



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**

- авторезиме на 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

Посвета

За проф. д-р Тони Довенски и проф. д-р Владимир Петков кои ме водеа и поддржуваа во мојата работа.

За моите Башак и Теон, и за мојата мајка Косара, преку кои ја наоѓав инспирацијата за мојата работа.

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

СОДРЖИНА

ИНДЕКС НА ЗБОРОВИ.....	1
ИЗВАДОК.....	3
I. ВОВЕД.....	7
II. ПРЕГЛЕД НА НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА.....	8
III. ЦЕЛИ.....	9
IV. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ.....	10
1. Експериментална постапка.....	10
2. Мострирање на ејакулати.....	11
3. Квалитативна и квантитативна хомогенизација на свежите ејакулати во збирен изворен примерок.....	12
4. Експериментални компоненти и ејакулатни раствори.....	12
4.1. Хомологна семинална плазма (HSP).....	12
4.2. Антиоксидативна компонента.....	12
4.3. Ејакулатни криопрезервациски медиуми.....	13
4.4. Ејакулатни суспензии.....	13
5. Криотретман - замрзнување на ејакулатните суспензии во течен азот (-196°C).....	14
6. После криотретман.....	14
7. Лабораториска анализа на примероците.....	15
7.1. Одредување на ејакулатниот волумен.....	15
7.2. Проценка на ејакулатната густина.....	15
7.3. Проценка на сперматозоидната брановидна подвижност.....	16
7.4. Одредување на клеточната концентрација.....	16
7.5. Проценка на мембранскиот и морфолошкиот интегритет на сперматозоидите... ..	16
7.6. Проценка на кинетичките карактеристики на сперматозоидите.....	17
8. Статистичка обработка на податоците.....	18
V. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	19
1. Квалитативни и квантитативни карактеристики на свежите ејакулати.....	19
2. Статистичка сензитивност на одделните анализи.....	20
3. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај контролните КМ за анализите на 0- и 3-часови од инкубацијата	21

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	22
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	24
6. Проценка на фреквенциите на дистрибуција кај експерименталните КМ во а-СТ и б-СТ	25
7. Резиме на дискусијата.....	28
VI. ЗАКЛУЧОЦИ.....	30
VII. СПИСОК НА ЛИТЕРАТУРА И ДРУГИ ИЗВОРИ.....	32
VIII. ТАБЕЛИ И ГРАФИКОНИ.....	35

ИНДЕКС НА ЗБОРОВИ

Ac	Интегритет на акрозомот
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 асистирана анализа на ејакулати
CAT	Каталаза
CT	Криотретман
GPx	Глутатион пероксидаза
GR	Глутатион редуктаза
GSH	Редуциран глутатион
GSSG	Оксидираниот облик на глутатион
HPS	Хомоген изворен примерок
HSP	Хомологна семинална плазма
KM	Криопрезервациски медиум
LDL	Липопротеинска фракција со ниска густина
LIN	Праволиниски индекс
Pm	Интегритет на плазмена мембрана
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 опсеги на VAP
VSL	Брзина по праволиниска траекторија
a-CT	Метод на суспендирање сперматозоиди со криопрезервациски медиум пред-криопрезервација
KPP	кислородно-реактивните-радикали

Мо

Морфологија на сперматозоид

СП

Семинална плазма

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 криопрезервацијата 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

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 сор., 2004), замрзнати овнешки ејакулати во течен азот (-196°C) може да ја задржат својата фертилна способност и до 35 години. И покрај обемниот 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 (Garcia, E.M., и сор., 2006; Marti 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 криопрезервираните 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.

2. ПРЕГЛЕД НА НАУЧНАТА ЛИТЕРАТУРА

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 SP 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 (Bucak и соp., 2007), протеински фракции од семинална плазма на свежи ејакулати (Bergeron и соp., 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 соp. 1999; Ghaoui и соp.,

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).

