

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна

Біологічний факультет

Кафедра генетики і цитології

До захисту допущено

Кафедрою генетики і цитології протокол № _____ від _____

завідувач кафедри _____

(підпис)

Наталя ВОЛКОВА

(ім'я, прізвище)

«11» грудня 2025 р.

Кваліфікаційна робота
здобувача другого (магістерського) рівня вищої освіти

Репродуктивні показники чоловіків за різних фізіологічних та патологічних станів

(назва роботи)

Спеціальність (спеціалізація) 091 Біологія та біохімія

(код та найменування спеціальності; спеціалізації спеціальності - за наявності)

Освітня програма

Генетика

(назва освітньої програми)

Виконавець _____

(підпис)

Ольга КЛИМУХІНА

(ім'я, прізвище)

Науковий керівник _____

(підпис)

Наталя ВОЛКОВА

(ім'я, прізвище)

Науковий консультант _____

(підпис)

Марина ПЕТРУШКО (д.б.н., професор,

Інститут проблем кріобіології
і кріомедицини НАНУ)

(ім'я, прізвище)

Харків – 2025

Анотація

до кваліфікаційної роботи бакалавра Климухіної Ольги Ігорівни
«Репродуктивні показники чоловіків за різних фізіологічних та патологічних
станів»

Робота викладена на 49 сторінках друкованого тексту, містить 10 рисунків, 2 таблиці, 50 джерел літератури.

Метою даної кваліфікаційної роботи було дослідити та комплексно оцінити вплив хронічної гіпоксії, спричиненої проживанням у гірській місцевості, а також впливу вдихання продуктів згоряння, на якісні та функціональні характеристики сперматогенезу людини. У цьому дослідженні оцінювали такі параметри сперми, як колір, рН, в'язкість, концентрацію, рухливість, морфологію сперматозоїдів. Всі виміри проводили відповідно до критеріїв та рекомендацій ВООЗ. Для отримання повної картини функціонального статусу сперми, було проаналізовано кінематичні показники (VAP, VSL, VCL, ALH). До цих стандартних параметрів, було також проаналізовано ступінь фрагментації ДНК у сперматозоїдах за допомогою методу SCD, активність ферментів антиоксидантного захисту – каталаза і глутатіонпероксидаза та оцінка кріорезистентності сперматозоїдів. При статистичному аналізі отриманих даних використовувався критерій Краскела-Уолліса та U-критерій Манна-Уїтні.

Встановлено, що концентрація сперматозоїдів, частка морфологічно нормальних сперматозоїдів, рівень фрагментації ДНК, активність антиоксидантних ферментів та кріорезистентність суттєво залежать від досліджуваних факторів, тоді як загальні показники рухливості (A, B, C, D) менш чутливі до них.

Ключові результати свідчать про системну деградацію якості сперми у групі, що зазнала впливу диму та гіпоксії. Зокрема, виявлено критичний дефіцит каталази та глутатіонпероксидази, що призводить до надзвичайно високого рівня фрагментації ДНК та найгірших показників кінематики і морфології. Це

підкреслює руйнівний вплив оксидативного стресу, спричиненого продуктами згоряння, на чоловічу репродуктивну функцію. Водночас, проживання у гірській місцевості саме по собі не викликає критичних генетичних чи функціональних порушень.

Ключові слова: сперматогенез, гіпоксія, фрагментація ДНК, кінематика, CASA, оксидативний стрес, чоловіча фертильність, кріопрезервація.

Annotation

The aim of this qualification work was to investigate and comprehensively assess the impact of chronic hypoxia caused by living in mountainous areas, as well as the impact of inhaling combustion products, on the qualitative and functional characteristics of human spermatogenesis. This study evaluated sperm parameters such as color, pH, viscosity, concentration, motility, and morphology of spermatozoa. All measurements were performed in accordance with WHO criteria and recommendations. To obtain a complete picture of the functional status of sperm, kinematic parameters (VAP, VSL, VCL, ALH) were analyzed. In addition to these standard parameters, the degree of DNA fragmentation in spermatozoa was analyzed using the SCD method, the activity of antioxidant defense enzymes—catalase and glutathione peroxidase—was assessed, and the cryoresistance of spermatozoa was evaluated. The Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test were used for statistical analysis of the data obtained.

It was found that sperm concentration, the proportion of morphologically normal sperm, the level of DNA fragmentation, the activity of antioxidant enzymes, and cryoresistance significantly depend on the factors studied, while the overall motility parameters (A, B, C, D) are less sensitive to them.

