МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ

Медицински факултет

Катедра по патологична физиология

„ПАТОФИЗИОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ И ПОВЛИЯВАНЕ НА ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС В НЯКОИ ИМУНОЛОГИЧНО-ПРИВИЛЕГИРОВАНИ ТЪКАНИ“

ДИСЕРТАЦИЯ

за присъждане на образователна и научна степен „ДОКТОР“

на д-р Зафер Ахмед Сабит

Област на висше образование 7. Здравеопазване и спорт, професионално направление 7.1 Медицина, научна специалност „ПАТОФИЗИОЛОГИЯ“

Научни ръководители:

Доц. д-р Радка Тафраджийска-Хаджиолова, дм

Доц. д-р Павлина Гатева, дм

София, 2021 г.

Използвани съкращения

БП болест на Паркинсон
ОС оксидативен стрес
ЦНС централна нервна система
СЗО Световна здравна организация
АТФ аденозин трифосфат
α-TTP алфа-токоферолов трансферен протеин
ТД тестостеронов дефицит
ФСХ фоликулостимулиращ хормон
ЛХ лутеинизиращ хормон
ИТМ индекс на телесна маса
Т тестостерон
E_2 естрадиол
ХХТ хипоталамо-хипофизно-тестикуларна ос
АСА антиспермални антитела
TGF-β трансформиращ растежен фактор бета
ROS реактивни кислородни форми
RNS реактивни азотни форми
LPO липидна пероксидация
MDA малондиалдехид
GPx глутатион пероксидаза
GSH глутатион
NFκB ядрен фактор капа В
DA допамин
mTOR рапамицин сигнална система
LA липоева киселина
6-OHDA 6-хидрокси допамин
HFD диета, богата на мазнини (high-fat diet)
MUFA мононенаситени мастни киселини
PUFA полиненаситени мастни киселини
LDL липопротеини с ниска плътност
HDL липопротеини с висока плътност
FFA свободни мастни киселини
TAG триацилглицерол
NO азотен оксид
ICAM-1 междуклетъчни адхезионни молекули
VCAM-1съдово-клетъчни адхезионни молекули
CRP С – реактивен протеин
PgI_2 простагландин И $_2$ (простациклин)
TXB_2 тромбоксан B_2
HO-1 хем-оксигеназа 1
ACE ангиотензин конвертиращ ензим
NADPH редуциран никотинамид аденин динуклеотид фосфат
$NADP^+$ никотинамид аденин динуклеотид фосфат
ETC електрон-транспортна верига
Nox NADPH оксидази
NADH редуциран никотинамид динуклеотид
XO ксантин оксидаза
XDH ксантин дехидрогеназа
ER ендоплазмен ретикулум
ERO-1 ER оксидоредуктаза
PDI протеин-дисулфид изомераза
SOD супероксид дисмутаза
CAT каталаза
PRX пероксиредоксини
GSSG глутатион дисулфид
HIF-1α хипоксия-индуциран фактор 1α
FIH фактор инхибиращ HIF-1α
MAPK митоген-активирана протеин киназа
Nrf2 nuclear factor erythroid 2- related factor 2
Keap1 Kelch-подобен ECH-асоцииран протеин
LPS липополизахарид
TLR-4 toll-like receptor 4
8-OHdG 8-хидрокси-2`-дезоксигуанозин
RSA рекурентен спонтанен аборт
ORP окислително-редукционен потенциал
SDF спермална ДНК фрагментация
GF germ-free (без чревна микрофлора)
SCFAs късоверижни мастни киселини
GPRs G-протеин свързани рецептори
LPL липопротеин липаза
TBARS реактивни субстанции на тиобарбитурова киселина
LBP липополизахарид свързващ протеин
IL-1β интерлевкин 1 бета
IL-6 интерлевкин 6
TNF-α тумор-некротизиращ фактор алфа
GnRH гонадотропин релизинг хормон
StAR стероидогенен акутен регулаторен протеин
PRL пролактин
i.m. интрамускулно
i.p. интраперитонеално
CFU колония формиращи единици
Hb хемоглобин
IVF ин витро оплождане
ICSI интрацитоплазмено спермално инжектиране

Съдържание

I.

I. Въведение 1

II. Литературен обзор 7

1. Термично обработени масла 7
2. Слънчогледово олио 7
3. Оксидативен стрес и видове реактивни форми на кислорода (ROS) 8
4. Образуване на ROS на ниво митохондрии 9
5. NADPH оксидази (Nox) 10
6. Ксантин оксидаза (XO) 11
7. Производство на ROS в ендоплазмения ретикулум 12
8. Производство на ROS в пероксизоми 12
9. Антиоксидантна защита на организма 13
10. Супероксид дисмутаза (SOD) 13
11. Глутатион пероксидази (GPX) 14
12. Каталаза 14
13. Пероксиредоксини (PRX) 14
14. Глутатион (GSH) 15
15. Алфа-липоева киселина 15
16. Витамин Е 16
17. Витамин С 18
18. Физиологични функции на ROS 20
19. Оксидативен стрес: прекомерно натрупване на ROS 21
20. Роля на затлъстяването и асоциираната чревна дисбиоза за развитие на безплодие 22
21. Роля на ОС за развитие на мъжкото безплодие 25
22. Физиологична роля на реактивните форми на кислорода при мъжкия фертилитет 29
23. Патологични ефекти на реактивните форми на кислорода и азота върху фертилитета при мъжете 31
24. Повреди на ДНК на сперматозоидите, индуцирани от реактивни форми на O_2 и N 34
25. Антиоксидантна терапия при мъжко безплодие 36
26. Тестове за оценка на реактивни форми на кислорода в сперма 37
27. Реактивни форми на кислорода, фертилност и технологии за асистирано опложданe (ART) 40
28. Микробиота и хомеостаза 41
29. Затлъстяване и чревна микробиота 43
30. Централна нервна система и оксидативен стрес 46
31. Физиологична рола на ROS в ЦНС 46
32. Ефекти на ОС в мозъчната тъкан при нарушения в ЦНС 48

33. Фактори обуславящи чувствителността на мозъка към ОС 49
34. Оксидативен стрес и болест на Паркинсон 50
35. Заключение във връзка с литературния обзор 52
III. Цели на проучването 53
IV. Задачи на дисертационния труд 53
V. Материали и методи 54
1. Ефекти на запържено слънчогледово олио върху спермалните показатели у миши модел: имат ли пробиотиците протективен ефект? 54
1.1. Дизайн на научното изследване 54
1.2. Приготвяне на водата за пиене с добавен пробиотик 56
1.3. Определяне на наддаването на телесно тегло, консумация на храна и енергия; определяне на консумираната енергия за грам наддадено тегло 57
1.4. Получаване на кръв, сперма и тъканни проби 57
1.5. Сперматологично изследване 58
1.5.1. Определяне на мотилитет и прогресивно движение напред на сперматозоидите 58
1.5.2. Определяне на концентрацията на сперматозоидите 59
1.5.3. Определяне процента на живите сперматозоиди по метода на Морозов 60
1.5.4. Определяне процента на патологичните сперматозоиди 61
1.6. Хистологично изследване 61
1.7. Определяне на триглицериди, общ холестерол и тестостерон 62
1.8. Измерване на липидна пероксидация 62
1.9. Статистически анализ 63
2. Антиоксидантен ефект на алфа-липоевата киселина при унилатерално, интрастриатално инжектирани плъхове 64
2.1. Лекарствени средства и химикали 64
2.2. Дизайн на проучването 64
2.3. 6-OHDA Едностранно интрастриатално инжектиране 65
2.4. Апоморфинов тест 66
2.5. Работа с хомогенати в мозъка 67
2.6. Измерване на GPx активност 67
2.7. Измерване на липидна пероксидация (TBARS) 67
2.8. Измерване на протеин 67
2.9. Статистика 68
VI. РЕЗУЛТАТИ 69
1. Ефекти на запържено слънчогледово олио върху спермалните показатели у миши модел: имат ли пробиотиците протективен ефект? 69
2. Антиоксидантен ефект на алфа-липоевата киселина при унилатерално, интрастриатално инжектирани плъхове 75

2.1. Апоморфинов тест 75
2.2. Оценка на TBARS 76
2.3. Глутатион-пероксидаза (GPx) 77
VII. Обсъждане 79
1. Ефекти на термичното оксидиране върху качеството на растителните масла 79
2. Здравни ефекти вследствие на употребата на термично обработени масла 81
3. Влияние на ОС и пробиотиците върху мъжките репродуктивни показатели 84
4. Ефекти на алфа-липоева киселина върху ОС и двигателните нарушения при модел на Паркинсонизъм 96
5. Заключение 100
VIII. Изводи 104
IX. Приноси 106
IX. Научни публикации и съобщенищя във връзка с темата на дисертационния труд 107
1. Публикации 107
2. Научни съобщения 107
X. Цитирания на публикациите свързани с дисертационния труд в Scopus и Web of Science.. 108
XI. Списък с научни проекти, свързани с дисертационния труд 110
XII. Библиография 111

ПАТОФИЗИОЛОГИЧНИ АСПЕКТИ И ПОВЛИЯВАНЕ НА ОКСИДАТИВНИЯ СТРЕС В ИМУНОЛОГИЧНО-ПРИВИЛЕГИРОВАНИ ТЪКАНИ

I. Въведение

Имунният отговор и асоцииранoто с това възпаление в определени части на тялото включващи мозък, око, тестиси, плацента и фетус са свързани с голям риск за тежки органни увреждания и репродуктивен неуспех. Интензивните проучвания в средата на 20 век относно отхвърлянето на трансплантати и удължаването на оздравителния процес при случаи на увеит и орхит, довеждат до постулиране на твърдението, че в организма на бозайниците съществуват имунологично-привилигеровани органи и като такива са определени следните: централна нервна система (ЦНС), тестиси (сперматогенен епител), око (очна леща), надбъбречни жлези, плацента и фетус [Streilein, 2003; Niederkorn, 2006]. Още Medawar през 1948 г. оперативно е определил имунологично-привилегированите тъкани, като места, където чужда тъканна присадка може да оцелее за дълъг период от време, докато подобна присадка, трансплантирана на регулярно място, предизвиква острото и отхвърляне [Medawar, 1948]. Такава имунна привилегия се смята за еволюционна адаптация, целяща да предпази тъканите, които са незаменими и които имат ограничен капацитет за регенерация (като мозъка, сперматогенния епител и окото) от потенциално увреждащите ефекти на неконтролиран възпалителен имунен отговор. По този начин, имунно-привилегированите органи се разглеждат като такива, в които внасянето на имунни клетки е забранено. Смята се, че срещата на левкоцитите със секвестрираните антигени в тези имунно-привилегировани тъкани при нормални условия се възпрепятства от наличието на специализирани физически бариери, т. нар. кръвно-тъканни бариери [Benhar et al., 2012].Обект на изследване в тази дисертация са мозъкът и тестисите.

Анатомо-структурните особености на мозъка, които предотвратяват иницииране на адаптивния имунитет към антигени в мозъчната тъкан, включват отсъствието на конвенционален лимфен дренаж и оскъден брой на дендритните клетки в нея. Миграцията на имунни клетки и възпалителни медиатори се възпрепятства поради естеството на плътните контакти (tight junctions) между ендотелните клетки в мозъчната микроциркулация (т. нар. хемато-енцефална бариера). Мозъкът е богат на резидентни макрофаги или т. нар. микроглия, които се активират при тъканно увреждане или инфекции на мозъка. Счита се, че прагът на сензитация на микроглията е по-висок в сравнение с този на макрофаги от други тъкани.

Един предполагаем механизъм за поддържането на този висок праг е инхибиращото сигнализиране от CD200 рецептора, по клетъчната мембрана на микроглиалните клетки. CD200 е лиганд, който е силно експерсиран в мозъка върху неврони и други типове клетки. Има доказателства, че имунният надзор върху микробни агенти в мозъка се осъществява от ЦНС. Например, честотата на някои опортюнистични инфекции в мозъка се увеличават значително при имуносупресирани пациенти. Пациенти третирани с моноклонални антитела, които блокират лимфоцитната и моноцитната адхезия към ендотелните клетки имат значително повишен, въпреки че все още малък, риск за активиране на латентния JC (човешки полиома 2) вирус, водещ до фатална инфекция на централната нервната система, наречена прогресираща мултифокална левкоенцефалопатия. Тези данни подсказват, че трафикът в мозъчната тъкан на Т лимфоцити и моноцити е необходим , за да контролират латентните вируси, и следователно, мозъкът не е строго имунно-изолирана тъкан [Abbas et al, 2015].

Имунната привилегия на тестиса служи, за да ограничи възпалителната реакция в тестикуларната тъкан и съответно да предотвати развитието на мъжки инфертилитет. Много от антигените на тестикуларната тъкан се експресират за първи път през пубертета след развитието на компетентна имунна система, която може да включва, специфични пре-Т и пре-В клетки, насочени срещу тестикуларни антигени. Следователно, имунната привилегия на тестиса, също така служи за предотвратяване на автоимунен тестикуларен отговор. Подобно на окото и мозъка, тестисите притежават бариера, т. нар. хемато-тестикуларна бариера. Тя се формира не от ендотелните клетки, а по-

скоро от Сертолиевите клетки, които постилат стените на извитите семенни каналчета, където се осъществява сперматогенезата. Хормоналната среда в тестиса, която е богата на андрогени, има инхибиращ ефект върху активността на макрофагите. Лайдиговите, Сертолиевите и перитубуларните клетки, които секретират трансформиращ растежен фактор бета (TGF-β), с което вероятно също допринася за имунната супресия в тестикуларната тъкан [Abbas et al, 2015].

Безплодието е глобален, здравен и демографски проблем, като приблизително 50% от случаите се дължат на влошеното качество на спермата [Zegers-Hochschild et al., 2009]. Различни хранителни фактори и диета-асоцииранoто затлъстяване увеличават риска от мъжки хипогонадизъм [Dardmeh et al.,2017]. Наред с това, слънчогледовото масло широко се използва при приготвянето на най-популярните пържени храни. Известно е, че интермитентното и непрекъснато пържене на растителните масла при приготвяне на храната изменя физиологичните и биохимичните им свойства, вследствие на получените химични промени в маслата [Sharoba & Ramadan, 2017; Dobarganes & Marquez-Ruiz, 2015; Rangel-Zuniga et al., 2014]. В тези проучвания е докладвано, че пърженето на растителни масла води до увеличаване на броя на реактивните кислородни радикали (ROS), които могат да бъдат причина за развитие на много патологични състояния [Kismali et al., 2009; Birben et al. 2012]. Сперматозоидите са много чувствителни към оксидативен стрес и пърженето на масла е много вероятно да повлияе негативно на сперматогенезата, оттам на качеството на спермата и броя на сперматозоидите [Chen et al., 2013]. Недостатъчният антиоксидантен отговор към формираните ROS причинява липидна пероксидация (LPO), която води до образуване на малондиалдехид (MDA), силно реактивна молекула и маркер за наличие на плазмена и тъканна липидна пероксидация [Kismali et al, 2009].

Хората в днешно време готвят храната си предимно чрез запържване с растителни масла и особено младите мъже във фертилна възраст се хранят в т. нар. fast-food заведения за бързо хранене, където основният начин за приготвяне на храната е запържване с растителни масла. Наред с другите причини за инфертилитет, много проучвания демонстрират, че диета богата на липиди и на запържени масла има вредни ефекти, които са асоциирани с влошаване

качествата на спермата и с намалени плазмени нива на тестостерон [Perumala Venkata and Subramanyam, 2016].

Многократно нагрятото растително масло, може да доведе до увеличаване на образуването на ROS, което е свързано с намаляване на елиминирането на радикалите и по този начин да причини клетъчни увреждания вследствие на оксидативен стрес. За да се противодейства на това, е важно да се повиши нивото на антиоксидантния капацитет.

Една от най-новите научни концепции в последните няколко години е взаимодействието на различни фактори по оста черва (вкл. и микробиотата) - мозък [Grenham et al., 2011]. Доказано е, че пробиотиците повишават антиоксидантния капацитет на организма, укрепват чревното здраве и имунната система, като правят възможно, организмът да се справи с много увреждащи биохимични процеси [Yen et al., 2009; Awney, 2011]. Те имат положителни ефекти върху антиоксидантните свойства и метаболизма на свободните радикали [Chen et al., 2012]. Проучвания върху експериментални модели с мишки докладват, че пробиотиците имат положителен ефект върху плодовитостта [Poutahidis et al., 2014; Bhandari et al., 2016]. Някои изследвания проведени с домашни птици показват, че антиоксидативните способности на пробиотиците могат да повишат броя на сперматозоидите и качеството на спермата [Haines et al., 2013; Poorghasemi et al., 2018].

Значителна е и ролята на ОС в патогенезата на болестта на Паркинсон (БП). Болестта на Паркинсон е една от най-често срещаните невродегенеративни заболявания, засягаща около 1,5% от човешката популация над 60 годишна възраст. Тя е асоциирана със загуба на допамин-секретиращи неврони в базалните ганглии (*substantia nigra).* Загубата на допаминергични неврони в *substantia nigra* води до понижаване на допаминовото ниво в стриатума. Счита се, че обширни участъци в ЦНС, различни невротрансмитери и други протеини, заедно с телцата на Lewy имат роля в патогенезата на БП, като симптоматиката не се ограничава само до нарушения в моторните функции [Kalia and Lang, 2015].

Алфа-липоевата киселина (LA), известна още като тиоктова киселина, е естествено срещащо се съединение. От откриването на антиоксидантните му свойства през 50-те години на миналия век, LA е широко проучена за лечение на диабетна невропатия, като антиоксидант и невропротективен агент [Tomassoni et al., 2013].

Много аспекти от ефектите на LA обаче все още трябва да бъдат изяснени, особено неговото приложение при лечението и предотвратяването на невродегенерация [Molz and Schroder, 2017]. Има някои противоречия в резултатите от тестването с LA при модели, третирани с 6-OHDA. Като пример може да се посочат in vitro проучвания, целящи да обяснят невропротективните механизми на LA, които демонстрират или активиране [Zhao et al., 2017], или инхибиране [Zhou and Cheng, 2019] на автофагия. LA демонстрира противовъзпалителни свойства и насърчава увеличаването на вътреклетъчното образуване на GSH, което е постулирано като полезно при невродегенеративните заболявания [De Araujo et al., 2011]. От друга страна, ефектът на LA върху нивото на GSH изглежда противоречив, тъй като по-ранните изследвания не успяват да потвърдят възстановяването или защитата на GSH срещу токсичност от 6-OHDA [Seaton et al., 1996].

Отрицателните ефекти на диетата с високо съдържание на мазнини (high-fat diet, HFD) и на запърженото масло върху здравето и положителните ефекти на пробиотиците са донякъде проучвани, особено при модели на затлъстяване [Sharoba & Ramadan, 2017; Chen et al., 2013].

Засега обаче са малко на брой проучванията, изясняващи следното: в каква форма слънчогледовото масло има по-неблагоприятен ефект върху репродуктивните способности на организма, дали приет във вид на рафинирано, термично необработено или във вид на запържено, по-конкретно върху показателите на спермограмата и серумната концентрация на тестостерон, и дали приложението на пробиотици има протективни ефекти върху репродуктивните показатели при хора и при експериментални животни, както и дали повлияват в благоприятен аспект негативните ефекти на оксидативния стрес? По отношение на ефектите на LA остава недоизяснена ролята и като

невропротектор и евентуално, дали би било уместно приложението му като адювантна терапия при болест на Паркинсон?

II. Литературен обзор

1. Термично обработени масла

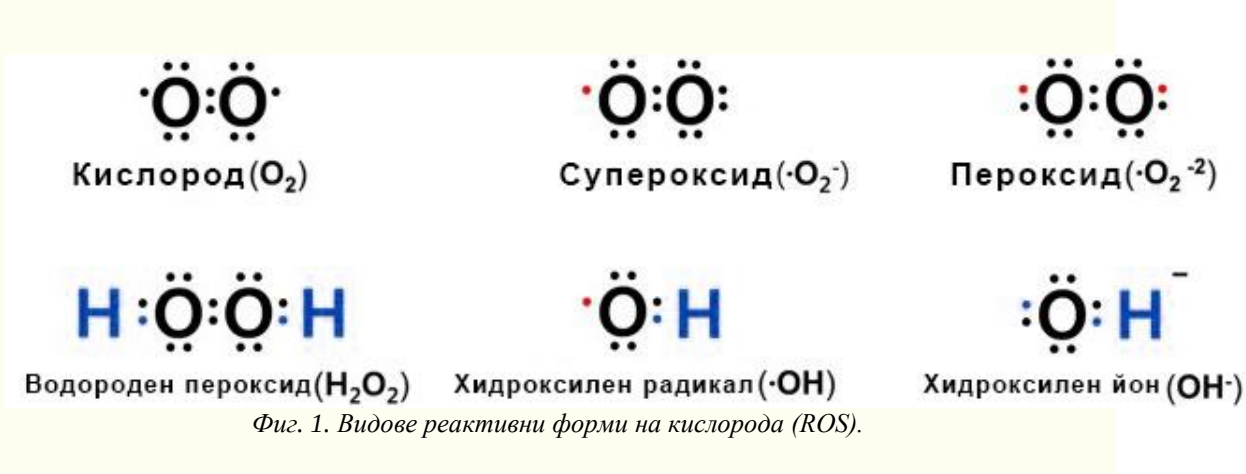
Загряването на готварското олио над определена температура може да промени физико-химичните му характеристики [Oboh et al., 2014; Falade & Oboh, 2015]. Устойчивостта и стабилността на различните масла за готвене към термично окисляване варира, тъй като това зависи от съставящите ги мастни киселини, като маслата с повече полиненаситени мастни киселини (PUFA) са по-податливи на термично окисляване [Vaskova and Buckova, 2015], а тези с повече наситени мазнини като палмовото масло са по-стабилни при високи температури [Matthaus, 2007]. Скоростта на термично окисление е много висока [Choe & Min, 2007] и се осъществява чрез верижна реакция, която генерира ROS. Въпреки че още от 80-те години на 20-ти век различни изследвания показват, че термичното окисление има негативен ефект върху качествата на маслата за готвене [Peers & Swoboda, 1982; Oboh et al., 2014], неправилната им употреба продължава.

2. Слънчогледово олио

Слънчогледовото олио, получено от семената на слънчоглед (Helianthus annuus), обикновено се използва за пържене и други кулинарни практики. Слънчогледовото олио е богат източник на PUFA (линолова киселина), които представляват около 59% от маслото. Други съставки на мастните киселини на слънчогледовото масло включват олеинова киселина (MUFA); палмитинова и стеаринова киселини (наситени мастни киселини). Въпреки че, високият дял на PUFA в слънчогледовото олио в сравнение с други масла се счита за предимство предвид неговите ползи за здравето, това обаче повишава неговата чувствителност към термично окисляване [Sadoudi et al., 2014]. Съобщава се, че нагряването на PUFA в присъствието на въздух предизвиква по-голяма степен на липидна пероксидация [Sadoudi et al., 2014], която представлява рисков фактор за човешкото здраве [Ramana et al., 2013].

3. Оксидативен стрес и видове реактивни форми на кислорода (ROS)

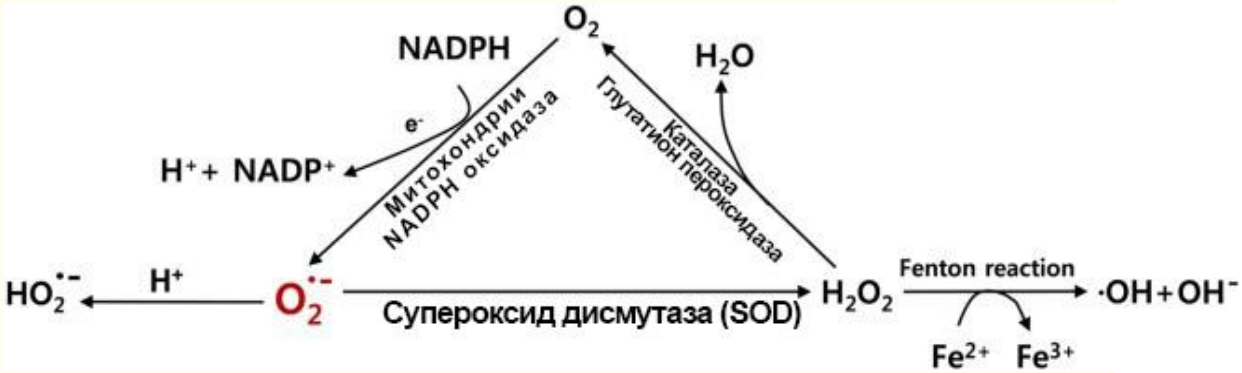
Оксидативния стрес представлява дисбаланс между образуване и обезвреждане на свободни радикали. С него са свързани различни типове клетъчно увреждане и патологични процеси – клетъчно стареене, неоплазия, невродегенеративни и други заболявания. Кислородът е податлив на образуване на радикали поради наличието на двата несвързани електрона, присъстващи във външната и електронна обвивка [Held, 2012]. Реактивните форми на кислорода (ROS) са дефинирани като група силно реактивни молекули, получени от кислорода [Bolisetty & Jaimes, 2013], които обикновено са краткотрайни и силно реактивни поради несдвоените си валентни електрони [Patten et al., 2010]. ROS включват, но не се ограничават до свободни радикали (супероксид, O_2-), хидроксилен радикал (·OH) или нерадикали (водороден пероксид, H_2O_2) и др., [Gandhi & Abramov, 2012; Bolisetty & Jaimes, 2013; Halliwell, 2006], (фиг. 1).



Фиг. 1. Видове реактивни форми на кислорода (ROS).

Предполага се, че супероксидът ($\cdot O_2^-$) играе основна роля при производството на ROS. $\cdot O_2^-$ може да се трансформира в по-стабилната форма H_2O_2 чрез супероксидна дисмутаза (SOD), (фиг. 2). Той може също да бъде протониран, образувайки хидропероксилен радикал (HO_2^-). H_2O_2 има потенциал да генерира високореактивни хидроксилни радикали (·OH), [Patten et al., 2010], но в същото време може да бъде преобразуван в H_2O и O_2 чрез каталаза, глутатион пероксидаза и други пероксидази [Song & Zou, 2015], (фиг. 2). За ·OH е известно, че е един от най-реактивните ROS, които са отговорни главно за цитотоксичните ефекти на ROS [Bolisetty & Jaimes, 2013]. ·OH може да се генерира от H_2O_2 и $O2^-$ и се метаболизира от йони на желязо чрез реакцията на

Fenton, която представлява Fe_2^+ - медиирано разлагане на H_2O_2 [Zorov et al., 2014].



Фиг. 2. Генериране на реактивни кислородни радикали. Супероксидният радикал ($\cdot O_2^-$) се генерира от O_2 като страничен продукт в в дихателните вериги на митохондриите или чрез NADPH ооксидазата. Чрез супероксиддисмутазата (SOD), суперкосидният радикал (O_2^-) може да се трансформира във водороден пероксид (H_2O_2), който по-нататък се трансформира в редица други реактивни радикали (ROS), като напр. хидроксилен радикал ($\cdot OH$) и хидроксилни аниони (OH^-).

4. Образуване на ROS на ниво митохондрии

Митохондриите са основният източник на продукция на ROS в повечето клетки. При нормално физиологично състояние до 2% от общата кислородна консумация на клетъчните митохондрии може да бъде свързана с генерирането на ROS, включително O_2^- [Orrenius, 2007; Widlansky & Gutterman, 2011; Cadenas & Davies, 2000]. Предложени са множество начини за производство на митохондриални ROS, които се модулират главно от комплексите на дихателната верига на митохондриите [Widlansky & Gutterman, 2011; Cadenas & Davies, 2000; Mancuso et al, 2006].

Митохондриалната електронна транспортна верига (ETC) се състои от пет комплекса, включващи NADH-коензим Q редуктаза (NADH дехидрогеназа, комплекс I), сукцинат-дехидрогеназа (комплекс II), коензим Q-цитохром С редуктаза (комплекс III), цитохром С оксидаза (комплекс IV) и АТФ синтаза (комплекс V) [Song & Zou, 2015; Mani, 2015].

Комплекс I е отговорен за ROS производството на супероксид (O_2^-), [Bolisetty & Jaimes, 2013; Quinlan et al., 2013] и улеснява преноса на електрон от NADH към CoQ. По време на този етап протоните се транспонират от матрикса в интермембранното пространство [Bolisetty & Jaimes, 2013]. Комплекс II участва в редукцията на CoQ и се знае, че участва в производството на малко количество O_2^- [McLennan & Degli Esposti, 2000; Yankovskaya et al, 2003]. Комплекс III, от друга страна, участва в генерирането на O_2^- в междумембранното пространство. Генерирането на $\cdot O_2^-$ е особено засилено, когато преносът на електрони намалява с увеличения потенциал на мембраната [Bolisetty & Jaimes, 2013].

Интересно е, че капацитетът на тези ензими да произвеждат ROS може да варира в различните органи или по време на болестни състояния [Turrens, 2003]. Например, изглежда, че комплекс I допринася за производството на повечето от $\cdot O_2^-$ в мозъка, докато комплекс III се счита за основен източник на $\cdot O_2^-$ в сърцето и белите дробове [Turrens, 2003]. В допълнение, в рамките на митохондриите, ЕТС комплекс I и III се считат за основни производители на $\cdot O_2^-$ [Song & Zou, 2015]. Производството на ROS от комплекс I е приблизително половината от това на комплекс III при здрави възрастни [Song & Zou, 2015], докато комплекс I упражнява основната роля в продукцията на ROS при патологични условия, вариращи от ускорено стареене до невродегенеративни заболявания [Zorov et al., 2014].

5. NADPH оксидази (Nox)

Известно е, че Nox, трансмембранен ензимен комплекс, е друг важен ендогенен източник на производство на $\cdot O_2^-$ в резултат на катализирането на прехвърлянето на електрон от NADPH към кислородна молекула [Infanger et al, 2006; Babior, 2004]. Nox се открива във високо концетрации във фагоцити (неутрофили, еозинофили, моноцити и макрофаги, наречени Phox или NOX2), както и в ендотела на сърдечно-съдовата тъкан [Babior, 2004; Lambeth, 2004]. Досега в клетките на бозайниците са идентифицирани седем Nox изоформи, включително Nox1 до Nox5 и двойни оксидази (Duox1 и Duox2) [Lambeth, 2004].

Всяка изоформа Nox има уникална клетъчна локализация, регулация и функция [Song & Zou, 2015, Song & Zou, 2012]. Например, Nox4 и Nox2 са в изобилие при ендотелните клетки, докато Nox1 е значително по-рядък [Gorlach et al, 2000; Bengtsson et al, 2003]. За разлика от това, Nox1 и Nox4 са по-застъпени от Nox2 в съдовите гладкомускулни клетки [Wingler et al, 2001]. Nox2, който се експресира главно във фагоцити и произвежда големи количества ROS, може да помогне за убиването на чуждите организми като част от имунната защита [Patten et al, 2010; Babior, 2004]. От друга страна, в сърдечно-съдовата тъкан Nox произвеждат сравнително малки количества ROS, но с бавна и устойчива скорост и те играят роля на вътреклетъчни сигнални молекули [Patten et al., 2010].

Предишни проучвания показват, че Nox4 е една от най-често срещаните изоформи в сърдечно-съдовата система [Song & Zou, 2012; Van Buul et al, 2005; Clempus et al, 2007; Ellmark et al, 2005; Bedard & Krause, 2007] и генерира главно H_2O_2, а не - $\cdot O_2^-$ [Gordillo et al, 2010; Dikalov et al, 2008].

6. Ксантин оксидаза (XO)

XO и ксантин дехидрогеназа (XDH) са взаимнозаменяеми форми на ксантин оксидоредуктаза [Abramov et al, 2007]. XO е отговорен за катаболизма на пурините чрез превръщане на хипоксантин в ксантин и ксантин в пикочна киселина [Dasuri et al, 2013;]. XO отдава електрони на кислорода и впоследствие генерира O_2^- и H_2O_2 в клетката [Harrison, 2004;]. При нормални условия ензимът присъства под формата на XDH [Gandhi & Abramov, 2012].

Участието на XO в ROS-медиирани заболявания е асоциирано с повишеното ниво на вътреклетъчен калций, когато в случай на исхемично увреждане енергийният статус на клетката се наруши и трансмембранните градиенти започнат да се изменят. Повишеният вътреклетъчен калций може да доведе до необратимото превръщане на XDH в XO, което катализира окисляването на хипоксантин до ксантин [Ghandi & Abramova, 2012; Harrison, 2002]. По-специално по време на реперфузия кислородът се редуцира до радикалните му форми - H_2O_2 и $\cdot O_2^-$, в присъствието на XO [Ghandi & Abramova, 2012; Harrison, 2004; Harrison, 2002]. Повишените нива на ROS могат да допринесат за по-нататъшно увреждане на тъканите.

7. Производство на ROS в ендоплазмения ретикулум

Ендоплазменият ретикулум (ER) е мембранно базирана вътреклетъчна органела, която е свързана преди всичко с протеиновото нагъване и липидната биосинтеза [Mani, 2015; Bhandary et al, 2012]. ER може да генерира ROS, чрез два основни механизма [Bhandary et al, 2012]. Първо, в ER протеини с роля за стабилност на мембраната се нагъват и се формират дисулфидни връзки, като този процес се извършва от ER оксидоредуктаза-1 (ERO-1) и протеин-дисулфид-изомераза (PDI), [Bhandary et al, 2012]. Тъй като електроните се прехвърлят от тиолна група към кислород чрез ERO-1 и PDI [Bhandary et al, 2012], ROS може да се получат като страничен продукт. Второ, ROS се произвежда също и от неправилно сгъване на протеини, особено в случаите на изчерпване на глутатиона (GSH) [Bhandary et al, 2012]. Окислените тиоли се регенерират от глутатиона (GSH), за да могат да взаимодействат отново с ERO-1 и PDI [Bhandary et al, 2012]. Тези стъпки могат да инициират повтарящи се цикли на разкъсване и образуване на дисулфидна връзка в лумена на ER и да доведат до образуване на големи количества ROS като страничен продукт [Bhandary et al, 2012; Higa & Chevet, 2012]. Следователно протеините, които имат множество дисулфидни връзки, са свързани с по-висок риск от производството на ROS [Bhandary et al, 2012]. Тъй като GSH се използва за намаляване на неправилно образувани дисулфидни връзки, особено в окислителна среда, то нивото на GSH се намалява допълнително и в тази ситуация може да се генерира повече ROS [Gordillo et al, 2010]. Освен това, тъй като процесът, участващ в окислителното нагъване на протеин в ER може да бъде силно енергийно зависим, трябва да се отбележи, че изчерпването на аденозин трифосфат (АТФ), причинено от нагъване на протеини, може да стимулира окислителното фосфорилиране в митохондриите и следователно да доведе до формиране на повече ROS [Bhandary et al, 2012; Malhorta & Kaufman, 2007].

8. Производство на ROS в пероксизоми

Пероксизомите присъстват в повечето еукариотни клетки и участват в множество метаболитни пътища, включително окисляване на мастни киселини,

фосфолипидна биосинтеза, катаболизъм на аминокиселини и окислително-редукционните реакции в пентозофосфатния цикъл [Mani, 2015; Shrader & Fahimi, 2006].

При нормални физиологични условия консумацията на кислород в пероксизомите може да доведе до производството на H_2O_2, но не и O_2^-. Пероксизомите са едни от органелите, които могат да генерират по-голямата част от H_2O_2 в организма, използвайки редица оксидази, като ацил-CoA-оксидази, D-аспартат-оксидаза и уратна оксидаза, което кара водорода да бъде прехвърлен към O_2 от съответните им субстрати [Mani, 2015]. В допълнение, пероксизомите съдържат и каталази, които могат да разграждат H_2O_2 и спомагат за поддържане на баланса между производството и отстраняването на ROS [Shrader & Fahimi, 2006; Valko et al, 2007]. Когато пероксизомите са повредени и количеството на каталазите намалява, увеличеното освобождаване на H_2O_2 в цитозола може да допринесе за оксидативен стрес в клетката [Valko et al, 2007].

9. Антиоксидантна защита на организма

Клетъчните нива на ROS могат да бъдат намалени чрез защитните механизми на антиоксидантните ензими и антиоксидантните витамини [Ghandi & Abramova, 2012]. $\cdot O_2^-$радикал може да бъде инактивиран от SOD, при което се получава H_2O_2. След това H_2O_2 може да бъде отстранен чрез действието на глутатион пероксидази, каталаза и пероксиредоксини [Power & Blumbergs, 2009].

10. Супероксид дисмутаза (SOD)

SOD играе важна роля за катализирането на разграждането на силно реактивни $\cdot O_2^-$ до по-малко реактивните H_2O_2 и кислород [Dasuri et al, 2013]. Цитозолната мед/цинк-SOD (SOD1), митохондриалната манган-зависима SOD (SOD2) и извънклетъчната SOD (SOD3) са трите най-широко проучвани изоформи на SOD. SOD1 и SOD2 участват главно в елиминирането на $\cdot O_2^-$ съответно в цитозола и митохондриите [Dasuri et al, 2013].

11. Глутатион пероксидази (GPX)

GPX са семейство от множество изоензими, които катализират редукцията на H_2O_2 и липидните пероксиди, използвайки GSH като донор на електрони [Ghandi & Abramova, 2012; Dasuri et al, 2013]. GPX се намират както в цитозола, така и в митохондриите. При бозайниците има пет различни изоформи на селен-зависими глутатион пероксидази (GPX1-4 и 6) и три неселенови форми (GPX 5, 7 и 8), които имат цистеин вместо селеноцистеин [Brigelius-Flohe & Maiorino, 2013]. Антиоксидантната функция на GPX зависи от изоформата и местоположението в клетките; GPX1 съществува универсално в цитозола и митохондриите, GPX2 - в епителa на червата, а GPX3 - в плазмата [Brigelius-Flohe & Maiorino, 2013].

Трябва да се отбележи, че GPX1 е един от основните антиоксидантни ензими в мозъка, който се експресира предимно в микроглията, но не и в невроните [Power & Blumbergs, 2009]. Проучванията сочат, че регулирането на GPX1 може да бъде една от защитните реакции срещу увреждане на невроните [Power & Blumbergs, 2009].

12. Каталаза

Каталазата е отговорна за превръщането на H_2O_2 във вода и кислород, използвайки желязо или манган като кофактор [Ghandi & Abramova, 2012; Dasuri et al, 2013; Droge, 2002;]. Каталазата се намира в пероксизомите, цитоплазмата и митохондриите [Ghandi & Abramova, 2012]. Ролята на каталазата е малка при ниски нива на H_2O_2, но много голяма при по-високи нива на H_2O_2 [Ghandi & Abramova, 2012].

13. Пероксиредоксини (PRX)

PRX са тиол-специфични пероксидази, които катализират редукцията на H_2O_2, както и на други органични хидропероксиди и пероксинитрити [Dasuri et al, 2013; Espinosa-Diez et al, 2015; Wood et al, 2003]. Сред шестте PRX изоформи PRX1, 2 и 4 присъстват в цитоплазмата, както и в ядрата на клетките. В допълнение, PRX1 се експресира и в митохондриите и пероксизомите, докато

PRX4 се намира в лизозомите [Espinosa-Diez et al, 2015]. PRX3 е изключително локализиран в митохондриите [Espinosa-Diez et al, 2015; Oberley et al, 2001], а PRX5 се намира в митохондриите, цитоплазмата, ядрата и пероксизомите [Seo et al, 2000].

Всички PRX използват консервативен остатък от цистеин в активното си място, с което да да намаляват директно пероксида [Hall et al, 2011]. Тъй като PRX са в изобилие в еукариотните клетки, те съставляват приблизително повече от 1% от клетъчните протеини и показват висока реактивност. PRX са отговорни за намаляването до 90% на митохондриалния H_2O_2 и почти 100% от цитоплазмения H_2O_2 [Hall et al, 2011; Winterbourn & Metodiewa, 1994; Winterbourn, 2008; Marinho et al, 2014].

14. Глутатион (GSH)

GSH е трипептид, синтезиран от глутамат, цистеин и глицин, който упражнява защитна функция на оцеляването на клетките срещу оксидативен стрес [Ghandi & Abramova, 2012; Dasuri et al, 2013]. GSH участва в следните два типа реакции: първо, GSH в редуцираната си форма реагира неензимно с ROS, като O_2^- и · OH, и ги дезактивира. При този процес ROS окисляват две молекули GSH, с което генерира глутатион дисулфид (GSSG), [Ghandi & Abramova, 2012; Dringer et al, 2000]. Второ, в реакцията на GPX, GSH е донорът на електрони за редукция на пероксидите [Dringen, 2000]. GSH може да се регенерира от GSSG, чрез реакцията с глутатион редуктаза, която прехвърля електрони от NADPH към него [Dringen, 2000; Dringen & Hirrlinger, 2003]. Няколко проучвания съобщават, че GSH участва в инхибирането на апоптотичната клетъчна смърт [Abramov et al, 2007; Presnell et al, 2013] и предпазва от увреждане на ДНК в клетките след оксидативен стрес [Presnell et al, 2013; Song et al, 2014].

15. Алфа-липоева киселина

Алфа-липоевата киселина (LA) притежава полезното свойство да неутрализира свободните радикали, без да се превръща в свободен радикал [Shay et al., 2009]. При окисляване с ROS и прооксиданти LA може да бъде възстановена от дихидролипоева киселина и други нейни редуцирани форми

[Bjorklund et al., 2019]. Дихидролипоевата киселина представлява голям интерес като чистач на супероксидни и пероксилни радикали и като усилвател на рециклирането на витамин Е [Packer et al., 2001]. Освен това LA има потенциална роля като хелатор на метали и възстановява нормалните нива на вътреклетъчния GSH и аскорбиновата киселина чрез неензимна регенерация след изчерпване, причинено от токсични вещества, замърсители на околната среда или от стареене [Tibullo et al., 2014].