III. ЦЕЛИ

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 ејакулати 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 ејакулати 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 анализи 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). Непосредно по ејакулацијата, спермособирачите беа пренесувани во андролошка лабораторија во период од околу 30 секунди и беа сместувани во водена бања сè до СТ ($T=30^{\circ}\text{C}$ и $\text{RH}=90\%$). Целокупната методологија за мострирање на ејакулатите беше утврдена според ЕУ директивата 2016/63/EU.

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

Примероците на свежи ејакулати беа проценувани според следните квалитативни карактеристики (Вусак 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 $T=4^{\circ}\text{C}$ (30 min), а потоа беа двофазно центрифугирани: I – $2000 \times g$, 4°C , 20 min.; II- $2500 \times g$, 4°C , 30 min. Издвоените супернатанти беа филтрирани низ микрофилтер ($0,22 \mu\text{m}$), а потоа складирани во криоепрувети и замрзнати на $T=-20^{\circ}\text{C}$ 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

прашката форма, со молекуларна маса од 307,32 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 mM GSH)

Стерилна вода 2 (SW2) - 0,040 g GSH/20,0 ml H₂O (6,25 mM GSH);

Стерилна вода 3 (SW3) - 0,051 g GSH/22,0 ml H₂O (7,50 mM GSH).

4.3. Ејакулатни криопрезервациски медиуми

Контролниот КМ (C) беше на основа на *Tris* (tris-hydorymethy-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 μL) + E (1.200 μL) = 60.000 μL ($100 \times 10^6/\text{ml}$);

Alq2 = C (14.850 μL) + E (150 μL) = 15.000 μL ($50 \times 10^6/\text{ml}$);

Alq3 = E1 (14.850 μL) + E (150 μL) = 15.000 μL ($50 \times 10^6/\text{ml}$);

Alq4 = E2 (14.850 μL) + E (150 μL) = 15.000 μL ($50 \times 10^6/\text{ml}$);

Alq5 = E3 (14.850 μL) + E (150 μL) = 15.000 μL ($50 \times 10^6/\text{ml}$).

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 краеве. 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); **9.** -20,0°C/min до -100,0 °C (1min); **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 a-СТ метод на суспендирање. Сите аликвоти имаа завршна клеточна концентрација од 50 x10⁶/ml. Инкубирањето на репликатите алоцирани во соодветните групи, беше изведено во атмосфера со T=37°C и 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 густы бранови); и **(5)** – одлична (95% од сперматозоидите се одлично подвижни и тие создаваат брзи и густы 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: $C_s (nL) = (N/n) \times (1/20) \times D$, каде D претставува степен на разредување.

7.5. Проценка на мембранскиот и морфолошкиот интегритет на сперматозоидите

Интегритетот на протоплазматската и акрозомската мембрана се одредуваше со помош на суправитално бојење Hancosk-2 (Hancosk, 1951), со користење на нигрозин-еозин. 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). 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. 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 ($VAP = 0 \mu\text{m/s}$).

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). Сензитивноста беше одредена според *a priori* анализа изведена со статистички софтвер (G*Power v.3.1. 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.

Податоците од статистичката обработка се достапни на Harvard Dataverse објавени под <https://doi.org/10.7910/DVN/WLCSMI>.

V. РЕЗУЛТАТИ И 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. 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 $(1-\beta)$. 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 КМ 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 ≥ 34 %, а придонесот на поединечната χ^2 вредност во однос на омнибусната да биде ≥ 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 фреквенциите на дистрибуција 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 пред-криопрезервациско суспендирање на анализите со контролни и експериментални КМ на 0- и 3-часа од инкубацијата. Сите аналити беа суспендирани со клеточна концентрација од 50×10^6 /ml пред СТ. Заклучно со податоците од табелите 4-9, ефектот на групите (факторите) од а-СТ методот врз криопрезервацискиот успех беше рефлектиран на следниот начин:

С-а-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 елипсовидност на сперматозоидната глава, високи вредности за брзината на мотилните клетки и висока девијација на траекторијата што ги класифицира како хиперактивирани (капацитирани).