Key results indicate systemic degradation of sperm quality in the group exposed to smoke and hypoxia. In particular, a critical deficiency of catalase and glutathione peroxidase was found, leading to extremely high levels of DNA fragmentation and the worst kinematic and morphological parameters. This highlights the devastating impact of oxidative stress caused by combustion products on male reproductive function. At the same time, living in mountainous areas does not in itself cause critical genetic or functional disorders.

Keywords: spermatogenesis, hypoxia, DNA fragmentation, kinematics, CSA, oxidative stress, male fertility, cryopreservation.

Зміст

ВСТУП.....	6
1.1. Базові відомості про сперматогенез людини	9
1.2. Нормальні параметри спермограми людини.....	11
1.3. Морфологія сперматозоїдів	12
1.4. Типи гіпоксії та їх вплив.....	16
1.5. Вплив оксидативного стресу на сперму	18
1.6. Адаптація організму до гіпоксії	21
1.7. Вплив кріоконсервації на сперматозоїди людини.....	24
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	26
2.1. Матеріали	26
2.2. Характеристики обстежених пацієнтів	26
2.3. Аналіз еякуляту	27
2.4. Методика кріопрезервації сперми	27
2.5. Методика розморожування сперматозоїдів	28
2.6. Методи дослідження.....	29
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	34
3.1. Характеристика концентрації сперматозоїдів чоловіків	34
3.2. Характеристика рухливості сперматозоїдів у чоловіків	36
3.3. Характеристика морфології сперматозоїдів в еякуляті чоловіків	39
3.4. Характеристика кінематичних показників сперматозоїдів в еякуляті чоловіків	39
3.5. Характеристика фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті чоловіків	40
3.6. Характеристика активності ферментів у чоловіків	42
3.7. Аналіз показників сперми після кріопрезервації	42
Висновок	44
Список використаних джерел	45

ВСТУП

Актуальність теми. Гіпоксичні стани, що характеризуються дефіцитом кисню в тканинах, є одним із ключових етіологічних факторів, що спричиняють порушення репродуктивної функції у чоловіків адаптованих до умов праці з низьким рівнем кисню. Патологічні зміни у репродуктивній системі включає в себе порушення сперматогенезу, якісних характеристик сперми та гормонального фону. Підтримка високої швидкості сперматогенезу вимагає функціональної сукупності сперматогоніальних стовбурових клітин, що характеризуються високою проліферативністю. Для забезпечення процесів самовідновлення та диференціації сперматогоніїв необхідний стабільний доступ до кисню, що є критично важливим для мітохондріального синтезу аденозинтрифосфату (АТФ). Однією з критичних екологічних загроз є пожежі, що виникають внаслідок вибухів, зокрема в умовах воєнних конфліктів або техногенних катастроф. Масове вивільнення чадного газу, діоксидів азоту, важких металів та дрібнодисперсних частинок призводить до значного зниження рівня кисню в навколишньому середовищі, викликаючи гіпоксію на клітинному рівні. У репродуктивній системі це може спричинити ушкодження ДНК сперматозоїдів, порушення функції мітохондрій та посилення оксидативного стресу. Пошкодження ядерної ДНК може активувати мітохондріальний апоптотичний сигнальний шлях або рецептори загибелі клітин, що призводить до посилення апоптозу, насамперед впливаючи на сперматогонії та первинні сперматоцити. Високий рівень вільних радикалів, що утворюються внаслідок оксидативного стресу, може зменшувати рухливість сперматозоїдів, підвищувати рівень фрагментації ДНК та знижувати здатність до запліднення.

Наукова новизна: Визначити вплив гіпоксії, спричиненої пожежами та умовами праці при нестачі кисню, на якість сперми. Дослідити механізми оксидативного стресу та його роль у пошкодженні клітин сперматогенезу. Розширити знання щодо впливу гіпоксії на сперматогенез, які можуть бути основою для подальших досліджень у репродуктивній медицині.

Практичне значення: Результати дослідження можуть бути використані для оцінки ризиків порушень чоловічої фертильності внаслідок гіпоксії та оксидативного стресу, спричинених пожежами та вибухами. Отримані дані сприятимуть розробці профілактики і терапевтичного лікування для зниження негативного впливу гіпоксії на репродуктивне здоров'я чоловіків.