LA е директен и непряк антиоксидант, който е в състояние да увеличи експресията на антиоксидантните ензими и да регулира експресията на протеини, участващи в енергийния метаболизъм, митохондриалната биогенеза и структурната цялост на митохондриите. Всички тези ефекти са медиирани както от антиоксидант-респонсивен елемент (ARE; Keap / Nrf2 път), така и от коактиватор-1 алфа на активирания рецептор, активируем от пероксизомни пролифератори-гама (PGC-1 алфа), [Phillipson, 2014].

LA се счита за мощна субстанция, която проявява редица фармакологични свойства. Тя оптимизира използването на въглехидрати и мастни киселини, като по този начин подпомага енергийния метаболизъм. Освен това, LA подпомага синтеза на аденозин трифосфат, намалявайки оксидативния и нитрозативен стрес, противодейства на неправилното конформиране на протеини, на възпалителните стимули, желязото и различни токсини от околната, и ендогенна среда. Мета-анализи показват някои благоприятни ефекти върху гликемични и възпалителни биомаркери [Rahimlou et al., 2019; Haghighatdoost and Hariri, 2019] и подобряване на липидния профил [Mousavi et al., 2019]. В областта на неврологията съществуват клинични доказателства главно за лечение на диабетна полиневропатия с LA [Han et al., 2012].

16. Витамин Е

Витамин Е е липоразтворим антиоксидант, който може да намали ефектите на пероксида и да предпази клетъчните мембрани от липидна пероксидация [Ghandi & Abramova, 2012; Dasuri et al, 2013]. Витамин Е

присъства в съдържащите липиди храни и като мастноразтворим витамин може да се натрупва в мастните тъкани на животни и хора. Групата на витамин Е (т.е. хроман-6-ол), колективно наричани токохроманоли (разделени на токофероли и токотриеноли), включва всички токолови и токотриенолови производни, които проявяват свойствата на биологичната активност на d-алфа-токоферол. Съществуват осем естествено срещащи се форми на витамин Е, а именно алфа, бета, гама и делта класове токоферол и токотриенол, които се синтезират в растенията от хомогентизинова киселина. Алфа- и гама-токоферолите са двете основни форми на витамин Е.

Най-богатите хранителни източници на витамин Е са растителните масла, тъй като те съдържат всичките му различни прозводни в различни пропорции [Rizvi et al., 2014]. Алфа- и гама-токофероли се откриват в кръвния серум и в червените кръвни клетки, като алфа-токоферол е в най-висока концентрация. Бета- и делта-токофероли се откриват в плазмата само в минимални концентрации. Преференциалното разпределение на алфа-токоферол в сравнение с другите форми на токоферол се дължи на по-бързия метаболизъм на тези форми, както и на наличието на алфа-токоферолoвия трансферен протеин (α-TTP). Поради високия афинитет на свързване на алфа-токоферол с алфа-TTP, по-голямата част от абсорбираните бета-, гама и делта-токофероли се екскретират в жлъчката и се отделят с фекалиите, докато алфа-токоферолът до голяма степен се отделя с урината. Алфа-токоферолът също така се натрупва и в извънчернодробните тъкани, особено на места, където производството на свободни радикали е най-голямо, като например в мембраните на митохондриите и ендоплазматичния ретикулум на клетките в сърцето и белия дроб [Rizvi et al., 2014].

Витамин Е е мощен антиоксидант, който инхибира производството на реактивните кислородни форми по време на окисление на липидите и по време на протичане на самите окислителните реакции [Burton et al., 1983]. Той е локализиран преди всичко в мембраните на клетката и органелите, където може да упражни максималния си защитен ефект, дори в концентрация равна само на една молекула на всеки 2000 фосфолипидни молекули. Витамин Е действа като първа линия на защита срещу липидната пероксидация на клетъчните мембрани. Благодарение на своята активност спрямо пероксилните радикали,

той също така защитава полиненаситените мастни киселини, присъстващи в мембранните фосфолипиди и плазмените липопротеини [Tran et al., 1996].

Образуваните в резултат на активността на витамин Е токофероксилни радикали могат да окисляват други липиди, да се подложат на по-нататъшно окисление, което води до формиране на токоферил хинони, да образуват нереактивни токоферолови димери чрез взаимодействие с друг токофероксилов радикал или да бъдат редуцирани от други антиоксиданти до токоферол. Участвайки в превенцията на образуване на окислени фосфолипиди, витамин Е поддържа интегритета на клетъчните мембрани. Установено е, че алфа-токоферол има роля и в регулацията на тромбоцитната агрегация. Увеличената му концентрация в ендотелните клетки инхибира агрегацията на тромбоцитите и обуславя освобождаването на простациклин (PGI_2). Счита се, че този ефект се получава поради потискане експресията (down-regulation) на вътреклетъчните адхезионни молекули (ICAM-1) и на съдово-клетъчните адхезионни молекули (VCAM-1), намалявайки по този начин адхезията на кръвните клетки към ендотела на съдовата стена. В допълнение на това, поради стимулиране активността на ензимите фосфолипаза А2[Freedman et al., 1996]. и циклооксигеназа-1[Li et al., 2001] се увеличава образуването на PgI_2, който е мощен вазодилататор и инхибитор на тромбоцитната агрегация [Brigelius-Flohe and Traber, 1999].

17. Витамин С

Витамин С е водоразтворим антиоксидант, който участва в отстраняването на свободните радикали чрез пренос на електрони и също така действа като кофактор на редица антиоксидантни ензими [Song & Zou, 2015; Dasuri et al, 2013]. Химически, витамин С е донор на електрони или редуциращ агент и електроните от аскорбат обуславят всичките му известни физиологични ефекти. Тъй като електроните от витамин С могат да редуцират окислените видове или окислителите, той често се означава като антиоксидант, но тази терминология е подвеждаща.

Електроните от аскорбат могат да редуцират метали, напр. мед и желязо, което води до образуването на супероксид и водороден пероксид, и с резултат последващо генериране на реактивни кислородни форми [Vissers and Das, 2018].

Така при някои обстоятелства аскорбатът, като действа като редуциращ агент, ще генерира окислители. Тази активност на витамин С се проявява in vivo, когато фармакологичните концентрации на аскорбат, в милимоларен диапазон се постигат в плазмата и в извънклетъчните течности, и може да се наблюдава и с физиологична концентрация на аскорбат в клетъчна култура, когато в нея има метали [Parrow et al., 2013]. Аскорбатът отдава електрони последователно. Когато се загуби един електрон, първият продукт е аскорбатен радикал. Повечето радикални видове имат кратък живот под една милисекунда. Аскорбатният радикал е различен, тъй като полуживотът му може да бъде много секунди или дори минути, в зависимост от липсата на кислородни и електронни акцептори, особено желязо [Padayatty and Levine, 2016].

При някои условия аскорбатният радикал може да бъде измерен в проби от кръв и извънклетъчна течност [Chen et al., 2007]. Когато се загуби втори електрон се образува по-стабилно съединение в сравнение със свободния радикал на аскорбат. Образуваното съединение е дехидроаскорбинова киселина, която съществува в хидратирана и дехидратирана форма. Дехидроаскорбиновата киселина има афинитет към глюкозни транспортери с улеснен транспорт и се транспортира от редица от тях [Corpe et al., 2013]. Както дехидроаскорбиновата киселина, така и аскорбатният радикал реверсивно се редуцират до аскорбат. Полуживотът на дехидроаскорбиновата киселина е само минути, поради хидролитичното разкъсване на пръстена му. След като веднъж пръстенната структура се загуби, продуктът 2,3-дикетогулонова киселина не може да възстанови своите прекурсори, а именно дехидроаскорбиновата киселина, аскорбатния радикал и аскорбат [Padayatty and Levine, 2016].

Аскорбиновата киселина функционира и като ензимен кофактор, включително и като косубстрат на ензимни реакции. При бозайници и човек аскорбатът действа като електронен донор за около петнадесет ензима [Englard & Seifter, 1986; Levine, 1986], между които две монооксигенази (допамин β-хидроксилаза, пептидил α-амидираща монооксигеназа), дванадесет диоксигенази и една аминооксидаза [Levine et al., 2006]. Витамин С катализира ензимната пост-транслационна модификация на проколагена, с което води до секретиране в адекватни количества на структурно нормален колаген от клетки, продуциращи колаген [Prockop & Kivirikko, 1995].

Наред с ролята си в хидроксилирането на колагена, витамин С участва и в хидроксилирането на специфични пролинови остатъци на хипоксия-индуцирания фактор – 1 алфа (HIF-1 α) чрез дейността на пролил-4-хидроксилази. Тези ензими съдържат нехемово желязо и изискват аскорбат, молекулен кислород и 2-оксоглутарат [Dengler et al., 2014]. HIF-1 от своя страна се регулира отрицателно от фактор, инхибиращ HIF (FIH). FIH е хидроксилаза, която също изисква аскорбат [Flashman et al., 2010].

При милимоларни плазмени концентрации или фармакологични концентрации, витамин С действа като прооксидант. Проучванията върху животни показват, че само тези фармакологични концентрации на аскорбат произвеждат аскорбатен радикал и водороден пероксид в извънклетъчната течност [Chen et al., 2005]. Фармакологичните концентрации на аскорбат имат антитуморна активност *in vitro* и при проучвания върху животни [Chen et al., 2008;Parrow et al., 2013; Yun et al., 2015].

18. Физиологични функции на ROS

Ниските до умерените нива на ROS са необходими за клетъчната сигнализация и оцеляването на клетката [Song & Zou, 2015; Patten et al, 2010; Valko et al, 2007; Groeger et al, 2009]. Например, произведените от Nox ROS, имат роля в клетъчната сигнализация, свързана със сърдечно-съдовите системи [Song & Zou, 2012], а тези във фагоцити (получени от Nox2) участват в защитните механизми на имунната система срещу чужди организми [Babior, 2004]. Освен това повишеното ниво на произведените от Nox ROS активира важни пътища за оцеляване, като например митоген-активирани протеин кинази (MAPK), [Patten et al., 2010]. MAPK, специфични серин / треонин протеин кинази, представляват основните редокс-регулирани сигнални молекули в сърдечно-съдовата система [Manea, 2010]. Те също така модулират различни клетъчни активности, включително генна експресия, митоза, пролиферация, миграция, клетъчна преживяемост и апоптоза [Patten et al, 2010; Groeger et al, 2009; Lassegue & Griendling, 2010].

Освен това ROS може да активират транскрипционни фактори, които регулират клетъчния отговор към ROS [Patten et al., 2010]. Следователно увеличената ROS може да насърчи антиоксидантните защитни процеси. Пример

е NF-E2-асоцииран фактор 2 (Nrf2), който е един от основните редокс-чувствителни транскрипционни фактори. Активира се от ROS и модулира експресията на няколко антиоксидантни ензима, включително SOD, PRX, GPX и хем-оксигенази [De Vries et al, 2008; Hyberston et al, 2011]. Супресорният Kelch-подобен ECH-асоцииран протеин 1 (Keap1), който е разположен в цитоплазмата, предотвратява транслокацията на Nrf2 към ядрото и поддържа Nrf2 неактивен при нормални условия [Hyberston et al, 2011]. Повишената продукция на ROS нарушава свързването между Keap1 и Nrf2, което позволява транскрипция чрез активиране на Nrf2 [Patten et al, 2010; Itoh et al, 1999].

Ядрения фактор-капа B (NF-κB) е друг транскрипционен фактор необходим за клетъчното оцеляване, който може да се активира от ROS [Patten et al., 2010]. NF-κB обикновено присъства в цитоплазмата като неактивно състояние под действието на NF-κB инхибитор. Умерените нива на ROS могат да индуцират фосфорилирането и разграждането на NF-κB инхибитора и да доведат до активиране на NF-κB [Bubici et al, 2006]. Активираният NF-kB транскрибира антиапоптотични протеини и инхибира каспаза-асоциираната клетъчна смърт [Patten et al, 2010; Kriete & Mayo, 2009]. За разлика от това, високите нива на ROS могат да допринесат за инактивиране на NF-κB чрез инхибиране на свързването му с ДНК и следователно насърчават на апоптозата [Toledano & Leonard, 1991]. В тази връзка ролята на активирането на NF-kB в отговор на оцеляването на клетката зависи от степента на образуването на ROS [Kriete & Mayo, 2009].

19. Оксидативен стрес: прекомерно натрупване на ROS

При здрави хора производството на ROS се балансира от различни антиоксидантни системи [Ghandi & Abramova, 2012; Dasuri et al, 2013]. Оксидативният стрес е състояние на дисбаланс между производството на ROS и антиоксидантните защитни сили, което води до прекомерно натрупване на ROS [Dasuri et al, 2013; Ray et al, 2012]. Оксидативният стрес може да бъде свързан с увреждане на клетъчната мембрана от пероксидацията на липидите, промени в структурата и функцията на протеините поради протеиново окисление и структурно увреждане на ДНК [Ghandi & Abramova, 2012].

20. Роля на затлъстяването и асоциираната чревна дисбиоза за развитие на безплодие

Безплодието се определя като невъзможност за постигане на бременност след 1 година на редовен и незащитен полов акт. [Rowe et al., 1993]. То е свързано с различни емоционални, физикални и социо-културни проблеми [Slade et al., 2007] и засягаа 15% от двойките в световен мащаб [Mascarenhas et al., 2012]. Глобалното разпространение на мъжкия инфертилитет варира между 2,5% -15%, съответстващо на поне 30 милиона безплодни мъже по целия свят. [Agarwal et al., 2015]. Мъжкият фактор (когато причината за безплодие е у мъжа) е отговорен за това в приблизително 40% от случаите на инфертилитет. Като сновна причина се посочва затлъстяването при мъжа, което често се съпътства с редуциране на броя на сперматозоидите [Sermondade et al., 2013] и увеличени нива на увредена ДНК в тях [Dupont et al., 2013], както и до епигенетични промени с възможни дълготрайни последици за бъдещите потомци, ако концепцията бъде осъществена [Bakos et al., 2011].

При използване методите на асистираната репродукция се установява, че, мъжкото затлъстяване е асоциирано с намалени нива на живородени бебета след, дори след редуциране на телесната маса на бъдещите майки преди бременността [Bakos et al., 2011; Taha et al., 2016]. Това е от особено значение, тъй като в развитите страни делът на мъжете в репродуктивна възраст с наднормено тегло или затлъстяване превишава 50% и има тенденция да се увеличава в бъдеще [Australian Bureau of Statistics, 2017-18].

Наскоро направен мета-анализ на 52 експериментални проувания с опитни животни, в които е изследвано влиянието на диета богата на мазнини (high-fat diet, HFD) върху репродуктивните им способности, са показали, че затлъстяването е асоциирано с намалено качество на спермата и намален фертилитет [Crean and Senior, 2019]. Kahn and Branningan [2017] установяват, че фактори, които се секретират от адипозната тъкан, като адипокини и лептин, участват в регулацията на възпалението и производството на тестостерон. Развитието на системното възпаление води до увеличена продукция на свободни кислородни радикали (ROS) и в резултат на това до фрагментация на ДНК на сперматозоидния пронуклеус. Увеличената тестикуларна температура и

намалената физическа активност също оказват негативни ефекти върху сперматогенезата [Kahn and Branningan, 2017].

Животински и човешки експериментални модели за изследване влиянието на HFD и на диетата богата на въглехидрати са установили, че тези хранителни режими могат да доведат до развитие на метаболитни нарушения, както и до промени в структурата и състава на чревната микробиота [Zhang et al., 2012]. Скорошни проучвания демонстрират, че чревната микробиота участва в патогенезата на различни метаболитни и сърдечно-съдови заболявания [Muscogiuri et al., 2019]. Микрофлората в червата има важна роля в регулацията на складиране на липидите [Backhed et al., 2004], в увеличаването на добива на енергия и активиране на формирането на субстрати за синтез на липиди за съхранение [Turnbaugh et al., 2006]. В допълнение на това, чревната микробиота произвежда съединения, абсорбиращи се в системната циркулация, които се асоциират с развитието на нарушения, свързани със затлъстяването, тъй като водят до възпалителен отговор и инсулинова резистентност [Khan et al., 2016].

Затлъстяването оказва негативно влияние на чревната микробиота, като намалява разнообразието на видовия му състав, водещ на свой ред до намалена консумация на метаболитна енергия от микрофлората на индивидите с наднормено тегло в сравнение с тази на индивиди с нормална телесна маса [Boroni et al., 2012]. Микробиотата участва в ефективната ферментация и смилане на несмилаемите въглехидрати във вид на късоверижни мастни киселини и по този начин доставя на гостоприемника излишък от енергийни субстрати, което на свой ред води до развитието на затлъстяване [Backhed et al., 2004]. Затлъстяването се разглежда и като най-честата причина за тестостеронов дефицит (ТД) в развитите страни, като повече от половината от затлъстелите мъже са с такъв недостиг [Corona et al., 2015].

Големи епидемиологични проучвания са установили взаимовръзка между затлъстяването и системното възпаление, като това е било демонстрирано с високи плазмени концентрации на С-реактивен протеин (CRP) и с ниски концентрации на тестостерон [Bobjer et al., 2013], докато приложението на проинфламаторни цитокини (IL-6) у мъже [Veldhuis et al.,

2016] или в ин-витро среда с култура от Лайдигови клетки [Hales, 2002], са демонстрирали редуциране на тестостероновата продукция. Предполага се, че възпалението е отговорно за развитието на мъжкия хипогонадизъм, тъй като редица проучвания са показали връзката между острите и хронични възпалителни процеси (сепсис, изгаряне, автоимунни заболявания) с ТД [Christeff et al., 1988].

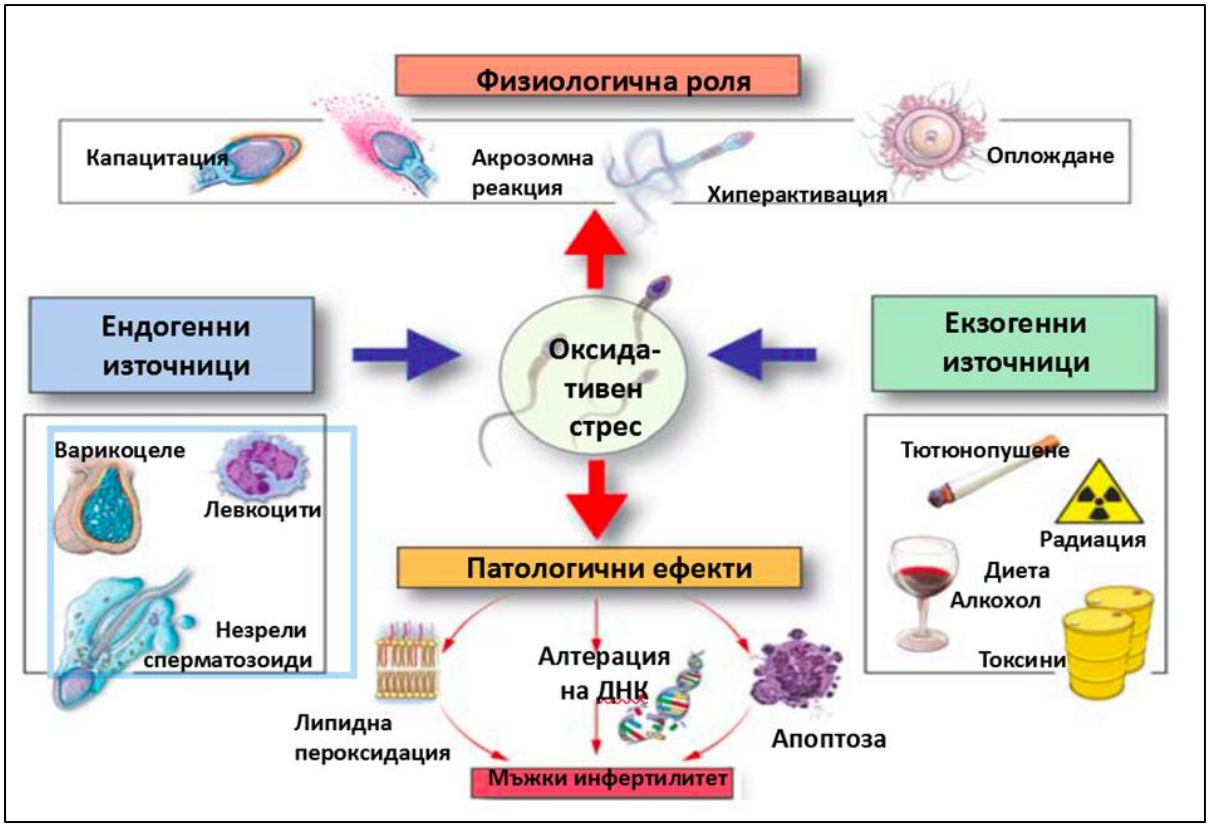
Tremellen [2016], изказва хипотезата, че наличният в червата бактериален ендотоксин, известен още като липополизахарид (LPS) е най-вероятният ключов индуциращ фактор, отговорен за ТД при затлъстели мъже. Установено е, че при затлъстяване се наблюдава нискостепенно възпаление, което е следствие от увеличения пасаж на ендотоксин от чревния лумен към системната циркулация, състояние означавано, като метаболитна ендотоксемия [Boutagy et al., 2016].

Човешките черва съдържат средно около 1,5 кг (100 трилиона) бактерии, като 70% от тях са Gram-негативни и съдържат голямо количество от мощния имунен стимулант LPS [Tremellen, 2016; Boutagy et al., 2016].Тези микроорганизми участват в модулирането на редица физиологични процеси, като доставка на енергия [Turnbaugh et al.,2006], поддържане интегритета на чревната стена [Cani, 2012], регулиране на гостоприемниковия имунитет [Tanoue et al., 2019] и осигуряване на защита срещу патогенни микроби [Gensollen et al., 2016]. При нормални условия тези бактерии не могат да преминат през чревната стена в системната циркулация, тъй като съществуват механизми, предотвратяващи това: наличие на плътни връзки (tight junctions) между чревните епителни клетки, мукусен филм върху лигавицата на колона и неутрализиращи секреторни IgA антитела. При затлъстяване обаче тези бариерни механизми са нарушени, вследствие на което се наблюдава транслокация на бактериални ендотоксини в системната циркулация. Това води до предизвикване на системен възпалителен отговор чрез активация на Toll-like receptor-4 (TLR-4), който е експресиран по мембраната на имунокомпетентните клетки от вродения имунитет [Rowe et al., 1993]. Въз основа на тези данни е предположено, че модулирането на чревната микробиота би могло да даде нови насоки за третиране на затлъстяването, както и на коморбидните състояния, асоциирани с това метаболитно заболяване [Muscogiuri et al., 2019].

21. Роля на ОС за развитие на мъжкото безплодие

Инфертилитета при мъжете представлява около 40% от всички случаи на безплодие и може да се дължи на различни фактори, като нарушения по оста хипоталамус-хипофиза-тестиси, претестикуларни, тестикуларни и постестикуларни (вкл. възпаление и обструкции на семеотводящите пътища), травми на репродуктивните органи, някои специфични причини включващи микроделеции на Y – хромозомата, синдром на Klinefelter, синдром на Kallmann и други форми на хипогонадотропен хипогонадизъм [Armstrong and Straton, 2016]. Въпреки това, не може да се установи основна причина за първично или вторично безплодие при приблизително 25% от двойките, което се означава като идиопатично безплодие. [Alahmar,2018]. Етиологията на мъжкото безплодие е многофакторна и все още до голяма степен остава неясна. Въпреки това се счита, че голяма роля за това играе оксидативният стрес и е известно, че има положителна корелация между високите нива на оксидативен стрес (ОС) и лошото качество на спермата [Armstrong and Straton, 2016].

Един от механизмите, предложен като причина за идиопатично мъжко безплодие, е метаболитната ендотоксемия и асоцираното с това субхронично системно възпаление при което клетъчните увреждания се дължат основно на ОС [Pearce et al., 2019]. ОС представлява дисбаланс между натрупаните реактивни форми на кислорода и/или на азота (ROS/RNS), и антиоксидантните защитни механизми в клетките и тъканите. В мъжките репродуктивни органи, сперматозоидите са изправени пред кислороден парадокс [Armstrong and Straton, 2016]. От една страна малко количество ROS/RNS са необходими, за да осигурят оплодителната способност на сперматозоидите, но от друга, излишъкът им може да доведе до негативни ефекти, като липидна пероксидация, увреждане на сперматозоидната ДНК и увеличена апоптоза на герминативните клетки в тестисите (Фиг. 3).



Фиг. 3. Потенциални екзогенни и ендогенни генератори на реактивни кислородни и азотни форми (ROS/RNS), водещи до оксидативен стрес в мъжките репродуктивни органи. Физиологичната роля на ROS/RNS се състои в участието им в капацитацията, акрозомната реакция и хиперкативацията на сперматозоидите, както и в рецептор-медиираното свързване между сперматозоида и ооцита (секундерен овоцит) по време на опложданe. При оксидативен стрес обаче патологичните ефекти водят до липидна пероксидация, увреждане на ДНК и увеличена апоптоза на сперматогенния епител, причиняващи мъжко безплодие (Модифицирано по Armstrong and Stratton., 2016).

По време на процеса на сперматогенезата ROS се генерират от редица метаболитни процеси в сперматозоидите. Натрупването на ROS може да предизвика дисбаланс във връзка с активността на антиоксидантните молекули, което води до ОС, изключително вреден за всички компоненти на сперматозоидите. Поддържането на баланс между неутрализацията на ROS и на генерирането им се дължи на антиоксидантния капацитет на спермата и семенната плазма. Ензимните и неензимни антиоксиданти в семенната плазма предпазват от пероксидация на липидите в плазмената мембрана на сперматозоидите [Lenzi et al. 2000, Kankofer et al. 2005].

ОС е една от основните, пряко или косвено, причини за мъжкото безплодие [Aitken & Clarkson 1987, Aitken & Barker 2002, Agarwal et al. 2003, 2008, 2014]. За фертилността е необходима балансирана антиоксидантна среда, тъй като ROS са необходими за оплождането: акрозомната реакция, активация на сперматозоидите, тяхната подвижност и капацитацията [Aitken & Barker

2002]. Ензими като SOD и CAT, както и средства, способни да блокират окислителните реакции, оказват антиоксидантно действие в семенната среда. Малката цитоплазма на сперматозоидите ограничава значимо съдържанието на вътреклетъчни антиоксиданти. Тъй като ОС е резултат от дисбаланс между ROS и съществуващите антиоксиданти [Halliwell & Gutteridge 2007], този дисбаланс може да се свърже с аномалии на сперматозоидите, което да доведе до безплодие [Agarwal et al. 2014]. Повишените нива на ROS са свързани с намалена подвижност на сперматозоидите и увреждане на тяхното ДНК [Gomez et al. 1998]. Сперматозоидните мембрани също така са богати на полиненаситени мастни киселини, които лесно могат да пострадат от липидна пероксидация [Parks & Hammerstedt 1985].

Един от най-поразителните вредни ефекти на ОС върху сперматозоидите е увреждането на хроматина [Sakkas & Alvarez 2010], което е свързано с нарушения в ембрионите [Aitken & Krausz 2001, Fatehi et al. 2006, Makker et al. 2009] и новородените, и дори в следващите поколения [Virro et al. 2004]. Фрагментацията на ДНК на сперматозоидите е крайният стадий на ефектите на ОС върху хроматина и е свързана с неуспех в развитието на ембриони [Virro et al. 2004) и стерилитет при възрастни [Tesarik et al. 2002]. Важно е да се отбележи обаче, че сперматозоидите с фрагментиран хроматин могат да оплодят яйцеклетката [Evenson & Wixon 2006]. Нискостепенно увреждане на ДНК на сперматозоидите може да се поправи от яйцеклетката след оплождането или по време на развитието на ембриона. Ако обаче щетите са големи, дори и да се извършва оплождане, това често води до апоптоза и ембрионална фрагментация [Ahmadi & Ng 1999, Tamburrino et al. 2012].

Има шест основни причини за увреждане на ядрения и митохондриален хроматин в спермата: i) апоптоза по време на сперматогенезата; ii) проблеми с ремоделирането на хроматина по време на сперматогенезата (протаминирането); iii) действие на ROS, особено на хидроксилния радикал и азотния оксид, по време на транспортиране на сперматозоиди през семенните канали и епидидимиса; iv) фрагментиране, индуцирано от каспази и ендонуклеази; v) лъчева и химиотерапия; и vi) токсични вещества от околната среда [Sakkas & Alvarez 2010]. Тестикуларният и епидидимален ОС е една от най-важните причини сред тези механизми [Agarwal et al. 2003]. Оксидативните увреждания в ДНК на сперматозоидите включват промени и делеции на азотни

бази, формиране на кръстосани връзки на ДНК, хромозомно преподреждане: разкъсване на нишки на ДНК, мутации и полиморфизми. В допълнение, проучванията показват, че ОС участва и в нарушеното опаковане на ДНК на сперматозоидите [Hammadeh et al. 2010].

Повишените количества ROS, заедно с намалената антиоксидантна защита, водят до редокс дисбаланс, намалена подвижност на сперматозоидите и увреждане на ДНК на спермата. Сперматозоидите са силно податливи на вредните ефекти на ROS поради голямото количество ненаситени мастни киселини, намиращи се в техните клетъчни мембрани. Реактивните кислородни форми насърчават пероксидацията на липидите, което води до вътреклетъчно окислително натоварване. Последователността на събитията включва липидна пероксидация, загуба на целостта на мембраната с повишена пропускливост, намалена подвижност на сперматозоидите, структурно увреждане на ДНК и апоптоза [Henkel and Schill, 1998; Sanocka-Maciejewska et al., 2005; Schuppe et al., 2008].

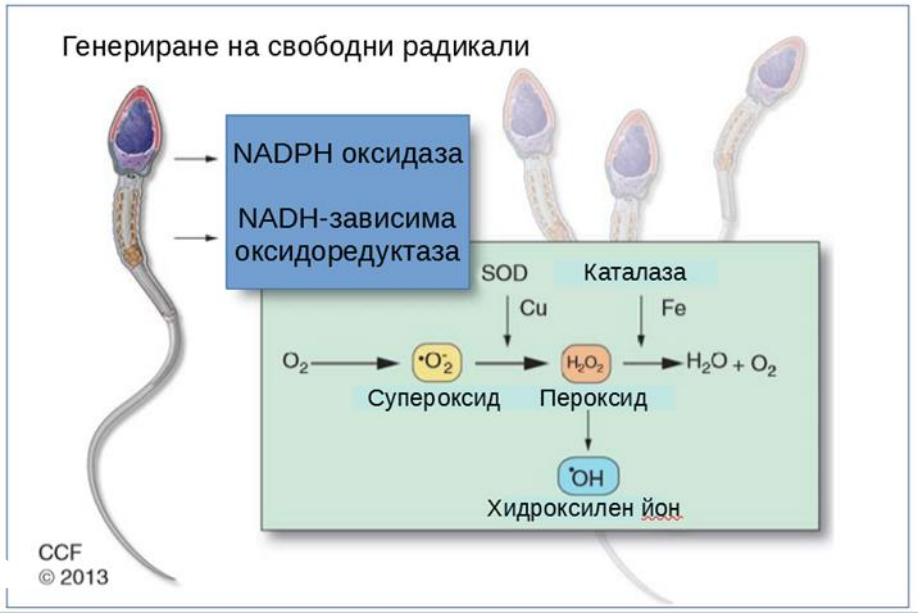
Световната здравна организация (СЗО) публикува референтни стойности за параметрите на анализ на семенната течност [Cavallini, 2006]. Намалената концентрация на сперматозоидите - определена като $<15 \times 10^6$ сперматозоиди / мл - се нарича олигозооспермия; астенозооспермията съответства на намалена подвижност на сперматозоидите <32% или общата подвижност на сперматозоидите под 40%. Тератоспермията се определя като нормална подвижност на сперматозоидите под 4%, като се използват строгите критерии на Крюгер [Cooper et al., 2010]. Комбинацията от всички тези аномалии се означава като олигоастенотератозооспермия.

Понастоящем, липсва консенсус за това кои пациенти трябва да бъдат тествани за ОС, както и кой тест да се извърши. Съществуват и противоречия относно вида, дозата и продължителността на лечение с антиоксиданти при пациенти с прекомерно високи нива на ROS [Wagner et al., 2018].

22. Физиологична роля на реактивните форми на кислорода при мъжкия фертилитет

Развитието на мъжките репродуктивни герминативни клетки води до формиране на значителни количества ROS, което представлява основен източник на ОС в сперматозоидите [Fischer and Aitken, 1997]. ROS модулират кондензацията на сперматозоидния хроматин, чрез което се регулира броя на зародишните клетки и се стимулира апоптоза или пролиферация на сперматозоиди [Aitken, 1999]. ROS също така участват в процесите на капацитация, акрозомната реакция, стабилност на митохондриите и подвижност на зрелите сперматозоиди.

При физиологични условия ROS се генерират предимно в митохондриите в процеса на електронния транспорт в дихателните вериги по време на окислителното фосфорилиране. Известно е, че продукцията на ROS от сперматозоидите се осъществява по два начина. Първият включва активността на NADPH оксидазната система на нивото на сперматозоидната мембрана и вторият чрез функцията на NADPH-зависимата оксидоредуктаза (диафораза) в митохондриите (фиг. 4).



Фиг. 4. Генериране на ROS в сперматозоидите при физиологични условия и ензимните антиоксидантни системи, участващи в неутрализирането им [Модифицирано по Armstrong and Stratton, 2015].

ROS може да функционират като клетъчни сигнализатори, чрез модулиране на ензимния комплекс NADPH оксидаза в клетъчната мембрана и регулация на дихателната верига в рамките на митохондриите. При сперматозоидите метаболизмът на супероксидния анион се регулира от ензима NADH оксидоредуктаза, който работи в тясна връзка с митохондриалната дихателна верига и ксантин оксидазата, открити в сперматозоидите и в семенната плазма [Fraczek and Kurpisz, 2005]. Незрелите сперматозоиди показват повишено производство на ROS в сравнение със сперматозоидите с нормална морфология [Gomez et al., 1996; Abd-Aziz et al., 2014].

Източници на ендогенно формирани ROS са незрелите сперматозоиди в спермални проби, левкоцитите при възпалителен процес и увредените тъкани при варикоцеле [Noda et al., 1994]. Източници на RNS могат да бъдат почти всички анатомични структури на мъжките репродуктивни тъкани, като допълнителните полови жлези - семинални везикули, простата, уретралните жлези, в пениса - кавернозното тяло, тазовият плексус и в нервните му разклонения. В тестисите, Лайдиговите клетки, инфилтриращите левкоцити, епителните и ендотелните клетки, гладкомускулните клетки и макрофагите в интерстициума на тестисите също се генерират реактивни азотни форми [Agarwal et al., 2008].

Семенните левкоцити са източник на ROS, като произвеждат 1000 пъти по-високи концентрации, отколкото сперматозоидите при физиологични условия. Това е така, защото семенните левкоцити представляват първата линия на защита срещу различни инфекциозни агенти, използвайки предимно окислителни и възпалителни механизми. [Plante et al, 1994]. Това обаче може да се превърне в меч с две остриета, тъй като дисбаланс между окислители и антиоксиданти може да доведе до клетъчно увреждане. Всъщност ROS, генериран за противодействие на инфекциозни агенти, също може да повреди собствените клетки, което може да доведе до разпадане на клетъчната мембрана или увреждане на ДНК на сперматозоидите.

От екзогенните източници на ROS, наред с всички останали фактори, особен интерес представлява затлъстяването. Редица проучвания върху експериментални животни и хора са установили негативна корелация между затлъстяването и качеството на спермата [Pearce et al., 2019; Ding et al., 2020; Tremellen et al., 2018]. Независимо от генератора на ROS/RNS, резултатът от

деструктивното действие на ОС е липидна пероксидация, увреждане на сперматозоидната ДНК и увеличена апоптоза на герминативните клетки в мъжките гонади [Armstrong and Straton, 2016].

23. Патологични ефекти на реактивните форми на кислорода и азота върху фертилитета при мъжете

Употребата на антиоксиданти за лечение на мъжкото безплодие се основава на прекомерните нива на ROS и тяхното неблагоприятно въздействие върху функцията на сперматозоидите и увреждането на тяхното ДНК. Проучване на Desai et al. установява, че качеството на сперматозоидите е значително по-ниско при безплодни мъже с високи нива на ROS в спермата [Desai et al, 2009]. Реактивните форми на кислорода променят целостта на ДНК в ядрото на сперматозоидите, като предизвикват разкъсване на нишки на ДНК, модификации на основата и хроматиново кръстосано свързване [Said et al, 2005]. Освен това сперматозоидите имат ограничени защитни механизми срещу индуцирано от ROS увреждане на ДНК.

Човешкият еякулат съдържа сперматозоиди с различна степен на зрялост, заедно с левкоцити, епителни клетки и незрели клетки от различни етапи на сперматогенезата. Сред тези клетки, левкоцитите с пероксидазна активност и незрелите сперматозоиди произвеждат значително количество свободни радикали. [Hendin et al, 1999]. Сперматозоидите са особено податливи на окислително увреждане поради наличието на изобилие от полиненаситени мастни киселини в тяхната плазмена мембрана. Мастните киселини са важни, тъй като осигуряват флуидност на мембраната, ключова характеристика за няколко мембранни събития на сливане, като акрозомната реакция и рецепторните взаимодействия между сперматозоида и яйцеклетката. Тези ненаситени мастни киселини обаче ги правят уязвими при атаки на свободни радикали и последващата липидна пероксидация [Zini et al,2009], който в резултат на това, наред с нарушенията във флуидността на мембраната, се увеличава и нейният пермеабилитет, инактивират се важни рецептори и

мембранни ензими и това води до клетъчно увреждане и дисфункция [Noda et al., 1994].

ОС е и главният виновник за увреждане на ДНК, което включва модификации (оксидиране) на азотната база гуанин, при което се формира 8-хидрокси-2`-дезоксигуанозин (8-OHdG), [Armstrong and Straton, 2016], нивата на който се използват като маркер за степента на оксидиране на нуклеиновите киселини.

Програмираната клетъчна смърт е процес, съпровождащ интактната сперматогенеза, като по този начин се регулира съотношението на популациите от герминативни клетки към тази на Сертолиевите клетки [Sharma and Agarwal, 2011]. Чрез този механизъм се регулира крайният специфичен брой на пролиферящите герминативни клетки, които могат да бъдат изхранени от Сертолиевите клетки в даден момент от сперматогенезата. Ако има излишен брой на увредени герминативни клетки, се активира апоптозата, като по този начин се осигурява правилна поддръжка на нормални сперматологични параметри в еякулата[Armstrong and Straton, 2016].

Установена е и връзка между формирането на хемато-тестикуларната бариера с индуциране на апоптозата при физиологични условия. Имунната привилегия на тестикуларния епител се осигурява от плътни междуклетъчни връзки (tight junctions) между Сертолиевите клетки и инхибирането на апоптотичните гени от Bax фамилията, което води до намалено формиране на плътните връзки, осигуряващи функционирането на хемато-тестикуларната бариера [El-Fakahany et al., 2011]. Високите нива и непрекъснатото генериране на ROS/RNS активира Fas/FasL зависимата каскада на апоптозата. Наблюдава се индуциране и на други регулаторни протеини на апоптозата, като p53, каспази, c-Myc, чувствителния цАМФ модулатор (cAMP responsive element modulator) и фамилията от Bcl-2 протеини. Увеличената апоптоза е в положителна корелация с инфертилитета, като семенната течност от инфертилни пациенти се характеризира с високо съдържание на апоптични сперматозоиди [El-Fakahany et al., 2011]. Независимо от това, в около 85% от случаите геномът на спермата е защитен от увреждане вследствие на оксидативния стрес, тъй като се свързва с централните нуклеопротамини. [Bisht et al, 2017].

При безплодни мъже е установен дефицит на протаминирането, представляващ още един източник на ROS-индуцирано увреждане на ДНК

[Olivia, 2006], което се усложнява от ограничения капацитет за възстановяване на ДНК на сперматозоидите, наблюдаван по време на сперматогенезата. [Marcon et al, 2004]. ROS-медиираното разрушаване на митохондриалните мембрани активира на каспази, което води до апоптоза. Апоптотичните пътища включват освобождаване на цитохром С, увеличаване нивата на ROS, увреждане на ДНК и апоптотоза на сперматозоидите [Thompson et al., 2009].

ДНК базите също са предразположени към ОС-индуцирано увреждане с модификации на основата, разкъсване на нишки и хроматиново кръстосано свързване. Всъщност ОС и апоптозата са ключови събития, които причиняват увреждане на ДНК в зародишната клетъчна линия [Agarwal & Said, 2005]. Основната роля на ROS в етиологията на увреждането на ДНК на сперматозоидите при безплодни мъже е потвърдена в множество проучвания [Angelopoulou et al, 2005; Tunc et al, 2009; Song et al, 2006; Bui et al, 2018].

Сперматозоидите носят пълен хаплоиден геном до яйцеклетката, за да образуват нов индивид. Кондензацията на ядрения материал в ядрото на сперматозоидите е от съществено значение за успеха на този процес. Тази кондензация се насърчава от уникалния процес на протаминиране, който включва заместване на хистоните с положително заредени протамини, които от своя страна образуват тесни тороидални комплекси. Това е от съществено значение, тъй като организацията на хроматина е необходима за оплождането и ранното ембрионално развитие [Simon et al, 2014]. При нормалните сперматозоиди се демонстрира ниска степен на фрагментиране на ДНК, докато при безплодни мъже има по-големи пропорции на фрагментирана ДНК [Simon et al, 2017].

Редица външни и вътрешни фактори участват в патогенезата на фрагментирана ДНК. Последните включват нарушване на хроматинова структура и дисрегулации в процесите на поправка на ДНК, абортивна апоптоза и дефектно съзряване [Sakkas et al, 1995, 1999] Натрупват се доказателства, че външните фактори също са отговорни за увеличената фрагментация на ДНК, данни за която се откриват в епидидимиса и еякулираната сперма, за разлика от тестикуларната сперма [Esteves et al, 2015]. Последните изследвания демонстрират ОС като основна външна причина за фрагментацията на ДНК на сперматозоидите (SDF), [Henkel et al, 2005], тъй като формираните ROS могат да надминат капацитета на ограничените антиоксидантни механизми на

сперматозоидите и да доведат до увреждане на полиненаситените мастни киселини в мембраните [Sharma & Agarwal, 1996; Atiken et al, 1989].