С-а-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 аналити имаа доминантна сперматозоидна популација која се карактеризираше со помала елипсовидност 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 С-а-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 елипсоидност 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 неоштетен структурен интегритет и морфологија, добро изразена елипсоидност 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 елипсоидност на главениот дел и статична мотилност. Не постоеја индикации за доминирање на хиперактивациска мотилност.

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

Целта на оваа анализа беше да се процени ефектот на после-криопрезервациско суспендирање на аналитите 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. Заклучно со податоците од табелите 10-15, ефектот на групите (факторите) од b-CT методот врз криопрезервацискиот успех беше рефлектиран на следниот начин:

C-b-0 аналитите 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 аналити 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 аналитите 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 аналитите 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 аналитите 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 елипсоидност 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 фреквенциите на дистрибуција кај експерименталните КМ во а-СТ и б-СТ

Целта на оваа анализа беше да се процени ефектот на пред- и после-криопрезервациско суспендирање на анализите со експериментални КМ на 0- и 3-часа од инкубацијата. Анализите суспендирани со б-СТ методот пред-криопрезервацијата имаа клеточна концентрација од 100×10^6 /ml, а после-криопрезервацијата 50×10^6 /ml. Анализите суспендирани со а-СТ пред- и после-криопрезервацијата имаа клеточна концентрација од 50×10^6 /ml. 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 елипсоидност 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 елипсоидност 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 нештетена 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 елипсоидност, 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 нештетен структурен интегритет и морфологија, и нормално изразена елипсоидност 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 елипсоидност 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 a-CT и b-CT методот, беше утврдено дека дејството на HSP беше највлијателно во манифестирањето на E3-медиумот. Есперименталните резултати од ова истражување посочуваа дека поединечното додавање на GSH или HSP во tris-медиумите за криопрезервација со a-CT или b-CT 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 (García, E.M., и сор., 2006; Martí 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 осеменување (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 загрозени видови и соејевни на животни, сметаме дека наодите на ова истражување ќе придонесат за создавање на постабилни крио-банки на сперматозоиди.

VI. 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.

VII. СПИСОК НА ЛИТЕРАТУРА И ДРУГИ ИЗВОРИ

- 1 Salamon, S., and Maxwell, W. M. (2000). Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 77–111.
- 2 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.
- 3 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.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 Bucak, M. N., Ateşşahin, A., Varışlı, 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.
- 8 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.
- 9 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.

- 10 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.
- 11 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.
- 12 Hancock, J. L. (1951). A staining technique for the study of temperature-shock in semen. *Nature*, 167(4243), 323.
- 13 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.
- 14 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.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 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.
- 18 Mortimer, S. T., & Maxwell, W. M. C. (1999). Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. *Reproduction, Fertility and Development*, 11(1), 25.
- 19 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.

- 20 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.
- 21 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.
- 22 World Health Organization (2010). WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen. In: Cooper, T.G. (Ed.). *Standard procedures* (pp. 37). WHO Press

VIII. 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

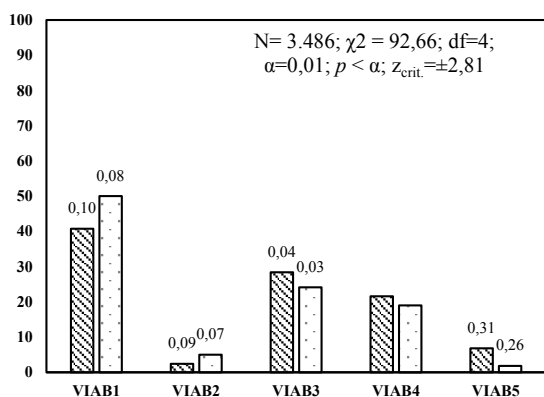
Vol – волумен на ејакулат, H-Sct – висина на сперматокритен столб, H-Spz – висина на сперматозонден столб, Sct – сперматокрит, M-Sct – средна вредност на сперматокрит од ејакулати, pVol – парцијален волумен на ејакулат во збирен изворен примерок

