (*Artemisia annua*), бабини зъби (*Tribulus terrestris*) и цикория (*Cichorium intybus*) към сперморазредителите подобрява кинематичните параметри на сперматозоидите (бързина, линейност, прогресивност), като би могло да повиши тяхната оплодителна способност при свежа-разредена и съхранена-охладена семенна течност от кочове.
2. Растителни екстракти с подходяща антиоксидантна активност могат да неутрализират негативните ефекти на ROS върху клетъчната мембрана на сперматозоидите и да подобрят техния оплодителен капацитет.
3. Изследването на някои ензими от спермалната плазма може да служи за измерване на нивата на оксидативен стрес в получените и/или обработени еякулати.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Georgieva, T., K. Hriskov. Antioxidant capacity of extracts from bulgarian medicinal plants. –In: tradition and modernity in veterinary medicine, 2023, 8, 2(15), 26 – 33. DOI: 10.5281/zenodo.10338389

Georgieva, T. Application of herbal extracts as antioxidant agents in ram semen – a review. –In: tradition and modernity in veterinary medicine, 2024, 9, 2(17), 93 – 104. doi.org/10.5281/zenodo.14278719

БЛАГОДАРНОСТИ

Изразявам огромната си благодарност на моя научен ръководител и скъп колега доц. д-р Калин Христов, който ме подкрепи в това начинание, винаги ми даваше ценни съвети както в научно направление, така и в житейско, защото неминуемо написването на такъв труд оставя следа в мирогледа на човек и гради нови черти в характера му. Благодаря му, че подкрепи идеята ми, че ми помогна в разработването на дисертационния труд, за съдействието му в документалната и процедурната организация. Доц. д-р Калин Христов има основна заслуга за моето професионално развитие в научно и приложно направление в последните пет години и винаги ще съм му благодарна.

Искрено благодаря на доц. д-р Надя Златева-Панайотова, ръководител на катедра „Хирургия, рентгенология, акушерство и гинекология“ за подкрепата ѝ, за съветите и насоките, за правилния поглед над нещата. Винаги ще ѝ бъда благодарна.

Най-сърдечно благодаря на всички мои колеги от катедра „Хирургия, рентгенология, акушерство и гинекология“ – гл. ас. д-р Александър Стоимонов, гл. ас. д-р Георги Маринов, гл. ас. д-р Севен Мустафа, доц. д-р Константин Аминков и ас. Лилия Петрова. Без тяхната подкрепа този етап от професионалното ми развитие щеше да е много по-труден, а те винаги ми вдъхваха надежда.

Искрени благодарности на гл. ас. д-р Мадлена Андреева, която ми помогна много в изпълнението на изследванията и обработката на данните от тях.

И последно, но не на последно място, огромно благодаря на моето семейство, на най-близките ми хора – на моя обичан съпруг Живко, без чието търпение, подкрепа и безусловна любов нямаше да се справя. И на моите родители Пламена и Богомил, моят безусловен пример в живота и компас за вярна посока.

Благодаря!

STUDY ON THE EFFECT OF PLANT EXTRACTS ON RAM SEMEN, APPLIED AS COMPONENTS OF THE SEMEN EXTENDER

Tsveta Bogomilova Georgieva

The aim of this study was to evaluate and compare the antioxidant effects of five plant extracts incorporated into semen extender 6A by analyzing kinematic and biochemical parameters in fresh-diluted and cooled-stored ram semen. The study involved six clinically healthy rams with normally developed reproductive organs, aged 1.5 to 2 years, selected for uniformity in age and body condition (80 – 90 kg). All animals were housed under standard breeding conditions, with controlled feeding, care, and reproductive management, in accordance with welfare and reproductive health regulations.

Semen samples were collected and evaluated macroscopically and microscopically for volume, density, color, and consistency. All six ejaculates showed comparable characteristics (volume measured in graduated vials; sperm concentration $>2.5 \times 10^9/\text{ml}$; progressive motility $>70\%$). Initial dilution (1:3) was performed using extender 6A (100.0 cm³ distilled water, 2.8 g sodium citrate, 0.4 g sucrose, 0.4 g lactose), providing a suitable medium for sperm stabilization. Motility was assessed by placing 0.05 mL of semen on a pre-warmed (37°C) slide under a coverslip and observing under a thermostated microscope. After dilution, samples were transported at 37°C and further diluted to 1:12 to standardize concentration and minimize individual variability. Each ejaculate was divided into six aliquots: one control (extender 6A only) and five experimental samples supplemented with different plant extracts (*Geranium sanguineum*, *Artemisia annua*, *Tribulus terrestris*, *Cichorium intybus*, *Cotinus coggygia*), yielding 36 samples (6 control, 30 experimental). Samples were analyzed under four conditions: CASA-based kinematic and morphological analysis, glutathione content, lipid peroxidation, and activity of five seminal plasma enzymes (LDH, ALP, ALT, AST, and GGT), totaling 180 enzyme measurements. All analyses were conducted on fresh-diluted samples and after 24-hour storage at 4°C.

Based on the experimental results, the addition of selected plant extracts to semen extender improved both qualitative and quantitative sperm parameters in fresh-diluted and cooled-stored ram semen. Among the tested plant extracts, *Cotinus coggygia* demonstrated the highest *in vitro* antioxidant

activity; however, it exerted a detrimental effect on semen quality due to the so-called “antioxidant paradox”. In contrast, *Cichorium intybus* extract significantly enhanced sperm motility and viability in both fresh and stored samples. Morphological sperm integrity was notably improved by the addition of *Cichorium intybus* and *Tribulus terrestris* extracts. The *Cichorium intybus* extract also increased glutathione levels and reduced lipid peroxidation, thereby lowering oxidative stress, unlike *Cotinus coggygia*, which led to increased oxidative alterations. Furthermore, *Cichorium intybus* most effectively stabilized the enzymatic profile of seminal plasma, while *Cotinus coggygia* induced elevated levels of LDH, ALP, ALT, AST, and GGT – indicative of compromised cellular integrity. The findings confirm the potential of the tested plant extracts (*Cichorium intybus*, *Geranium sanguineum*, *Artemisia annua*, and *Tribulus terrestris*) as antioxidant additives in semen extenders for improving ram semen preservation.

Key words: plant extract, sperm extender, antioxidant, ram