Мета дослідження: Визначити вплив гіпоксії на якісні параметри сперми, з'ясувати механізми оксидативного стресу та пошкодження клітин сперматогенезу, оцінити можливі наслідки для чоловічої репродуктивної функції.

Завдання:

1. Огляд та аналіз наукової літератури;
2. Розробка експериментальної моделі;
3. Оцінка ефективності методів;
4. Порівняльний аналіз результатів;
5. Обговорення результатів.

Об'єкт: людина

Матеріал: зразки сперми людини.

Обладнання: Аналізатор сперми CASA Hamilton Thorne IVOS, Мікроскоп Nikon eclipse E 200, термостат лабораторний, центрифуга лабораторна, спектрофотометр

Реактиви та інші витратні матеріали: комерційний набір для SCD Halosperm, барвник Еозін-нігрозин, комерційний діагностичний набір для визначення активності каталази та глутатіонпероксидази, пробірки типу Еппендорф, центрифужні пробірки різного об'єму, наконечники для піпеток, напівавтоматичні піпетки різних об'ємів, резервуар з рідким азотом, кріопробірки, гліцерин.

Біоетичні вимоги та природоохоронні заходи: Інформована згода, конфіденційність, заборона комерціалізації, безпечне поводження з біологічними відходами.

Тип дослідження: Експериментальне дослідження

Статистичний аналіз даних: критерій Краскела – Уолліса, U-критерій Манна-Уїтні

Носії первинної наукової інформації: лабораторний журнал, протоколи лабораторій.

Форма запису наукових фактів: конспект, таблиці.

Подяки: Висловлюю глибоку подяку професору, доктору біологічних наук Петрушко Марині Павлівні та колективу відділу кріобіології систем репродукції Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України. Дякую за сприяння в організації та проведенні експериментальної частини дослідження, за надання доступу до обладнання та за вашу доброзичливу і професійну допомогу у вирішенні всіх практичних завдань.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Базові відомості про сперматогенез людини

Сперматозоїди – це високоспеціалізовані гаплоїдні клітини, які відіграють важливу роль у заплідненні та репродукції людини. Вони виникають з первинних статевих клітин, стають зрілими та функціонально активними, та можуть здійснити запліднення (Рис.1).

Під час ембріонального розвитку первинні статеві клітини мігрують у зачаток яєчка, де стають джерелом чоловічих гамет. З недиференційованих клітин із диплоїдним набором хромосом (сперматогонії) формуються високоспеціалізовані гаплоїдні клітини — сперматозоїди. Сперматогенез (процес утворення сперматозоїдів) включає чотири основні фази: розмноження, ріст, дозрівання та формування. Усі ці етапи відбуваються у звивистих сім'яних каналцях сім'яника.

Протягом ембріонального періоду та після народження до статевого дозрівання сперматогонії активно діляться мітозом (фаза розмноження), що забезпечує збільшення їх кількості. Сперматогонії мають диплоїдний набір хромосом і походять від первинних статевих клітин, які утворюються в жовтковій ентодермі та мігрують у зачаткові яєчка під час ембріогенезу. У період інтенсивного поділу сперматогонії диференціюються в сперматоцити першого порядку [50].

У фазі росту сперматоцити першого порядку вступають у профазу першого мейотичного поділу, яка триває близько 22 діб. Цей процес супроводжується збільшенням об'єму клітин у чотири рази. Перед першим мейотичним поділом в інтерфазі відбувається редуплікація ДНК, що призводить до тетраплоїдності сперматоцитів першого порядку. У цей період у ядрах сперматоцитів відбувається кон'югація хромосом, що сприяє зростанню розмірів клітин і активації білкового синтезу [48].

Під час фази дозрівання сперматогенезу завершується перший мейотичний поділ, у результаті якого з одного сперматоцита першого порядку утворюються два сперматоцити другого порядку. Вони переходять у коротку інтерфазу, під час

якої реплікація ДНК не відбувається. Другий мейотичний поділ завершується утворенням чотирьох гаплоїдних клітин — сперматид. Кожна сперматида значно менша за розміром порівняно зі сперматоцитом першого порядку. У процесі мейозу відбувається випадковий розподіл материнських і батьківських хромосом, а також кросинговер, що забезпечує генетичну індивідуальність [47, 49].

На завершальному етапі формування кожна гаплоїдна сперматида диференціюється в рухливий гаплоїдний сперматозоїд. Сформовані сперматозоїди відокремлюються від клітин Сертолі та транспортуються до просвіту канальця, звідки пасивно переміщуються по статевих шляхах.