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

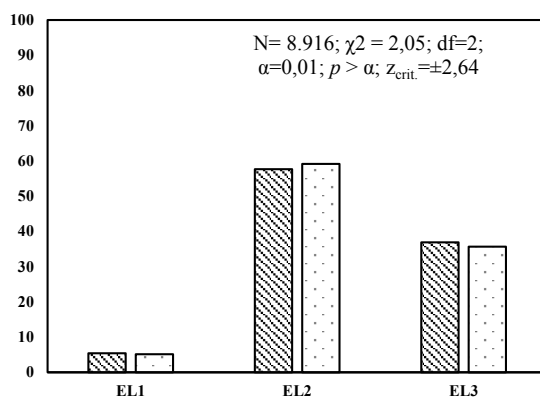
N	df	<i>A priori</i>			<i>Post hoc</i>	
		λ	1- β	α	$z_{crit.}$	χ^2
1	44	76,84	0,99	0,001	$\pm 3,34$	78,75
2	33	69,89	0,99	0,001	$\pm 3,28$	63,87
3	28	66,34	0,99	0,001	$\pm 3,23$	56,89
4	22	50,51	0,99	0,001	$\pm 3,20$	40,29
5	21	49,78	0,99	0,01	$\pm 3,16$	38,93
6	14	44,02	0,99	0,01	$\pm 3,08$	29,14
7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