24. Повреди на ДНК на сперматозоидите, индуцирани от реактивни форми на кислорода и азота

Въпреки че, ROS изглежда играе физиологична роля в акрозомната реакция, активирането, подвижността и капацитацията [Makker et al, 2009], техните потенциално вредни ефекти не могат да бъдат пренебрегвани. ОС може да предизвика бърза загуба на вътреклетъчен АТФ, което води до аксонемално увреждане с намалена жизнеспособност и подвижност на сперматозоидите и увеличени структурни дефекти в шийката, с вредни ефекти върху капацитацията на спермата и акрозомната реакция. Липидната пероксидация на мембраната на сперматозоидите е ключов медиатор на индуцираното от ROS увреждане на сперматозоидите, което води до безплодие [Alvarez et al, 1995; de Lamirande & Gagnon, 1992].

Водородният пероксид е основният ROS произвеждан от човешките сперматозоиди, но прекомерното производство на ROS от анормални сперматозоиди или левкоцити изглежда е свързано с мъжкото безплодие [Sharma & Agarwal, 1996]. Умерено повишените концентрации на водороден пероксид причиняват обездвижване на сперматозоидите, най-вече чрез изчерпване на вътреклетъчния АТФ и намалено фосфорилиране на аксонемални протеини, без да влияят върху жизнеспособността им. За разлика от това, по-високите концентрации на водороден пероксид стимулират липидната пероксидация и клетъчната смърт [Kemal Duru et al, 2000; Misro et al, 2004].

В проучване на Pasqualotto et al., 2000 е установено, че нивата на антиоксиданти в семенната плазма от безплодни мъже са значително по-ниски, отколкото при фертилни контроли, а нивата на ROS, произведени от сперматозоидите, са обратнопропорционални с качеството на спермата. При спермата на безплодни мъже патологичните нива на ROS са резултат от увеличеното производство на ROS и нарушена антиоксидантна защита [Zini et al, 1993].

Екзогенните или ендогенни източници на ROS могат да предизвикат увреждане на ДНК на сперматозоидите, което от своя страна може да причини, невропсихиатрични разстройства и ракови заболявания в детска възраст, като ретинобластома [Wiener-Magnazi et al, 2012; Atiken et al, 2014]. ОС има тенденция да увреждa теломерите, които са ключови геномни протектори. Теломерите се увреждат по-бързо, когато са изложени на ОС, което води до тяхната дисфункция, нестабилност на хромозомите и апоптоза, като всички те са свързани със стареенето и канцерогенезата [Rima et al, 2016].

Увреждането на ДНК на сперматозоидите може да бъде особено важна при рекурентен спонтанен аборт (recurrent spontaneous abortion, RSA). В проучване върху 25 двойки с идиопатичен RSA и 25 доказани фертилни контроли, нивата на ROS и увреждането на ДНК са значително по-високи сред мъжете от групата на RSA [Shamsi et al, 2011]. Митохондриалната дисфункция и ОС са свързани с рак, апоптоза и стареене, както и с изолирани случаи на астенозооспермия [Nowicka-Bauer et al, 2018].

Антиоксидантите могат да предотвратяват загубата на теломери и да насърчават геномната стабилност в клетките с митохондриална дисфункция, потвърждавайки връзката с ОС. Освен това ядреният трансфер защитава геномите от дисфункция на теломерите и възстановяване на митохондриите, като по този начин подпомага оцеляването на клетките [Liu et al, 2002].

Каскадата на липидната пероксидация допринася за производството на свободни радикали и индуцира производството на липидни алдехиди като акролеин, 4-хидроксиноненал (4-HNE) и малондиалдехид (MDA), [Sabeti et al, 2016]. Те са свързани с ОС и увреждане на ядрената и митохондриалната ДНК, с по-къси теломери, образуване на 8-хидрокси-дезоксигуанин (8-OHdG) и фрагментиране на митохондриалната ДНК. Те могат също така да повлияят на плазмените мембрани на сперматозоидите, като по този начин намаляват тяхната подвижност и способността да се слеят с яйцеклетката. Производството на 8-OHdG улеснява увреждането на ДНК чрез ограничаване на възстановяващия капацитет на сперматозоидите [Hekmatdoost et al, 2009]. Тъй като фрагментираната ДНК носи висок мутагенен потенциал, ооцитът може да пропусне ексцизията на дефектната азотна база (8-OHdG), което води до геномна хипермутабилност и нестабилност, както и до безплодие [Atiken, 2017].

Високата честота на генетични аберации в ембрионите се дължи на

индуцираният от ROS оксидативен стрес в мъжката зародишна линия. Той се асоциира със състояния като рак в детството, невропсихични разстройства, като аутизъм и шизофрения, и доминиращи генни мутации като синдром на Аперт и ахондроплазия [Bisht et al, 2017].

25. Антиоксидантна терапия при мъжко безплодие

Различните налични перорални антиоксиданти принадлежат към категорията на екзогенните антиоксиданти и те включват витамин С, витамин Е, коензим Q10, N-ацетил цистеин, карнитин, микроелементи като цинк, селен, пентоксифилин и комбинация от тези вещества. Проведени са множество изследвания за оценка на ефективността на оралните добавки с антиоксиданти за лечение на мъжко безплодие. Повечето от проучванията показват подобрение на един или повече параметри на семенната течност [Immamovic-Kumalis & Pinter, 2014; Alahmar, 2018], докато някои проучвания не отчитат положителен ефект [El Sheikh et al, 2015; Akmal et al, 2006; Vahidinia et al, 2017], (Таблица 1).

Таблица 1: Антиоксидантна терапия при мъжко безплодие

Автор, години	Групи/брой на участници	Контро-лирано	Вид на Антиоксидант и доза	Интервен-ционен период	Резултати
Safarinejad, 2011	Идиопатична олигоастенотератозооспермия/ 211	Да	EPA и DHA киселини, 1.84 g/ ден спрямо плацебо	32 седмици	Увеличение на общия брой и концентрация на сперматозоиди. Както EPA, така и DHA корелират положително с плазмената супероксиддисмутазна и каталазна активност
Wirleitner *et al*., 2012	Олигоастенотератозооспермия и неолигоастенотератозоосперм-мия/147	Да	Fertilovit M-Plus Vitamin C-100 mg Vitamin E-100 mg Folic acid-500 µg Zinc-25 mg Selenium-100 µg N-acetyl L-cysteine 50 mg L-carnitine 300 mg Citrulline 300 mg GSH reductase 50 mg Lycopene 4 mg Co-enzyme Q10 15 mg два пъти на ден Coenzyme Q10-200 mg на ден	2 месеца	Повишена концентрация и подвижност на сперматозоидите. Няма значително подобрение в морфологията
Safarinejad *et al.*, 2012	Идиопатична олигоастенотератозооспермия/ 228	Да	Coenzyme Q10-200 mg на ден	26 седмици	Повишена плътност, подвижност и морфология на сперматозоидите. Намалена фоликулостимулираща хормонална активност

Автор, години	Групи/брой на участници	Контро-лирано	Вид на Антиоксидант и доза	Интервен-ционен период	Резултати
Safarinejad, 2012	Идиопатична олигоастенотератозооспермия/ 287	Не	Coenzyme Q10-300 mg два пъти на ден	12 месеца	Повишена средна концентрация на сперматозоиди, прогресивна подвижност и нормална морфология
Busetto *et al.*, 2012	Идиопатична астенотератозооспермия/114	Не	L-carnitine-145 mg Acetyl L carnitine-64 mg, fructose 250 mg, citric acid 50 mg Selenium 50 µg CoQ10 20 mg Zinc 10 mg Ascorbic acid 90 mg Cyanocobalamine 1.5 µg Folic acid 200 mcg/веднъж дневно	4 месеца	Повишена прогресивна подвижност на сперматозоидите и без значително подобрение в концентрацията и морфологията на сперматозоидите
Chen *et al.*, 2012	Олигозооспермия и астенозооспермия/64 и 42	Да	Tamoxifen 10 mg два пъти дневно Tamoxifen 10 mg + Vitamin E 100 mg три пъти дневно Астеноспермия Levocarnitine 1 бутилка два пъти дневно Levocarnitine 1 бутилка два пъти дневно, Vitamin E 100 mg три пъти дневно	3 месеца	Прогресивно увеличаване на подвижността на сперматозоидите при мъже с олигоспермия. Налице е незначително подобрение в подвижността на сперматозоидите при астенозооспермични индивиди
Cavallini, 2016	Идиопатична олигоастенотератозооспермия/55	Да	L-carnitine 1 g два пъти дневно L-carnitine 500 mg два пъти дневно +30 mg cinnoxicam всеки 4 дни	3 месеца	Подобряване на морфологията и броя на сперматозоидите. Повишен процент на бременност след ICSI. Незначително подобрение в броя на прехвърлените оплодени ооцити и ембриони
Abad *et al.*, 2013	Астенотератозооспермия/20	Да	L-carnitine-1500 mg Vitamin C-60 mg Coenzyme Q10-20 mg Vitamin E-10 mg Zinc-10 mg Vitamin B9-200 µg Vitamin B12-1 µg Selenium-50 µg	0 ч, 2 ч, 6 ч, 8 ч и 24 ч	Повишаване на концентрацията на сперматозоиди, подвижността, жизнеността и морфологичните параметри
Nadjarzadeh *et al.*, *2014*	Идиопатична олигоастенотератозооспермия/60	Да	200 mg/ден CoQ10 или плацебо	3 месеца	Подобрени параметри на спермата
Raigani *et al.*, 2014	Олигоастенотератозооспермия/83	Да	Folic acid (5 mg/ден) Zine sulfate (220 mg/ден) или плацебо	16 седмици	Повишена концентрация на сперматозоиди при комбинирано лечение

26. Тестове за оценка на реактивни форми на кислорода в сперма

Оценката на нивата на ROS в сперматозоидите при безплодни мъже може да помогне за определяне на лицата, които могат да се възползват от антиоксидантна терапия. Разработени са различни тестове за откриване на семенните нива на ROS, които могат да бъдат класифицирани в директни и косвени анализи (табл. 2 и табл. 3). Понастоящем не съществуват препоръки за

лечение на безплодие, базирани на рутинното измерване на ROS и все още продължава дискусия относно това, какъв тип пациенти трябва да бъдат тествани за оксидативен стрес. Астенозооспермията в проба от сперма е маркер на вероятно повишени нива на ROS [Agarwal et al, 2014].

Хипервискозитетът също подсказва за повишен ОС, тъй като се дължи на повишените нива на малондиалдехид. Повишените левкоцити или незрели сперматозоиди, които са един от основните източници на ROS, могат да насочат към по-нататъшно тестване за ОС. Нарушения в морфологията на сперматозоидите, поради наличие на цитоплазмени остатъци също корелира с високите нива на ROS [Wagner et al, 2018]. Хипоосмотичният тест за подуване на сперматозоидите предполага мембранно увреждане в сперматозоидите, поради липидна пероксидация и това може да означава по-високи нива на ROS в спермата. Освен това някои изследователи препоръчват ROS тестване при лица с идиопатично безплодие [Mayorga-Torres et al, 2017].

Табл. 2. Директни методи за анализ на оксидативен стрес

Тест	**Метод за измерване**	**Функция**	**Предимства**	**Недостатъци**
Хемилуминес-центен анализ	Заредените или незаредени сонди претърпяват окисляване / редукция с генериране на светлина като страничен продукт	Намаляване на окислението или редукцията чрез генериране на светлина	Висока чувствителност и специфичност. Силен тест	Голямо и скъпо оборудване Времеемко Изисква по-голям обем на пробата Интерферентни променливи като контрол на възрастта, обема и температурата на спермата
Проточна цитометрия	Когато се възбужда от светлина с различни дължини на вълната, инкубацията с багрилото излъчва флуоресценция	Измерване на ROS	Изисква малък брой сперматозоиди - пациенти с нисък брой сперматозоиди - и може да измерва множество маркери едновременно	Скъп инструмент, който не е практичен за широко клинично приложение
Електронен спинов резонанс	Получава спектрите на абсорбция на спиновата енергия сред несдвоени електрони в приложено магнитно поле	Откриване на свободни радикали	Широко използване, обхващащо различни параметри като: Наблюдение на свободните радикали Анализ на характеристиките на свободните радикали Количествен анализ на свободните радикали Кинетичен анализ Добър за високи нива на ROS производство	Свободните радикали могат да реагират с друга молекула, различна от спин-улавящия агент Интерференционни фактори като неутрализация

Тест	Метод за измерване	Функция	Предимства	Недостатъци
Редукция на цитохром С	Идентифицират се супероксидни радикали и редуциран ферицитохром С	Оценка на ROS на клетъчната мембрана	Добър при откриване на високи нива на ROS Количествено определя супероксид, отделен по време на респираторен взрив на неутрофили или ензими	Ако ензимната активност е по-малка, относителна нечувствителност към откриването на NADPH оксидазна активност
Nitroblue tetrazolium тест	Nitroblue tetrazolium е жълт до лилав / син, когато е изложен на ROS	Локализация на реакцията между левкоцити или сперматозоиди и супероксидни йони	Открива неутрофили в концентрация 0,5 × 10 / ml или по-висока Лесно и рентабилно	Субективна интерпретация на положителен или отрицателен неутрофил
Анализ на тиобарбитурова киселина	Въз основа на реакцията на хромогенен агент, 2-тиобарбитурова киселина с MDA	Използва се за оценка на устойчивостта на сперматозоидите към оксидативен стрес	Може да оцени нивата на MDA на спермата. Нуждае се от скъпи четци за микроплаки	Необходимо е скъпо оборудване
Xylenol orange-based анализ	Оксидантите в пробите от сперма окисляват железния йон-о-дианизидинов комплекс до железен йон. Железен йон образува оцветено съединение с ксиленол, което може да бъде открито с помощта на спектрофотометър	Колориметричен автоматизиран анализ	Измерва нетния оксидативен дисбаланс между производството на ROS и концентрацията на антиоксиданти	Ограничен използване поради високи разходи
FITC-маркирани лектини	Използва се за откриване на състоянието на акрозома на спермата	Използва се за откриване на сперматозоидна пероксидаза с помощта на растителни лектини, маркирани с флуоресцентен агент (FITC) за откриване на група сперматозоидни пероксидази	Открива състоянието на акрозома на сперматозоидите	Трудно е да се открие истинска и фалшива акрозомна реакция. Не може да се открие жизнеспособността на сперматозоидите и състоянието на акрозомна реакция в една снимка. Флуоресцентният сигнал понякога може да избледнее

Таблица 3: Индиректни методи за анализ на оксидативен стрес

Тест	Метод на измерване	Функция	Предимства	Недостатъци
Миелопероксидаза или Endtz тест	Положителността на пероксидазата се оценява чрез оцветяване, като се използва бензидин като буфер	Откриване на гранулоцити в спермата	Специфично отличава WBC, особено произвеждащите гранулоцити от незрели зародишни клетки в спермата	Не може да се използва за откриване на производството на ROS в сперматозоидите

Тест	Метод на измерване	Функция	Предимства	Недостатъци
Нива на липидна пероксидация	Откриване на MDA и токсичен 4-HNE чрез колориметрични и тиобарбитурови киселинни анализи	Идентифициране на страничните продукти на липидната пероксидация	MDA е оцветено вещество, което може да бъде измерено чрез флуорометрия или спектрофотометрия. Ниската концентрация на сперма на MDA може да бъде измерена чрез чувствително HPLC оборудване или спектрофлуорометрично измерване на промотори на основата на желязо	Не е широко използван тест в клиничната практика
Тест	Метод на измерване	Функция	Предимства	Недостатъци
MiOXSYs	Оценка на електронен трансфер в миливолта от редуциращ агент към окислител, използвайки система, базирана на галваностат	Измерване на окислително-редукционния потенциал	Лесна за работа в клинична обстановка Може да се използва при пациенти с малък обем на сперма	Необходими са по-големи кохортни изследвания за установяване на референтната стойност
Общ антиоксидантен капацитет	Оценява редукционната способност на антиоксидантите в спермата срещу окислител като водороден пероксид и измерва ефекта върху субстрата	Оценява кумулативния ефект на антиоксидантите в семенната течност	Бърз колориметричен метод Общите антиоксиданти в семенната плазма могат да бъдат измерени	Не измерва индивидуални или ензимни антиоксиданти. Изисква скъп комплект за анализ и четец за микроплаки
Gpx активност	Активността на Gpx се измерва чрез намаляване на съдържанието на GSH след инкубиране на пробата в присъствието на H_2O_2 и NaN_3,	Въз основа на принципа, че Gpx катализира реакцията между водороден пероксид и редуциран GSH	Gpx предпазва спермата от липидна пероксидация и увреждането на ДНК може да бъде значително, ако нивата на Gpx са по-ниски	Някои проучвания показват, че активността на Gpx не корелира с подвижността или концентрацията на сперматозоидите
Кометен анализ	Позволява миграция на ДНК в агарозен гел под електрическо поле. Разхлабената ДНК образува модел на миграция, който прилича на комета	Анализ на едноклетъчна гел електрофореза за оценка на увреждане на ДНК	Може да открие степен на увреждане на ДНК, еквивалентна на 50 единични разкъсвания на клетка Може да се използва при мъже с ниска концентрация на сперматозоиди (изисква само 100 клетки за анализ)	Не е постигнат консенсус по протокола за стандартизация

GSH-глутатион, GPx-GSH пероксидаза, 4-HNE-4-хидроксиноненал, MDA-малондиалдехид, WBC - бели кръвни клетки, ROS-реактивни кислородни видове, HPLC-високоефективна течна хроматография

27. Реактивни форми на кислорода, фертилност и технологии за асистирано опложданe (ART)

Реактивните форми на кислорода и окислително-редукционният потенциал (ОРП) играят значителна роля в процеса на опложданe и съответно повлияват резултата от ART. В проспективно проучване, проведено при 1168 безплодни и 100 фертилни мъже, са били сравнени параметрите за анализ на спермата, ОРП и SDF. Проучването демонстрира, че безплодните мъже имат

значително по-лоши параметри на спермата и по-високи нива на ОРП и SDF, както и че съществува значителна положителна зависимост между ОРП, SDF и дефектите на главата на сперматозоидите [Majzoub et al, 2018].

Данните за ефекта от увреждането на ДНК на сперматозоидите върху резултатите от ART са все още спорни. Li et al, 2005, са направили метаанализ и са установили, че увреждането на ДНК на сперматозоидите има отрицателно въздействие върху процента на клинична бременност при IVF, но не влияе върху успешното оплождане при IVF и ICSI [Li et al, 2005]. Друг мета-анализ на Zini et al., 2008, оценяващ влиянието на увреждането на ДНК на сперматозоидите върху процента спонтанни аборти след IVF и ICSI, показва силен негативен ефект върху резултатите от ART и предлага тест за клинична оценка на увреждането на ДНК преди IVF или ICSI [Zini et al, 2008]. Въпреки това, Комитетът по практика на Американското дружество за репродуктивна медицина заключава, че данните в съществуващата литература не подкрепят неблагоприятните последици от увреждането на ДНК на сперматозоидите върху ART и естествените резултати от бременността, но препоръчва бъдещи изследвания за валидиране на клиничната полезност на тестовете за целостта на спермата [American Society for Reproductive Medicine, 2013].

По-скорошен мета-анализ на Simon et al, 2017, включващо 41 проучвания, показва, че увреждането на ДНК в спермозоидите значително корелира с неблагоприятните резултати от ART с IVF или ICSI техники. Увреждането на ДНК на сперматозоидите се оценява с помощта на различни тестове, като кометен анализ (Comet assay), анализ на хроматиновата структура на сперматозоидите (TUNEL assay - terminal deoxyuridine nick end labeling assay and sperm chromatin dispersion assay), [Simon et al, 2017]. Следователно, въпреки наличието на проучвания, демонстриращи връзка между увреждането на ДНК на сперматозоидите и неблагоприятните изходи при ART, доказателствата са неубедителни, тъй като няма стандартизация на тестовете, които са били използвани за откриване на увреждане на ДНК на сперматозоидите.

28. Микробиота и хомеостаза

В последните 15 години са проведени интензивни проучвания, относно ролята на чревната микробиота в патогенезата на широк спектър от

заболявания, включващи коморбидните състояния на метаболитния синдром [Muscogiuri et al, 2019; Backhed et al, 2004; Turnbaugh et al, 2006; Khan et al, 2016], невродегенеративни заболявания и тревожно-депресивни състояния [Kubelkova and Macela, 2020], мъжко безплодие[Muscogiuri et al, 2019;Pearce et al, 2019; Ding et al, 2020; Tremellen et al, 2018], автоимунни [James et al, 2020] и туморни заболявания [Zhang et al, 2019].

Чревната микробиота (включващ и колективния геном на микроорганизмите, означаван като микробиом), е съставен от бактерии, археи, вируси, фунги и протозои. Изчислено е, че броят на бактериите в червата е приблизително 3 x 10^{13} и при здрави, възрастни индивиди е съставен (98%) най-вече от следните бактериални типове: Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria и Actinobacteria, като доминиращи са представителите от тип Firmicutes (60-80%) и от тип Bacteroidetes (15-25%)[Zhang et al, 2019]. Видовото многообразие и количеството на бактериите в чревната микробиота нарастват от стомаха към колона, където се установява най-голямата им концентрация и е интересен фактът, че микробиомът се състои от над 3 млн. гени, имайки предвид, че в човешкия геном има само 20 000 – 25 000 гени [International Human Genome Sequencing Consortium, 2004].

Динамичната функционална мрежа между чревно-микробната екосистема, системния метаболизъм, имунната система и ентералната нервноендокринна система е от особено важно значение за установяването и поддържането на хомеостазата на гостоприемниковия (човешкия) организъм. Установено е, че чревната микробиота упражнява важно въздействие върху гостоприемниковата физиология, включително контрол на посттранслационни модификации на гостоприемниковия протеом [Seth et al, 2019], стимулиране развитието на имунната система и имунната хомеостаза [Kim et al, 2018], установяване на интегритета на чревната бариера[Dodd et al, 2017], извличане от диетата на недостъпни и ценни хранителни вещества [Koh et al, 2016], синтез на някои есенциални витамини и невротрансмитери [Lynch and Pedersen, 2016], модулиране на невроповеденческите свойства [Sharon et al, 2019], ендокрини функции [X. Zhang et al, 2019], регулиране на костната плътност [Tyagi et al, 2018] и дори участие в биотрансформацията на лекарствени средства [Zimmermann et al, 2019]. Загубата на полезни чревни бактерии и намаляването

на видовото разнообразие на чревномикробната екосистема се означава, като чревна дисбиоза (дисбаланс на микрофлората) [Zhang et al, 2019].

Наред с нарушенията във функциите на гастроинтестиналния тракт и съответстващата им патология, вследствие на чревната дисбиоза може да бъдат засегнати и далечни органи чрез разнообразни и различни механизми, включващи транслокация на чревния микробиом и/или на части от техните компоненти, циркулация на метаболити или ендокринни продукти получени от бактерии, миграция на имунни клетки и фактори, както и модулиране на сигнализацията чрез n. vagus по оста „черва-мозък“. Всичко това може да индуцира развитието на невропсихиатрични нарушения (депресия, аутизъм) [Kubelkova and Macela, 2020; Sharon et al, 2019], автоимунни заболявания [Paun et al, 2019], метаболитни заболявания [Depommier et al, 2019; Delzenne and Bindels, 2018] и дори развитие на екстраинтестинални тумори [Singh et al, 2018; Luu et al, 2018]. В това отношение важно е да се отбележи, че има много доказателства относно ролята на микробните метаболити, получени от погълнатите хранителни вещества (късоверижните мастни киселини (short-chain fatty acids, SCFAs), микробиалните триптофанови катаболити и сукцинат), като основни ключови фактори в тези механизми [Zhang et al, 2019].

29. Затлъстяване и чревна микробиота

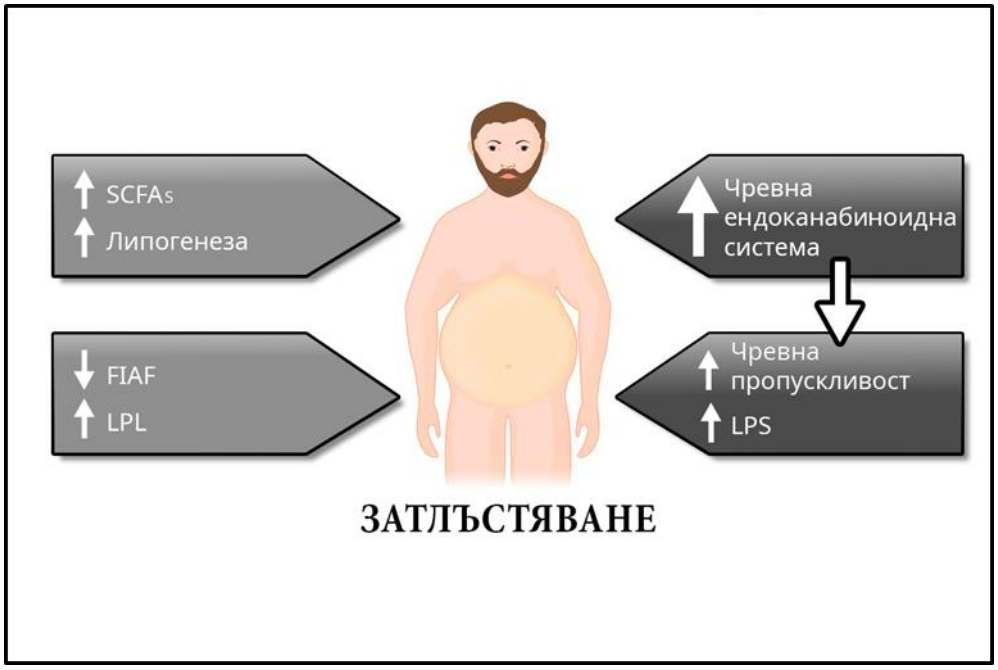
Микробиотата на хора със затлъстяване съдържа по-малко като количество представители от тип Bacteriodetes и повече представители от тип Firmicutes в сравнение с лица с нормална телесна маса [Ley et al, 2005]. Доказателства за взаимовръзката между затлъстяването и дисбаланаса на чревната микробиота са демонстрирани от опитите на Wostmann et al., които са установили, че гнотобиотични линии мишки (родени в стерилна среда и без чревна микрофлора, germ-free, GF) изискват хранене с висококалорична диета, за да достигнат таргетна телесна маса в сравнение с мишки от див тип, които достигат определената маса с нормална диета [Wostmann et al, 1983]. Тези констатации са подкрепени от Backhed и сътр., 2004, които са установили, че при мишки от див тип има 47% повече мастна тъкан в сравнение с GF мишки, въпреки че последните са хранени с висококалорична диета. В допълнение на това, когато са колонизирали червата на GF мишки с микрофлора, придобита от

цекума на мишки див тип, GF мишките увеличават масата на адипозната си тъкан с 60% [Backhed et al, 2004]. Установено е също, че GF мишки, хранени в продължение на 8 седмици с HFD и диета богата на въглехидрати (high-carbohydrate/high-fat Western diet) придобиват по-ниско телесно тегло в сравнение с тези от див тип. Освен това GF мишките нямат нарушения в глюкозния метаболизъм, докато тези от див тип имат [Backhed et al, 2007].

Няколко проучвания са изследвали потенциалните механизми, допринасящи за взаимовръзките между затлъстяването и промените в микробиотата чрез отчитане на различните фенотипове на зътлъстяване, и разликите в микробиотата, стремейки се да установят как промененият състав на микрофлората, може да модулира енергийния метаболизъм на гостоприемника [Turnbaugh et al, 2006; Khan et al, 2016]. Изобилието на представители от тип Bacteriodetes в чревната микробиота е пряко свързано с концентрацията на късоверижни мастни киселини (SCFAs) във фекални проби от пациенти със затлъстяване[Muscogiuri et al, 2019]. Особено високи нива са установени за пропионат, бутират и ацетат, които взаимодействат с G-протеин свързания рецептор (GPRs) и по-специално с GPR41 (free fatty acid receptor 3, FFAR3), който се експресира в червата, по адипоцитите и в периферната нервна система. Този рецептор се свързва първично с Gi/Go протеини, докато GPR43 (free fatty acid receptor 2, FFAR2) главно активира Gi/Go протеините в червата и в мастната тъкан. Допълнителни данни демонстрират, че SCFAs свързвайки се с GPR43, могат да модулират имунния отговор чрез освобождаването на проинфламаторни цитокини [Choi et al, 2013] и чрез увеличаване чувствителността на хипоталамуса към лептин [Samuel et al, 2008]. В мастната тъкан активирането на GPR43 инхибира инсулиновата сигнализация, като по този начин инхибира натрупването на липиди и стимулира липолизата в адипоцитите. Чревно-асоциираният GPR43 улеснява секрецията на глюкагон-подобния пептид 1 (GLP-1), който на свой ред увеличава постпрандилната секреция на инсулин и намалява освобождаването на глюкагон [Kimura et al, 2013].

Затлъстяването е асоциирано с изобилие от бактерии, способни да ферментират въглехидратите от диетата, което води до увеличени нива на биосинтез на късоверижни мастни киселини (SCFAs), доставяйки на

гостоприемника излишък от енергийни субстрати, които в крайна сметка се депонират във вид на липиди или на гликоген. Намалената експресия на индуцираният от глад адипозен фактор (fasting-induced adipose factor, FIAF), който е циркулиращ инхибитор на липопротеилипазата (LPL), води до увеличено депониране на липиди в бялата мастна тъкан. По-късните промени в микробиотата включват активиране на ендоканабиноидната система в червата, което допринася за увеличаване на чревния пермеабилитет и води до ускорено повишение на нивата на бактериален липополизахарид (LPS) в кръвната плазма. Активирането на чревната ендоканабиноидна система с високите плазмени нива на LPS допринася за увеличаване на адипогенезата (фиг. 5).



Фиг. 5. Механизми лежащи в основата на взаимовръзката между затлъстяване и дисбиоза. SCFAs - късоверижни мастни киселини, FIAF (fasting-induced adipose factor) - индуцираният от глад адипозен фактор, LPL – липопротеилипаза, LPS -липополизахарид [модифицирано по G. Muscogiuri et al., 2019].

Промените в композицията на чревната микробиота, свързани с нарастване на количеството на Грам-отрицателните бактерии, може да наруши интегритета на чревната стена, чрез промени в плътните междуклетъчни връзки (tight junctions), като по този начин да се увеличи пропускливостта и за бактериалните ендотоксини(LPS) чрез CD14 рецепторно свързване. Това води до активиране на LPS-сигнализираната каскада с резултат продукция на проинфламаторни цитокини, което се демонстрира при развитието на затлъстяването и увеличената инсулиновата резистентност [de la Serre et al, 2010]. При дисбиоза се активира също и ендоканабиноидната система в червата

чрез стимулиране на ендотелни канабиноид-1 (CB 1) рецептори, които увеличават пропускливостта на чревната стена. В резултат на това се увеличават плазмените нива на LPS, като нарушената бариерна функция на чревната стена, увеличената ендоканабиноидна активност на червата и адипозната тъкан, допълнително комплицират инициалните нарушения и водят до развитие на порочен кръг [Muccioli et al, 2010].

30. Централна нервна система и оксидативен стрес

Увеличават се доказателствата относно ролята на чревната микробиота в патогенезата на невродегенеративните заболявания, както и при острите клинични състояния, като мозъчен инсулт и травматично мозъчно увреждане. Като ключов играч в патогенезата на споменатите нарушения се посочва ОС [Bonaz et al, 2018].

Скорошни експериментални данни демонстрират, че в присъствието на микробиотата, епителната обвивка на червата генерира физиологични нива на ОС, което повлиява състава и функционалността на микробиотата (напр. анаеробите процъфтяват в присъствието на електронни акцептори), и директно пропускливостта на червата, като по този начин се увеличава шансът на ксенобиотичните молекули да достигнат системната циркулация и съответно до ЦНС [Reese et al, 2018]. Окислително-редукционният потенциал на чревната микробиота (т.е. тенденцията и способността на микробиота за получаване на електрони) влияе върху хомеостазата на чревната бариера, докато мозъкът модулира нивата на ОС в рамките на червата чрез вагусните противовъзпалителни холинергични пътища. Това може да има преки или косвени (и евентуално кумулиращи) последици върху окислителния баланс в ЦНС, като това може да се случи по два начина – чрез увеличаване на ROS или чрез повлияване върху антиоксидантната система [Bonaz et al, 2018].

31. Физиологична рола на ROS в ЦНС

ROS имат и физиологична роля в ЦНС. По-голямото количество на ROS се генерира чрез ензимите участващи в окислително-редукционите процеси в клетката или при взаимодействие с потенциално увреждащи фактори.

Основните места в клетката за производство на ROS са митохондриалните комплекси I (NADH-коензим Q оксидоредуктаза) и III (цитохром с оксидоредуктаза), както и комплекс II (сукцинат-Q оксидоредуктаза). Една от основните роли на митохондриите е производството на енергия във формата на аденозин трифосфат (АТФ) чрез процеса на окисляване фосфорилиране (OXPHOS). Този процес се осъществява във вътрешната митохондриална мембрана, където четирите редокс-комплекси образуват електронно-транспортната верига (ETC) [Grimm and Eckert, 2017].

Производството на АТФ от цитохром С оксидаза (комплекс IV) в последния етап на ETC изискват електрони, които се транспортират от редуциран никотинамид аденин динуклеотид (NADH) и редуциран флавин аденин динуклеотид (FADH2) с помощта на комплекси I и II. Голямо количество O_2 е необходим в този процес, тъй като се осигурява ефективен акцептор на електрони. Добавянето на електрон към O_2 води до образуване на супероксид ($\cdot O2^-$), който е основният предшественик на много от ROS в митохондриите [Valko et al., 2007].

При нормални условия нивата на супероксида, получен в резултат на транспорта на електрони в ETC, се намалява от антиоксидантните ензими, като манган-зависимата супероксид дисмутаза (SOD) и мед/цинк-зависимата SOD, които превръщат супероксида във водороден пероксид (H_2O_2) и O_2, като първият след това се трансформира във вода чрез действието на каталаза и глутатион пероксидаза. Този процес обаче не е съвършен и преминаването на електрони през ETC също води до изтичане на електрони, и последващо образуване на ниски нива на супероксид. Добавянето на електрон към супероксида води до генериране на ROS, като H_2O_2 и хидроксилен анион (-OH) и колкото по-високо е количеството на кислорода, толкова по-високо е това на супероксида, което води до по-голямо производство на ROS [Patel, 2016].

Хидроксилният радикал ($HO^{\cdot}$) е много реактивен и образуването му зависи не само от количеството на кислород, но също и от това на железни и медни йони, които служат като каталитични фактори в преобразуването, което е известно като реакция на Fenton ($\cdot O2^- + H_2O_2 \rightarrow HO^{\cdot} + OH^- + O_2$) [Moniczewski et al., 2015].

ROS в ЦНС се генерират и от активността на ензими, като моноамин-оксидазата, формираща H_2O_2 във външната митохондриална мембрана, NADPH оксидазата - при трансфера на електрони в ендоплазмения ретикулум, липооксигеназите – при оксидиране на полиненаситените мастни киселини и при катализирането на трансформацията на арахидоновата киселина се образуват супероксиден и хидроксилен радикали. Пероксизомите също генерират ROS при метаболизма на липидите в процеса на β-окисление, където се формират супероксид и H_2O_2. В цитоплазмата на клетката се генерира супероксид при метаболизма на пурините от ксантин-оксидазата.

Активираните левкоцити и микроглия, представляват друг важен източник за генериране на ROS в мозъка, който е съпроводен с висока консумация на кислород и впоследствие от „кислороден взрив“ [Dumitrescu et al., 2018].

При физиологични условия, ROS участват в регулацията на няколко взаимносвързани процеси, като невровъзпалението, сигналните трансдукционни пътища, имунният отговор и апоптозата. Съществува двупосочно взаимодействие между ОС и възпалението. От една страна ОС може да бъде индуциран от възпалителен отговор и от друга, възпалението може да се активира или засили от ROS чрез активиране на NF-kB, който контролира експресията на редица гени, включително такива, участващи във възпалението и водещи до продукция на различни провъзпалителни цитокини [Dumitrescu et al., 2018].

Левкоцитите индуцират ОС в процеса на фагоцитоза чрез генериране на ROS в реакции, катализирани от NADPH оксидаза, супероксиддисмутаза и миелопероксидаза. Миелопероксидазата е лизозомен ензим, който генерира хипохлорна киселина (HOCl), използвана като мощен окислител срещу патогени [Lloyd et al., 2013].

32. Ефекти на ОС в мозъчната тъкан при нарушения в ЦНС

Увреждащите ефекти на ОС се изразяват в индуцирането на липидна пероксидация, нарушения в структурата и функциите на нуклеиновите

киселини, и на протеините. Основните цели на липидната пероксидация са PUFA (арахидонова киселина и линолова киселина), които се намират в изобилие в клетъчната мембрана. Добавянето на водород от ROS към PUFA води до образуването на липиден пероксилен радикал, който взаимодейства с други PUFA и реагира с кислород, като се образува друг липиден пероксилен радикал, генерирайки по този начин верижна реакция [Cobb and Cole, 2015].

Хидроксилният радикал е с най-висока реактивност и предизвиква най-ефективно липидна пероксидация със съответните увреждания на невроналната мембрана. Клетъчното ниво на ·OH зависи от количеството на наличния кислород, но също и от тези на железните и медните йони, които катализират преобразуването на супероксида и водородния пероксид в хидроксилен радикал [Moniczewski et al., 2015].

Нуклеиновите киселини, като рибонуклеинова киселина (РНК), ядрена ДНК или митохондриалната ДНК също са мишени на ОС. Хидроксилният радикал може трайно да увреди ДНК чрез модифициране на азотните бази и дезоксирибозата. Митохондриалната ДНК е най-податлива към окисляване, тъй като митохондриите са основното място за производство на ROS и тя е в пряк контакт с тях. Окисляването на протеини може да доведе до промени в тяхната функция като активиране, инактивиране или печалба на нова функция, в зависимост от специфичната окислителна модификация с различни последствия за трансдукционните сигнални пътища в клетката [Grimm and Eckert, 2017].

33. Фактори обуславящи чувствителността на мозъка към ОС

Има множество фактори, които правят мозъка особено податлив на ОС. Най-забележителното е, че мозъкът има висока скорост на използване на кислород, възлизаща на около 20% от общото кислородно потребление, въпреки че представлява само 2% от телесната маса. Както беше споменато по-горе, генерирането на АТФ чрез ЕТС води до изтичане електрони и образуване на супероксид с последващо производство на ROS. Тъй като мозъкът използва големи количества кислород, това е свързано с генериране на значително количество ROS. Освен това в ЦНС има региони с високи нива на желязо, което способства за генерирането на още повече хидроксилни радикали. По-голямата концентрация на PUFA в невроните е друга причина за податливостта на мозъка

към ОС [Galecki et al., 2015]. Наред с това мозъкът се характеризира с тесен хомеостатичен редокс потенциал, въпреки че правилното функциониране на ЦНС изисква генерирането на високи нива на ROS (т.е. нужда от много кислород, висок окислителен метаболизъм и широко използване на ROS, и други реактивни видове за вътре- и междуклетъчно сигнализиране) и наличието на автооксидиращи се невротрансмитери (допамин) [Cobley et al., 2018].

34. Оксидативен стрес и болест на Паркинсон

Сложното взаимодействие между генетичните фактори и факторите на околната среда, допринасят за увеличаване ролята и негативните ефекти на оксидативния стрес. Роля в това отношение имат и възпалението, автофагията, апоптозата, протеиновата агрегация и промените в нивата на невротрансмитерите[Tamtaji et al., 2020]. Ролята на оксидативния стрес изглежда е от съществено значение в патогенезата на БП. Както е известно, оксидативният стрес е резултат от дисбаланс между продуцираните ROS и тяхната неутрализация от антиоксидантните системи в тъканите. Допаминергичните неврони в *substantia nigra* се установяват високи базови нива на ROS, като същевременно притежават ниска активност на глутатион-перкосидазите (GPx) - семейство ензими, което включва осем изоформи, участващи в детоксикацията на H_2O_2. GPx може да използва γ-глутамилцистеин като редуктор за H_2O_2 [Quintana-Gabrera et al., 2012]. За мозъка основна роля се приписва на изоформата GPx4, тъй като индуцираната от тамоксифен Gpx4 аблация при мишки води до летален фенотип със загуба на неврони [Yoo et al., 2012].

Новооткрит път на клетъчна смърт, наричен фероптоза, наскоро е свързан както с GPx4, така и с БП [Guiney et al., 2017]. Фероптозата се отнася до желязозависима клетъчна смърт, която включва изчерпване на нивата на вътреклетъчния редуциран глутатион (GSH). Апоптотичният сигнален път, фосфорилирането на протеин киназата и активирането на ядрения фактор капа B (NFκB) от окислители, са процеси пряко зависими от вътреклетъчната и тъканната GPx [Lei et al., 2007].

Поради дългите си аксони и милиони синапси, които се нуждаят от висока енергия, за да работят правилно, допаминергичните неврони в субстанция нигра са особено уязвими към ОС [Giulla et al., 2019]. В мозъка съществува също изобилие от генериращи ROS ензими, като тирозин хидроксилаза и моноамин оксидаза. Допаминът (DA) лесно се окислява както спонтанно, така и ензимно, до получаване на допамин-хинонови производни, които са в състояние ковалентно да модифицират клетъчни нуклеофили, като глутатион (GSH), протеиновите цистеинилни остатъци, α-синуклеин, паркин и други протеини, които са свързани с патофизиологията на ПБ [Spencer et al., 2002]. Невротрансмитерът допамин лесно се автоокислява и се превръща в невромеланин, което насърчава образуването на ROS. Следва самопотенциращ се порочен цикъл на невродегенерация [Puspita et al., 2017].