Таким чином, під час сперматогенезу з кожного тетраплоїдного сперматоцита першого порядку утворюються чотири морфологічно рівноцінних сперматозоїди [47, 49]

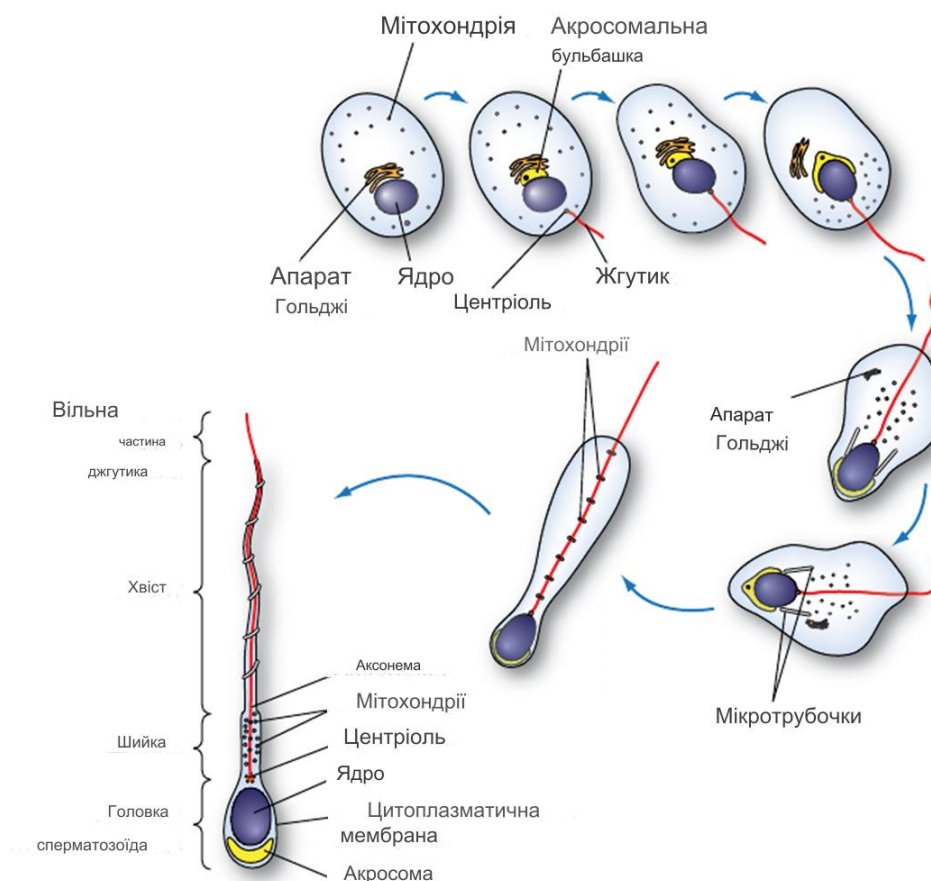


Рис.1 Схема формування спермія зі сперматоцита першого порядку

[Помилка! Джерело посилання не знайдено.]

1.2. Нормальні параметри спермограми людини

Якість сперми чоловіка безпосередньо впливає на його фертильність. Чим кращі показники спермограми, тим вища ймовірність успішного зачаття. Оцінка спермограми є основним діагностичним критерієм чоловічої безплідності. При виконанні спермограми здійснюють аналіз таких параметрів, як: об'єм, в'язкість, рН, колір, рухливість сперматозоїдів, концентрація сперматозоїдів, морфологія сперматозоїдів (Табл.1). Нормальний об'єм сперми сягає від трьох до п'яти мілілітрів. У одному мілілітрі сперми має бути більше двадцяти мільйонів сперматозоїдів - це вважається нормою [13].

У нормі повинно бути 50 % і більше активних сперматозоїдів (категорія A+B+C) або 32% і більше з поступальними рухами сперматозоїдів (категорія A+B) (Табл. 1).

Таблиця 1

Нормальні показники спермограми [43]

Об'єм	> 2,0 мл
рН	7,2-8,0
Концентрація сперматозоїдів	> 20 млн./мл. (<20 - олігозооспермія)
Загальна кількість сперматозоїдів	> 49 млн. в еякуляті
Рухливість сперматозоїдів	> 50% з поступальним рухом та 32% з швидким рухом протягом 60 хв. з моменту еякуляції
Морфологія	> 4% нормальних сперматозоїдів(<4% – тератозооспермія)
Кількість «живих» сперматозоїдів	> 50%
Лейкоцити	< 1 млн./мл.