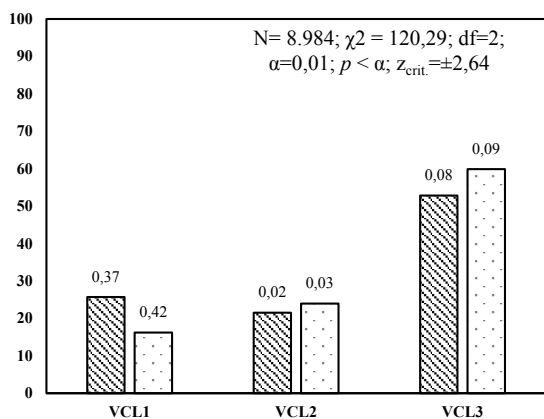
Графикон 1



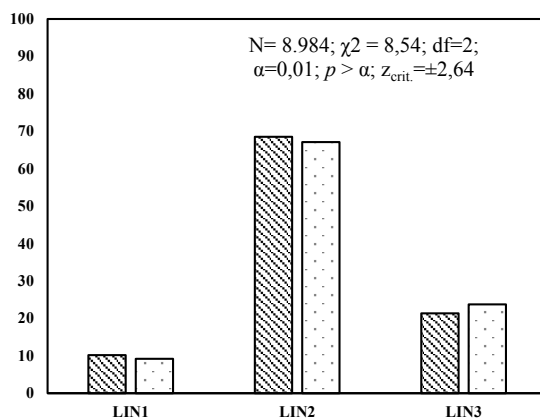
Графикон 2



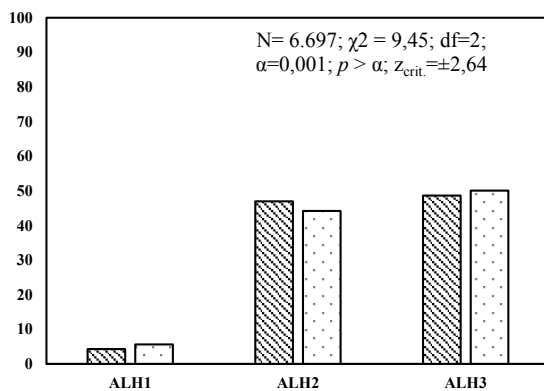
Графикон 3



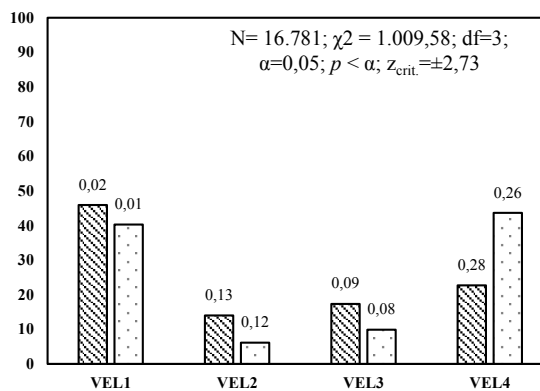
Графикон 4



Графикон 5



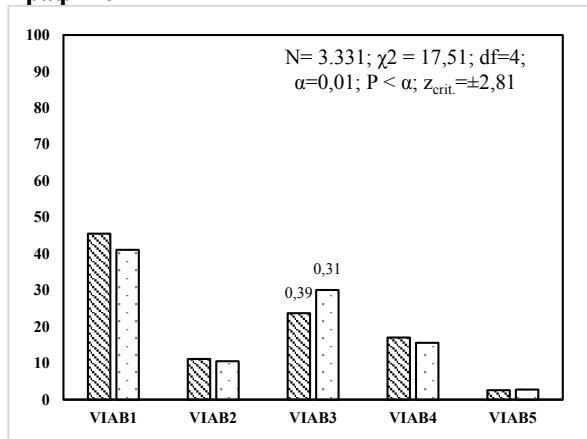
Графикон 6



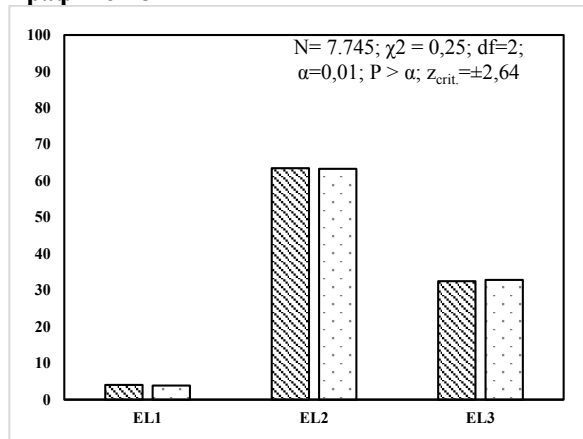
C-a-0 **C-b-0**

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.