Митохондриите са едни от основните места за производството на ROS и са основна цел на причинените от свободните радикали, клетъчни увреждания. Нарушения в нагъването на протеини в ендоплазмения ретикулум и високият цитоплазмен калциев товар са други важни източници на ROS в клетките.

Невровъзпалението, дължащо се на свръхактивирано и/или хронично активирано състояние на микроглията, е друг източник на прекомерно и неконтролирано освобождаване на свободни радикали. Молекулярните механизми, залегнали в основата на тези патофизиологични процеси, все още са в процес на оценка, но скорошни доказателства идват от проучвания върху гена high-mobility group box 1(HMGB1) [Angeloupolou et al., 2018], част от сигналната система на рапамицин (mTOR) [Zhu et al., 2019] и nuclear factor, erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) [Francisqueti et al., 2019].

Неотдавнашните генетични изследвания разкриват, че дисфункцията на лизозомната система е един от най-ранните патогенетични механизми. Тези промени вървят успоредно с другите патогенетични механизми [Cleeter et al., 2013].

Продуктите на липидна пероксидация могат да подпомогнат образуването на токсични разтворими олигомери по дозозависим начин. Следователно, превенцията на липидната пероксидация може да

инхибира ненормалната агрегация на α- синуклеин и по този начин да забави патогенезата на БП [Bae et al., 2013].

Автофагията и ОС са взаимозависими процеси. ОС може да повлияе на автофагия чрез много механизми, т.е. активиране на аденозин-монофосфат-зависима протеин киназа (AMPK, EC 2.7.11.11) [Li et al., 2013], инхибиране на сигналния път mTOR [Jiang et al., 2016] или активиране на пътя на JNK [Suzuki et al., 2015]. От една страна, ОС е мощен активатор на автофагия, от друга страна, дефектната автофагия увеличава ОС.

Съществуващата терапия на БП е насочена само към облекчаване на симптомите чрез увеличаване на централните ефекти на DA или блокада на ацетилхолин. Мутациите на глюкоцереброзидазния ген бяха открити като най-критичният фактор за генетична уязвимост за ПБ, а лекарствата, които пречат на този процес, са в процес на изследване[Noelker et al., 2015]. За съжаление, дори при този скорошен пробив в лечението на БП, забавянето на невродегенеративния процес в патогенезата на заболяването чрез невропротективна терапия е важна, но недостатъчно разработена територия. Централното място, което заема ОС, както при прогресията на БП, така и при усложненията от допаминергичната терапия (т.е. дискинезия), налага въпроса за стойността на употребата на антиоксиданти.

35. Заключение във връзка с литературния обзор

- Има многобройни изследвания относно ролята на ОС в патогенезата на идиопатичния мъжки инфертилитет, но данните са неоднозначни, особено по отношение третирането му с антиоксиданти.

- Увеличават са данните за ролята на микробиотата в патогенезата на различни заболявания, но данните за ефектите върху репродуктивните параметри все още са оскъдни.

- Опитите с прилагане на антиоксиданти за повлияване на ОС в ЦНС невинаги са успешни, което показва необходимостта от проучвания в тази насока.

III. Цели на проучването

1. Оценка на оксидативния стрес в тестисите и патофизиологичното му значение за мъжката репродуктивна функция.

2. Оценка на оксидативния стрес в ЦНС и патофизиологичното му значение за двигателните нарушения при модел на Паркинсонизъм.

3. Оценка на ефекта на пробиотиците при модел на инфертилитет, индуциран с диета.

4. Оценка на ефекта на α-липоевата киселина върху модел на Паркинсонизъм.

IV. Задачи на дисертационния труд

1. Да се проучи влиянието на диета, суплементирана с рафинирано и запържено слънчогледово масло върху параметрите на сперматозоидите.

2. Да се оцени влиянието върху телесното тегло и натрупването на епидидимална мастна тъкан при мишки с добавено слънчогледово (рафинирано и запържено) масло и при тези с добавен пробиотик.

3. Да се установят ефектите на диетата, суплементирана с рафинирано и термично обработено слънчогледово масло върху сперматогенния епител на тестикуларна тъкан чрез хистологичен анализ.

4. Да се оцени изменението в липидния профил на кръвната плазма и нивата на тестостерон.

5. Да се оцени нивото на оксидативен стрес в кръвната плазма и тестикуларна тъкан чрез измерване нивата на липидна пероксидация.

6. Да се проучи възможният протективен ефект на пробиотиците при мишки с диета-индуциран оксидативен стрес.

7. Да се репродуцира експериментален модел на хемипаркинсонизъм при плъхове чрез унилатерално, интрастриатално инжектиране на 6-OHDA.

8. Да се оцени нивото на ОС в мозъчни хомогенати от двете хемисфери на експерименталните животни, чрез измерване нивата на липидна пероксидация и активността на глутатион-пероксидаза.

V. Материали и методи

1. Ефекти на запържено слънчогледово олио върху спермалните показатели у миши модел: имат ли пробиотиците протективен ефект?

1.1. Дизайн на научното изследване

Експерименталният протокол на научното изследване беше одобрен от Комисията по хуманно отношение към опитните животни на Near East University, Никозия, Кипър с разрешително №2016/2-1. Животните бяха придобити от Вивариума при Near East University и проучването беше осъществено във Факултета по ветеринарна медицина на същия университет. Бяха използвани общо 40 мъжки мишки от линия BALB/c на възраст 90 дни, т.е. достигнали фертилна възраст. Те бяха разделени на 5 групи, по 8 във всяка (n=8). Експерименталните мишки бяха отглеждани във Вивариума на Near East University в гр. Никозия в продължение на 63 дни при редуване на 12 ч./12 ч. светлинен и тъмнинен режим. Те имаха достъп *ad libitum* до храна и вода.

Мишките в контролната група бяха хранени със стандартна гранулирана храна. Първа експериментална група беше хранена със стандартна гранулирана храна с добавено рафинирано слънчогледово олио (Oil). Втора група - със стандартна гранулирана храна с добавен пробиотик (OilPro). Трета група със стандартна гранулирана храна с добавено слънчогледово олио и четвърта група съответно със стандартна гранулирана храна с добавено запържено олио и пробиотик (FryOilPro). За приготвянето на запърженото олио, беше закупено рафинирано слънчогледово олио за търговски цели, което беше загрявано до 232ºC (точка на пушене), 3 последователни пъти. Хранителните характеристики на диетата и добавките във всяка от групите са посочени в табл. 4.

Табл. 4: Хранителни характеристики на диетата в съответните групи.

Групи	Диета	Суров протеин (%)	Маз-нини (%)	Целу-лоза (%)	Скор-бяла (%)	Пе-пел (%)	Сухо веще-ство (%)	Енергия (Kcal/kg)
Контрол-на	Стандартна гранулирана храна	19,43	2,48	4,35	38,97	6,19	92,03	2789
I (Oil)	Стандартна гранулирана храна + слънчогледово олио	17,51	13,77	4,65	34,37	5,63	93,11	3306
II (OilPro)	Стандартна гранулирана храна + слънчогледово олио + пробиотик	17,51	13,77	4,65	34,37	5,63	93,11	3306
III (FryOil)	Стандартна гранулирана храна + запържено олио	17,21	14,1	4,99	33,94	5,64	93,22	3317
IV (FryOil Pro)	Стандартна гранулирана храна + запържено олио + пробиотик	17,21	14,1	4,99	33,94	5,64	93,22	3317

Хранителните характеристики на компонентите на диетата за всяка група бяха анализирани от лицензирана лаборатория (Safyem Ar-Ge Lab., гр. Ескишехир, Турция).

1.2.Приготвяне на водата за пиене с добавен пробиотик

Пробиотиците бяха закупени от местната аптечна мрежа във вид на водоразтворим прах в алуминиеви сашета по 1 g. Всяко саше съдържаше по $2x10^9$ от посочените микроорганизми - *Lactobacillus casei, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus plantarum* и *Bifidobacterium lactis*. Препоръчаната доза от производителя за хора е едно саше (1 g) дневно. За да потвърдим количеството на живи бактерии във всяко саше, цялото съдържание на едно пакетче беше изсипано в 100 ml стерилен физиологичен разтвор (0,9% NaCl, w/v) и внимателно беше размесено в стерилна Ерленмайерова колба. В този разтвор беше определен общият брой на аеробните бактерии. За целта беше направено десетократно нарастващо серийно разреждане на приготвената суспензия, както е посочено от Miller and Wolin, 1974. Един милилитър от хомогенизираната суспензия беше добавен към 0,9 % р-р на NaCl, последвано от серийно разреждане от 10^{-1} до 10^{-8}, използвайки една и съща пипета. От всяка от последните три разредени проби беше отпипетирано по 0,1 ml и беше нанесен върху плаки с триптиказа-соев агар (TSA, Merck Germany), след което бяха инкубирани за 48 часа на 37 ºC. Всички бактериални колонии, отгледани на плаките, бяха преброени и резултатите бяха изведени като $\log_{10}$ колония образуващи единици на грам пробиотичен продукт (CFU/g). Установеното общо количество на живи бактерии в пробиотичния източник беше $1,7x10^8$ CFU/g.

След определянето на количеството живи бактерии в пробиотика, беше обогатена водата за пиене на експерименталните животни с добавяне на прахообразният пробиотик. Концентрацията на живи бактерии във водата за пиене след добавката на пробиотика беше $1x10^7$ CFU/ml. Така приготвена, водата с добавеният пробиотик се сменяше на всеки три дни в продължение на експерименталния период. Използваният пробиотик по време на употреба беше съхраняван на стайна температура, както е по указания на производителя. Всички мишки имаха свободен достъп до водата за пиене през експерименталния период.

1.3.Определяне на наддаването на телесно тегло, консумация на храна и енергия; определяне на консумираната енергия за грам наддадено тегло

За да се определи наддаването на телесно тегло, всички мишки бяха претеглени на 1-вия и на 63-тия ден. На края на всяка седмица се измерваше теглото на всички мишки, за да се проследи наддаването на тегло във всяка една от групите. Определянето на консумираната енергия и на енергията, неоходима за грам наддаване на телесно тегло, се изчисли според количеството консумирана храна и дадените в таблицата енергийни стойности за всяка отделна група.

1.4.Получаване на кръв, сперма и тъканни проби

Биохимичните изследвания бяха направени в диагностичната лаборатория на Animal Hospital, Neat East University. Кръвните проби се получиха чрез перкутанна кардиална пункция с помощта на 2 ml спринцовки с хиподермални игли 23G в епруветки съдържащи K_2EDTA и в епруветки с активатор на съсирването. Плазмените и серумните проби бяха получени след центрофугиране на кръвните проби на 1500 G за 10 минути при 4 ^{0}C. Мишките след това се евтаназираха чрез цервикална дислокация и веднага бяха подложени на лапаротомия по линия алба, за да се визуализират *ductus deferens* и надсеменниците. Споменатите органи бяха отпрепарирани и поставени в 5 ml затоплен до 37ºC фосфатно-буферен разтвор на Dulbecco. Епидидималната мастна тъкан беше отделена от надсеменника и претеглена на електронна везна (ATX-224, |d=0,0001g|, Shimadzu, Kyoto, Japan). Непосредствено след това надсеменниците и семепроводите бяха нарязани на малки късчета в средата на Dulbecco и покрити с минерално масло FertiCult®. Нарязаните на късчета органи бяха инкубирани за 20 минути, за да може сперматозоидите да дифундират в буферния разтвор. Веднага след това от така приготвената суспензия, с микропипета се вземаха по 10 µl и се приготвиха нативни микроскопски препарати за определяне на мотилитет и прогресивно движение напред на сперматозоидите. Тестисите също бяха ексцизирани и поставени на –80ºC до момента на определяне на нивата на липидна пероксидация.

1.5.Сперматологично изследване

1.5.1. Определяне на мотилитет и прогресивно движение напред на сперматозоидите

Наблюдението на нативните препарати се направи на светлинен микроскоп интегриран с дигитална аналитична система за наблюдение и софтуер (Leica DM500 light microscope/Leica Application Suit version 3.0 Serial 38132019 Leica ICC50 HD, Heerbrugg, Switzerland) при увеличение x200. Подвижността и прогресивното движение се определиха паралелно. За целта капка от сперматозоидната суспензия беше накапана върху предварително затоплено до 38 – 40 ºC предметно стъкло и покрито с покривно стъкло. За определяне на мотилитета се проследяваха 10 случайно подбрани сперматозоида във всяко зрително поле, като за всяка проба се наблюдаваха пет различни полета. Мотилитета се определяше, като се преоброяваха колко от наблюдаваните сперматозоиди са подвижни и резултата се отчиташе в проценти, по следната формула:

$$M = \frac{n\ x\ 100}{N}$$

където:

M – % на подвижните сперматозоиди;

n – брой на изброените подвижни сперматозоиди;

N – общ брой изброени сперматозоиди;

По същия начин се отчиташе и процентът на прогресивно движещите се напред сперматозоиди, с тази разлика, че стойността на изброените праволинейно движещи се сперматозоиди се разделяше на общия брой на подвижните сперматозоиди. Наблюдаваното движение е праволинейно настъпателно и е резултат от ритмични удари на опашката на сперматозоида и завъртане около надлъжната ос, поради асиметричното устройство на главичката. То е един от критериите за добро качество на спермата

1.5.2. Определяне на концентрацията на сперматозоидите (x 10^6/ml)

Концентрацията на сперматозоидите се определи с помощта на броителна камера на Тома (Thoma counting chamber) и меланжер за левкоцити, подобно на броенето на бели кръвни клетки [Christensen et al., 2005]. Изследваните проби се разреждаха 10 пъти с дестилирана вода в пипетата за разреждане на левкоцити. От така разредената проба се зареждаше броителната камера, като първата капка се отсраняваше от меланжера. Изчисляването на концентрацията се извършваше след преброяване на сперматозоидите в пет средни квадрата от хемоцитометъра на Тома (Фиг. 6) по следната формула:

$$C = \frac{n \times D \times 4000000}{N}$$

където:

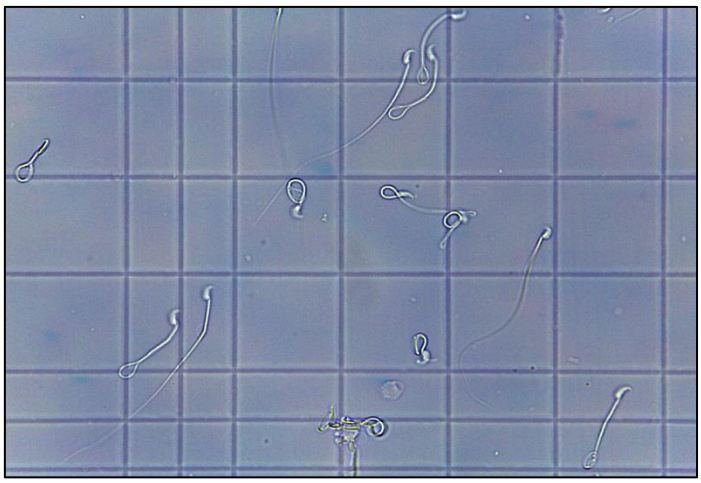
C е броят на сперматозоидите в 1 ml;

n – броят на преброените сперматозоиди (в 5 средни или 80 малки квадратчета);

D – степента на разреждане в меланжера;

N – броят на изброените малки квадратчета (80);

4 000 000 – число, изразяващо обема на камерата в 1 $см^3$ (едно малко квадратче има обем 1/4 000 000 от 1 $см^3$)



Фиг. 6: Мрежа на броителната камера на Тома със заредени сперматозоиди (Ориг. увел. x100).

1.5.3. Определяне процента на живите сперматозоиди по метода на Морозов

За целта приготвихме тънка натривка върху добре почистено и обезмаслено предметно стъкло. Натривката се приготви по следния начин: капка от сперматозоидната суспензия се накапа върху предметното стъкло. Към нея се добави капка от 5%-ов воден разтвор на еозин. Двете капки се размесиха внимателно, след което с шлифовано стъкло се направи равномерна натривка. Живите сперматозоиди в момента на боядисването не поемат боя, а на мъртвите и слабоподвижните главичките се оцветяват в червено (Фиг. 7).

Фиг. 7 : Оцветяване на мъртвите сперматозоиди с 5%-ов воден разтвор на еозин (със стрелки са показани живи сперматозоиди; ориг. увел. x200).

Преброиха се 500 сперматозоиди, като се отчиташе броят на оцветените и неоцветените. Процентът на живите сперматозоиди се определи по следната формула:

$$X = \frac{n \times 100}{N}$$

където:

X е % на живите сперматозоиди;

n – неоцветени сперматозоиди в бр.;

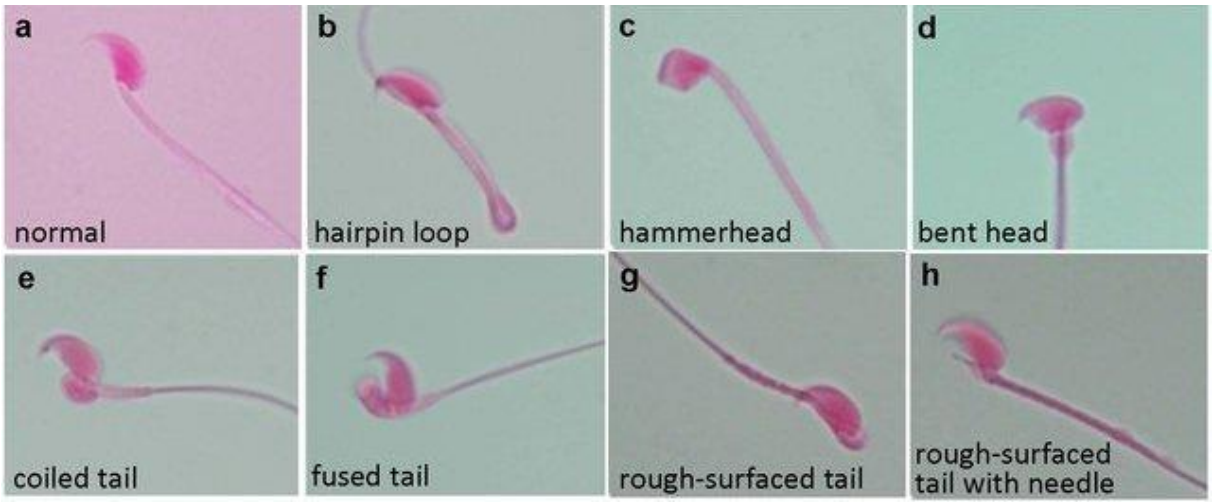
100 – коефициент за превръщане в процент;

N – общ брой изброени сперматозоиди.

1.5.4. Определяне процента на патологичните сперматозоиди

Определянето на процента на патологичните сперматозоиди се извършваше след приготвяне на натривки от разредената спермална проба. След изсушаване, натривките се фиксираха с метанол и след повторното им изсушаване се накапваха с няколко капки от боята на Giemsa (10 капки от боята на Giemsa се разтварят в 5 ml дестилирана вода) за 5 минути. След промиване с дестилирана вода и повторно подсушаване, натривките се наблюдаваха на увеличение x1000 с имерсионен обектив на светлинен микроскоп. Определянето на процента на патологичните сперматозоиди се извършваше след отчитане на броя на сперматозоидите с абнормална структура на главичката, шийката, средната част и опашката (Фиг. 8), като се преброяваха 300 сперматозоида. Процента на абнормалните сперматозоиди се изчисли по следната формула:

% патологични сперматозоиди = брой патологични форми x 100/общ брой преброени сперматозоиди.



Фиг. 8: Различни патологични форми на миши сперматозоиди (Оцв. с еозин, по Takeda et al., 2016).

1.6.Хистологично изследване

Тъканните проби от тестикуларна тъкан бяха фиксирани след отпрепарирането им в 10% -ен неутрален формалин и след това бяха включени в парафинови блокчета. С микротом бяха направени 5 µm срези и оцветени с хематоксилин и еозин. Хистологичните срези бяха анализирани на светлинен микроскоп интегриран с дигитална аналитична система за наблюдение и софтуер (Leica DM500 light microscope/Leica Application Suit version 3.0 Serial

38132019 Leica ICC50 HD, Heerbrugg, Switzerland). Семинифериите каналчета бяха оценени (50 семинифериии каналчета на животно) според методиката на Johnsen`s Tubular Biopsy Score [Johnsen S., 1970].

Чрез този метод се установява наличието на съответните клетъчни типове и генерации клетки в семенните каналчета (наличие на Сертолиеви клетки, сперматогонии и всички следващии генерации клетки от сперматогенезата до фаза на диференцирани сперматозоиди в лумена им, се оценява с 10, 9 или 8; до фаза сперматиди – 7; до сперматоцити – 5 или 4; само сперматогонии - 3 и т.н.). Установена е висока степен на корелация между Jonsen`s Tubular Biopsy Score и сперматозоидната концентрация, като показател за функционалното състояние на тестикуларната тъкан [Johnsen S., 1970].

1.7.Определяне на триглицериди, общ холестерол и тестостерон

Бяха изследвани нивата на общ холестерол (mg/dL) и триглицериди(mg/dL) в проби от кръвен серум с помощта на автоматичен биохимичен анализатор (BS120, Mindray, Shenzen, China). Концентрацията на тестостерон (в ng/mL) се определи чрез ензимно-свързано имуносорбнетно изследване (competitive ELISA тест, Testosterone, DE1559, Lot.29K126, Demeditec, Kiel, Germany). Изследването беше направено според препоръките на производителя. Промиването на плаките между отделните натоварвания на реагентите се извърши в автоматичен микротитърен апарат за промиване (MW-12A Microplate washer, Mindray, Shenzen, China) и резултатите бяха получени на микротитърен ELISA рийдър при 450 nm (MR-96A Microplate reader, Mindray, Shenzen, China).

1.8.Измерване на липидна пероксидация

За да се определи концентрацията на малондиалдехид (MDA) в пробите от кръвна плазма и тестикуларна тъкан използвахме кит за определяне на реактивните субстанции на тиобарбитурова киселина (TBARS Assay Kit, Item No.10009055, Batch No.0510196 and 0502129, Cayman Chemicals, Michigan, USA). Пробите от кръвна плазма веднага бяха използвани за анализ, докато пробите от семенниците бяха хомогенизирани, като процедурата се извърши по протокол на производителя, използвайки RIPA буфер (Item No. 100110263,

Batch No. 0490889-1, Cayman Chemicals, Michigan, USA) и сет на Dounce за тъканно хомогенизиране (D8938, Lot. 3110, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) върху лед. След това хомогенизираните проби бяха центрофугирани при 1600 G за 10 минути при 4ºC и супернатантите бяха използвани за анализ. Принципът на измерването се базира на реакцията на тиобартитуровата киселина в кипяща вода за 60 минути в кисела среда и определяне на абсорбцията на реакционната смес при 532 nm. Абсорбцията се измери чрез оптична спектроскопия с UV/VIS спектрофотометър (Model T70, S/N:17-1814-01-0059, PG Instruments Ltd, UK). Плазмените нива на MDA се измериха в μmol/L, а на тестикуларните в μmol MDA/g.

1.9.Статистически анализ

Обработката на резултатите се извърши със софтуер на GraphPad Prism (версия 7.04, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Всички данни бяха изразени като средна стойност ± стандартно отклонение (±SD). Групите от данни бяха сравнени чрез анализ на дисперсията (ANOVA) и последвано от post hoc анализ (Tukey`s multiple comparison test). Стойности на $P<0.05$ се определиха като статистически достоверни.

2. Антиоксидантен ефект на алфа-липоевата киселина при унилатерално, интрастриатално инжектирани плъхове

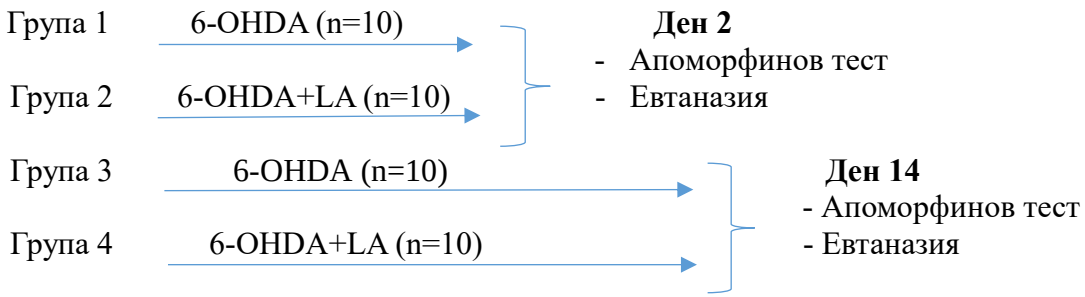
2.1.Лекарствени средства и химикали

Използвахме (R) - (+) - α-липоева киселина (аналитичен стандарт, №04471, Supelco, Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA) за всички експерименти. Фосфатен буфер, 6-OHDA, дезипрамин, аскорбинова киселина, фосфатен-буфер (PBS), апоморфин, кит за активност на GPx (SAB2502102) и кит за доказване на тиобарбитурова киселина (TBARS) (MAK085) са закупени от Sigma-Aldrich, САЩ. Кетамин хидрохлорид е закупен от Richter Pharma, Австрия а ксилазин от Alfasan International, Холандия.

2.2.Дизайн на проучването

Експериментът се проведе в Катедрата по патофизиология на МУ-София, след получаване на разрешително № 184/2017 от Българската агенция по безопасност на храните и при спазване на всички хуманни принципи за работа с опитни животни. Четиридесет мъжки плъхове Wistar (220–260 g) бяха доставени от Вивариума на Медицинския университет в София и бяха поставени при стандартни лабораторни условия (стайна температура 22 ° C, 12 h светлина / 12 h тъмен цикъл), със свободен достъп до вода и стандартна диета. Експериментът започна след една седмица адаптация на животните.

В първия ден всички плъхове бяха разпределени на случаен принцип в четири групи от G1 до G4 (n=10 за всяка група) и всички получиха едностранна интрастриална инжекция на 6-OHDA. Плъховете от G2 и G4 групите бяха третирани i.p. с LA 35 mg / kg дневно, разтворен в 1% разтвор Tween-80, от началото до края на експеримента. На 2-рия ден животните от G1 и G2 бяха подложени на апоморфинов тест. След това бяха евтаназирани с пълно отстраняване на мозъка за допълнителна оценка. Същата процедура беше приложена на 14-ия ден от експеримента с останалите плъхове от G3 и G4 групи. Блок-схемата на изследването е представена на фигура 9.

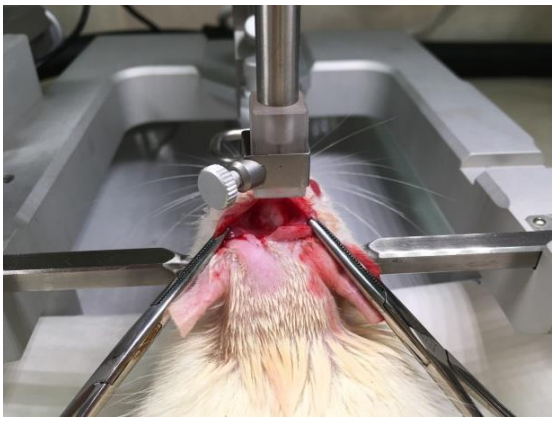


Фиг. 9. Блок-схема на изследването.

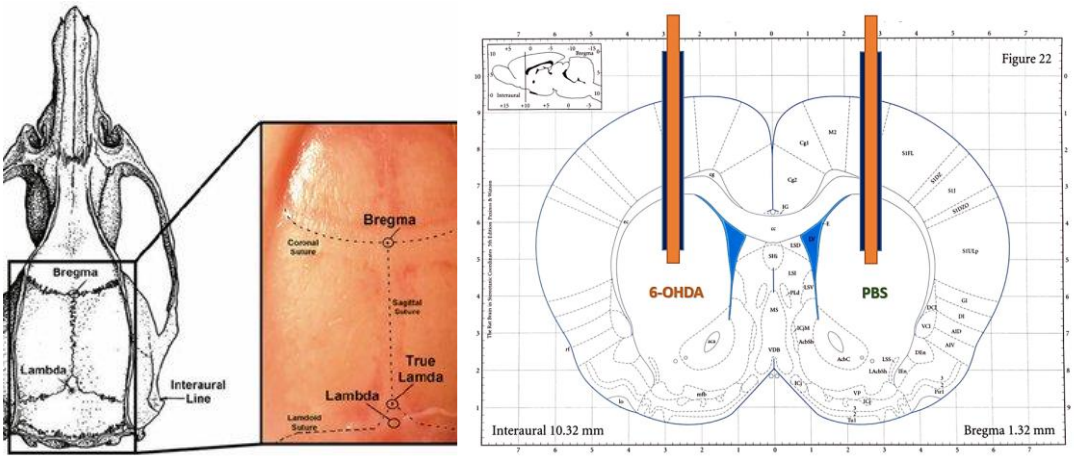
2.3.6-OHDA Едностранно интрастриатално инжектиране

Тридесет минути преди инжектиране на 6-OHDA плъховете бяха третирани с дезипрамин - инхибитор на обратното захващане на норадреналин / серотонин с доза от 25 mg / kg, i.p., за да се предотврати поглъщането на 6-OHDA от норадренергични терминали и за да се увеличи селективността и невротоксичността на 6-OHDA. Стандартни стереотаксични процедури бяха използвани за насочване в медиалния преден мозък.

Плъховете се анестезираха с интрамускулна инжекция на кетамин хидрохлорид (80 mg / kg) и ксилазин (10 mg / kg) и се поставиха върху стереотаксичен апарат (Classic Lab Standard ™ Stereotaxic Instrument, Stoelting, Дъблин, Ирландия). Отпрепарира се кожата над черепния покрив и след визуализирането на отправните точки (ламда и брегма) се определиха съответните координати на местата за микроинжектиране (фиг. 10 и фиг. 11)



Фиг. 10. Експериментален плъх с фиксирана глава на стереотаксичен апарат (Ориг. снимка).



Фиг. 11. Отляво са показани шевовете на черепния покрив при плъх с местата на брегма и ламбда точките. Отдясно е показан напречен срез на мозъка и мястото на микроинжектиране на субстанциите в стриатума(каудатния путамен) на плъх.

След това, 6-OHDA (12 µg в 3 µL физиологичен разтвор с 0,2% аскорбинова киселина) се микроинжектира едностранно (дясната страна) в медиалния преден мозък, като се използваха следните координати (mm): от брегмата (антериор-постериор: -1.32; медиално-латерална: ±3.0; и дорзално-вентрална: -5.0) [Paxinos and Watson, 2007]. Контралатерално (лявата страна) беше микроинжектиран с фосфатен буферен разтвор (PBS). Скоростта на инжектиране беше 1 µL / min, като се използва 30 G канюла, свързана с 10 µL спринцовка Хамилтън. След инжектирането се изчака 2 минути, като време за дифузия преди лекото отдръпване на канюлата.

2.4.Апоморфинов тест

Индуцираната с апоморфин ротация на плъхове с едностранна нигростриална лезия се наблюдаваше след приложението му в доза от 2 mg / kg, i.p., [Hudson et al, 1994]. Животните се оставяха да хабитуират в продължение на 10 минути в тихо изолирано помещение и след това се поставяха в прозрачен цилиндър (диаметър 33 см и височина 35 см). Пълните ротации бяха преброени за първите 60 минути. Двама наблюдатели независимо регистрираха броя на ротациите, противоположни на лезията на нигростриалния тракт.

2.5.Работа с хомогенати в мозъка

На 2-ри и 14-ти ден, съответно, животните се декапитираха с гилотина, без анестезия, за да се избегнат евентуални биохимични промени, дължащи се на използването на анестетици. Мозъците бяха отстранявани, замразявани бързо в течен азот и съхранявани при -80 ° C за по-нататъшно оценяване. Левият и десният лоб бяха обработени отделно. Мозъчните тъкани се претегляха, поставяха се върху лед и се приготвяха 10% w / v хомогенати с PBS, използвайки ултразвуков хомогенизатор. Хомогенатът се центрофугираше при 4000 × g при 4 ° C в продължение на 10 минути, за да се получи ниска-скоростна фракция на супернатантата за TBARS и GPx анализ.

2.6.Измерване на GPx активност

GPx активност се измерваше с помощта на реакция, свързана с глутатион редуктаза [Flohe and Gunzler, 1984]. Редуцираният глутатион се използваше от GPx за намаляване на водородния пероксид (H_2O_2), който от своя страна се регенерира от глутатионредуктазата от редуциран глутатион и NAD(P)H. Резултатите бяха изразени като ензимна активност в U / mg протеин. Един U от GPx представлява 1 μmol NAD (P) H окислен / min на mg протеин.

2.7.Измерване на липидна пероксидация (TBARS)

TBARS се оценяваше колориметрично [Ohkava et al, 1979]. Тъканните хомогенати се обработиха с 10% трихлороцетна киселина и се центрофугираха при 1600 × g в продължение на 15 минути при 4 ° C. Супернатантите се инкубираха с 0,67% тиобарбитурова киселина в продължение на 10 минути при 100 ° C. Успоредно с това се построи стандартна крива с малодиалдехид и концентрацията на TBARS се отчиташе при 532 nm. TBARS се изразяваха като nmol/mg тъкан протеин.

2.8.Измерване на протеин

Протеинът се определяше съгласно метода на Lowry et al. (1951), с говежди серумен албумин като стандарт [Lowry et al, 1951]. Измерването на концентрацията на протеините беше използвано за определяне на антиоксидантната активност на ензимите спрямо mg белтък. Всички

лабораторни оценки бяха извършени със спектрофотометъра S-220 UV / Vis, Boeco, Германия.

2.9. Статистика

Резултатите са представени като средни стойности (M) и стандартни отклонения (SD). За статистическата оценка на резултатите от теста с апоморфин, при необходимост е приложен непараметричният еднофакторен анализ на дисперсия на Kruskal–Wallis (ANOVA) с Tukey posthoc тест. За резултатите от TBARS и GPx оценка е проведена с двуфакторен ANOVA по отношение влиянието на двете независими променливи (група за третиране, мозъчно полукълбо). Групите на третиране включваха G1, G2, G3 и G4, както е показано на Фигура 9, а мозъчното полукълбо се състои от ляво и дясно полукълбо, което се оценяваше отделно. Прието е нивото на значимост $p < 0,05$. Софтуер SigmaPlot, версия 11.0 беше използван за статистическа оценка. Всички плъхове преживяха едностранната интрастриална инжекция на 6-OHDA и бяха включени в статистическия анализ.

VI. РЕЗУЛТАТИ

1. Ефекти на запържено слънчогледово олио върху спермалните показатели у миши модел: имат ли пробиотиците протективен ефект?

През 63-те дни на експерименталния период количеството на консумираната храна във всички групи беше сходна с изключение на тази в контролната група ($P<0.001$, Табл. 5). Не се установи разлика между групите по отношение на консумираната енергия, степента на консумираната енергия за грам наддаване на тегло и наддаването на тегло, за периода на изследването. По отношение на степента на натрупване на епидидимална мастна тъкан се установи, че групите, суплементирани с Oil и с OilPro, са със статистически по-високи стойности на натрупана мастна тъкан в сравнение с контролната група ($P<0.05$, Табл. 5). В допълнение FryOilPro групата имаше по-малко количество епидидимална мастна тъкан в сравнение с тази на Oil групата($P<0.05$).

Въпреки факта, че средната стойност на броя на сперматозоидите във FryOil групата е по-ниска, не се установи статистически достоверна разлика между отделните групи по отношение на концентрацията на сперматозоидите, както и по отношение на морфологията им. Подвижността на сперматозоидите в OilPro и във FryOilPro групите беше значително по-висока в сравнение с контролната и Oil групата ($P<0.01$). Резултатът за подвижността на FryOilPro групата беше с най-висока стойност в сравнение с всички останали групи. Висок беше и резултатът за подвижност на сперматозоидите на мишките от OilPro групата. В този смисъл, използването на пробиотици има позитивен ефект по отношение на мотилитета на сперматозоидите (Табл. 5).

Табл. 5: Резултати за консумираната храна и енергия, наддаването на телесно тегло, както и резултати от сперматологичните, биохимичните и хистологични показатели представени по групи. Резултатите са представени, като $\bar{X} \pm SD$, (n = 8 във всяка група).

	Групи				
Показатели	**Контролна**	**Oil**	**OilPro**	**FryOil**	**FryOilPro**
Консумирана храна (g), 63 дни	271±8.01	216±7.95 [c]	225±7.79 [c]	221±7.23 [c]	227±7.46 [c]
Консумирана енергия (KCal) 63 дни	757	714	744	732	753
Консумирана енергия на g наддадено т.тегло (KCal)	178	190	157	183	121
Наддаване на тегло(g) 63 дни	4.25±2.49	3.75±1.66	4.75±1.48	4.00±2.39	6.25±2.25
Епидидимална мастна тъкан (g)	0.36±0.05	0.55±0.08 [c]	0.49±0.18 [a]	0.45±0.21	0.43±0.13 [a]
Концентрация на сперматозидите (x10^6 /mL)	19.49±6.96	19.75±6.65	19.62± 11.17	13.12±5.16	16.81±9.65
Морфология на сперматозоидите (% патологични форми)	28.71±3.81	23.57±7.42	21.75±5.40	28.29±6.58	24.29±9.79
Мотилитет на сперматозоидите (%)	58.57±7.89	61.14±11.86	70.38± 8.76 [b, e]	61.43±13.29 [g]	73.14±4.73 [j]
Оценка по скалата на Johnsen (JS score)	8.40±0.35	7.78±0.43 [c]	8.39±0.34 [f]	7.61±0.27 [c, d, h]	8.22±0.14 [f, j]
Общ холестерол (mg/dL)	99.19±24.77	121.09±12.02	129.51± 16.10 [a]	109.23 ±14.26	118.60 ±30.97
Триглицериди (mg/dL)	106.40±.69	77.88 ± 25.18	59.39 ± 15.77 [a]	91.69 ±34.68	93.13±40.26
Тестостерон (ng/mL)	2.70 ± 3.69	2.96 ± 4.14	3.38 ± 3.55	2.30±1.74	3.74±3.10

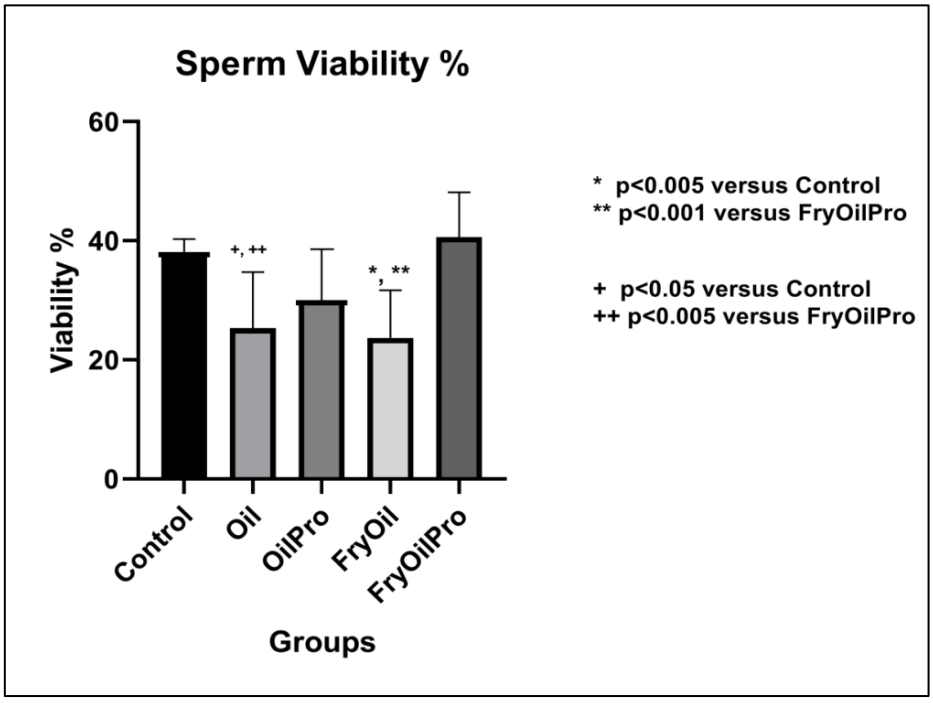
[a]: P<0.05 versus control: [b]: P<0.01 versus control; [c]: P<0.001 versus control; [d]: P<0.05 versus Oil [e]: P<0.01 versus Oil [f]: P<0.001 versus Oil; [g]: P<0.01 versus Oilpro; [h]: P<0.001 versus Oilpro; [j]: P<0.001 versus FryOil.

Беше извършен one-way ANOVA тест и за да се определи дали процентът на живите сперматозоиди е различен при групите с различна диета. Данните са представени като средна стойност ± стандартна грешка. Процентът на живите сперматозоиди има статистически значима разлика между различните групи, F (4, 35) = 7.952, p <0 .005. Живите сперматозоиди са понижени при групите Oil и FryOil, хранени съответно с олио (25.33 ± 3.33) и със запържено олио (23.69 ± 2.83) в сравнение с контролната група (38.13 ± 0.77) и FryOilPro групата (40.64 ± 2.65). Tukey post hoc анализът показва статистически значимо понижение на живите сперматозоиди между контролна и Oil (12.80, 95% CI (1.903 to 23.70))

(p = 0.015) и между Контролна и FryOil (14.43, 95% CI (3.537 to 25.33)) (p < 0.005), както и между FryOilPro и Oil (15.30, 95% CI (4.403 to 26.20)) (p <0 .005), и FryOilPro и FryOil (14.43, 95% CI (6.037 to 27.83)) (p <0 .005), докато между останалите групи няма статистически значими разлики (Табл. 6 и фиг. 12).

Таблица 6: Резултати от изследването за %-а живи сперматозоиди, получени от надсеменниците и семепроводите на опитните мишки (± SD; n = 8 във всяка група).