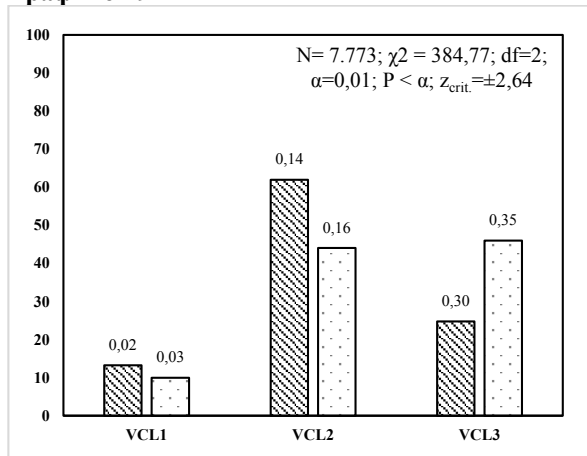
Графикон 7



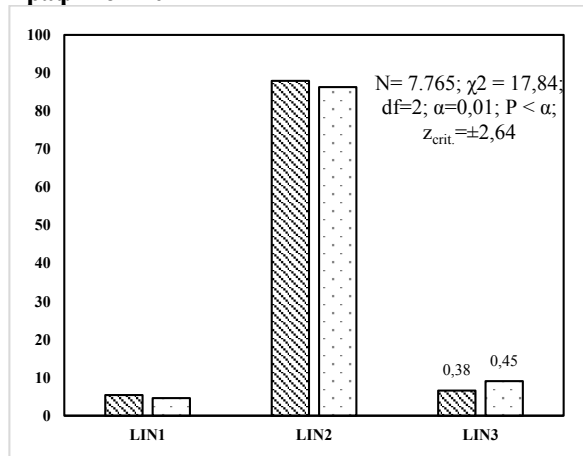
Графикон 8



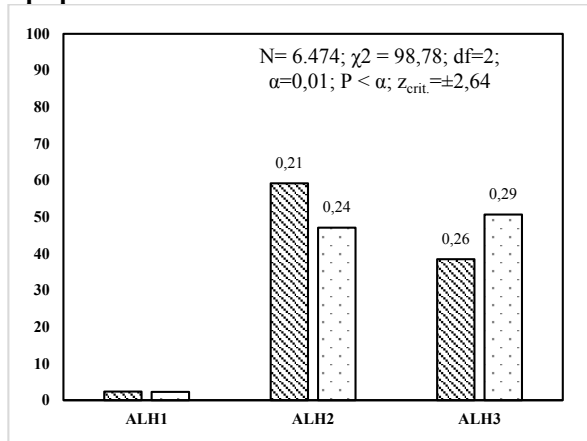
Графикон 9



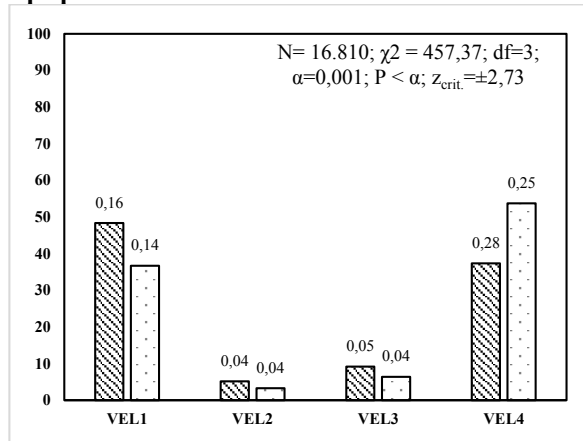
Графикон 10



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 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											
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		$\chi^2=87,12$
	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	$\alpha=0,01$
	z	-5,72	0,22	-1,48	3,81	-1,15	4,40	-1,47	2,02		$p < \alpha$
	RCI	0,12	0,00	0,01	0,05	0,01	0,07	0,01	0,02		$Z_{crit}=\pm 3,08$
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 анализи 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 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 12. Фреквенција на дистрибуција на сперматозоиди во категории според брзина на криволиниска траекторија (VCL) 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											
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		$\chi^2=5.300,43$
	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	$\alpha=0,01$
	z	-26,28	1,84	-23,32	21,03	-12,75	33,20	-10,68	20,55		$p < \alpha$
	RCI	0,06	0,00	0,05	0,04	0,02	0,11	0,01	0,04		$Z_{crit}=\pm 3,08$
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 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 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 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
	z	10,15	-3,11	0,06	-2,53	5,78	-3,76	-2,77	-3,96		χ ² =1.229,56
	RCI	0,07	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,01		df=14
LIN2	%	67,11	86,30	67,88	82,73	71,80	89,45	74,16	82,53	77,33	α=0,01
	z	-16,96	13,65	-14,98	8,20	-8,17	17,96	-5,71	8,27		p < α
	RCI	0,05	0,03	0,04	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01		z _{crit} =±3,08
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 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 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
	z	0,80	-8,13	3,88	-0,35	2,37	-4,74	6,77	-1,42		χ ² =1.147,98
	RCI	0,00	0,05	0,01	0,00	0,00	0,02	0,03	0,00		df=14
ALH2	%	44,22	47,07	48,15	59,60	47,81	71,35	54,62	70,33	55,24	α=0,01
	z	-13,74	-9,63	-8,53	5,00	-8,17	18,65	-0,84	17,92		p < α
	RCI	0,06	0,03	0,02	0,01	0,02	0,12	0,00	0,11		z _{crit} =±3,08
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 μm); ALH2 (7-12 μm); ALH3 (13-30 μm). 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 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.