Tukey's multiple comparisons test	Средна разлика	95.00% CI of diff.	Статистически значимо?	Обобщение	P Value
Control vs. Oil	12.80	1.903 to 23.70	Да	*	0.0146
Control vs. OilPro	8.121	-2.776 to 19.02	Не	ns	0.2255
Control vs. FryOil	14.43	3.537 to 25.33	Да	**	0.0046
Control vs. FryOilPro	-2.500	-13.40 to 8.397	Не	ns	0.9636
Oil vs. OilPro	-4.679	-15.58 to 6.218	Не	ns	0.7316
Oil vs. FryOil	1.634	-9.263 to 12.53	Не	ns	0.9925
Oil vs. FryOilPro	-15.30	-26.20 to -4.403	Да	**	0.0024
OilPro vs. FryOil	6.313	-4.585 to 17.21	Не	ns	0.4676
OilPro vs. FryOilPro	-10.62	-21.52 to 0.2760	Не	ns	0.0591
FryOil vs. FryOilPro	-16.93	-27.83 to -6.037	Да	***	0.0007



Фиг. 12. Процент (%) на живи сперматозоиди, определени в мишките от експерименталната постановка по групи (± SD; n = 8 във всяка група).

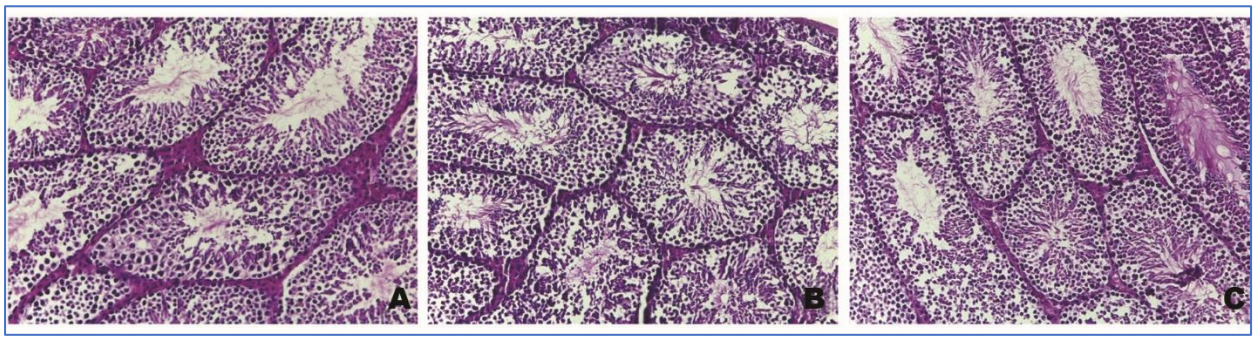
Хистологичните срези от семенните каналчета на тестисите бяха подложени на оценка според скалата на Johnsen (Johnsen Score). Стойностите, получени според скалата на Johnsen в контролната, в OilPro и във FryOilPro групи бяха по-високи отколкото тези в Oil и във FryOil групите. Стойността на контролната група беше по-висока в сравнение с тези на Oil и FryOil групите ($P<0.001$). Също така, резултатът на Oil групата беше по-висок от този на FryOil ($P<0.05$). И двете групи - OilPro и FryOilPro бяха с по-висок резултат след оценка по скалата на Johnsen в сравнение с резултата на FryOil групата ($P<0.001$). С по-висок резултат бяха и стойностите, според скалата на Johnsen, на OilPro и FryOilPro групите, отколкото тези на Oil групата ($P<0.001$). Консумирането на слънчогледово олио във рафинирана или запържена форма намали стойностите на оценките, получени по методиката на Johnsen, в сравнение с оценките, получени за мишките от контролната група, хранени със стандартна диета. Въпреки това, използването на пробиотик изглежда значително предпазва от развитие на негативните ефекти (нарушения и редуциране на отделните клетъчни елементи в сперматогенния епител) на диета, богата на рафинирано и на запържено слънчогледово олио, като протектира сперматогенния епител (Табл. 5).

По отношение на морфологията на сперматозоидите, във всички групи се установи наличие на патологични форми (Фиг. 13).

Фиг. 13: Микроскоскопски изображения на миши сперматозоиди с абнормална морфология. А – контролна група; В – FryOil група; С – FryOilPro група (сравнително по-малко на брой абнормални сперматозоиди). Със стрелки са показани сперматозоиди с абнормална морфология (абнормална главичка). Ориг. увел. х200, оцветяване за морфология на сперматозоиди – по Гимза.

Хистологичното изследване установи нормална структура на тестикуларната тъкан при животните от контролната група. В тъканните проби, взети от групата хранени със запържено масло обаче, се установиха дегенеративни промени и липса на някои клетъчни типове, характерни за

епителa на семинифeрните каналчета. Във FryOilPro групата се установи, че негативните ефекти, свързани с наличието на запържено масло в диетата на животните от FryOil групата в голяма степен са неутрализирани от добавката на пробиотици в диетата им (Фиг. 14).



Фиг. 14. 14A - нормална хистологична структура на сперматогенен епител при животните от контролната група. 14B - абнормална хистологична структура (дегенеративни промени в сперматогенния епител с липса на някои клетъчни типове) на тестикуларна тъкан на мишки от група FryOil, показващи ефектите на запържено олио. 14C - подобрена структура на тестикуларна тъкан на мишки от група FryOilPro, показващи ефектите на пробиотика, неутрализирал в голяма степен негативните ефекти на запърженото олио. Ориг. увел. x200, оцветяване на хистологични препарати с хематоксилин-еозин.

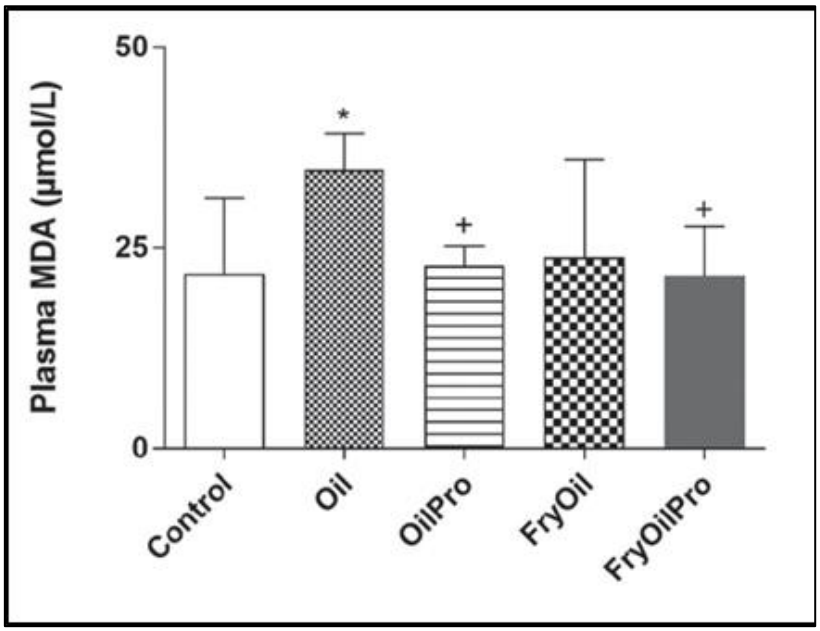
Изследването нивата на липидите в пробите от кръвна плазма установи сигнификантно намаление на триглицеридната концентрация в животните от OilPro групата в сравнение с триглицеридните нива на животните от контролната група ($P<0.05$).

По отношение на нивата на плазмен MDA (крайният продукт на липидната пероксидация) в Oil групата се установи, че са значително по-високи в сравнение с тези на животните от контролната група ($P<0.05$). Установи се и значителна разлика в стойностите на MDA в OilPro и FryOilPro групите в сравнение с тези на Oil групата ($P<0.05$).

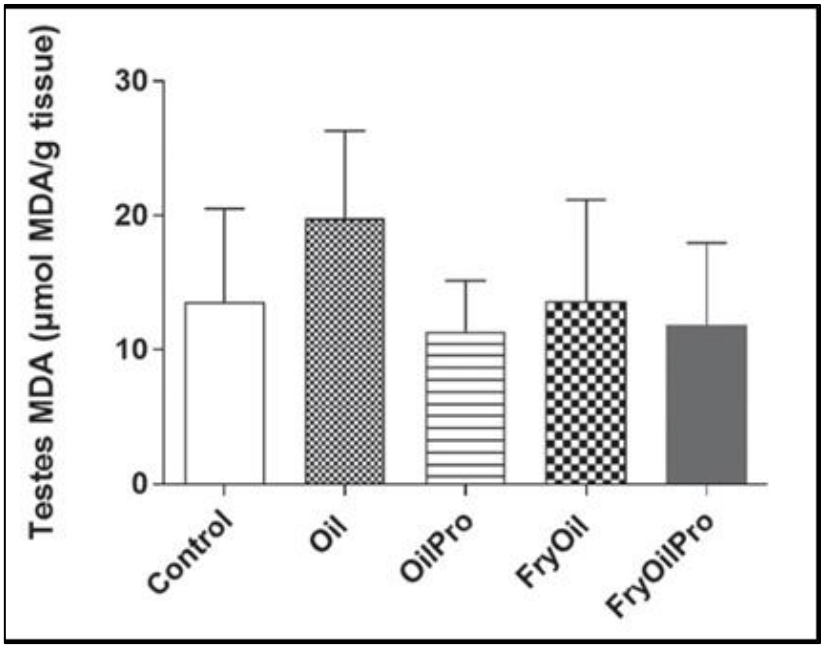
При определяне нивата на MDA в тестикуларна тъкан, не се установиха статистически значими разлики между отделните групи, въпреки че бяха установени по-високи стойности в Oil групата. Не се установи обаче статистическа разлика в нивата на MDA между FryOil и FryOilPro групите ($P>0.05$).

Плазмените нива на MDA са представени на фиг. 15, а нивата на MDA в тестикуларната тъкан на фиг. 16.

Средните стойности на нивата на тестостерон бяха по-високи в експерименталните групи с добавени пробиотици в диетата, но въпреки това не се установиха статистически достоверни разлики. Серумните нива на общ холестерол, триглицериди и тестостерон са дадени в табл. 5.



*Фиг. 15: Нива на малондиалдехид (MDA) в кръвна плазма (± SD; n = 8 във всяка група). *P<0,05 в сравнение с контролна група, $^{+}$P<0,05 в сравнение с група Oil.*

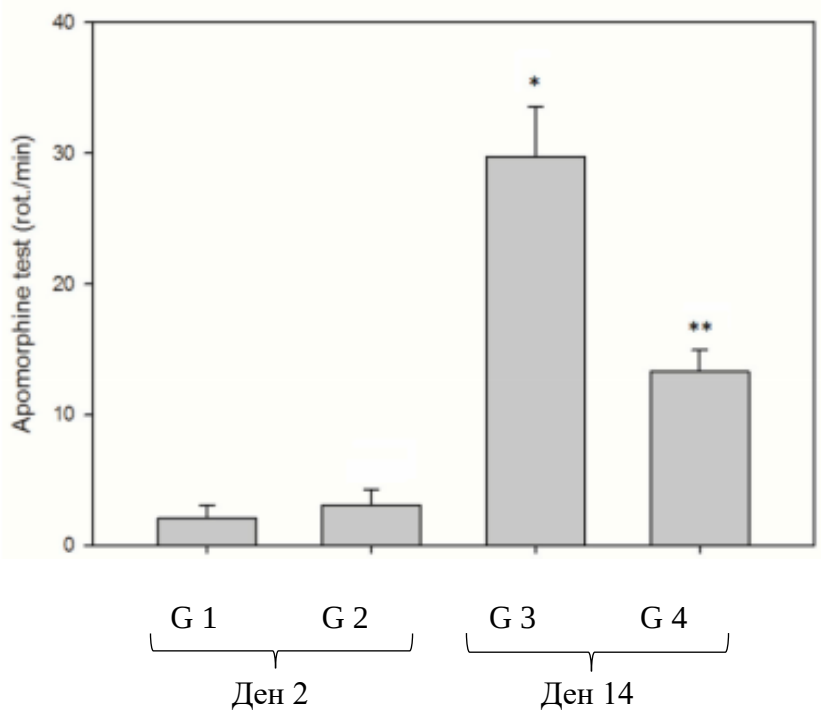


Фиг. 16. Нива на малондиалдехид (MDA) в тестикуларна тъкан (± SD; n = 8 във всяка група).

2. Антиоксидантен ефект на алфа-липоевата киселина при унилатерално, интрастриатално инжектирани плъхове

2.1.Апоморфинов тест

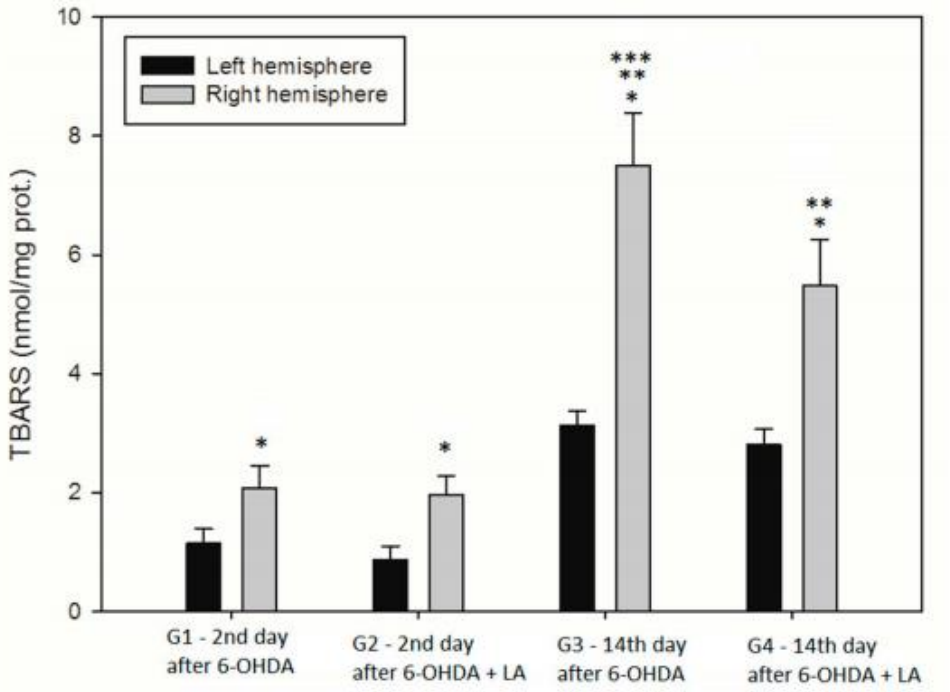
Резултатите от теста на Kruskal–Wallis бяха значителни (H = 34.041, 3 df, ($p<0.001$)); средните стойности на ротация в минута показаха значителни разлики между четирите групи. На 14-ия ден, след едностранното интрастриално инжектиране на 6-OHDA, индуцираните с апоморфин ротации са статистически значимо по-изразени от тези, наблюдавани на втория ден от експеримента (Фиг. 17). Увеличаването на контралатералните ротации индуцирани с апоморфин говори за загубата на допаминергични неврони и директен токсичен ефект на 6-OHDA. Въпреки че, се наблюдаваше тенденция за по-ниска степен на ротации в групата G4 спрямо G3, статистическа значимост не може да бъде достигната.



*Фиг. 17. Апоморфин-индуцирана ротация на експерименталните плъхове представени по отделни групи. Данните са представени, като средна стойност и стандартно отклонение. *p < 0.05 (G3 към G1 и G2); **p < 0.05, G4 към G1 (Tukey test), n=10 във всяка група*

2.2. Оценка на TBARS

Беше проведен двуфакторен ANOVA тест върху двете независими променливи (тип група, мозъчно полукълбо) по отношение нивата на TBARS в мозъчните хомогенати. Всички ефекти бяха статистически значими при нивата на значимост p <0.05 (Фиг. 18). Основният ефект за типа група даде F (3, 72) = 316.836, p <0.001, което показва значителна разлика между G1 група (M = 1.613, SD = 0.57), група G2 (M = 1.420, SD = 0.62), G3 група (M = 5.32, SD = 2.33) и G4 група (M = 4.145, SD = 1.48). Основният ефект за мозъчното полукълбо дава F (1, 72) = 443.609, p <0.001, показва, че има значителна разлика между двете полукълба; ляво полукълбо (M = 1.989, SD = 1.03) и дясно полукълбо (M = 4,26, SD = 2.46). Ефектът на взаимодействие беше значителен; F (3, 72) = 55.633, p <0.001.



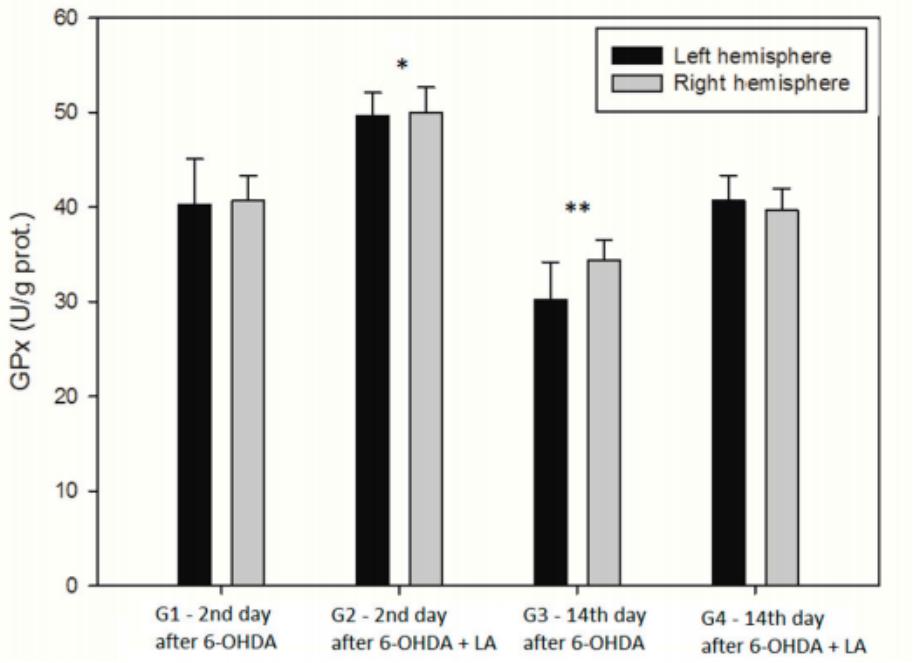
*Фиг. 18. Нива на малондиалдехид (TBARS) на експерименталните плъхове представени по отделни групи. Данните са представени, като средна стойност и стандартно отклонение. *p <0.05 (лява с/у дясна хемисфера във всяка група); ** p <0.05, G3 и G4 към G1 и G2. ***p<0.05, G3 към G4 (Tukey test); n = 10 във всяка група.*

В рамките на всяка група стойностите на TBARS се различаваха статистически значимо между лявото и дясното полукълбо, което показва, че 6-OHDA генерира по-висока липидна пероксидация там, където се прилага, в сравнение с контралатералното полукълбо. Установиха се статистически значимо по-високи нива на TBARS и в двете групи, оценени на 14-ия ден от

експеримента (G3 и G4), в сравнение с нивата на втория ден от експеримента (G1 и G2). Нивото на TBARS в групата с LA хронично третиране (G4) е статистически значимо по-ниско от групата без третиране с LA (G3).

2.3. Глутатион-пероксидаза (GPx)

Приложи се двуфакторен ANOVA тест по отношение на двете независими променливи (тип група, полукълбо на мозъка) върху нивата на GPx в хомогенатите. Всички ефекти бяха статистически значими при нивата на значимост <0.05, с изключение на фактора - мозъчно полукълбо (Фиг. 19). Основният ефект за тип група даде F (3, 72) = 108.658, p <0.001, което показва значителна разлика между G1 група (M = 40.5, SD = 3.76), G2 група (M = 49.8, SD = 2.52), G3 група (M = 32.3, SD = 3.77) и G4 група (M = 40.2, SD = 2.44). Основният ефект за мозъчното полукълбо дава F (1. 72) = 2.121, p = 0.15, което показва, че няма значима разлика между двете полукълба; ляво полукълбо (M = 40.20, SD = 7.77) и дясно полукълбо (M = 41.20, SD = 6.15). Ефектът на взаимодействие не е статистически значим, F (3, 72) = 2.645, p <0.056, което показва, че разликите между различните групи не зависят от това кое мозъчното полукълбо е изследвано.



*Фиг. 19. Нива на глутатион-пероксидаза (GPx) на експерименталните плъхове, представени по отделни групи. Данните са представени, като средна стойност и стандартно отклонение. *p <0.05, G2 към G1, G3 и G4; ** p <0.05, G3 към G1, G2 и G4; (Tukey test); n = 10 във всяка група.*

Статистически значимо по-висока активност на GPx в сравнение с останалите три групи беше регистрирана в група G2, т.е., добавена с LA и оценена на 2-ри ден от експеримента. Статистически значимо по-ниска активност на GPx в сравнение с останалите три групи е регистрирана в група G3, т.е. на 14-ия ден от приложението на 6-OHDA без добавяне на LA.

VII. Обсъждане

1. Ефекти на термичното оксидиране върху качеството на растителните масла

Термичното окисляване на готварските масла е нормално събитие в домовете и хранителната индустрия, където маслата се използват за различни видове готвене при различни температури, вариращи от ниска до много висока. Температурата е описана като един от основните фактори, които влияят върху качеството на готварските масла [Gupta, 2005].

Влиянието на термичното окисление върху качеството на готварските масла е проучвано в множество изследвания [Naz et al., 2005; Adam et al., 2007; Carrasco- Pancorbo et al., 2007; Attya et al., 2010; Маринова и др., 2012; Oboh et al., 2014; Sadoudi et al., 2014; Falade & Oboh, 2015].

Предишно проучване на Naz et al. [2005] изследва влошаването на зехтина, царевичното и соевото масло, причинени от излагане на въздух, светлина и пържене при високи температури. Маслата, съобщавани в изследването, са използвани за пържене на картофи при 180 ° C в продължение на 30, 60 и 90 минути. Проучването показва повишаване на показателите за оксидативна увреда (стойности на пероксид и p-анизидин) с най-високи стойности, наблюдавани при дълбоко пържене, при соевото масло, което е най-податливото на окисление. Междувременно, % свободни мастни киселини (% FFA) се увеличават с увеличаване на времето на пържене, което се дължи на хидролизата.

Aladedunye & Przybylski [2009] оценяват ефекта от температурата на пържене върху разграждането на рапичното масло. Рапичното масло в изследването се загрява при 185 °C и 215 °C в продължение на 7 часа дневно в продължение на 7 дни. Авторите заключават, че повишаването на температурата на пържене над 195 ºC може да предизвика изомеризация на PUFA, като по този начин увеличи броя на транс изомерите, които са описани като нездравословни.

В проучване на Sadoudi et al. [2014] се съобщава, че термичното окисляване на слънчогледовото олио при 100 ° C в продължение на 52 часа

причинява влошаване на качествата на олиото, което води до развитието на окислителна гранясалост. Наблюдава се и значителна загуба на есенциалните мастни киселини (главно линолова киселина) в термично окисленото слънчогледово олио.

В едно от проучванията [Oboh et al., 2014], екипът изследва ефекта на термичното окисляване върху физикохимичните свойства, малондиалдехида (MDA) и съдържанието на каротеноиди в палмовото масло. В проучването, прясно палмово масло се нагрява от 0 до 20 минути с температури в границите съответно от 33 ° C до 320 °C и се оценява влиянието им върху физикохимичните свойства, съдържанието на MDA и каротеноидите в маслото. Проучването показва, че високата продължителност на термично окисление причинява значителни промени във физикохимичните свойства, повишено съдържание на MDA и намалява каротеноидното съдържание в маслото, като по този начин причинява изменение на хранителните качества на палмовото масло.

В друго проучване, Falade & Oboh [2015] изследват ефекта на термично окисление върху степента на липидната пероксидация, физикохимичните свойства и съдържанието на β-каротен във фъстъчено масло. Маслото се нагрява в продължение на 20 минути, като температурата достига 220°C. В проучването се установява, че термичното окисляване предизвиква липидна пероксидация и причинява промени във физикохимичните свойства (pH, йодиди и пероксид) и намалява съдържанието на β-каротен. Авторите препоръчват да се избягва готвене и пържене с фастъчено масло при висока температура за дълъг период от време, тъй като това може да доведе до значителна загуба в β-каротен в маслото. Маринова и др. [2012] изследват високо – температурните изменения на някои масла за готвене (слънчогледово олио, масло от гроздови семена, соево масло, царевично масло и захтин), които се подлагат на нагряване при температура на пържене от 180ºC. Проучването разкрива, че зехтинът има по-добра термична окислителна стабилност, което се дължи на неговия мастно-киселинен състав. Също така, соевите и царевичните масла са оценени като едни от най-устойчивите на окисляване при високи температури на пържене [Marinova et al., 2012]. Освен това Adam et al. [2007] изследват ефекта на многократното нагряване върху съдържанието на витамин Е в палмово и соево масло. Маслата, използвани в изследването, се нагряват пет пъти, като

температурата достига 180 ° C, с продължителност от 10 минути. Проучването предполага, че загряването ще намали различните фракции на витамин Е в палмово и соево масло. Забележително е, че около 98% от трите най-разпространени изомери на витамин Е (α-токоферол, α- токотриенол и γ-токотриенол) в палмовото масло са загубени при нагряване, докато само 60% от γ-токоферола (най-разпространената форма на витамин Е в соевото масло) се разрушава при нагряване.

Brenes et al. [2002] в своето проучване за влиянието на термичната обработка върху съдържанието на полифенол в зехтин extra virgin, използвайки симулирани процеси на готвене, оценяват ефекта на тези процеси върху фенолното съдържание и физико-химичните характеристики на маслата. В проучването пърженето се симулира чрез загряване на маслото при 180 °C в продължение на 1.5, 3, 5, 10, 20 и 25 часа. Проучването разкрива, че термичното окисляване при 180 °C намалява значително хидрокситирозол и тирозолоподобните вещества. Въпреки това, висок дял на лигнани: 1-ацетоксипинорезинол и пинорезинол се задържат дори след 25 часа, което предполага устойчивостта на лигнаните към термично окисляване. Освен това, по време на термично окисляване се наблюдава бързо разграждане на α-токоферол и на глицеридните фракции на маслото.

2. Здравни ефекти вследствие на употребата на термично обработени масла

Като се има предвид образуването на много цитотоксични съединения по време на термично окисляване, ефектът от консумацията на термично окислени готварски масла върху здравето отдавна е доказан проблем. Няколко проучвания установяват връзка между термично-окислените готварски масла и малабосрбцията [Márquez -Ruiz et al., 1992; Márquez -Ruiz et al., 1993; Olivero-David et al., 2011].

Неотдавнашен обзор на Dorbaganes & Márquez -Ruiz [2015] съобщава, че пържените масла, имат намалена усвояемост, която се дължи на лоша хидролиза на триацилглицеролни (TAG) полимери от панкреатична липаза. TAG полимерите са димери и олигомери, получени при термично окисляване и се намират основно в термично-окислени масла. Ефектът на многократно

нагрявано палмово масло върху серумния липиден профил, липидната пероксидация и нивата на хомоцистеин е изследвана в пост-менопаузален модел на плъх от Adam et al. [2008a]. Проучването съобщава, че многократно загрятото палмово масло повишава липидната пероксидация и общия холестерол. В проучването се доказва, че многократно нагрятото масло е вредно поради факта, че причинява окислително увреждане, като по този начин увеличава риска от атеросклероза.

В друго проучване на Adam et al. [2008b] разкриват, че консумацията на многократно нагряти соеви масла може да бъде вредно за хемопоетичната система, тъй като причинява промяна в концентрацията на Hb, броя на еритроцитите, неутрофилите и лимфоцитите.

Shastry et al. [2011] също оценяват ефекта на многократно нагряваните хранителни масла върху плъхове Wistar и доказват, че окислените слънчогледово и палмово масла може да бъдат токсични и да причинят значителни щети на организмово ниво. Освен това, Williams et al. [1999] изследват ефекта от приема на храна, богата на мазнини, която преди това е била използвана за дълбоко пържене в хранително заведение и наблюдава нарушение на функцията на артериалния ендотел при здрави мъже. Техните резултати показват, че консумацията на окислени масла може да допринесе за ендотелна дисфункция. Ендотелната дисфункция е разпозната като ранен предшественик на атеросклерозата [Mudau et al., 2012]. Jaarin et al. [2011] изследват ефектите на нагрятите палмови и соеви масла върху кръвното налягане при плъхове и установяват, че многократно нагрятите растителни масла повишават кръвното налягане, засилват вазоконстрикцията, индуцирана от фенилефрин, и намаляват вазодилатацията, предизвикани от ацетилхолин, и натриев нитропрусид. Повишеното кръвно налягане, предизвикано от преработените растителни масла, е свързано с повишена съдова реактивност и намалено ниво на азотен оксид (NO). Изследването също предполага, че термичното окисляване може да насърчи генерирането на свободни радикали, като по този начин допринася за патогенезата на хипертонията при плъхове.

В подобно проучване Hamsi et al. [2015] изследват ефекта от консумацията на прясно и пържено кокосово масло върху кръвното налягане и

възпалителните биомаркери, където е открито, че многократно загрято кокосово масло води до повишено кръвно налягане и усилена продукция на възпалителни маркери като ICAM-1, VCAM-1, С-реактивен протеин (CRP), простациклин (PGI_2) и тромбоксан B2 (TxB_2). Резултатът от изследването предполага, че термично окислените готварски масла могат да предизвикат възпаление в което и ендотелна дисфункция, важна стъпка в развитието на атеросклерозата и канцерогенезата. Освен това Leong et al. [2010] изследват възможния механизъм за повишаване на кръвното налягане в резултат на консумацията на нагрято растително масло чрез оценка на ефекта от консумацията на загрято соево масло върху кръвното налягане, плазмената концетрация на NO, хем-оксигеназата (HO-1) и ангиотензин-конвертиращия ензим (ACE). Проучването регистрира по-високо кръвно налягане и ACE активност, тъй като плазмените нива на NO и HO-1 намаляват. Азотният оксид е вазодилататор произведен от ендотела и участва в регулирането на хомеостазата на съдовата система, като балансьор на съдовия тонус [Leong et al., 2015]. Намаляването на нивото на NO компрометира интегритета на съдовата система.

Хем-оксигеназата е индуцируем ензим, който катализира превръщането на про-окислителния хем в желязо, биливердин и въглереоден оксид. По-нататък биливердинът се метаболизира до билирубин [Stocker et al., 1987], докато въглеродният оксид наред с други функции участва в ралаксирането на кръвоносните съдове и инхибирането на агрегацията на тромбоцитите [Chlopicki et al., 2006; Achouh et al., 2008]. Тези вазоактивни характеристики на HO-1 предполагат участието му в регулирането на кръвното налягане.

Редица изследвания демонстрират връзка между по-често консумация на пържени храни с по-висок риск от централно затлъстяване, по-ниският HDL-холестерол и повишено кръвно налягане [Guallar-Castillón et al., 2007; Sayon-Orea et al., 2013, 2014]. Съобщава се също, че консумацията на термично окислено слънчогледово олио оказва неблагоприятен ефект върху черния дроб и мастната тъкан на плъхове, като се наблюдава хипертрофия на адипоцитите при тези животни [Sadoudi et al., 2013].

Окислението на растителните масла вследствие на нагряването води до получаване на летливи органични съединения, като например алдехиди, кетони,

диени и киселини [Katraggada et al., 2010]. Продуктите от окислителното разграждане не само създават неблагоприятни ефекти или намаляват срока на годност на готварските масла, но могат да причинят и неблагоприятни ефекти върху здравето [Fullana et al., 2004].

Алдехидите са основни продукти на разграждане, които имат способността да предизвикват токсични ефекти в резултат на тяхното взаимодействие с протеиновите аминогрупи [Katraggada et al., 2010]. Освен това, алдехидите са способни да произвеждат други летливи съединения, като MDA когато са подложени на автоокисляване. MDA е един от свободно-радикалните електрофили, които причиняват оксидативен стрес [Farmer & Davoine, 2007].

Оксидативният стрес участва в патогенезата на различни дегенеративни заболявания, включително рак [Halliwell, 2007], болест на Алцхаймер [Pohanka, 2014], инфаркт на миокарда [Ramond et al., 2013], бъбречна дисфункция [Massy et al., 2009], захарен диабет [Yang et al., 2011] и неговите усложнения [Giacco & Brownlee, 2010]. Освен алканали, други по-токсични ненаситени алдехиди, като алкенали и алкендиенали са доказани в редица изследвания на термично обработени масла [Meacher & Menzel, 1999; Katragadda et al., 2010]. Тези вещества са промотори за образуване на свободни радикали, реактивни форми на кислорода и съответно за развитие на оксидативен стрес.

3. Влияние на ОС и пробиотиците върху мъжките репродуктивни показатели

Безплодието е световен проблем и в 25% от случаите на инфертилитет при мъжете, не се установяват конкретни причини за това [Agarwal &Said, 2003]. Доказано е обаче, че има пряка връзка между увеличените нива на ROS и намаления мотилитет на сперматозоидите [Mehrotra et al, 2013].

Установени са и негативните ефекти на богатата на мазнини диета върху антиоксидантния капацитет на организма. Това е свързано с увеличаване нивата на реактивните кислородни радикали и на клетъчните увреждания поради повишаване на оксидативния стрес. В този смисъл е възможно

намаление на оксидативните увреждания чрез увеличение на антиоксидантния капацитет на тъканите [Chen et al., 2012].

Особено актуално е изследването на ефектите на пробиотиците във връзка с взаимодействието им с имунната система, изграждането на правилен имунен отговор и имунен толеранс, както и взаимодействието по оста черва – мозък. Беше изяснена и положителната роля на пробиотиците по отношение на повишаване на антиоксидантния капацитет на тъканите. Взаимовръзката между нарушената композиция на микробиотата при мъже със затлъстяване и хипогонадизма, е насочило вниманието на учените към изучаване ефектите на пробиотиците, както и комбинацията им с пребиотици, към повлияване в положителен аспект на репродуктивните функции при пациенти с идиопатичен инфертилитет. Проучванията за протективния ефект на пробиотиците по отношение на фертилитета, свързани с богата на мазнини диета при хора и при животни, все още са оскъдни [Darmdeh et al., 2017; Poutahidis et al.,2014; Bhandari et al., 2016].

Редица проучвания при хора от последните години, са доказали взаимовръзката между андрогенния дефицит, съпроводен и с нарушения в сперматогенезата при затлъстяване, както и с асоцииранатa с това метаболитно заболяване ендотоксемия, с последваща секреция на проинфламаторни цитокини.

В пилотното проучване на Pearce и сътр. от 2019 г., са подбрани мъже с идиопатичен инфертилитет в репродуктивна възраст. Наред с определянето на антропометричните им данни (индекса на телесна маса - ИТМ, обиколка на талията, % на мастна тъкан), са били определени следните параметри: пропускливост на чревната стена (чрез определяне на серумния зонулин), метаболитна ендотоксемия (чрез определяне на нивата на Lipopolysaccharide Binding Protein, LBP), възпалителни маркери в семенна течност (неутрофилна еластаза), ОС в семенната течност (8OHdG), спермограма и хормонални изследвания (тестостерон, ФСХ и ЛХ). Резултатите са демонстрирали значителна положителна корелация между ИТМ, увеличения пермеабилитет на чревната стена, метаболитната ендотоксемия, сперматозоидно ДНК увреждане поради ОС и повишената фрагментация на ДНК на сперматозоидите.

Метаболитната ендотоксемия е била в положителна корелация с ОС в семенната течност, докато нивата на тестостерона са били в отрицателна корелация с високите стойности на ИТМ, обиколката на талията и % мастна тъкан. В това проучване за първи път при хора е демонстрирана, връзката между затлъстяването, асоциирано с метаболитна ендотоксемия и увеличената ДНК фрагментация на сперматозоидите (8OhdG), [Pearce et al, 2019] .

В друго изследване, извършено от Tremellen и сътр. през 2018 г., са проведени два вида проучвания, първото е кохортно и второто рандомизирано, плацебо-контролирано. В кохортното проучване е изследвана връзката между плазмените нива на липополизахарид-свързващия протеин (LBP), мъжките репродуктивни хормони, проинфламаторни маркери (CRP, IL-1β, IL-6, TNF-α) и затлъстяването при 75 мъже в репродуктивна възраст (между 18г. и 50 г.). Резултатите са показали сигнификантна негативна корелация между високият процент на мастна тъкан и нивата на тестостерон (Т), както на общия, така и на свободния (FT). По отношение на проинфламаторния статус, и трите показателя на затлъстяването (ИТМ, обиколка на талия, %мастна тъкан) са били в строга положителна корелация със серумните нива на LBP, IL-6 и CRP. Същевременно е била установена негативна корелация между серумния LBP и общия Т, и между IL-6 и серумния Т. Положителна корелация е имало между серумните нива на LBP и на IL-6.

В нашето проучване, въпреки че резултатите не достигат статистическа достоверност, концентрацията на Т също беше по-ниска при животните хранени с рафинирано и запържено масло (т.е. при мишките хранени с HFD).

При второто проучване на Tremellen и сътр., 2018, с общо 33 участници (здрави мъже във фертилна възраст с нормална телесна маса, възраст между 18 - 40 г.) са били разделени на две групи, като на участниците в първата е било приложено i.v. плацебо (0.9% р-р на NaCl), а на тези от втората група е бил приложен i.v. ендотоксин в ниска доза(2,000 EU/ml) от Escherichia coli O113:H10. Половин час преди апликацията и след това (на 1-ви, 2-ри, 3-ти, 6-и и 24-ти час) са били взети кръвни проби за определяне на нивата на плазмените цитокини и репродуктивни хормони (Т, ФСХ,ЛХ). Резултатите са демонстрирали, че след апликацията на ниски дози от ендотоксина се индуцира

остър системен възпалителен отговор, което се подкрепя от значително покачване на плазмените нива на IL-6 и TNF-α, като това покачване е било транзиторно с пик на 2-ия час след апликацията на LPS. Същевременно, това е било съпроводено със значително намаляване на плазмените нива на Т, които се възстановили до норма на 24-ия час след ендотоксиновата апликация. Не са били установени промени свързани с другите репродуктивни хормони [Tremellen et al, 2018]. Това проучване много ясно демонстрира взаимовръзката между ендотоксиновата експозиция и последващото индуциране на възпалителен отговор, което води до андрогенов дефицит при здрави мъже с нормално тегло в репродуктивна възраст. Всъщност, подобни са и механизмите, водещи до хипогонадизъм при мъже със затлъстяване, където се установява метаболитна ендотоксемия със субхронично, нискостепенно системно възпаление, което индуцира проинфламаторни промени в репродуктивните тъкани заедно с ОС. Това рефлектира в различни нарушения във функциите на тестикуларната тъкан и в промени в спермограмата. Промените в сперматозоидните показатели са асоциирани с намален обем на еякулата, намален общ брой на сперматозоидите, намалена концентрация на сперматозоидите, намален мотилитет и увеличена ДНК фрагментация [Bellastella et al, 2019].

Въпреки, че в нашето проучване не бяха определяни проинфламаторни маркери, резултатите по отношение на мотилитета на сперматозоидите и нивата на ОС в групите, хранени с рафинирано и запържено масло са в унисон с намалената подвижност на сперматозоидите и увеличения ОС в ДНК, както е установено в проучването на Bellastella et al., 2019.

Друго проучване е показало, че високите стойности на ИТМ са асоциирани с нисък резултат за свързване на хиалуронан (hyaluronan binding score), показател за завършена нормална сперматогенеза [Wegner et al, 2010]. Заедно с метаболитната ендотоксемия и ОС, нарушенията водещи до мъжки хипогонадизъм могат да включат и други механизми, като инсулинова и лептинова резистентност, които водят до дисрегулация по оста хипоталамус-хипофиза-тестиси (ХХТ), при което се намаляват съответно секрецията на гонадотропин релизинг хормон (GnRH), ФСХ и ЛХ, и оттам и на Т [Wegner et al, 2010]. Лептинът е хормон, който се установява в по-големи количества при

мъже със затлъстяване в сравнение с лица с нормално тегло [Teerds et al, 2011]. Той може да намали чувствителността на Лайдиговите клетки към стимулацията с ЛХ и да индуцира повишена апоптоза в сперматогенния епител [Isidori et al, 1999]. Освен това, инсулиновата резистентност и хиперинсулинемията могат да бъдат асоциирани с ниски нива на секс-хормон свързващия глобулин (SHBG), тъй като хиперинсулинемията потиска чернодробната продукция на този глобулин. В резултат на това се намалява концентрацията на общия Т и се редуцира полуживотът му, при което се повишават плазмените нива на свободния тестостерон, което е предпоставка за ускорената му ароматизация от адипозната тъкан (тестостерон-естрогенов шънт). Увеличените плазмени нива на естрогени на свой ред инхибират секрецията на GnRH и гонадотропни хормони от ХХТ ос [Cohen, 1999].

Интересен механизъм е предложен от Winters и сътр., 2006, относно директния ефект на затлъстяването върху функцията на Сертолиевите клетки. При пациенти със затлъстяване са измерени ниски нива на инхибин-В. Ефектът на затлъстяването върху инхибин-В се установява по време на пубертета, тъй като концентрацията на този хормон е нормална при предпубертетни момчета със затлъстяване. Имайки предвид, че Сертолиевите клетки могат да изхранват лимитиран брой герминативни клетки, то по-малкият брой изхранващи клетки може да рефлектира в намалено общо количество на сперматозоиди в еякулата при вече полово-зрелите мъже [Winters et al, 2006].

Наред с ендокринните нарушения, адипозната тъкан сама по себе си, също е способна да секретира проинфламаторни цитокини, които също могат да предизвикат увеличаване на пропускливостта на чревната стена и да играе ролята на поддържащ механизъм на ендотоксемията [Tremellen et al, 2018]. Като допълнителен механизъм, способстващ за ендотоксемията, е консумирането на HFD от пациентите със затлъстяване, предизвикващ продукция на повече хиломикрони, което би спомогнало за по-интензивния пасаж на бактериални ендотоксини в циркулацията [Boutagy et al, 2016].

Все още не е напълно изяснено по какъв точно механизъм ендотоксемията води до намалена продукция на Т. Експерименталните данни са демонстрирали, че Лайдиговите клетки могат директно да бъдат повлияни от

циркулиращите ендотоксини чрез свързване с техните TLR4 [Hales et al, 2000]. Данните от животински експериментални постановки са показали, че апликацията на LPS води директно до инхибиране на продукцията на Т чрез намаляване на активността на стероидогенния акутен регулаторен протеин (steroidogenic acute regulatory protein, StAR) [Hales et al, 2000; Bosmann et al, 1996]. StAR е ключов протеин, участващ в началния трансфер на холестерола в митохондриите, където по-късно се осъществява конвертирането му до Т. Експериментите с гризачи са демонстрирали, че при експозиция на LPS само след два часа базовите нива на StAR са спаднали до 10% от първоначалните, медиирано главно от ОС. Впоследствие в тази си роля се включват и цитокините IL-1β, IL-6 и TNF-α, които инхибират функцията на останалите ензими, участващи в стероидогенезата [Hales, 2002; Hales et al, 2000].

Няколко проучвания са били извършени с модели на затлъстяване или хранене с HFD. Те са демонстрирали, влошаване на параметрите на спермограмата, които са били преодоляни след приложение на пробиотици [Ding et al, 2020; Maretti and Cavallini, 2017].

В проучването на Ding et al., 2020, е изследвано влиянието на чревната дисбиоза върху сперматогенезата и репродуктивните показатели при мишки. Чревната дисбиоза е получена чрез трансплантация на фекална микробиота от донори (получена от мишки хранени с HFD) на животни реципиенти, хранени с нормална диета. В продължение на 15 седмици на всеки 2-ри ден е правена фекална трансплантация посредством гаваж. В резултат на това животните реципиенти (на които е извършена трансплантация с фекална микробиота от донори хранени с HFD) са увеличили значително телесното си тегло, концентрацията на общия холестерол и на плазмената глюкоза, имали са и нарушен глюкозен толеранс, което предполага, че HFD води до метаболитни нарушения. Наред с това, изследванията на интестиналната микрофлора чрез секвенционен анализ на 16S-рРНК-и са установили чревна дисбиоза, като координатният анализ (Principal coordinate analysis) по една от осите е показал различия между микробиотата на мишките, хранени с HFD, и на тези, хранени с нормална диета, в рамките на 63,13%. Храненето на мишките с HFD е довело до намаляване на количеството на представителите от *Bacteriodetes* и *Verrucomicrobia* и увеличение на броя микроорганизми от типовете *Firmicutes* и

Proteobacteria. При HFD третираните животни е било установено значително намаляване на концентрацията на сперматозоидите и на подвижността им. Хистологичното изследване на тестикуларна тъкан е показало значително намаление в броя на сперматоцитите и сперматидите в сперматогенния епител [Ding et al., 2020].

Намалението на подвижността на сперматозоидите, нарушенията в хистологичнта структура на сперматогенния епител и повишената епидидимална мастна тъкан у мишките, хранени с HFD диета, са в съответствие с получениете от нашето проучване данни. В същото проучване на Ding et al., 2020, е показано, че при инфертилни пациенти (с астено-, терато- и олигоспермия) чревната дисбиоза е асоциирана с комбинирано увеличение на микроорганизмите от родовете *Bacteroides* и *Prevotella,* като това изобилие показва силно изразена негативна корелация с подвижността на сперматозоидите, докато положителна корелация е установена по отношение изобилието на представители от р. *Bacteroides* с високите плазмени нива на ендотоксин. Ендотоксемията при HFD третираните мишки е била асоциирана с инфилтрация на Т лимфоцити и макрофаги в *lamina propria* на чревната стена, което е индикация за локален възпалителен процес. Такъв е бил установен и в епидидимиса, тъй като са били установени значително високи нива на проинфламаторни цитокини, като IL-1β, C-X-C мотив хемокин-10 (CXCL) и моноцит хемоатрактантен протеин-1 (MCP-1).

Известно е, че сперматозоидите престояват сравнително дълъг период в епидидимиса, където претърпяват матурация и придобиват способност за активно придвижване. Локалното възпаление в тези случаи най-вероятно е отговорно за нарушенията в мотилитета на сперматозоидите. От получените данни, ясно се очертава връзката между HFD и последващите нарушения в метаболизма, чревната микробиота и репродуктивните показатели при експерименталните животни, като съществува потенциална взаимовръзка между изобилието на микроорганизми от родовете *Bacteroides* и *Prevotella* с увеличениете плазмени нива на ендотоксин и нарушенията в сперматогенезата и подвижността на сперматозоидите и при мишки, и при човек.

Локалното възпаление в тестикуларната и епидидималната тъкан може да бъде причина за активиране и на хуморалния имунен отговор, с резултат формиране на антиспермални антитела (АСА), което може да бъде причина за имунологично безплодие у мъжете. Такива АСА са открити у пациенти с *H. pylori* инфекция асоцииран гастродуоденит, като е установена значителна положителна корелация между АСА и анти - *H. pylori* антителата, което предполага, че най-вероятно микробиалната инфекция е била причината за образуването на АСА [Dimitrova-Dikanarova et al., 2016].

Италианските лекари Marreti и Cavallini, 2017 са наблюдавали трима пациенти лекувани по повод на идиопатична олигоастенотератоспермия (иОАТС), които са подобрили семенните си показатели след няколкодневен прием на пробиотик с пребиотик (синбиотик), поради чревно разстройство. Това им е дало повод да проведат пилотно двойно-сляпо плацебо-контролирано проспективно проучване за ефектите на синбиотика върху репродуктивните параметри при 46 мъже с идиопатичен инфертилитет. Половината пациенти са приемали комбинация от пробиотик с пребиотик, а другата половина - скорбяла (като най-близка субстанция в структурно отношение на пребиотика) в продължение на шест месеца. Изследвани са били семенни показатели в началото и в края на експерименталния период. Освен това са били проведени изследвания на плазмените нива на ФСХ, ЛХ, Т, естрадиол(Е2) и пролактин (PRL). След изтичане на експерименталния период, мъжете в групата, приемали синбиотик, са имали значително подобрение на семенните показатели, като увеличен обем на еякулата, увеличение на сперматозоидната концентрация, повишаване на процента на подвижните сперматозоиди, увеличение на количеството на еякулираните сперматозоиди и повишаване на количеството на сперматозоидите с типична морфология. В групата с прием на скорбяла (контролна) не е имало промяна в споменатите параметри на спермограмата. По отношение на нивата на репродуктивни хормони, в първата група (приемала синбиотик) са се увеличили плазмените нива на ФСХ, ЛХ и Т, докато нивата на Е2 и PRL не са претърпели съществена промяна. В другата група не са били установени сигнификантни промени в плазмените нива на изследваните хормони. На общо осем участника, четири мъже от групата на синбиотик и на други четирима от контролната група, са били изследвани

нивата на ДНК фрагментация на сперматозоидите. В експерименталната група ДНК фрагментацията в началото е била съответно 45%, 39%, 44% и 65%, като след шест месечния период е била редуцирана, както следва: 22%, 25%, 20% и 21%, докато в групата, приемала контролната субстанция, не е имало подобрение по отношение на изследвания индекс [Maretti and Cavallini, 2017]. Един от механизмите, който най-вероятно води до подобряване на семенните характеристики, е именно оптимизиране нивото на ROS в тестисите и епидидимисите, както и оптимизиране на микросредата в простатата чрез подобряване на чревната микрофлора [Cavallini, 2006; Uranga et al, 2016].

В настоящата научна разработка се проучиха и оцениха негативните ефекти на силно запържено рафинирано слънчогледово олио и на рафинирано нетермично обработено олио върху репродуктивните органи на мъжки мишки, както и протективния ефект на добавените в диетата пробиотици, по отношение на някои сперматологични, биохимични и хистологични параметри на животните включени в изследването. Установи се, че свободните радикали, наред с редица неблагоприятни ефекти в клетките и тъканите, играят важна роля и в патогенезата на репродуктивните нарушения. Известно е, че сперматозоидната цитоплазмена мембрана е много богата на полиненаситени мастни киселини и е много податлива на увреждащото действие на свободните радикали [Agarwal et al., 2014].

Проучванията в експериментални модели с опитни животни с богата на мазнини диета са показали, че подвижността на сперматозоидите е намалена и нормалната морфология е нарушена[Mortazavi et al., 2014]. Добавката на пробиотици в тези проучвания са установили повишение на броя на сперматогониите и Сертолиевите клетки в семенните каналчета.

В друго проучване е установено, че диетата, богата на мазнини, е довела до намаляване нивата на тестостерон в плазмата, влошила е качествата на спермата и е причинила дегенеративни изменения в семинифeрните каналчета на тестисите, като тези нарушения са били обратими след суплементация с пробиотик [Ibrahim et al., 2012).

В настоящото проучване се установи, че добавката на пробиотик в диетата значително повиши мотилитета на сперматозоидите, което е в унисон с

резултатите от проучването на Marreti и Cavallini, 2017. Подвижността на сперматозоидите на животните от FryOilPro групата беше по-добра в сравнение с тази на мишките от FryOil групата ($P<0.01$).

В някои проучвания е докладвано, че високоенергийната диета може да е причина за митохондриална дисфункция, асоциирана със свръпродукция на реактивни кислородни радикали в процеса на митохондриалния метаболизъм в сперматогенния епител. Добавката на пробиотик се разглежда, като потенциален агент, който може да елиминира тези негативни последствия върху репродуктивните функции [Darmdeh et al., 2017; Rato et al., 2014]. Въпреки, че статистически в нашето проучване не установихме значими разлики, нивата на патологичните сперматозоиди бяха по-ниски в Oil и OilPro групите, в сравнение с тези на контролната група. Нашето проучване също така установи намаляване на абнормалните сперматозоиди във FryOilPro групата в сравнение с FryOil и контролната групи ($P<0.01$). Независимо, че получените резултати за сперматозидната концентрация не показват статистически значима разлика, в животните от FryOil групата се установи значително намаляване на сперматозоидната концентрация и този ефект се преодолява в групите с добавен пробиотик.

Пробиотиците се препоръчват, като алтернативно средство вместо фармакологични препарати, при различни патологични състояния, като например модулация на затлъстяването, което често е асоциирано с лошо качество на спермата. Darmdeh et al., 2017 са определили, че *Lactobacillus rhamnosus PB01* има позитивен ефект по отношение редукцията на телесното тегло и репродуктивните хормони, и сигнификантно подобряват мотилитета и прогресивното праволинейно движение на сперматозоидите. Редица проучвания са били направени, използвайки различни видове гризачи, като експериментален модел за изследване на ефектите на пробиотиците при различни физиологични и патологични състояния [Poutahidis et al., 2014; Ayyanna et al., 2018; Bhandari & Prabha, 2015]. Докладвано, че пробиотиците повлияват благотворно сперматогенния епител в семенни каналчета с нарушена морфология [Zeitoun et al., 2014]. Получените от нас резултати ясно показват негативните ефекти на диетите с добавено рафинирано слънчогледово олио и дълбоко термично обработеното олио върху епителa на семинiферните тубули

в тестисите. Тези неблагоприятни последствия бяха редуцирани с добавянето на пробиотик. Освен това в OilPro и FryOilPro групите се установи подобряване на подвижността на сперматозоидите и на морфологичната оценка на семиниферния епител (Johnsen`s Tubular Biopsy Score).

Проучване, проведено *in vivo* с плъхове, е демонстрирало, че диета богата на мазнини не повлиява серумните нива на холестерол и триглицериди, но значително е намалило нивата на тестостерон и повишило мастната тъкан на епидидимисите [Vigueras-Villasenor et al., 2009]. Fernandez et al., 2011 докладват, че качеството на спермата е намаляло и сперматозоидната концентрация е подобна сред групите от плъхове, хранени с диета богата на мазнини, като мотилитетът е намалял, без да е имало неблагоприятни ефекти върху други спермални показатели. Резултатите от нашите собствени проучвания са подобни. Те показват, че масата на епидидималната мастна тъкан е значително повишена, особено в Oil и OilPro групите, в сравнение с тази на контролната група ($P<0.001$; $P<0.05$). Масата на епидидималната мастна тъкан е сигнификантно по-малка у животните от FryOilPro групата, сравнена с масата на мастната тъкан при мишките във FryOil групата ($P<0.05$), като същата тенденция се наблюдава при сравнение масата на епидидималната мастна тъкан между Oil и OilPro групата. Използването на пробиотик е довело до редукция на масата на епидидималната мастна тъкан.

Дietата, богата на мазнини, намалява плазмените нива на тестостерон, като същевременно се увеличава нивото на оксидативен стрес у плъхове [Erdemir et al., 2012]. Резултатите от нашите собствени изследвания показват, че нивата на тестостерон не са статистически различни в различните групи. Въпреки това се установява, че има различия в нивата на MDA в различните групи, който е важен индикатор за наличие на увреждане вследствие на оксидативен стрес. В нашето проучване установихме, че нивото на общия холестерол беше значително по-високо в OilPro групата, в сравнение с нивото на холестерол в контролната група. В другите групи също имаше повишение на нивата на холестерола, но това повишаване не беше статистически голямо. Смята се, че тези високи нива на холестерола са във връзка с „up-регулация“ на холестероловия биосинтез, който се индуцира от високите плазмени нива на липиди и свързаната с това инсулинова секреция [Madariaga et al., 2015]. В

контраст на това се счита, че намаляването на триглицеридите у животните от експерименталните групи вероятно е свързано с техния метаболизъм. Известно е, че при мишките има повишено усвояване и транспорт на липидите, поради което техния метаболизъм е ускорен в сравнение с този на плъховете. Това би могло да е свързано с факторите, повлияващи стимулирането на инсулиновата секреция [LeBoeuf et al., 1994]. Още повече, високите нива на триглицериди не се акумулират в черния дроб на мишките от линия Balb/C хранени с диета богата на мазнини и това може да е асоциирано с намаленото усвояване на мастни киселини от тази линия мишки [Montgomery et al., 2013]. В нашето проучване пробиотиците не доведоха до статистически значими промени в нивата на холестерола и триглицеридите сред животните от експерименталните групи.

Различният състав на диетата и добавката на пробиотици имаше за резултат и разлики в нивата на тестостерон в кръвната плазма. Въпреки че, нямаше статистически изразени разлики, средните стойности на тестостерона бяха по-високи в групите с добавен пробиотик в диетата. Това предполага, че използването на пробиотици има положителен ефект по отношение на репродуктивните способности на съответните експериментални животни. Това се демонстрира и от други *in vivo* проучвания, осъществени с плъхове[Chen et al., 2013; Awney, 2011; Ding et al, 2020]. Освен това нивата на MDA в тестикуларните тъканни проби бяха малко по-високи в Oil и FryOil групите в сравнение с тези в групите с добавен пробиотик в диетата. Предполагаме че, ако продължителността на експеримента беше по-продължителен от 63 дни, щяха да се получат по-изразителни разлики в нивата на индикатора за липидна пероксидация – малондиалдехид и в тестикуларната тъкан, както се установи в кръвната плазма. Нашите резултати са подобни на резултатите, получени в други *in vivo* проучвания, проведени с плъхове [Chen et al., 2013; Poutahidis et al., 2014]. Нашето заключение е, че диетата богата на масло, рафинирано и запържено, води до увеличаване на оксидативния стрес в тестикуларната тъкан за дълъг период от време и предполагаме, че би променило нивата на MDA. Използването на пробиотици в тези случаи, може да предотврати и да редуцира негативните ефекти по отношение на фертилитета.

4. Ефекти на алфа-липоева киселина върху ОС и двигателните нарушения при модел на Паркинсонизъм

LA е подложена на интензивни проучвания след откриването на антиоксидантните му свойства през 50-те години. Много *in vitro* и *in vivo* предклинични проучвания са показали потенциални антиоксидантни и невропротективни ефекти на LA, с потенциална полза за пациенти с БП. Имплементирането на тези резултати в клиничната практика обаче не е направено. Въпреки патофизиологичните, епидемиологичните и механистичните данни, които предполагат друго, клиничните изпитвания с антиоксиданти са най-вече отрицателни при назначаването на хронична терапия [Steinhbul, 2008]. Доколкото ни е известно, нито едно ръководство (guidline) не препоръчва използването на LA от пациенти с БП. Прецизирането на мястото на LA в терапията на ПБ се нуждае от рандомизирани клинични изпитвания (RCTs).

Нашето проучване беше проведено за тестване на ефекта от добавката на LA при едностранно интрастриално инжектирани плъхове с 6-OHDA. Levodopa (предшественик на DA и избор на лечение за ПБ), самите DA и 6-OHDA имат съпоставим про-окислителен потенциал спрямо невроните. Токсинът 6-OHDA е силно окислим аналог на DA, който селективно увреждa катехоламинергичните неврони чрез генерирането на ОС. 6-OHDA се използва от 1968 г. за възпроизвеждане на няколко клетъчни процеси, идентифицирани в патогенезата на ПБ, тясно свързани с невроинфламацията и смъртта на невроните. Невротоксичността му споделя молекулни механизми, подобни на невротоксичността на самия DA [Filloux and Townsend, 1993]. От предишни проучвания се знае, че 6-OHDA участва в автоокисление, интраневронално производство на реактивни кислородни видове (ROS) и чрез активиране на протеин киназа Cδ посредством каспаза 3 е в състояние да активира апоптозата [Hanrott et al., 2006]. Наблюдава се също силно инхибиране на комплексите на дихателната верига на митохондриите [Glinka et al., 1997]. Ранното активиране на микроглията и получените от NADPH оксидаза ROS, е описано наскоро като трети възможен механизъм за за генерирането на ОС и 6-OHDA-свързаната невротоксичност [Rodrigues-Pallarez

et al., 2007]. Като краен резултат от окислително-редукционните процеси се получава неразтворим полимерен пигмент, асоцииран с невромеланин.

От проучвания на други автори е установено, че 6-OHDA индуцира високи нива на ОС и силно регулира автофагията и невродегенерацията [Marin and Aguilar, 2011]. В нашия експеримент, ние демонстрирахме статистически значително повишено ниво на липидна пероксидация (TBARS) и понижена GPx активност 14 дни след приложение на 6-OHDA, което е показателно за 6-OHDA токсичност. GPx е податлива на инактивация от своите субстрати [Cho et al., 2010]. Този факт може да обясни защо на 14-ия ден от нашия експеримент наблюдаваме значително по-ниска активност на GPx при плъховете, третирани с 6-OHDA, които не получават LA.

Постсинаптичният агонист апоморфин предизвиква ротации, контралатерални на увредените места, поради стимулиране на индуцирани от денервация up-регулирани D2 рецептори. Приема се, че големината на нигростриаталните лезии корелира с ротационното моторно поведение [Deumens et al., 2002]. В нашия експеримент контралатералната ротация значително се увеличи на 14-ия ден от експеримента. Обикновено едностранното 6-OHDA инжектиране в едното полукълбо се използва като модел на хемипаркинсонизъм. От друга страна, това е остър модел на невротоксичност, при който липсват телцата на Lewy и прогресивните, зависими от възрастта, ефекти на БП [Tieu, 2011]. Подобни клинични ситуации могат да бъдат резултат от рязко повишаване на нивата на допамин поради загубата на строга допаминергична регулация. Известно е например, че при около половината от пациентите леводопа предизвиква дискинезии след 5 до 10 години лечение, за които ОС и невровъзпалението са предложени като възможни механизми. Това свързано с лечението усложнение при ПБ е друга клинична причина за търсене на невропротекция, посредством прилагане на антиоксиданти.

Наскоро бе съобщено за зависимия от дозата антидискинетичен ефект на LA. Вероятното обяснение за това е способността на LA да намалява както ОС, така и апоптозата в невроните [Zhang et al., 2018]. Разкриват се и други полезни механизми, свързани със способността на LA да коригира метаболизма на DA и

серотонина до нивата при здрави животни, когато LA е тествана в комбинация с карнозин като наномицеларен комплекс [Kulikova et al., 2018]. Серотонинергичните неврони са важен източник на освобождаване на DA в стриатални синапси. Тяхната неспособност да се регулират в отговор на повишен DA, е механизъм замесен в индуцираната от леводопа-дискинезия [Carta and Bjorklund, 2018]. LA се предлага като обещаваща терапия за модифициране на заболяването, тъй като забавя загубата на допаминергични неврони при пациенти, като същевременно забавя началото на индуцираната от леводопа дискинезия [Martini et al., 2019]. С цел да се преодолее ОС, свързан с леводопа-терапията, от други изследователи са синтезирани серия от многофункционални хибридни молекули, свързващи в себе си леводопа или DA с LA [Di Stefano et al., 2006].

Нашето проучване показа, че LA (35 mg / kg), приложен i.p. за 14 дни, статистически значимо повишава активността на GPx и намалява TBARS в модел на 6-OHDA едностранно, интрастриално инжектирани плъхове. Този ефект е успореден с по-ниската индуцирана с апоморфин ротация на 14-ия ден, в сравнение с плъхове, които не получават LA. Статистическата значимост обаче не може да бъде достигната. Вероятно обяснение може да бъде острият 6-OHDA токсичен ефект, водещ до максимални невронални лезии.

Друго клинично състояние, което също е свързано със синдрома на допаминова дисрегулация при пациенти, лекувани с допаминергични агонисти, е развитието на импулсивното / натрапчивото поведение. Това разстройство включва компулсивно прекомерно използване на лекарства, хазарт, сексуална дезинхибиция и пр. Плъховете третирани с6-OHDA са предложени наскоро от други изследователи като модел за изучаване на подобни манийни отговори при терапия на БП [Campbell et al., 2014].

Повечето от предклиничните оценки на LA се извършват с дози от 50 или 100 mg/kg p.o. В ротенон-индуцирано увреждане на нигралните допаминергични неврони, добавката на LA 50 mg / kg / ден / 12 дози p.o. подобряват моторния отговор и намаляват нивото на липидна пероксидация [Zaitone et al., 2012]. Нашите резултати подкрепят антиоксидантния ефект на LA. В допълнение, те съвпадат с подобни резултати,

съобщаващи, че LA 100 mg / kg намалява производството на TBARS в плъхов модел на хемипаркинсонизъм, каквото установяват и други автори [Jalali-Nadoushan and Roghani, 2013]. Токсикологичните проучвания на Cremer et al., 2006, отчитат стойност на NOAEL (ниво на липса на нежелани реакции) за плъхове от 60 mg / kg / ден след дългосрочно приемане на LA. Оралната резорбция на LA е силно променлива, затова предпочитахме да използваме интраперитонеално приложение в нашия експеримент. Доказано е, че дори по-ниските дози LA имат биологична активност, т.е. понижаване на кръвното налягане [Dudek et al., 2016], защита от индуцирана от циклофосфамид репродуктивна токсичност [Selvakumar et al., 2004] или намаляване на съдовия оксидативен стрес [Xiang et al., 2019]. Третирането с по-високи дози обаче показва поведенчески и неврологични ефекти при опитни животни [De Araujo et al., 2013]. Дългосрочната полезност на LA представлява още едно предизвикателство. Почти всички антиоксиданти могат да станат про-окислители, т. нар. хормезис ефект. При тази парадигма по-ниските дози антиоксиданти могат да бъдат полезни, докато високите дози могат да бъдат увреждащи. В проучване на ОС при пациенти с диабетна невропатия, лекувани с LA, положителният ефект е продължил до 60 дни. След това се наблюдава хормезис ефект [Mrakic-Sposta et al., 2018].

Публикувани са няколко потенциални механизма, обясняващи ефектите на LA. Тя е основен кофактор за метаболизма на митохондриите. LA е необходима за стабилизиране на множество ROS-регулирани митохондриални 2-кетокиселинни дехидрогеназни комплекси с основни функции в клетъчния растеж, митохондриалната активност и координацията на енергийния метаболизъм [Solmonson and De Berardinis, 2018]. Освен това LA показва ефект за ограничаване на калориите, поради изчерпващото му въздействие върху цитозолния ацетил-коензим А [Le Noci et al., 2019]. Биологичната активност на LA най-вече се основава на способността за предизвикване на автофагия, като този ефект е докладван наскоро при *in vitro* тестване на клетъчни линии с 6-OHDA [Hu et al., 2011]. Редуцираната форма на LA, дихидролипоева киселина, взаимодейства с ензима роданеза, участващ в сулфан-серния метаболизъм и освобождаването на сероводород (H2S) [Bilska-Wilkosz et al., 2017]. Сероводородът увеличава субстрата за получаване на GSH, директно стимулира

γ- глутамилцистеин синтазата, скоростоопределящ ензим, който регулира генерирането на GSH, а също така действа и като чистач (scavenger) на ROS [Kimura et al., 2010].

Интригуваща нова констатация е направена за значителната инхибиторна активност на LA върху хистон деацетилаза, позволяваща епигенетична модификация на nuclear factor erythroid-2 like 2 (Nrf2) [Moos et al., 2017]. Nrf2 е от съществено значение за поддържане на нормална митохондриална функция и структурна цялост, особено при условия на клетъчен / невронален стрес, присъщи на невродегенеративни нарушения [Irwin et al., 2016]. ДНК-метилиране-зависимо модулиране на експресията на IL-1β и IL-6 чрез LA бе наскоро демонстрирано при *in vitro* изследвания [Dinicola et al., 2017]. Новите разкрития за ролята на епигенетиката в механизма на действие на LA дава нови насоки за изследване.

5. Заключение

На този етап за лечение на идиопатичното безплодие, медицинската наука не разполага с достатъчен набор от методи за повлияването му. *In vitro* и *in vivo* прочвания са доказали ефективността на антиоксидантите [Armstrong and Straton, 2016], но тяхното приложение си остава в голяма степен като емпирично третиране. В допълнение на това, трябва да се има предвид, че прекомерното намаляване на формирането на ROS/RNS в сперматозоидите, би имало негативни ефекти по отношение на осигуряване на оплождането, както и предозирането на антиоксидантите сами по себе си също могат да имат нежелани странични ефекти [Armstrong and Straton, 2016].

При пациенти със затлъстяване, наред с мерките за по-голяма физическа активност и хранене със здравословна диета, намират приложение и методите на бариатричната хирургия. Последните са трудно изпълними при голяма част от пациентите със затлъстяване и имайки предвид, че бариатричната хирургия може да бъде асоциирана с постоперативни усложнения, те остават с ограничено приложение.

Данните от последните години за ефектите на пробиотиците по отношение третиране на затлъстяването и в частност на идиопатичното

безплодие са обнадеждаващи [Maretti and Cavallini, 2017]. В допълнение на това, като предимство може да се изтъкне ниската им цена и лесното им приложение.

Въпреки известните дани, все още не е достатъчно изяснен въпросът, кое е първичното нарушение – храненето с HFD или метаболитните промени при затлъстяването са причина за увеличената пропускливост на чревната стена и съответно за развитието на ME. Експериментални постановки с миши модели за чревна дисбиоза сочат, че HFD води до промяна в композицията на микробиотата, като преобладават микробните представители от родовете *Bacteroides* и *Prevotella* с последваща ендотоксемия и като следствие, свързаните с това нарушения в спермограмата и нивата на T [Ding et al, 2020]. Най-вероятно веднъж установено, затлъстяването играе ролята на допълнителен, поддържащ механизъм за ME и за субхроничното системно възпаление. Има данни, че колонизирането и на тънките черва от микробиотата при т. нар. бактериален свръхрастеж в тънките черва (small intestinal bacterial overgrowth, SIBO) е асоциирано с продукция на зонулин, който обуславя увеличената пропускливост на чревната стена, чрез разрушаване на плътните епителни контакти на чревния епител, което способства за развитието на ME и последващите промени в сперматогенезата [Tremellen and Pearce, 2020]. За развитие на SIBO може да допринесе и приложението на инхибитори на протонната помпа, тъй като повлияват секрецията на стомашната и жлъчните киселини, при което се губи техният антибактериален ефект в лумена на тънките черва [Tremellen and Pearce, 2020].

Tremellen и сътр., имайки предвид факта, че тестостеронът подтиска имунния отговор, са изказали хипотезата, че инфертилитетът по време на ендотоксемия е еволюционно изграден механизъм за предотвратяване на трансфера на евентуално дефектни гени в потомството и намаляването на плазмените нива на T, подпомагат имунната система, за да се справи с патогенните причинители (т. нар. GELDING хипотеза) [Tremellen, 2016; Tremellen et al, 2017].

Наличните засега данни и повдигнатите по-горе въпроси, изтъкват силно необходимостта от допълнителни проучвания, за осветляване на всички механизми, водещи до нарушаване на интегритета на чревната стена и асоциирания с това инфертилитет при мъже. Изясняването в пълнота на тези

механизми, би допринесло за откриването на потенциално нови стратегии и методи за лечение на мъжкия идиопатичен хипогонадизъм.

В заключение, може да се обобщи, че диетата богата на мазнини или вискоенергийната диета използвана при мъжки мишки, може да доведе до инфертилитет, причинен от оксидативен стрес и неговите негативни ефекти, дори и при съответните експериментални животни да не се установява затлъстяване. Това се потвърждава от резултатите на настоящото проучване по отношение на мотилитета и %-та на живите сперматозоиди, оценката на тестикуларна тъкан по скалата на Johnsen, нивата на MDA в плазмата и в тъкани от сперматогенен епител. Резултатите показват, че пробиотиците имат потенциал да обръщат негативните ефекти на запърженото слънчогледово масло при мишки.

Ако се вземат под внимание продължителността на хранене на опитните мишки и начинът на хранене, които са обект на настоящото проучване, може да се предположи, че по-дългият експериментален период и храненене чрез гастрална сонда (гаваж), биха допринесли за по-ясно изразени негативни ефекти върху фертилитета, поради по-интензивния оксидативен стрес. Този експериментален модел, може да е полезен за по-добро разбиране на влиянието, механизмите и ефектите на „фаст-фууд“ диетата върху човешкото репродуктивно здраве.

По отношение на негативните ефекти на ОС при невродегенеративните заболявания, нашите резултати показват благоприятния ефект на LA в 6-OHDA-индуцирания ОС. ОС е един от водещите участници в патофизиологията на БП, но също така е замесен в дългосрочни усложнения, свързани с лечението при БП. Нашето проучване показва, че ниска доза LA може да бъде полезна за намаляване на ОС от приложението на невротоксичната субстанция 6-OHDA, подкрепяйки необходимостта от по-нататъшно проучване на ползата от лечението с LA при ПБ. ОС не може да се разглежда самостоятелно, тъй като е тясно свързан с автофагията, невровъзпалението, апоптозата, нагъването на протеини и множество промени в невротрансмитерите. По-доброто изясняване на тези механизми би могло да се използва за разработването на клинични изпитвания с LA като адювантна терапия при лечение на БП. Би било

интересно да се проучат и ефектите на пробиотиците по отношение повлияването на БП и на други заболявания, свързани с невровъзпалението, апоптозата и ОС, като едни от основните патологични процеси в ЦНС.

VIII. Изводи

1. Установи се увеличаване на епидидималната мастна тъкан при експерименталниите мишки хранени с рафинирано слънчогледово масло и рафинирано слънчогледово масло с добавен пробиотик, като за Oil групата, увеличението беше по-значително.

2. Всред всички експериментални групи, в мишките от FryOilPro групата, масата на епидидималната тъкан беше най-ниска, което вероятно се дължи на приложението на пробиотика.

3. Храненето на експерименталните животни с HFD и добавката на пробиотик не доведе до сигнификантни разлики по отношение на концентрацията и морфологията на сперматозоидите.

4. Приложението на пробиотици към групите, хранени с рафинирано слънчогледово масло и термично обработено слънчогледово масло, доведе до значително повишаване на подвижността на сперматозоидите в сравнение с тази на мишките от контролната и Oil групата, което показва положителният ефект на пробиотиците по отношение на този сперматозоиден показател.

5. Консумирането на рафинирано и термично обработеното слънчогледово масло води до нарушения в сперматогенния епител и в сперматогенезата на експерименталните мишки, докато приемът на пробиотици преодолява в значителна степен нагативните им ефекти.

6. Консумирането на рафинирано слънчогледово масло с добавен пробиотик (OilPro група) доведе до намаление на плазмените триглицеридни нива в експерименталните животни в сравнение с тези от контролната група.

7. Консумирането на HFD води до намаление на % живи сперматозоиди, докато приложението на пробиотици води до редуциране на негативните ефекти на високолипидната диета.

8. Консумирането на HFD води до сигнификантна липидна пероксидация в кръвната плазма, както се установи в Oil групата, докато приложението на пробиотици може да редуцира тези негативни ефекти, показано при мишките от OilPro и FryOilPro групите.

9. Въпреки че, не е достигната статистически значима разлика, HFD води до редуциране на T концентрация (спрямо нормалната диета) и приложението на пробиотици води до сравнително повишаване на плазмените концентрации на тестостерон.

10. Приложението на LA води до повишена антиоксидантна активност на GPx в мозъчната тъкан, което води до намаляване ефектите на ОС.

IX. Приноси

1. Консумирането на диета, богата на липиди води до увеличаване на епидидималната мастна тъкан, до намаление на плазмените концентрации на тестостерон, както и до ОС в кръвната плазма и до нарушения в сперматогенния епител.

2. Приложението на пробиотици води до намаление на плазмените концентрации на триглицеридите, предотвратява прекомерното образуване на епидидимална мастна тъкан, има протективна роля по отношение на ОС и обръща негативните ефекти на HFD по отношение на сперматогенния епител.

3. Приложението на пробиотици редуцира в значителна степен негативните ефекти на високолипидната диета и подобрява в значителна степен подвижността на сперматозоидите и % на живите сперматозоиди.

4. Приложението на ниски дози (35 mg/kg, i.p.) LA, повишава антиоксидантния капацитет и намалява ОС в мозъчната тъкан.

5. Приложението на ниски дози LA, би могло да има потенциална роля при лечението на ПБ, като адювантна терапия.

X. Научни публикации и съобщенищя във връзка с темата на дисертационния труд

1. Публикации

1. S. Sayiner, N. Gulmez, Z. Sabit, M. Gulmez. Effects of deep-frying sunflower oil on sperm parameters in a mouse model: do probiotics have a protective effect? Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 25 (6), 2019. **IF=0.489**

2. Pavlina Andreeva-Gateva, Lubomir Traikov, Zafer Sabit, Dimitar Bakalov, Radka Tafradjiiska-Hadjiolova. Antioxidant Effect of Alpha Lipoic Acid in 6-Hydroxydopamine Unilateral Intrastriatal Injected Rats. Antioxidants 9 (2),2020. **IF=5,014**

3. З. Сабит, Д. Бакалов,С. Лазаров, П. Андреева-Гатева, Р. Тафраджийска-Хаджиолова. Роля на чревната дисбиоза и оксидативния стрес в патогенезата на мъжкия идиопатичен инфертилитет, и повлияването му от приложението на пробиотици. Български медицински журнал(2),2021. Под печат.

2. Научни съобщения

1. 2nd International conference on "Veterinary biochemistry and clinical biochemistry: ADVANCES and CHALLENGES on UNDERSTANDING the MECHANISMS of DISEASES" October 24-26, 2019 Ankara / Turkey

Effects of deep-frying sunflower oil alone and in combination with probiotics in mice: a biochemical, histological and spermatological approach. Serkan Sayıner , Nurhayat Gülmez , Zafer Sabit , Murat Gülmez – oral presentation.

Награда за най-добра орална презентация (Oral Presentation 24 - awarded as best oral presentation).

XI. Цитирания на публикациите свързани с дисертационния труд в Scopus и Web of Science

Andreeva-Gateva, P.; Traikov, L.; Sabit, Z.; Bakalov, D.; Tafradjiiska-Hadjiolova, R. Antioxidant Effect of Alpha-Lipoic Acid in 6-Hydroxydopamine Unilateral Intrastriatal Injected Rats. Antioxidants 2020, 9, 122. https://doi.org/10.3390/antiox9020122

1. Tyagi, A. Yeon, S.-J. Daliri, E.B.-M. Chelliah, R. Oh, D.-H. Untargeted metabolomics of korean fermented brown rice using uhplc q-tof ms/ms reveal an abundance of potential dietary antioxidative and stress-reducing compounds. – Antioxidants, 10,2021, 4, p. 626.
2. Roberts, L.A. Suzuki, K. Anti-inflammatory and antioxidant e□ects of dietary supplementation and lifestyle factors. - Antioxidants, 10,2021, 3, pp. 1-4.
3. Domingues, R. Pereira, C. Cruz, M.T. Silva, A. Therapies for Alzheimer's disease: a metabolic perspective. – Molecular Genetics and Metabolism, 132, 2021, 3, pp. 162-172.
4. Pop, A.L. Crișan, S. Bârcă, M. Trifu, S. Năsui, B.A. Evaluation of Dissolution Profiles of a Newly DevelopedSolid Oral Immediate-Release Formula ContainingAlpha-Lipoic Acid. – Processes, 9, 2021, 1, 176, pp. 1-22.
5. Enogieru, A.B. Momodu, O.I. The Developing Cerebellum as a Target for Toxic Substances: Protective Role of Antioxidants. – Cerebellum, 2021, Article in Press.
6. Rezaie, M. Nasehi, M. Vaseghi, S. Zarrindast, M.-R. Nasiri Khalili, M.A. The protective e□ect of alpha lipoic acid (ALA) on social interaction memory, but not passive avoidance in sleep-deprived rats. - Naunyn- Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, 393, 2021, 11, pp 2081-2091.
7. Soltesova Prnova, M. Medina-Campos, O.N. Pedraza-Chaverri, J. Santamaria, A. Stefek, M. Antioxidant Mechanisms in the Neuroprotective Action of Cemtirestat: Studies in Chemical Models, Liposomes and Rat Brain Cortical Slices. – Neuroscience, 443, 2021, pp. 206-217.
8. Piersimoni, Maria Elena; Teng, Xiangyu; Cass, Anthony E. G. et al. Antioxidant lipoic acid ligand-shell gold nanoconjugatesagainst oxidative stress caused by alpha-synucleinaggregates. - NANOSCALE ADVANCESVolume: 2 Issue: 12 Pages: 5666-5681, Published: DEC 1 2020.

Sayıner S, Gülmez N, Sabit Z, Gülmez M: Effects of deep-frying sunflower oil on sperm parameters in a mouse model: Do probiotics have a protective effect?. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 25 (6): 857-863, 2019. DOI: 10.9775/kvfd.2019.22063.

1. Sayiner, S. Darbaz, I. Ergene, O. Aslan, S. Changes in antioxidant enzyme activities and metabolic parameters in dairy cows during di□erent reproductive periods. – Theriogenology, 159, pp. 116-122.
2. Sağmanligil, V. Arsoy, D. Sayiner, S. Findik, A. Gülmez, N.. Sağmanligil, V. Arsoy, D. Sayiner, S. Findik, A. Gülmez, N. - E□ects of deep-frying palm

oil and exercise onsperm and biochemical parameters in mice. - Journal of Oil Palm Research, 32, 2020, 4, pp.647-655.
3. Kadhim, R.J. Dawood, T.N. E□ect of raw cow milk ke□r on some semen traits in Iraqi ram lambs. - Plant Archives, 20, 2020, pp. 2934-2939.

XII. Списък с научни проекти, свързани с дисертационния труд

1. Проект на тема: „Проучване на влиянието на запържени мазнини и ефектите на пробиотици върху сперматозоидни показатели“ финансиран от Near East University, Nicosia, North Cyprus. Времетраене на проекта: 2016-17 г.

2. ФНИ при МОН – Договор№ ДН 13/16 от 21. 12. 2017 г. Тема на проекта: „Неврофармакологични проучвания на новосинтезирани производни на мелатонина с ароилхидразонов фрагмент“.

XIII. Библиография

1. Abbas A. K., Lichtman A. H., Pillai S., Cellular and Molecular Immunology. EIGHTH EDITION. ELSEVIER, 2015.
2. Abd-Aziz N, Chatterjee C, Durairajanayagam D. Corticosterone-induced oxidative stress alters epididymal sperm fertility in rats. ASM Sci J 2014;8:117-24.
3. Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. J Neurosci. 2007;27:1129–1138.
4. Absalan F, Movahedin M, Mowla SJ: Assesment of testis histological changes and sperm parameters in experimentally-induced unilateral and bilateral cryptorchid mouse model. Iran J Reprod Med, 6(3), 143–148, 2008.
5. Achouh P.E., Simonet S., Fabiani J.N., Verbeuren T.J., Carbon monoxide induces relaxation of human internal thoracic and radial arterial grafts. Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg., 2008, 7, 959–962.
6. Adam S.K., Das S., Soelaiman I.N., Umar N.A., Jaarin K., Consumption of repeatedly heated soy oil increases the serum parameters related to atherosclerosis in ovariectomized rats. Tohoku J. Exp. Med., 2008b, 215, 219–226.
7. Adam S.K., Soelaiman I.N., Umar N.A., Mokhtar N., Mohamed N., Jaarin K., Effects of repeatedly heated palm oil on serum lipid profi le, lipid peroxidation and homocysteine levels in a postmenopausal rat model. McGill J. Med., 2008a, 11, 145–151.
8. Adam S.K., Sulaiman N.A., Mat Top A.G., Jaarin K., Heating reduces vitamin E content in palm and soy oils. Malays. J. Biochem. Mol. Biol., 2007, 15 (2), 76–79.
9. Agarwal A, Ahmad G, Sharma R. Reference values of reactive oxygen species in seminal ejaculates using chemiluminescence assay. J Assist Reprod Genet 2015;32:1721-9.
10. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: A clinical approach. BJU Int 2005;95:503-7.

11. Agarwal A, Said TM: Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum Reprod Update, 9(4), 331–345, 2003. DOI: 10.1093/humupd/dmg027.
12. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. World J Mens Health 2014;32:1-17.
13. Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS: Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. World J Mens Health, 32(1), 1, 2014. DOI: 10.5534/wjmh.2014.32.1.1.
14. Agarwal AL, Makker K, Sharma R; 2008 Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. American Journal of Reproductive Immunology592–11. (doi:10.1111/j.1600-0897.2007.00559.x)
15. Agarwal, A., Krajcir, N., Chowdary, H. & Gupta, S. (2008) Female infertility and assisted reproduction: impact of oxidative stress. Current Women's Health Reviews, 4(1), 9–15.
16. AgarwalALTvrdaESharmaR2014Relationship amongst teratozoospermia, seminal oxidative stress and male infertility. Reproductive Biology and Endocrinology121–8. (doi:10.1186/1477-7827-12-1)
17. AgarwalASalehRABedaiwymA2003Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. Fertility and Sterility79829–843. (doi:10.1016/S0015-0282(02)04948-8)
18. AhmadiANgSC1999Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. Journal of Experimental Zoology284696–704. (doi:10.1002/(SICI)1097-010X(19991101)284:6<696::AID-JEZ11>3.0.CO;2-E)
19. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. Biol Reprod 1989;41:183-97.
20. Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De Iuliis GN. Oxidative stress and male reproductive health. Asian J Androl 2014;16:31-8.
21. Aitken RJ. DNA damage in human spermatozoa; important contributor to mutagenesis in the offspring. Transl Androl Urol 2017;6:S761-4.
22. Aitken RJ. The amoroso lecture. The human spermatozoon – a cell in crisis? J Reprod Fertil 1999;115:1-7.
23. AitkenRJBarkerMA2002Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. International Journal of Andrology25191–194. (doi:10.1046/j.1365-2605.2002.03521.x)

24. AitkenRJClarksonJS1987Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility81459–469. (doi:10.1530/jrf.0.0810459)
25. AitkenRJKrauszC2001Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. Reproduction122497–506. (doi:10.1530/rep.0.1220497)
26. Akmal M, Qadri JQ, Al-Waili NS, Thangal S, Haq A, Saloom KY, et al. Improvement in human semen quality after oral supplementation of Vitamin C. J Med Food 2006;9:440-2.
27. Aktas MS, Kandemir FM, Ozkaraca M, Hanedan B, Kirbas A: Protective Effects of Rutin on Acute Lung Injury Induced by Oleic Acid in Rats. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 23(3), 445–451, 2017. DOI: 10.9775/kvfd.2016.16977.
28. Aladedunye F.A., Przybylski R., Degradation and nutritional quality changes of oil during frying. J. Am. Oil Chem. Soc., 2009, 86, 149–156.
29. Alahmar A. Effect of Vitamin C, Vitamin E, zinc, selenium, and coenzyme Q10 in infertile men with idiopathic oligoasthenozoospermia. Int J Infertil Fetal Med 2017;8:45-9.
30. Alahmar AT. The effects of oral antioxidants on the semen of men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. Clin Exp Reprod Med 2018;45:57-66.
31. Alahmar AT. The effects of oral antioxidants on the semen of men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. Clin Exp Reprod Med 2018;45:57-66.
32. Alarcon de la Lastra C., Barranco M.D., Motilova V., Herrerias J.M., Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. Curr. Pharm. Design., 2001, 7, 933–950.
33. Alvarez JG, Storey BT. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. Mol Reprod Dev 1995;42:334-46.
34. Andrikopoulos N.K., Kalogeropoulos N., Falirea A., Barbagianni M.N., Performance of virgin olive oil and vegetable shortening during domestic deep-frying and pan-frying of potatoes. Int. J. Food Sci. Tech., 2002, 37 (2), 177–190.

35. Angelopoulou R, Plastira K, Msaouel P. Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA. Reprod Biol Endocrinol 2007;5:36.
36. Angelopoulou, E.; Piperi, C.; Papavassiliou, A.G. High-mobility group box 1 in Parkinson's disease: From pathogenesis to therapeutic approaches. J. Neurochem. 2018, 146, 211–218.
37. Ani E.J., Nna V.U., Obi C.E., Udobong N.J., Comparative effects of thermoxidized palm oil and groundnut oil diets on some haematological parameters in albino wistar rats. Aust. J. Basic Appl. Sci., 2015a, 9 (5), 181–184.
38. Attya M., Benabdelkamel H., Perri E., Russo A., Sindona G., Effects of conventional heating on the stability of major olive oil phenolic compounds by tandem mass spectrometry and isotope dilution assay. Molecules, 2010, 15, 8734–8746.
39. Australian Bureau of Statistics. 4364.0.55.001 - National Health Survey: first results, 2017–18. http://www.abs.gov.au/ausstats/abs@.nsf/mf/4364.0.55.001.
40. Awney HA: The effects of Bifidobacteria on the lipid profile and oxidative stress biomarkers of male rats fed thermally oxidized soybean oil. Biomarkers, 16(5), 445–452, 2011. DOI: 10.3109/1354750X.2011.590228.
41. Ayyanna R, Ankaiah D, Arul V: Anti-inflammatory and Antioxidant Properties of Probiotic Bacterium Lactobacillus mucosae AN1 and Lactobacillus fermentum SNR1 Wistar Albino Rats. Front Microbiol, 9, 1–13, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03063.
42. Babior BM. NADPH oxidase. Curr Opin Immunol. 2004;16:42–47.
43. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:15718–23.
44. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104:979–84.
45. Bae, E.-J.; Ho, D.-H.; Park, E.; Jung, J.W.; Cho, K.; Hong, J.H.; Lee, H.-J.; Kim, K.P.; Lee, S.-J. Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxy-2-Nonenal Promotes Seeding-Capable Oligomer Formation and Cell-to-Cell Transfer of α-Synuclein. Antioxid. Redox Signal. 2013, 18, 770–783.

46. Bakos HW, Henshaw RC, Mitchell M, Lane M. Paternal body mass index is associated with decreased blastocyst development and reduced live birth rates following assisted reproductive technology. Fertil Steril. 2011;95(5): 1700–4.
47. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev. 2007;87:245–313.
48. Bellastella G, Menafra D, Puliani G, Colao A, Savastano S; Obesity Programs of nutrition, Education, Research and Assessment (OPERA) Group. How much does obesity affect the male reproductive function? Int J Obes Suppl. 2019 Apr;9(1):50-64.
49. Bengtsson SH, Gulluyan LM, Dusting GJ, Drummond GR. Novel isoforms of NADPH oxidase in vascular physiology and pathophysiology. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2003;30:849–854.
50. Benhar I., London A., Schwartz M. The privileged immunity of immune privileged organs: the case of the eye. Frontiers in immunology. 2012, Vol. 3;
51. Bhandari P, Prabha V: Evaluation of profertility effect of probiotic Lactobacillus plantarum 2621 in a murine model. Indian J Med Res, 142(1), 79–84, 2015. DOI: 10.4103/0971-5916.162127.
52. Bhandari P, Rishi P, Prabha V: Positive effect of probiotic Lactobacillus plantarum in reversing LPS-induced infertility in a mouse model. J Med Microbiol, 65(5), 345–350, 2016. DOI: 10.1099/jmm.0.000230.
53. Bhandary B, Marahatta A, Kim HR, Chae HJ. An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. Int J Mol Sci. 2012;14:434–456.
54. Bilska-Wilkosz, A.; Iciek, M.; Kowalczyk-Pachel, D.; Górny, M.; Sokołowska-Jeżewicz, M.; Włodek, L. Lipoic Acid as a Possible Pharmacological Source of Hydrogen Sulfide/Sulfane Sulfur. Molecules 2017, 22, 388.
55. Birben E, Murat U, Md S, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O: Oxidative Stress and Antioxidant Defense. WAO J, 5, 9–19, 2012. DOI: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
56. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. Nat Rev Urol 2017;14:470-85. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28508879. [Last accessed on 2018 Jan 28].

57. Bjørklund, G.; Aaseth, J.; Crisponi, G.; Rahman, M.M.; Chirumbolo, S. Insights on alpha-lipoic and dihydrolipoic acids as promising scavengers of oxidative stress and possible chelators in mercury toxicology. J. Inorg. Biochem. 2019, 195, 111–119.
58. Blekas G., Boskou D., Phytosterols and stability of frying oils. 1999, in: Frying of Food. (eds. D.Boskou, I. Elmadfa). Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, pp. 205–222.
59. Bobjer J, Katrinaki M, Tsatsanis C, Lundberg Giwercman Y, Giwercman A. Negative association between testosterone concentration and inflammatory markers in young men: a nested cross-sectional study. PloS One 8: e61466, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0061466.
60. Bolisetty S, Jaimes EA. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. Int J Mol Sci. 2013;14:6306–6344.
61. B. Bonaz, T. Bazin, and S. Pellissier, "The vagus nerve at the Interface of the microbiota-gut-brain axis," Frontiers in Neuroscience, vol. 12, 2018.
62. Boroni Moreira AP, Fiche Salles Teixeira T, do CGPM, de Cassia Goncalves Alfenas R. Gut microbiota and the development of obesity. Nutr Hosp. 2012;27:1408–14.
63. Boskou D., Culinary applications. 2006, in: Olive Oil Chemistry and Technology (ed. D. Boskou). AOCS Press, Champaign, Illinois, pp. 243–248.
64. Bosmann HB, Hales KH, Li X, Liu Z, Stocco DM, Hales DB. Acute in vivo inhibition of testosterone by endotoxin parallels loss of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein in Leydig cells. Endocrinology 137: 4522–4525, 1996. doi:10.1210/endo.137.10.8828518.
65. Boutagy NE, McMillan RP, Frisard MI, Hulver MW. Metabolic endotoxemia with obesity: Is it real and is it relevant? Biochimie 124:11–20, 2016. doi:10.1016/j.biochi.2015.06.020.
66. Brenes M., Garciäa A., Dobarganes M.C., Velasco J., Romero C.N., Infl uence of thermal treatments simulating cooking processes on the polyphenol content in virgin olive oil. J Agric. Food Chem., 2002, 50, 5962–5967.
67. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. Biochim Biophys Acta. 2013;1830:3289–3303. .
68. Brigelius-Flohé R, Traber MG. Vitamin E: Function and metabolism. FASEB J 1999; 13:1145–55.

69. Bubici C, Papa S, Dean K, Franzoso G. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. Oncogene. 2006;25:6731–6748. .
70. Bui AD, Sharma R, Henkel R, Agarwal A. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. Andrologia 2018;50:e13012.
71. Burton GW, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E the only lipidsoluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? Arch Biochem Biophys 1983; 221:281–90.
72. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. Free Radic Biol Med. 2000;29:222–230.
73. Campbell, J.C.; Jeyamohan, S.B.; Cruz, P.D.L.; Chen, N.; Shin, D.; Pilitsis, J.G. Place conditioning to apomorphine in rat models of Parkinson's disease: Differences by dose and side-effect expression. Behav. Brain Res. 2014, 275, 114–119.
74. Cani PD. Crosstalk between the gut microbiota and the endocannabinoid system: impact on the gut barrier function and the adipose tissue. Clin Microbiol Infect 2012;18 Suppl 4:50–3.
75. Carta, M.; Björklund, A. The serotonergic system in L-DOPA-induced dyskinesia: Pre-clinical evidence and clinical perspective. J. Neural. Transm (Vienna) 2018, 125, 1195–1202.
76. Cavallini G. (2006) Male idiopathic oligoasthenoteratospermia. Asian JAndrol 8, 143–157.
77. Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. Asian J Androl 2006;8:143-57.
78. Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Shaded E, Levine M. Pharamacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: Action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissuse. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102:13604–13609. [PubMed: 16157892].
79. Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee JH, Krishna MC, Shacter E, Choyke PL, Pooput C, Kirk KL, Buettner GR, Levine M. Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104:8749–54. [PubMed: 17502596].

80. Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC, Khosh DB, Drisko J, Levine M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105:11105–11109. [PubMed: 18678913].
81. Chen X, Gong L, Xu J: Probiotics Attenuate Sperm Damage Induced by Oxidative Stress in Rats. 2012 Int Conf Biomed Eng Biotechnol,446–448, 2012. DOI: 10.1109/iCBEB.2012.314.
82. Chen XL, Gong LZ, Xu JX: Antioxidative activity and protective effect of probiotics against high-fat diet-induced sperm damage in rats. Animal, 7(2), 287–292, 2013. DOI: 10.1017/S1751731112001528.
83. Chlopicki S., Olszanecki K., Marcinkiewicz E., Lomnicka M., Motterlini R., Carbon monoxide released by CORM-3 inhibits human platelets by a mechanism independent of soluble guanylate cyclase. Cardiovasc. Res., 2006, 71, 393–401.
84. Cho, C.-S.; Lee, S.; Lee, G.T.; Woo, H.A.; Choi, E.-J.; Rhee, S.G. Irreversible Inactivation of Glutathione Peroxidase 1 and Reversible Inactivation of Peroxiredoxin II by H2O2 in Red Blood Cells. Antioxid. Redox Signal. 2010, 12, 1235–1246.
85. Choe E., Min D.B., Chemistry of deep-fat frying oils. J. Food Sci., 2007, 72 (5), R77–R86.
86. Choi J, Joseph L, Pilote L. Obesity and C-reactive protein in various populations: a systematic review and meta-analysis. Obesity Rev. 2013;14:232–44.
87. Chong Y.H., Ng T.K.W., Effects of palm oil on cardiovascular risk. Med. J. Malaysia, 1991, 46, 1.
88. Christeff N, Benassayag C, Carli-Vielle C, Carli A, Nunez EA. Elevated oestrogen and reduced testosterone levels in the serum of male septic shock patients. J Steroid Biochem 29: 435–440, 1988. doi:10.1016/0022-4731(88)90254-3.
89. Christensen P, Stryhn H, Hansen C: Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. Theriogenology, 63(4), 992–1003, 2005. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.05.026.

90. Cicerale S., Lucas, L.J., Keast R.S.J., Antimicrobial, antioxidant and anti-infl ammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. Curr. Opin. Biotechnol., 2012, 23, 129–135.
91. Ciulla, M.; Marinelli, L.; Cacciatore, I.; Stefano, A.D. Role of Dietary Supplements in the Management of Parkinson's Disease. Biomolecules 2019, 9, 271.
92. Cleeter, M.W.J.; Chau, K.-Y.; Gluck, C.; Mehta, A.; Hughes, D.A.; Duchen, M.; Wood, N.W.; Hardy, J.; Mark Cooper, J.; Schapira, A.H. Glucocerebrosidase inhibition causes mitochondrial dysfunction and free radical damage. Neurochem. Int. 2013, 62, 1–7.
93. Clempus RE, Sorescu D, Dikalova AE, Pounkova L, Jo P, Sorescu GP, Schmidt HH, Lassègue B, Griendling KK. Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2007;27:42–48.
94. Cobb C. A. and M. P. Cole, "Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration," Neurobiology of Disease, vol. 84, pp. 4–21, 2015.
95. Cobley J. N., M. L. Fiorello, and D. M. Bailey, "13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress," Redox Biology, vol. 15, pp. 490–503, 2018.
96. Cohen PG. The hypogonadal-obesity cycle: role of aromatase in modulating the testosterone-estradiol shunt—a major factor in the genesis of morbid obesity. Med Hypotheses. 1999;52:49–51.
97. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update 2010;16:231-45.
98. Corona G, Vignozzi L, Sforza A, Mannucci E, Maggi M. Obesity and late-onset hypogonadism. Mol Cell Endocrinol 418: 120–133, 2015. doi:10.1016/j.mce.2015.06.031.
99. Corona G, Vignozzi L, Sforza A, Mannucci E, Maggi M. Obesity and late-onset hypogonadism. Mol Cell Endocrinol. 2015 Dec 15;418 Pt 2:120-33. doi: 10.1016/j.mce.2015.06.031. Epub 2015 Jul 2. PMID: 26143633.
100. Corpe CP, Eck P, Wang J, Al-Hasani H, Levine M. Intestinal dehydroascorbic acid (DHA) transport mediated by the facilitative sugar transporters, GLUT2 and GLUT8. J Biol Chem. 2013; 288:9092–101. [PubMed: 23396969].

101. Crean AJ, Senior AM. High-fat diets reduce male reproductive success in animal models: a systematic review and meta-analysis. Obes Rev. 2019 Jun;20(6):921-933. doi: 10.1111/obr.12827.

102. Cremer, D.R.; Rabeler, R.; Roberts, A.; Lynch, B. Long-term safety of α-lipoic acid (ALA) consumption: A 2-year study. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2006, 46, 193–201.

103. D. Armstrong and R. D. Stratton. Oxidative stress and antioxidant protection: the science of free radical biology and disease. First edition, John Wiley & Sons, Inc. 2016.

104. Dardmeh F, Alipour H, Gazerani P, Van Der Horst G, Brandsborg E, Nielsen HI: Lactobacillus rhamnosus PB01 (DSM 14870) supplementation affects markers of sperm kinematic parameters in a diet-induced obesity mice model. PLoS One, 12(10), 1–17, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0185964.

105. Dasuri K, Zhang L, Keller JN. Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. Free Radic Biol Med. 2013;62:170–185.

106. De Araújo, D.P.; De Sousa, C.N.S.; Araújo, P.V.P.; Menezes, C.E.d.S.; Sousa Rodrigues, F.T.; Escudeiro, S.S.; Lima, N.B.C.; Patrocínio, M.C.A.; Aguiar, L.M.V.; Viana, G.S.d.B.; et al. Behavioral and Neurochemical Effects of Alpha-Lipoic Acid in the Model of Parkinson's Disease Induced by Unilateral Stereotaxic Injection of 6-Ohda in Rat. Evid. Based Complement. Alternat. Med. 2013, 2013, 1–13.

107. De Araújo, D.P.; Lobato, R.D.F.G.; Cavalcanti, J.R.L.D.P.; Sampaio, L.R.L.; Araújo, P.V.P.; Silva, M.C.C.; Neves, K.R.T.; Fonteles, M.M.D.F.; Sousa, F.C.F.D.; Vasconcelos, S.M.M. The Contributions of Antioxidant Activity of Lipoic Acid in Reducing Neurogenerative Progression of Parkinson's Disease: A Review. Int. J. Neurosci. 2011, 121, 51–57.

108. de La Serre CB, Ellis CL, Lee J, Hartman AL, Rutledge JC, Raybould HE. Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2010;299:G440–8.

109. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. J Androl 1992;13:368-78.

110. de Vries HE, Witte M, Hondius D, Rozemuller AJ, Drukarch B, Hoozemans J, van Horssen J. Nrf2-induced antioxidant protection: a promising target to counteract ROS-mediated damage in neurodegenerative disease? Free Radic Biol Med. 2008;45:1375–1383.

111. Delzenne, N. M. & Bindels, L. B. Microbiome metabolomics reveals new drivers of human liver steatosis. Nat. Med. 24, 906–907 (2018).

112. Dengler VL, Galbraith MD, Espinosa JM. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2014; 49:1–15. [PubMed: 24099156].

113. Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, Van Hul M, Vieira-Silva S, Falony G, Raes J, Maiter D, Delzenne NM, de Barsy M, Loumaye A, Hermans MP, Thissen JP, de Vos WM, Cani PD. Supplementation with Akkermansia muciniphila in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. Nat Med. 2019 Jul;25(7):1096-1103.

114. Desai N, Sharma R, Makker K, Sabanegh E, Agarwal A. Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. Fertil Steril 2009;92:1626-31.

115. Deumens, R.; Blokland, A.; Prickaerts, J. Modeling Parkinson's Disease in Rats: An Evaluation of 6-OHDA Lesions of the Nigrostriatal Pathway. Exp. Neurol. 2002, 175, 303–317.

116. Dumitrescu L, Popescu-Olaru I, Cozma L, Tulbă D, Hinescu ME, Ceafalan LC, Gherghiceanu M, Popescu BO. Oxidative Stress and the Microbiota-Gut-Brain Axis. Oxid Med Cell Longev. 2018 Dec 9;2018:2406594. doi: 10.1155/2018/2406594.

117. Dimitrina K. Dimitrova-Dikanarova, Vladislav V. Lazarov, Radka TafradjiiskaHadjiolova, Ivanka I. Dimova, Nina U. Petkova & Zahariy A. Krastev (2017) Association between Helicobacterpylori infection and the presence of anti-sperm antibodies, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 31:1, 1-8, DOI: 10.1080/13102818.2016.1258330.

118. Di Stefano, A.; Sozio, P.; Cocco, A.; Iannitelli, A.; Santucci, E.; Costa, M.; Pecci, L.; Nasuti, C.; Cantalamessa, F.; Pinnen, F. L-Dopa− and Dopamine−(R)-α-Lipoic Acid Conjugates as Multifunctional Codrugs with Antioxidant Properties. J. Med. Chem. 2006, 49, 1486–1493.

119. Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griendling KK. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. Free Radic Biol Med. 2008;45:1340–1351.

120. Ding N, Zhang X, Zhang XD, Jing J., Liu S.S., Mu Y.P., Peng L.L., Yan Y.J., Geng G.M., Bi X.Y., Chen H., Li F.H., Yao B., Zhao A. Z. Impairment of spermatogenesis and sperm motility by the high-fat diet-induced dysbiosis of gut microbesGut 2020;69:1608-1619.

121. Dinicola, S.; Proietti, S.; Cucina, A.; Bizzarri, M.; Fuso, A. Alpha-Lipoic Acid Downregulates IL-1β and IL-6 by DNA Hypermethylation in SK-N-BE Neuroblastoma Cells. Antioxidants 2017, 6, 74.

122. Dittrich M., Jahreis G., Bothor K. et al., Benefi ts of foods supplemented with vegetable oils rich in alpha-linolenic, stearidonic or docosahexaenoic acid in hypertriglyceridemic subjects: a double-blind, randomized, controlled trial. Eur. J. Nutr., 2015, 54, 881–893.

123. Dobarganes C, Márquez-Ruiz G: Possible adverse effects of frying with vegetable oils. Br J Nutr, 113(S2), S49–S57, 2015. DOI: 10.1017/S0007114514002347.

124. Dobarganes C., Márquez-Ruiz G., Possible adverse effects of frying with vegetable oils. British J. Nutr., 2015, 113, S49-S57.

125. Dodd, D. et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. Nature 551, 648–652 (2017). DOI: 10.3389/fimmu.2012.00296.

126. Dringen R, Gutterer JM, Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. Eur J Biochem. 2000;267:4912–4916.

127. Dringen R, Hirrlinger J. Glutathione pathways in the brain. Biol Chem. 2003;384:505–516.

128. Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. Prog Neurobiol. 2000;62:649–671.

129. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002;82:47–95.

130. Dudek, M.; Razny, K.; Bilska-Wilkosz, A.; Iciek, M.; Sapa, J.; Wlodek, L.; Filipek, B. Hypotensive effect of alpha-lipoic acid after a single administration in rats. Anatol. J. Cardiol. 2016, 16, 306–309.

131. Dupont C, Faure C, Sermondade N, Boubaya M, Eustache F, Clément P, et al. Obesity leads to higher risk of sperm DNA damage in infertile patients. AJA. 2013;15(5):622–5.

132. El-Fakahany, Hasan M, Denny Sakkas. 2011. "Abortive apoptosis and sperm chromatin damage." Sperm Chromatin, 295–306. Springer.

133. Ellmark SH, Dusting GJ, Fui MN, Guzzo-Pernell N, Drummond GR. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. Cardiovasc Res. 2005;65:495–504.

134. ElSheikh MG, Hosny MB, Elshenoufy A, Elghamrawi H, Fayad A, Abdelrahman S, et al. Combination of Vitamin E and clomiphene citrate in treating patients with idiopathic oligoasthenozoospermia: A prospective, randomized trial. Andrology 2015;3:864-7.

135. Englard S, Seifter S. The biochemical functions of ascorbic acid. Annu Rev Nutr. 1986; 6:365–406. [PubMed: 3015170].

136. Erdemir F, Atilgan D, Markoc F, Boztepe O, Suha-Parlaktas B, Sahin S: Efecto de la obesidad inducida por dieta en el tejido testicular y parámetros de estrés oxidativo en el suero. Actas Urol Esp, 36(3), 153–159, 2012. DOI: 10.1016/j.acuro.2011.06.019.

137. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, Lamas S. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. Redox Biol. 2015;6:183–197.

138. Esteves SC, Sánchez-Martín F, Sánchez-Martín P, Schneider DT, Gosálvez J. Comparison of reproductive outcome in oligozoospermic men with high sperm DNA fragmentation undergoing intracytoplasmic sperm injection with ejaculated and testicular sperm. Fertil Steril 2015;104:1398-405.

139. EvensonDPWixonR2006Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. Theriogenology65979–991. (doi:10.1016/j.theriogenology.2005.09.011)

140. Falade A.O., Oboh G., Ademiluyi A.O., Odubanjo O.V., Consumption of thermally oxidized palm oil diets alters biochemical indices rats. Beni Suef University J. Basic Appl. Sci., 2015, 4 (2), 150–156.

141. Falade A.O., Oboh G., Thermal oxidation induces lipid peroxidation and changes in the physico-chemical properties and β-carotene content of arachis oil. Int. J. Food Sci., 2015, dx.doi.org/10.1155/2015/806524.

142. Farmer E.E., Davoine C., Reactive electrophile species. Curr. Opin. Plant Biol., 2007, 10 (4), 380–6. Unauthentifiziert | Heruntergeladen 16.10.19 10:05 UTC 104 Potential Health Implications of Thermally-Oxidized Oils – a Review

143. FatehiANBeversMMSchoeversERoelenBAColenbranderBGadellaBM 2006DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. Journal of Andrology27176–188. (doi:10.2164/jandrol.04152)

144. Fernandez CDB, Bellentani FF, Fernandes GSA, Perobelli JE, Favareto APA, Nascimento AF, Cicogna AC, Kempinas WDG: Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. Reprod Biol Endocrinol, 9, 32, 2011. DOI: 10.1186/1477-7827-9-32.

145. Filloux, F.; Townsend, J.J. Pre- and postsynaptic neurotoxic effects of dopamine demonstrated by intrastriatal injection. Exp. Neurol. 1993, 119, 79–88.

146. Fisher HM, Aitken RJ. Comparative analysis of the ability of precursor germ cells and epididymal spermatozoa to generate reactive oxygen metabolites. J Exp Zool 1997;277:390-400.

147. Flashman E, Davies SL, Yeoh KK, Schofield CJ. Investigating the dependence of the hypoxia-inducible factor hydroxylases (factor inhibiting HIF and prolyl hydroxylase domain 2) on ascorbate and other reducing agents. Biochem J. 2010; 427:135–42. [PubMed: 20055761].

148. Flohé, L.; Günzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymolog. 1984, 105, 114–120.

149. Francisqueti-Ferron, F.V.; Ferron, A.J.T.; Garcia, J.L.; Silva, C.C.V.d.A.; Costa, M.R.; Gregolin, C.S.; Moreto, F.; Ferreira, A.L.A.; Minatel, I.O.; Correa, C.R. Basic Concepts on the Role of Nuclear Factor Erythroid-Derived 2-Like 2 (Nrf2) in Age-Related Diseases. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 3208. .

150. Freedman JE, Farhat JH, Loscalzo J, Keaney JF Jr. Alphatocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. Circulation 1996; 94:2434–40.

151. Fullana A., Carbonell-Barrachina A.A., Sidhu S., Comparison of volatile aldehydes present in the cooking fumes of extra virgin olive, olive, and canola oils. J. Agric. Food Chem., 2004, 52, 5207–5214.

152. Galecki, P., M. Talarowska, G. Anderson, M. Berk, and M. Maes, "Mechanisms underlying neurocognitive dysfunctions in recurrent major depression," Medical Science Monitor, vol. 21, pp. 1535–1547, 2015.

153. G. Muscogiuri, E. Cantone, S. Cassarano, D. Tuccinardi, L. Barrea, S. Savastano, A. Colao. Gut microbiota: a new path to treat obesity. International Journal of Obesity Supplements https://doi.org/10.1038/s41367-019-0011-7

154. Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. Oxid Med Cell Longev. 2012;2012:428010.

155. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, et al. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. Science 2016;352:539–44.

156. Giacco F., Brownlee M., Oxidative stress and diabetic complications. Circ. Res., 2010, 107 (9), 1058–1070.

157. Glinka, Y.; Gassen, M.; Youdim, M.B.H. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. In Advances in Research on Neurodegeneration; Riederer, P., Calne, D.B., Horowski, R., Mizuno, Y., Poewe, W., Youdim, M.B.H., Eds.; Springer Vienna: Vienna, Austria, 1997; Volume 50, pp. 55–66. ISBN 978-3-211-82898-4.

158. Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ, et al. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: Correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. J Androl 1996;17:276-87.

159. GomezEIrvineDSAitkenRJ1998Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. International Journal of Andrology2181–94. (doi:10.1046/j.1365-2605.1998.00106.x)

160. Gordillo G, Fang H, Park H, Roy S. Nox-4-dependent nuclear H2O2 drives DNA oxidation resulting in 8-OHdG as urinary biomarker and hemangioendothelioma formation. Antioxid Redox Signal. 2010;12:933–943.

161. Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. Circ Res. 2000;87:26–32.

162. Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG: Brain-gut-microbe communication in health and disease. Front Physiol, 2(Article 94), 1–15, 2011. DOI: 10.3389/fphys.2011.00094.

163. Grimm A., Eckert A. "Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view," Journal of Neurochemistry, vol. 143, no. 4, pp. 418–431, 2017.

164. Groeger G, Quiney C, Cotter TG. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. Antioxid Redox Signal. 2009;11:2655–2671.

165. Guiney, S.J.; Adlard, P.A.; Bush, A.I.; Finkelstein, D.I.; Ayton, S. Ferroptosis and cell death mechanisms in Parkinson's disease. Neurochem. Int. 2017, 104, 34–48.

166. Gupta M.K., Frying oil. 2005, in: Edible Oil and Food Products: Products and Applications (ed. F. Shahidi). John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, pp. 1–31.

167. Haghighatdoost, F.; Hariri, M. The effect of alpha-lipoic acid on inflammatory mediators: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. Eur. J. Pharmacol. 2019, 849, 115–123.

168. Haines MD, Parker HM, McDaniel CD, Kiess AS: Impact of 6 different intestinal bacteria on broiler breeder sperm motility in vitro. Poult Sci, 92(8), 2174–2181, 2013. DOI: 10.3382/ps.2013-03109.

169. Hales DB. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. J Reprod Immunol 57: 3–18, 2002. doi:10.1016/S0165-0378(02)00020-7.

170. Hales KH, Diemer T, Ginde S, Shankar BK, Roberts M, Bosmann HB, Hales DB. Diametric effects of bacterial endotoxin lipopolysaccharide on adrenal and Leydig cell steroidogenic acute regulatory protein. Endocrinology 141: 4000–4012, 2000. doi:10.1210/endo.141.11.7780.

171. Hall A, Nelson K, Poole LB, Karplus PA. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. Antioxid Redox Signal. 2011;15:795–815.

172. Halliwell B & Gutteridge JMC2007 Cellular responses to oxidative stress: adaptation damage repair senescence and death. In Free Radicals in Biology and Medicine4th edn pp 187–268. Oxford: Oxford University Press

173. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? J Neurochem. 2006;97:1634–1658.

174. Halliwell B., Oxidative stress and cancer: have we moved forward. Biochem. J., 2007, 401 (1), 1–11.

175. Halvorsen B.L., Blomhoff R., Determination of lipid oxidation products in vegetable oils and marine omega-3 supplements. Food Nutr. Res., 2011, 55, 5792, doi: 10.3402/fnr.v55i0.5792.

176. HammadehMHamadMMontenarhMFisher-HammadehC2010Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. Human Reproduction252708–2720. (doi:10.1093/humrep/deq226)

177. Hamsi M.A., Othman F., Das S., Kamisah Y., Thent Z.C., Qodriyah H.M., Zakaria Z., Emran A., Subermaniam K., Jaarin K., Effect of consumption of fresh and heated virgin coconut oil on the blood pressure and infl ammatory biomarkers: An experimental study in Sprague Dawley rats. Alexandria J. Med., 2015, 51, 53–63.

178. Han, T.; Bai, J.; Liu, W.; Hu, Y. Therapy of endocrine disease: A systematic review and meta-analysis of α-lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral neuropathy. Eur. J. Endocrinol. 2012, 167, 465–471.

179. Hanrott, K.; Gudmunsen, L.; O'Neill, M.J.; Wonnacott, S. 6-Hydroxydopamine-induced Apoptosis Is Mediated via Extracellular Auto-oxidation and Caspase 3-dependent Activation of Protein Kinase Cδ. J. Biol. Chem. 2006, 281, 5373–5382.

180. Harrison R. Physiological roles of xanthine oxidoreductase. Drug Metab Rev. 2004;36:363–375.

181. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? Free Radic Biol Med. 2002;33:774–797.

182. Hekmatdoost A, Lakpour N, Sadeghi MR. Sperm chromatin integrity: Etiologies and mechanisms of abnormality, assays, clinical importance, preventing and repairing damage. Avicenna J Med Biotechnol 2009;1:147-60.

183. Held P. An introduction to reactive oxygen species: measurement of ROS in cells (white paper) BioTek Instruments, Inc.: Winooski, VT; 2012.

184. Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ Jr., Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. J Urol 1999;161:1831-4.

185. Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. Fertil Steril 2005;83:635-42.

186. Henkel R, Schill WB. Sperm separation in patients with urogenital infections. Andrologia 1998;30 Suppl 1:91-7.

187. Higa A, Chevet E. Redox signaling loops in the unfolded protein response. Cell Signal. 2012;24:1548–1555.

188. Hu, X.; Weng, Z.; Chu, C.T.; Zhang, L.; Cao, G.; Gao, Y.; Signore, A.; Zhu, J.; Hastings, T.; Greenamyre, J.T.; et al. Peroxiredoxin-2 Protects against 6-Hydroxydopamine-Induced Dopaminergic Neurodegeneration via Attenuation of the Apoptosis Signal-Regulating Kinase (ASK1) Signaling Cascade. J. Neurosci. 2011, 31, 247–261.

189. Hudson, J.L.; Fong, C.-S.; Boyson, S.J.; Hoffer, B.J. Conditioned apomorphine-induced turning in 6-OHDA-lesioned rats. Pharmacol. Biochem. Behav. 1994, 49, 147–154.

190. Hybertson BM, Gao B, Bose SK, McCord JM. Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation. Mol Aspects Med. 2011;32:234–246.

191. Ibrahim HAM, Zhu Y, Wu C, Lu C, Ezekwe MO, Liao SF, Haung K: Selenium-enriched probiotics improves murine male fertility compromised by high fat diet. Biol Trace Elem Res, 147(1–3), 251–260, 2012. DOI: 10.1007/s12011-011-9308-2.

192. Imamovic Kumalic S, Pinter B. Review of clinical trials on effects of oral antioxidants on basic semen and other parameters in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. Biomed Res Int 2014;2014:426951.

193. Infanger DW, Sharma RV, Davisson RL. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. Antioxid Redox Signal. 2006;8:1583–1596.

194. Innis S.M., Dyer R.A., Dietary canola oil alters hematological indices and blood lipids in neonatal piglets fed formula. J. Nutr., 1999, 129 (7), 1261–1268.

195. International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. Nature 431, 931–945 (2004).

196. Irwin, M.H.; Moos, W.H.; Faller, D.V.; Steliou, K.; Pinkert, C.A. Epigenetic Treatment of Neurodegenerative Disorders: Alzheimer and Parkinson Diseases. Drug Dev. Res. 2016, 77, 109–123.

197. Isidori AM, Caprio M, Strollo F, et al. Leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84:3673–80.

198. Itoh K, Wakabayashi N, Katoh Y, Ishii T, Igarashi K, Engel JD, Yamamoto M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. Genes Dev. 1999;13:76–86.

199. Ivanov D.S., Lević J.D., Sredanović S.A., Fatty acid composition of various soybean products. Food Feed Res., 2010, 37 (2), 65–70.

200. Jaarin K., Mustafa M.R., Leong X.F., The effects of heated vegetable oils on blood pressure in rats. Clinics, 2011, 66 (12), 2125–2132.

201. Jalali-Nadoushan, M.; Roghani, M. Alpha-lipoic acid protects against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in a rat model of hemi-parkinsonism. Brain Res. 2013, 1505, 68–74.

202. James K.R., Gomes T, Elmentaite R., Kumar N , Gulliver E.L., King H.W., Stares M.D, Bareham B.R., Ferdinand J.R., Petrova V.N., Polański K., Forster S.C., Jarvis L.B., Suchanek O., Howlett S., James L.K., Jones J.L., Meyer K.B., Clatworthy M.R., Saeb-Parsy K., Lawley T.D. and Teichmann S.A. Distinct microbial and immune niches of the human colon. Nature

Immunology volume 21, pages343– 53(2020). doi.org/10.1038/s41590-020-0602-z.

203. Jiang, S.; Fan, J.; Wang, Q.; Ju, D.; Feng, M.; Li, J.; Guan, Z.; An, D.; Wang, X.; Ye, L. Diosgenin induces ROS-dependent autophagy and cytotoxicity via mTOR signaling pathway in chronic myeloid leukemia cells. Phytomedicine 2016, 23, 243–252.

204. Johnsen SG: Testicular biopsy score count – a method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. Horm Res Paediatr, 1(1), 2–25, 1970. DOI: 10.1159/000178170.

205. Kahn BE, Brannigan RE. Obesity and male infertility. Curr Opin Urol. 2017; 27(5):441–5.

206. Kalia, L.V.; Lang, A.E. Parkinson's disease. Lancet 2015, 386, 896–912.

207. Kankofer M KolmM AurichJAurichC2005Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 58°C. Theriogenology631354–1365. (doi:10.1016/j.theriogenology.2004.07.005)

208. Katragadda H.R., Fullana A.S., Sidhu S., Carbonell-Barrachina A.A., Emissions of volatile aldehydes from heated cooking oils. Food Chem., 2010, 120, 59–65.

209. Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. Fertil Steril 2000;74:1200-7.

210. Khan MJ, Gerasimidis K, Edwards CA, Shaikh MG. Role of gut microbiota in the aetiology of obesity: proposed mechanisms and review of the literature. J Obes. 2016;2016:7353642.

211. Kim M, Galan C, Hill AA, Wu WJ, Fehlner-Peach H, Song HW, Schady D, Bettini ML, Simpson KW, Longman RS, Littman DR, Diehl GE. Critical Role for the Microbiota in CX3CR1+ Intestinal Mononuclear Phagocyte Regulation of Intestinal T Cell Responses. Immunity. 2018 Jul 17;49(1):151-163.e5.

212. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. Nat Commun. 2013;4:1829.

213. Kimura, Y.; Goto, Y.-I.; Kimura, H. Hydrogen Sulfide Increases Glutathione Production and Suppresses Oxidative Stress in Mitochondria. Antioxid. Redox Signal. 2010, 12, 1–13.

214. Kismali G, Ozgur E, Sayiner S, Alpaslan B, Guler G, Seyhan N, Sel T: The effects of Epigallocatechin Gallate and N-Acetylcysteine on mobile phone-induced oxidative stress in Guinea pigs. J Anim Vet Adv, 8(5), 959–961, 2009.

215. Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Backhed, F. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. Cell 165, 1332–1345 (2016).

216. Komori K, Tsujimura A, Ishijima S, Tanjapatkul P, Fujita K, Matsuoka Y, Takao T, Miyagawa Y, Takada S, Okuyama A: Comparative study of Sperm Motility Analysis System and conventional microscopic semen analysis. Reprod Med Biol, 5(3), 195–200, 2006. DOI: 10.1111/j.1447-0578.2006.00141.x.

217. Kriete A, Mayo KL. Atypical pathways of NF-kappaB activation and aging. Exp Gerontol. 2009;44:250–255.

218. Kubelkova K., Macela A. Microbiota–Gut–Brain Signaling: a minireview. Mil. Med. Sci. Lett. (Voj. Zdrav. Listy) 2020, 89(1), 41-51. DOI: 10.31482/mmsl.2020.002

219. Kulikova, O.I.; Berezhnoy, D.S.; Stvolinsky, S.L.; Lopachev, A.V.; Orlova, V.S.; Fedorova, T.N. Neuroprotective effect of the carnosine–α-lipoic acid nanomicellar complex in a model of early-stage Parkinson's disease. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2018, 95, 254–259.

220. Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nat Rev Immunol. 2004;4:181–189.

221. Lassègue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30:653–661.

222. Le Noci, V.; Sommariva, M.; Bianchi, F.; Triulzi, T.; Tagliabue, E.; Balsari, A.; Sfondrini, L. Local Administration of Caloric Restriction

Mimetics to Promote the Immune Control of Lung Metastases. J. Immunol. Res. 2019, 2019, 1–8.

223. LeBoeuf RC, Caldwell M, Kirk E: Regulation by nutritional status of lipids and apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV in inbred mice. J Lipid Res, 35(1), 121–33, 1994.

224. Lei, X.G.; Cheng, W.-H.; McClung, J.P. Metabolic Regulation and Function of Glutathione Peroxidase-1. Annu. Rev. Nutr. 2007, 27, 41–61.

225. LenziAGandiniLPicardoMTramerFSandriGPanfiliE2000Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsatured fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. Frontiers in Bioscience51–5. (doi:10.2741/Lenzi)

226. Leong X.F., Mustafa M.R., Das S., Jaarin K., Association of elevated blood pressure and impaired vasorelaxation in experimental Sprague-Dawley rats fed with heated vegetable oil. Lipids Health Dis., 2010, 9, 66.

227. Leong X.F., Ng C.U., Jaarin K., Mustafa M.R., Effects of repeated heating of cooking oils on antioxidant content and endothelial function. Austin J. Pharmacol. Ther., 2015, 3 (2), 1068.

228. Leong X.F., Salimon J., Mustafa M.R., Jaarin K., Effect of repeatedly heated palm olein on blood pressure-regulating enzymes activity and lipid peroxidation in rats. Malays. J. Med. Sci., 2012, 19 (1), 20–29.

229. Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. N Engl J Med. 1986; 314:892–902. [PubMed: 3513016].

230. Levine, M.; Padayatty, SJ.; Wang, Y.; Corpe, C.; Lee, L.; Wang, J.; Chen, Q.; Zhang, L. Vitamin C. In: Stipanuk, M.; Caudill, M., editors. Biochemical; Physiological; and Molecular Aspects of Human Nutrition. W B Saunders; St. Louis, MO, USA: 2006. p. 760-796.

231. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:11070–5.

232. Li D, Saldeen T, Romeo F, Mehta JL. Different isoforms of tocopherols enhance nitric oxide synthase phosphorylation and inhibit human platelet aggregation and lipid peroxidation: Implications in therapy with vitamin E. J Cardiovasc Pharmacol Ther 2001; 6:155–61.

233. Li Z, Wang L, Cai J, Huang H. Correlation of sperm DNA damage with IVF and ICSI outcomes: A systematic review and meta-analysis. J Assist Reprod Genet 2006;23:367-76.

234. Li, L.; Chen, Y.; Gibson, S.B. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. Cell. Signal. 2013, 25, 50–65.

235. Liu L, Trimarchi JR, Smith PJ, Keefe DL. Mitochondrial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability. Aging Cell 2002;1:40-6.

236. Lloyd M. M., M. A. Grima, B. S. Rayner, K. A. Hadfield, M. J.Davies, and C. L. Hawkins, "Comparative reactivity of the myeloperoxidase-derived oxidants hypochlorous acid and hypothiocyanous acid with human coronary artery endothelial cells," Free Radical Biology & Medicine, vol. 65, pp. 1352–1362,2013.

237. Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951, 193, 265–275.

238. Luu TH, Bard JM, Carbonnelle D, Chaillou C, Huvelin JM, Bobin-Dubigeon C, Nazih H. Lithocholic bile acid inhibits lipogenesis and induces apoptosis in breast cancer cells. Cell Oncol (Dordr). 2018 Feb;41(1):13-24.

239. Lynch, S. V. & Pedersen, O. The human intestinal microbiome in health and disease. N. Engl. J. Med. 375, 2369–2379 (2016).

240. M. Sharoba A, Ramadan MF: Impact of Frying on Fatty Acid Profile and Rheological Behaviour of Some Vegetable Oils. J Food Process Technol, 03(07), 2017. DOI: 10.4172/2157-7110.1000161.

241. Madariaga YG, Bo M, Irsula MT, Alfonso OC, Cáceres BA, Morgado EB: Assessment of four experimental models of hyperlipidemia. Lab Anim (NY), 44(04), 135–140, 2015. DOI: 10.1038/laban.710.

242. Majzoub A, Arafa M, Mahdi M, Agarwal A, Al Said S, Al-Emadi I, et al. Oxidation-reduction potential and sperm DNA fragmentation, and their associations with sperm morphological anomalies amongst fertile and infertile men. Arab J Urol 2018;16:87-95.

243. Makker K, Agarwal A, Sharma R. Oxidative stress and male infertility. Indian J Med Res 2009;129:357-67.

244. MakkerKAgarwalASharmaR2009Oxidative stress & male infertility. Indian Journal of Medical Research129357–36.

245. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? Antioxid Redox Signal. 2007;9:2277–2294.

246. Mancuso M, Coppede F, Migliore L, Siciliano G, Murri L. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. J Alzheimers Dis. 2006;10:59–73.

247. Manea A. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. Cell Tissue Res. 2010;342:325–339.

248. Mani S. Production of reactive oxygen species and its implication in human diseases. In: Rani V, Yadav UC, editors. Free radicals in human health and disease. New Delhi: Springer; 2015. pp. 3–15.

249. A. Moniczewski, M. Gawlik, I. Smaga et al., "Oxidative stress as an etiological factor and a potential treatment target of psychiatric disorders. Part 1. Chemical aspects and biological sources of oxidative stress in the brain," Pharmacological Reports, vol. 67, no. 3, pp. 560–568, 2015.

250. Marcon L, Boissonneault G. Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. Biol Reprod 2004;70:910-8.

251. Maretti C., Cavallini G. The association of a probiotic with a prebiotic (Flortec, Bracco) to improve the quality/quantity of spermatozoa in infertile patients with idiopathic oligoasthenoteratospermia: a pilot study. Andrology, 2017, 5, 439–444.

252. Marin, C.; Aguilar, E. In vivo 6-OHDA-induced neurodegeneration and nigral autophagic markers expression. Neurochem. Int. 2011, 58, 521–526.

253. Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. Redox Biol. 2014;2:535–562.

254. Marinova E.M., Seizova K.A., Totseva I.R., Panayotova S.S., Marekov I.N., Momchilova S.M., Oxidative changes in some vegetable oils during heating at frying temperature. Bulg. Chem. Commun., 2012, 44 (1), 57–63.

255. Márquez-Ruiz G., Pérez-Caminò M.C., Dobarganes M.C., Digestibility of fatty acid monomers, dimers and polymers in the rat. J. Am. Oil Chem. Soc., 1992, 69, 930–934.

256. Márquez-Ruiz G., Pérez-Caminò M.C., Dobarganes M.C., Evaluation of hydrolysis and absorption of thermally oxidized olive oil in non-absorbed lipids in the rat. Ann. Nutr. Metabol., 1993, 37, 121–128.

257. Martini, M.L.; Neifert, S.N.; Mocco, J.; Panov, F.; Tse, W.; Walker, R.H.; Jin, J.; Gupta, F. Recent Advances in the Development of Experimental Therapeutics for Levodopa-Induced Dyskinesia. J. Mov. Disord. 2019, 12, 161–165.

258. Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA.National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys. PLoS Med. 2012;9(12):e1001356.

259. Massy Z.A., Stenvinkel P., Drueke T.B., The role of oxidative stress in chronic kidney disease. Semin. Dialysis, 2009, 22 (4), 405–408.

260. Matthäus B., Use of palm oil for frying in comparison with other high-stability oils. Eur. J. Lipid Sci. Tech., 2007, 109 (4), 400–9.

261. Mayorga-Torres BJ, Camargo M, Cadavid ÁP, du Plessis SS, Cardona Maya WD. Are oxidative stress markers associated with unexplained male infertility? Andrologia 2017;49(5).

262. Mba O.I., Dumont M., Ngadi M., Palm oil: processing, characterization and utilization in the food industry – A review. Food Biosci., 2015, 10, 26–41.

263. McLennan HR, Degli Esposti M. The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. J Bioenerg Biomembr. 2000;32:153–162.

264. Meacher D.M., Menzel D.B., Depletion in lung cells by low-molecular weight aldehydes. Cell Biol. Toxicol., 1999, 15, 163–171.

265. Mehrotra A, Katiyar DK, Agarwal A, Das V, Pant KK: Role of total antioxidant capacity and lipid peroxidation in fertile and infertile men. Biomed Res, 24(3), 347–352, 2013. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3285-09.2009.

266. Mesembe O.E., Ibanga I., Osim E.E., The effects of fresh and thermoxidized palm oil diets on some haematological indices in rat. Niger. J. Physiol. Sci., 2004, 19 (1–2), 86–91.

267. Miller TL, Wolin MJ: A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. Appl Microbiol,1974. DOI: 10.1007/BF00532977.

268. Misro MM, Choudhury L, Upreti K, Gautam D, Chaki SP, Mahajan AS, et al. Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative stress in subjects presenting a normal semen profile. Int J Androl 2004;27:82-7.

269. Molz, P.; Schröder, N. Potential Therapeutic Effects of Lipoic Acid on Memory Deficits Related to Aging and Neurodegeneration. Front. Pharmacol. 2017, 8, 849.

270. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, Turner N: Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. Diabetologia, 56(5), 1129–1139, 2013. DOI: 10.1007/s00125-013-2846-8.

271. Moos, W.H.; Faller, D.V.; Glavas, I.P.; Harpp, D.N.; Irwin, M.H.; Kanara, I.; Pinkert, C.A.; Powers, W.R.; Steliou, K.; Vavvas, D.G.; et al. Epigenetic Treatment of Neurodegenerative Ophthalmic Disorders: An Eye Toward the Future. BioRes. Open Access 2017, 6, 169–181.

272. Mortazavi M, Salehi I, Alizadeh Z, Vahabian M, Roushandeh AM: Protective effects of antioxidants on sperm parameters and seminiferous tubules epithelium in high fat-fed rats. J Reprod Infertil, 15(1), 22–28, 2014.

273. Mousavi, S.M.; Shab-Bidar, S.; Kord-Varkaneh, H.; Khorshidi, M.; Djafarian, K. Effect of alpha-lipoic acid supplementation on lipid profile: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. Nutrition 2019, 59, 121–130.

274. Mrakic-Sposta, S.; Vezzoli, A.; Maderna, L.; Gregorini, F.; Montorsi, M.; Moretti, S.; Greco, F.; Cova, E.; Gussoni, M. R(+)-Thioctic Acid Effects on Oxidative Stress and Peripheral Neuropathy in Type II Diabetic Patients: Preliminary Results by Electron Paramagnetic Resonance and Electroneurography. Oxid. Med. Cell. Longev. 2018, 2018, 1–15.

275. Muccioli GG, Naslain D, Bäckhed F, Reigstad CS, Lambert DM, Delzenne NM, et al. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. Mol Syst Biol. 2010;6:392.

276. Mudau M., Genis A., Lochner A., Strijdom H., Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. Cardiovasc. J. Afr., 2012, 24 (4), 222–231.

277. Mukherjee S., Mitra A., Health effects of palm oil. J. Hum. Ecol. 2009, 26 (3), 197–203.

278. Nakbi A., Tayeb W., Dabbou S., Chargui I., Issaoui M., Zakhama A., Miled, A., Hypolipidemic and antioxidant activities of virgin olive oil and its fractions in 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid- -treated rats. Nutr., 2012, 28, 81–91.

279. Naz S., Siddiqi R., Sheikh H., Sayeed S.A., Deterioration of olive, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying. Food Res. Int., 2005, 38, 127–134.

280. Noda, Y., Y. Goto, Y. Umaoka, M. Shiotani, T. Nakayama, T. Mori. (1994). Culture of human embryos in alpha modification of Eagle's medium under low oxygen tension and low illumination. Fertility and Sterility 62(5):1022–1027.

281. Noelker, C.; Lu, L.; Höllerhage, M.; Vulinovic, F.; Sturn, A.; Roscher, R.; Höglinger, G.U.; Hirsch, E.C.; Oertel, W.H.; Alvarez-Fischer, D.; et al. Glucocerebrosidase deficiency and mitochondrial impairment in experimental Parkinson disease. J. Neurol. Sci. 2015, 356, 129–136.

282. Nowicka-Bauer K, Lepczynski A, Ozgo M, Kamieniczna M, Fraczek M, Stanski L, et al. Sperm mitochondrial dysfunction and oxidative stress as possible reasons for isolated asthenozoospermia. J Physiol Pharmacol 2018;69(3).

283. O'Brien R., Fats and oils formulating and processing for applications. Formulating and Processing for Applications (3rd ed.). CRC Press. 2008, pp. 37–40.

284. Oberley TD, Verwiebe E, Zhong W, Kang SW, Rhee SG. Localization of the thioredoxin system in normal rat kidney. Free Radic Biol Med. 2001;30:412–424.

285. Oboh G., Falade A.O., Ademiluyi A.O., Effect of thermal oxidation on the physico-chemical properties, malondialdehyde and carotenoid contents of palm oil. Riv. Ital. Sostanze Gr., 2014, 91 (1), 59–65.

286. Odia S.J., Ofori S., Maduka O., Palm oil and the heart: A review. World J. Cardiol., 2015, 7 (3), 144–149.

287. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem, 95(2), 351–358, 1979. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.

288. Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by the thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 1979, 95, 351–358.

289. Oil World, Oil World Annual, 2013. Retrieved from [http://www. oilworld.biz/app.php], Released June 2013.

290. Oliva R. Protamines and male infertility. Hum Reprod Update 2006;12:417-35.

291. Olivero-David R., Paduano A., Fogliano V. et al., Effect of thermally oxidized oil and fasting status on the short-term digestibility of ketolinoleic acids and total oxidized fatty acids in rats. J. Agric. Food Chem., 2011, 59, 4684–4691.

292. Ong A.S., Goh S.H., Palm oil: a healthful and cost-effective dietary component. Food Nutr. Bull., 2002, 23, 11–22.

293. Onyeali E.U., Onwuchekwa A.C., Monago C.C., Monanu M.O., Plasma lipid profi le of wistar albino rats fed palm oil supplemented diets. Int. J. Biol. Chem. Sci., 2010, 4 (4), 1163–1169.

294. Orrenius S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. Drug Metab Rev. 2007;39:443–455.

295. Owen R.W., Giacosa A., Hull W.E., Haubner R., Wurtele G., Spiegelhalder B., Bartsch H., Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. Lancet Oncol., 2000, 1, 107–112.

296. Oyewole O.E., Amosu A.M., Public health nutrition concerns on consumption of red palm-oil (RPO): the scientifi c facts from literature. Afr. J. Med. Med. Sci., 2010, 39, 255–262.

297. Packer, L.; Kraemer, K.; Rimbach, G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. Nutrition 2001, 17, 888–895. .

298. Padayatty SJ, Levine M. Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. Oral Dis. 2016;22(6):463-493. doi:10.1111/odi.12446.

299. ParksJEHammerstedtRH1985Developmental changes occuring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. Biology of Reproduction32653–668. (doi:10.1095/biolreprod32.3.653).

300. Parrow NL, Leshin JA, Levine M. Parenteral ascorbate as a cancer therapeutic: a reassessment based on pharmacokinetics. Antioxid Redox Signal. 2013; 19:2141–56. [PubMed: 23621620].

301. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. Fertil Steril 2000;73:459-64.

302. Patel M. "Targeting oxidative stress in central nervous system disorders," Trends in Pharmacological Sciences, vol. 37, no. 9, pp. 768–778, 2016.

303. Patten DA, Germain M, Kelly MA, Slack RS. Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. J Alzheimers Dis. 2010;20(Suppl 2):S357–S367.

304. Paun A, Yau C, Meshkibaf S, Daigneault MC, Marandi L, Mortin-Toth S, Bar-Or A, Allen-Vercoe E, Poussier P, Danska JS. Association of HLA-dependent islet autoimmunity with systemic antibody responses to intestinal commensal bacteria in children. Sci Immunol. 2019 Feb 1;4(32):eaau8125.

305. Paxinos, G.; Watson, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th ed.; Academic Press: Orlando, FL, USA, 2007.

306. Pearce K., Hill A., Tremellen. K. Obesity related metabolic endotoxemia is associated with oxidative stress and impaired sperm DNA integrity. Basic and Clinical Andrology. (2019) 29:6. https://doi.org/10.1186/s12610-019-0087-5

307. Peers K.E., Swoboda P.A.T., Deterioration of sunfl ower oil under simulated frying conditions and during small scale frying of potato chips. J. Sci. Food Agric., 1982, 33 (4), 389–395.

308. Perumalla Venkata R, Subramanyam R: Evaluation of the deleterious health effects of consumption of repeatedly heated vegetable oil. Toxicol Reports, 3, 636–643, 2016. DOI: 10.1016/j.toxrep.2016.08.003.

309. Phillipson, O.T. Management of the aging risk factor for Parkinson's disease. Neurobiol. Aging 2014, 35, 847–857.

310. Plante M, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. Fertil Steril 1994;62:387-93.

311. Pohanka M., Alzheimer's disease and oxidative stress: a review. Curr. Med. Chem., 2014, 21 (3), 356–364.

312. Poorghasemi M, Chamani M, Mirhosseini SZ, Sadeghi AA, Seidavi A: Effect of Probiotic and Different Sources of Fat on Performance, Carcass Characteristics, Intestinal Morphology and Ghrelin Gene Expression on Broiler Chickens. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 24(2), 169–178, 2018. DOI: 10.9775/kvfd.2017.18433.

313. Poutahidis T, Springer A, Levkovich T, Qi P, Varian BJ, Lakritz JR, Ibrahim YM, Chatzigiagkos A, Alm EJ, Erdman SE: Probiotic microbes sustain youthful serum testosterone levels and testicular size in aging mice. PLoS One, 9(1), e84877, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0084877.

314. Power JH, Blumbergs PC. Cellular glutathione peroxidase in human brain: cellular distribution, and its potential role in the degradation of Lewy bodies in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Acta Neuropathol. 2009;117:63–73.

315. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: A guideline. Fertil Steril 2013;99:673-7.

316. Presnell CE, Bhatti G, Numan LS, Lerche M, Alkhateeb SK, Ghalib M, Shammaa M, Kavdia M. Computational insights into the role of glutathione in oxidative stress. Curr Neurovasc Res. 2013;10:185–194. .

317. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. Annu Rev Biochem. 1995; 64:403–34. [PubMed: 7574488].

318. Puspita, L.; Chung, S.Y.; Shim, J. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. Mol. Brain 2017, 10, 53.

319. Quinlan CL, Perevoshchikova IV, Hey-Mogensen M, Orr AL, Brand MD. Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates. Redox Biol. 2013;1:304–312.

320. Quintana-Cabrera, R.; Fernandez-Fernandez, S.; Bobo-Jimenez, V.; Escobar, J.; Sastre, J.; Almeida, A.; Bolaños, J.P. γ-Glutamylcysteine

detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. Nat. Commun. 2012, 3, 718.

321. Rahimlou, M.; Asadi, M.; Banaei Jahromi, N.; Mansoori, A. Alpha-lipoic acid (ALA) supplementation effect on glycemic and inflammatory biomarkers: A Systematic Review and meta-analysis. Clin. Nutr. ESPEN 2019, 32, 16–28.

322. Ramana K.V., Srivastava S., Singhal S.S., Lipid peroxidation products in human health and disease. Oxid. Med. Cell Longev., 2013, dx.doi.org/10.1155/2013/583438. Unauthentifiziert | Heruntergeladen 16.10.19 10:05 UTC A.O. Falade et al. 105

323. Ramond A., Godin-Ribuot D., Ribuot C., Totoson P., Koritchneva I., Cachot S., Levy P., Joyeux-Faure M., Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. Fundam. Clin. Pharmacol., 2013, 27 (3), 252–261.

324. Rangel-Zuñiga OA, Haro C, Perez-Martinez P, Delgado-Lista J, Marin C, Quintana-Navarro GM, Tinahones FJ, Malagón MM, Lopez-Segura F, López-Miranda J, Perez-Jimenez F, Camargo A: Effect of frying oils on the postprandial endoplasmic reticulum stress in obese people. Mol Nutr Food Res, 58(11), 2239–2242, 2014. DOI: 10.1002/mnfr.201400401.

325. Rato L, Alves MG, Cavaco JE, Oliveira PF: High-energy diets: A threat for male fertility? Obes Rev, 15(12), 996–1007, 2014. DOI: 10.1111/obr.12226.

326. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Cell Signal. 2012;24:981–990.

327. A. T. Reese, E. H. Cho, B. Klitzman et al., “Antibiotic-induced changes in the microbiota disrupt redox dynamics in the gut,” eLife, vol. 7, 2018.

328. Rima D, Shiv BK, Bhavna CH, Shilpa B, Saima KH. Oxidative stress induced damage to paternal genome and impact of meditation and yoga – Can it reduce incidence of childhood cancer? Asian Pac J Cancer Prev 2016;17:4517-25.

329. Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F. The role of vitamin e in human health and some diseases. Sultan Qaboos Univ Med J. 2014;14(2):e157-e165.

330. Rodriguez-Pallares, J.; Parga, J.A.; Muñoz, A.; Rey, P.; Guerra, M.J.; Labandeira-Garcia, J.L. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: The role of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. J. Neurochem. 2007, 103, 143–153.

331. Rogalski M., Szterk A., Oxidative stability of α-linolenic acid in corn chips enriched with linseed oil pro/antioxidative activity of tocopherol. J. Am. Oil Chem. Soc., 2015, 92 (10), 1461–1471.

332. Rowe P, Comhaire FH, Hargreave T. WHO Manual for the Standardized Investigation of the Infertile Couple. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.

333. Rowe P, Comhaire FH, Hargreave T. WHO Manual for the Standardized Investigation of the Infertile Couple. Cambridge: Cambridge University Press; 1993.

334. Sabeti P, Pourmasumi S, Rahiminia T, Akyash F, Talebi AR. Etiologies of sperm oxidative stress. Int J Reprod Biomed (Yazd) 2016;14:231-40.

335. Sadoudi R., Ammouche A., Ali A.D., Effect of ingestion of thermally oxidized sunfl ower oil on the fatty acid composition and histological alteration of rat liver and adipose tissue in development. Afr. J. Agric. Res., 2013, 8 (24), 3107–3112.

336. Sadoudi R., Ammouche A., Ali A.D., Thermal oxidative alteration of sunflower oil. Afr. J. Food Sci., 2014, 8 (3), 116–121.

337. Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ Jr., Sikka SC. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. Fertil Steril 2005;83:95-103.

338. Sakkas D, Manicardi G, Bianchi PG, Bizzaro D, Bianchi U. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. Biol Reprod 1995;52:1149-55.

339. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U, et al. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. Rev Reprod 1999;4:31-7.

340. SakkasDAlvarezJG2010Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. Fertility and Sterility931027–1036. (doi:10.1016/j.fertnstert.2009.10.046)

341. Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. Proc Natl Acad Sci USA. 2008;105:16767–72.

342. Sanocka-Maciejewska D, Ciupińska M, Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. J Reprod Immunol 2005;67:51-6.

343. Sayon-Orea C., Bes-Rastrollo M., Basterra-Gortari F.J. et al., Consumption of fried foods and weight gain in a Mediterranean cohort: the SUN project. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis., 2013, 23, 144–150.

344. Sayon-Orea C., Martínez-González M.A., Gea A. et al., Consumption of fried foods and risk of metabolic syndrome: the SUN cohort study. Clin. Nutr., 2014, 33, 545–549.

345. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. Biochim Biophys Acta. 2006;1763:1755–1766.

346. Schuppe HC, Meinhardt A, Allam JP, Bergmann M, Weidner W, Haidl G, et al. Chronic orchitis: A neglected cause of male infertility? Andrologia 2008;40:84-91.

347. Seaton, T.A.; Jenner, P.; Marsden, C.D. Thioctic acid does not restore glutathione levels or protect against the potentiation of 6-hydroxydopamine toxicity induced by glutathione depletion in rat brain. J. Neural Transmission 1996, 103, 315–329.

348. Selvakumar, E.; Prahalathan, C.; Mythili, Y.; Varalakshmi, P. Protective effect of dl-α-lipoic acid in cyclophosphamide induced oxidative injury in rat testis. Reprod. Toxicol. 2004, 19, 163–167.

349. Seo MS, Kang SW, Kim K, Baines IC, Lee TH, Rhee SG. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. J Biol Chem. 2000;275:20346–20354.

350. Seppanen C.M., Song Q.H., Csallany A.S., The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats and food systems. J. Am. Oil Chem. Soc. 2010, 87, 469–481.

351. Serkan SAYINER, Nurhayat GÜLMEZ, Zafer SABİT, Murat GÜLMEZ. Effects of Deep-Frying Sunflower Oil on Sperm Parameters in A Mouse Model: Do Probiotics Have A Protective Effect?. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 25 (6): 857-863, 2019. DOI: 10.9775/kvfd.2019.22063

352. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. Hum Reprod Update. 2013;19(3):221–31.

353. Seth, P. et al. Regulation of microRNA machinery and development by interspecies S-nitrosylation. Cell 176, 1014–1025.e1012 (2019).

354. Shamsi MB, Venkatesh S, Pathak D, Deka D, Dada R. Sperm DNA damage and oxidative stress in recurrent spontaneous abortion (RSA). Indian J Med Res 2011;133:550-1.

355. Sharma R and Agarwal A. 2011. "Spermatogenesis: an overview." Sperm Chromatin, Zini A, Agarwal A. Springer, New York. 19–44.

356. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. Urology 1996;48:835-50.

357. Sharon, G. et al. Human gut microbiota from autism spectrum disorder promote behavioral symptoms in mice. Cell 177, 1600–1618.e1617 (2019).

358. Shastry C.S., Patel N.A., Joshi H., Aswathanarayana B.J., Evaluation of effect of reused edible oils on vital organs of wistar rats. Nitte University J. Health Sci., 2011, 1 (4), 10–15.

359. Shay, K.P.; Moreau, R.F.; Smith, E.J.; Smith, A.R.; Hagen, T.M. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. Biochim. Biophys. Acta Genl. Subj. 2009, 1790, 1149–1160.

360. Simon L, Aston KI, Emery BR, Hotaling J, Carrell DT. Sperm DNA damage output parameters measured by the alkaline Comet assay and their importance. Andrologia 2017;49(2).

361. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. Hum Reprod 2014;29:2402-12.

362. Simon L, Zini A, Dyachenko A, Ciampi A, Carrell DT. A systematic review and meta-analysis to determine the effect of sperm DNA damage on in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection outcome. Asian J Androl 2017;19:80-90.

363. Singh V, Yeoh BS, Chassaing B, Xiao X, Saha P, Aguilera Olvera R, Lapek JD Jr, Zhang L, Wang WB, Hao S, Flythe MD, Gonzalez DJ, Cani PD, Conejo-Garcia JR, Xiong N, Kennett MJ, Joe B, Patterson AD, Gewirtz AT, Vijay-Kumar M. Dysregulated Microbial Fermentation of Soluble Fiber Induces Cholestatic Liver Cancer. Cell. 2018 Oct 18;175(3):679-694.e22.

364. Skrypnik K, Bogdanski P, Loniewski I, Regula J, Suliburska J: Effect of probiotic supplementation on liver function and lipid status in rats. Acta Sci Pol Technol Aliment, 17(2), 185–192, 2018. DOI: 10.17306/J.AFS.0554.

365. Slade P, O'Neill C, Simpson AJ, Lashen H. The relationship between perceived stigma, disclosure patterns, support and distress in new attendees at an infertility clinic. Hum Reprod 2007;22:2309-17.

366. Solmonson, A.; DeBerardinis, R.J. Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation. J. Biol. Chem. 2018, 293, 7522–7530.

367. Song GJ, Norkus EP, Lewis V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. Int J Androl 2006;29:569-75.

368. Song J, Kang SM, Lee WT, Park KA, Lee KM, Lee JE. Glutathione protects brain endothelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative stress by increasing nrf2 expression. Exp Neurobiol. 2014;23:93–103.

369. Song P, Zou MH. Regulation of NAD(P)H oxidases by AMPK in cardiovascular systems. Free Radic Biol Med. 2012;52:1607–1619.

370. Song P, Zou MH. Roles of reactive oxygen species in physiology and pathology. In: Wang H, Patterson C, editors. Atherosclerosis: risks, mechanisms, and therapies. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc.; 2015. pp. 379–392.

371. Soto-Otero, R.; Méndez-Álvarez, E.; Hermida-Ameijeiras, Á.; Muñoz-Patiño, A.M.; Labandeira-Garcia, J.L. Autoxidation and Neurotoxicity of 6-Hydroxydopamine in the Presence of Some Antioxidants: Potential Implication in Relation to the Pathogenesis of Parkinson's Disease. J. Neurochem. 2002, 74, 1605–1612.

372. Spencer, J.P.E.; Jenner, P.; Daniel, S.E.; Lees, A.J.; Marsden, D.C.; Halliwell, B. Conjugates of Catecholamines with Cysteine and GSH in Parkinson's Disease: Possible Mechanisms of Formation Involving Reactive Oxygen Species. J. Neurochem. 2002, 71, 2112–2122.

373. Steinhubl, S.R. Why Have Antioxidants Failed in Clinical Trials? Am. J. Cardiol. 2008, 101, S14–S19.

374. Stocker R., Yamamoto Y., Mc Donagh A.F., Glazer A.N., Ames B.N., Bilirubin is antioxidant of possible physiological importance. Science, 1987, 235, 1043–1046.

375. Suzuki, M.; Bandoski, C.; Bartlett, J.D. Fluoride induces oxidative damage and SIRT1/autophagy through ROS-mediated JNK signaling. Free Radic. Biol. Med. 2015, 89, 369–378.

376. Szterk A., Rogalski M., Szymborski T., The impact of linseed oil lipids on the physical properties of corn crisps and the possibility of obtaining crisps enriched with n-3 fatty acids. J. Am. Oil Chem. Soc., 2015, 92 (8), 1195–1203.

377. Taha EA, Sayed SK, Gaber HD, Abdel Hafez HK, Ghandour N, Zahran A, et al. Does being overweight affect seminal variables in fertile men? Reprod BioMed Online. 2016;33(6):703–8.

378. TamburrinoLMarchianiSMontoyaMMarinoFENataliICambiMFortiGB aldiEMuratoriM2012Mechanisms and clinical correlates of sperm DNA damage. Asian Journal of Andrology1424–31. (doi:10.1038/aja.2011.59)

379. Tamtaji, O.R.; Reiter, R.J.; Alipoor, R.; Dadgostar, E.; Kouchaki, E.; Asemi, Z. Melatonin and Parkinson Disease: Current Status and Future Perspectives for Molecular Mechanisms. Cell. Mol. Neurobiol. 2020, 40, 15–23.

380. Tanoue T, Morita S, Plichta DR, et al. A defined commensal Consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. Nature 2019;565:600–5.

381. Teerds KJ, de Rooij DG, Keijer J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. Hum Reprod Update. 2011;17:667–83.

382. Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM, et al. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is

predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. Hum Reprod 2009;24:2061-70.

383. Tibullo, D.; Li Volti, G.; Giallongo, C.; Grasso, S.; Tomassoni, D.; Anfuso, C.D.; Lupo, G.; Amenta, F.; Avola, R.; Bramanti, V. Biochemical and clinical relevance of alpha-lipoic acid: Antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. Inflamm. Res. 2017, 66, 947–959.

384. Tieu, K. A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. Cold Spring Harb Perspect. Med. 2011, 1, a009316.

385. Toledano MB, Leonard WJ. Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:4328–4332.

386. Tomassoni, D.; Amenta, F.; Di Cesare Mannelli, L.; Ghelardini, C.; Nwankwo, I.E.; Pacini, A.; Tayebati, S.K. Neuroprotective Activity of Thioctic Acid in Central Nervous System Lesions Consequent to Peripheral Nerve Injury. BioMed. Res. Int. 2013, 2013, 1–14. .

387. Tran K, Wong JT, Lee E, Chan AC, Choy PC. Vitamin E potentiates arachidonate release and phospholipase A2 activity in rat heart myoblastic cells. Biochem J 1996; 319:385–91.

388. Tremellen K. Gut endotoxin leading to a decline in gonadal function (GELDING) - a novel theory for the development of late onset hypogonadism in obese men. Basic Clin Androl 26: 7, 2016. doi:10.1186/s12610-016-0034-7.

389. Tremellen K., McPhee N, Pearce K., Benson S, Schedlowski M, Engler H. Role of Gut Microbiota and Gut-Brain and Gut-Liver Axes in Physiological Regulation of Inflammation, Energy Balance, and Metabolism. Endotoxin-initiated inflammation reduces testosterone production in men of reproductive ageAm J Physiol Endocrinol Metab 314: E206–E213, 2018. doi:10.1152/ajpendo.00279.2017.

390. Tremellen K., Pearce K. Small intestinal bacterial overgrowth (SIBO) as a potential cause of impaired spermatogenesis. Gut 2020; 69:2058-2059.

391. Tripoli E., Giammanco M., Tabacchi G., Di Majo D., Giammanco S., La Guardia M., The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and benefi cial effects on human health. Nutr. Res. Rev., 2005, 18, 98–112.

392. Tunc O, Tremellen K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. J Assist Reprod Genet 2009;26:537-44.

393. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. Nature. 2006;444:1027–31.

394. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J Physiol. 2003;552:335–344.

395. Tyagi AM, Yu M, Darby TM, Vaccaro C, Li JY, Owens JA, Hsu E, Adams J, Weitzmann MN, Jones RM, Pacifici R. The Microbial Metabolite Butyrate Stimulates Bone Formation via T Regulatory Cell-Mediated Regulation of WNT10B Expression. Immunity. 2018 Dec 18;49(6):1116-1131.e7.

396. Unsal C, Unsal H, Ekici M, Koc Yildirim E, Uner AG, Yildiz M, Gules O, Ekren Asici GS, Boyacioglu M, Balkaya M, Belge F: The effects of exhaustive swimming and probiotic administration in trained rats: Oxidative balance of selected organs, colon morphology, and contractility. Physiol Int, 105(4), 309–324, 2018. DOI: 10.1556/2060.105.2018.4.25.

397. Uranga JA, Lopez-Miranda V, Lombo F & Abalo R. (2016) Food, nutrients and nutraceuticals affecting the course of inflammatory bowel disease. Pharmacol Rep 68, 816–826.

398. USDA National Nutrient Database for Standard Reference. 2008; Release 21.

399. Vahidinia A, Rahbar AR, Shakoori Mahmoodabadi MM. Effect of astaxanthin, Vitamin E, and Vitamin C in combination with calorie restriction on sperm quality and quantity in male rats. J Diet Suppl 2017;14:252-63.

400. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39:44–84.

401. Van Buul JD, Fernandez-Borja M, Anthony EC, Hordijk PL. Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. Antioxid Redox Signal. 2005;7:308–317.

402. Vaskova H., Buckova M., Thermal degradation of vegetable oils: spectroscopic measurement and analysis. Procedia Eng., 2015, 100, 630–635.

403. Veldhuis J, Yang R, Roelfsema F, Takahashi P. Proinflammatory cytokine infusion attenuates LH's feedforward on testosterone secretion: modulation by age. J Clin Endocrinol Metab 101: 539–549, 2016. doi: 10.1210/jc.2015-3611.

404. Vieira N de MG, Losano JD de A, Angrimani D de SR, Kawai GKV, Bicudo L de C, Rui BR, da Silva B do CS, Assumpção MEODA, Nichi M: Induced sperm oxidative stress in dogs: Susceptibility against different reactive oxygen species and protective role of seminal plasma. Theriogenology, 108, 39–45, 2018. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.020.

405. Vigueras-Villaseñor RM, Rojas-Castañeda JC, Chávez-Saldaña M, Gutiérrez-Pérez O, García-Cruz ME, Cuevas-Alpuche O, Reyes-Romero MM, Zambrano E: Alterations in the spermatic function generated by obesity in rats. Acta Histochem, 113(2), 214–220, 2011. DOI: 10.1016/j.acthis.2009.10.004.

406. VirroMRLarson-CookKLEvensonDP2004Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertility and Sterility811289–1295. (doi:10.1016/j.fertnstert.2003.09.063).

407. Vissers MCM, Das AB. Potential Mechanisms of Action for Vitamin C in Cancer: Reviewing the Evidence. Front Physiol. 2018 Jul 3;9:809. doi: 10.3389/fphys.2018.00809.

408. Wagner H, Cheng JW, Ko EY. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. Arab J Urol 2018;16:35-43.

409. Wang C., Harris W.S., Chung M., Lichtenstein A.H., Balk E.M., Kupelnick B., Jordan H.S., Lau J., n-3 Fatty acids from fi sh or fi sh-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefi t cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. Am. J. Clin. Nutr., 2006, 84 (1), 5–17.

410. Warner K., Chemical and physical reactions in oil during frying. 2004, in: Frying Technology and Practice (eds. M.K. Gupta, K. Warner, P. J. White). AOCS., Champaign, pp. 16–28.

411. Wegner CC, Clifford AL, Jilbert PM, Henry MA, Gentry WL. Abnormally high body mass index and tobacco use are associated with poor sperm quality as revealed by reduced sperm binding to hyaluronan-coated slides. Fertil Steril. 2010;93:332–4.

412. WHO, World Health Organization, Diet nutrition and the prevention of chronic diseases. Report. 2003, 82–88. 80. Yang H., Jin X., Kie Lam C.W., Yan S.K., Oxidative stress and diabetes mellitus. Clin. Chem. Lab. Med., 2011, 49 (11), 1773–1782

413. Widlansky ME, Gutterman DD. Regulation of endothelial function by mitochondrial reactive oxygen species. Antioxid Redox Signal. 2011;15:1517–1530.

414. Wiener-Megnazi Z, Auslender R, Dirnfeld M. Advanced paternal age and reproductive outcome. Asian J Androl 2012;14:69-76.

415. Williams M.J., Sutherland W.H., McCormick M.P., de Jong S.A., Walker R.J., Wilkins G.T., Impaired endothelial function following a meal rich in used cooking fat. J. Am. Coll. Cardiol., 1999, 33, 1050–1055.

416. Wingler K, Wünsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH. Upregulation of the vascular NAD(P) H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. Free Radic Biol Med. 2001;31:1456–1464.

417. Winterbourn CC, Metodiewa D. The reaction of superoxide with reduced glutathione. Arch Biochem Biophys. 1994;314:284–290.

418. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. Nat Chem Biol. 2008;4:278–286.

419. Winters SJ, Wang C, Abdelrahaman E, Hadeed V, Dyky MA, Brufsky A. Inhibin-B levels in healthy young adult men and prepubertal boys: is obesity the cause for the contemporary decline in sperm count because of fewer Sertoli cells? J Androl. 2006;27:560–4.

420. Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. Trends Biochem Sci. 2003;28:32–40.

421. Wostmann BS, Larkin C, Moriarty A, Bruckner-Kardoss E. Dietary intake, energy metabolism, and excretory losses of adult male germfree Wistar rats. Lab Anim Sci. 1983;33:46–50.

422. Xiang, W.; Wang, L.; Cheng, S.; Zhou, Y.; Ma, L. Protective Effects of α-Lipoic Acid on Vascular Oxidative Stress in Rats with Hyperuricemia. Curr. Med. Sci. 2019, 39, 920–928.

423. Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. Science. 2003;299:700–704.

424. Yen PL, Chen BH, Yang F Lo, Lu YF: Effects of deep-frying oil on blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive and normotensive rats. Nutrition, 26(3), 331–336, 2010. DOI: 10.1016/j.nut.2009.04.020.

425. Yoo, S.-E.; Chen, L.; Na, R.; Liu, Y.; Rios, C.; Van Remmen, H.; Richardson, A.; Ran, Q. Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in the brain. Free Radic. Biol. Med. 2012, 52, 1820–1827. .

426. Yun J, Mullarky E, Lu C, Bosch KN, Kavalier A, Rivera K, Roper J, Chio, Giannopoulou EG, Rago C, Muley A, Asara JM, Paik J, Elemento O, Chen Z, Pappin DJ, Dow LE, Papadopoulos N, Gross SS, Cantley LC. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH. Science. 2015; 350(6266):1391–6. [PubMed: 26541605].

427. Zaitone, S.A.; Abo-Elmatty, D.M.; Shaalan, A.A. Acetyl-l-carnitine and α-lipoic acid affect rotenone-induced damage in nigral dopaminergic neurons of rat brain, implication for Parkinson's disease therapy. Pharmacol. Biochem. Behav. 2012, 100, 347–360.

428. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, Sullivan E, Vanderpoel S: International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. Fertil Steril, 92(5), 1520–1524, 2009. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2009.09.009.

429. Zeitoun M, Farahna M, Al-sobayil K, Abdel-salam A: Impact of the aqueous extract of dandelion , probiotic and their synbiotic on male lamb ' s testicular histopathology relative to semen characteristics. 4(1), 23–30, 2014. DOI: 10.4236/ojas.2014.41004.

430. Zhang C, Zhang M, Pang X, et al. Structural resilience of the gut microbiota in adult mice under high-fat dietary perturbations. Isme J 2012;6:1848–57.

431. Zhang Z, Tang H, Chen P., Xie H., Tao Y. Demystifying the manipulation of host immunity, metabolism, and extraintestinal tumors by the gut microbiome. Signal Transduction and Targeted Therapy (2019) 4:41 ; https://doi.org/10.1038/s41392-019-0074-5.

432. Zhang, S.; Xie, C.; Lin, J.; Wang, M.; Wang, X.; Liu, Z. Lipoic acid alleviates L-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA parkinsonian rats via anti-oxidative stress. Mol. Med. Rep. 2018, 17, 1118–1124.

433. Zhang, X., Grosfeld, A., Williams, E., Vasiliauskas, D., Barretto, S., Smith, L., Mariadassou, M., Philippe, C., Devime, F., Melchior, C., Gourcerol, G., Dourmap, N., Lapaque, N., Larraufie, P., Blottière, H. M., Herberden, C., Gerard, P., Rehfeld, J. F., Ferraris, R. P., Fritton, J. C., Ellero-Simatos, S., Douard, V. Fructose malabsorption induces cholecystokinin expression in the ileum and cecum by changing microbiota composition and metabolism. FASEB J. 33, 7126–7142 (2019).

434. Zhao, H.; Zhao, X.; Liu, L.; Zhang, H.; Xuan, M.; Guo, Z.; Wang, H.; Liu, C. Neurochemical effects of the R form of α-lipoic acid and its neuroprotective mechanism in cellular models of Parkinson's disease. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2017, 87, 86–94.

435. Zhou, L.; Cheng, Y. Alpha-lipoic acid alleviated 6-OHDA-induced cell damage by inhibiting AMPK/mTOR mediated autophagy. Neuropharmacology 2019, 155, 98–103.

436. Zhu, Z.; Yang, C.; Iyaswamy, A.; Krishnamoorthi, S.; Sreenivasmurthy, S.G.; Liu, J.; Wang, Z.; Tong, B.C.-K.; Song, J.; Lu, J.; et al. Balancing mTOR Signaling and Autophagy in the Treatment of Parkinson's Disease. Int. J. Mol. Sci. 2019, 20, 728.

437. Zimmermann, M., Zimmermann-Kogadeeva, M., Wegmann, R. & Goodman, A. L. Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. Nature 570, 462–467 (2019).

438. Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: Systematic review and meta-analysis. Hum Reprod 2008;23:2663-8.

439. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: Levels of superoxide dismutase – And catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. Int J Androl 1993;16:183-8.

440. Zini A, San Gabriel M, Baazeem A. Antioxidants and sperm DNA damage: A clinical perspective. J Assist Reprod Genet 2009;26:427-32.

441. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. Physiol Rev. 2014;94:909–950.