Нормальним співвідношенням буде 50% і більше живих сперматозоїдів, 20% мертвих, до 20% патологічних сперматозоїдів. Колір сперми повинен бути молочно-білий, без домішок. Нормальна спермограма показує відсутність будь-

яких домішок, слизу в спермі. Кров в спермі (гемоспермія), мікрофлора, еритроцити, клітини епітелію (більше 2-3) – це відхилення від норми, а отже симптом урологічних захворювань. В нормі у аналізі сперми не повинно бути більше двох лейкоцитів у полі зору. Спермограма враховує різноманітні параметри, такі як в'язкість сперми (допустима норма від 0 до 5 мм), рівень рН (7,2-8), час необхідний для розрідження сперми, що складає 20-60 хв [37, 43].

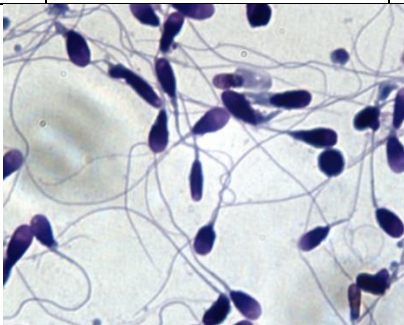
За останній час відзначається тривожна тенденція до погіршення показників чоловічої репродуктивної функції. Існує стійка закономірність до постійного зниження середніх показників репродуктивної функції чоловіків.

Чоловіче безпліддя стає причиною невдач з зачаттям майже в 50% пар [1]. Наявність проблем зі спермою може свідчити про зниження фертильності. Оцінка спермограми є основним діагностичним критерієм чоловічого безпліддя. За нормальних показників для висновків достатньо одного аналізу. За наявності патології, виявленої не менше ніж у двох аналізах сперми, показано повне андрологічне обстеження. Згідно з критеріями Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), для нормальної фертильності чоловіка рухливість сперматозоїдів має становити від 32% до 42%. Морфологія сперматозоїдів повинна бути не нижче 4% [37, 43].

1.3. Морфологія сперматозоїдів

Характеристика нормального сперматозоїда (Рис.1) включає його овальну форму голівки з відношенням довжини до ширини від 1,5 до 1,75 мкм та чітко виражену акросомну область, що займає 40-70% площі голівки. Шийка повинна бути тонкою, довжина в 1,5 рази більшою за довжину головки і прикріплена до неї вздовж осі. Розміри цитоплазматичних крапель не повинні перевищувати половини розміру головки. Хвіст має бути прямим, однакової товщини, з довжиною приблизно 45 мкм, без закручень та з відношенням довжини до головки 1:9 або 1:10 [4, 5, 15, 17].

Приклади морфології сперміїв при диференційному фарбуванні

Патології сперміїв	Приклади патологічних форм		
Патологія головки			
Патологія шийки			
Патологія хвоста			
Цитоплазматична крапля			
Нормальні форми			
Фото сперміїв			

Дефекти голівки можуть включати великі, маленькі, конічні форми, а також головки з вакуолями в ділянці хроматину або нерівномірно розташованою акросомальною областю [4, 9, 37]. Дефекти шийки і середньої частини можуть виявлятися у вигляді "схилених" шийок, асиметричного прикріплення до головки або товстої середньої частини [4, 9]. Дефекти хвоста можуть бути у вигляді коротких, зламаних, похилих або закручених хвостів. При оцінці морфологічних відхилень враховуються лише сперматозоїди з хвостами [17]. Сперматозоїди, у яких головка укладена в цитоплазматичну краплю або у яких цитоплазматична крапля розташована на шийці у вигляді шарфа і по відношенню до розміру головки становить більше 1/3, виділяються як незрілі або молоді. У нормальній спермограмі вони становлять близько 1% [7, 17].

Форми порушень сперматогенезу. При вивченні причин чоловічого безпліддя враховують такі ключові показники: кількість сперматозоїдів, об'єм еякуляту, морфологія сперматозоїдів, рухливість сперматозоїдів. Рухливість сперматозоїдів відіграє вирішальну роль у процесі запліднення. Для успішного проникнення в яйцеклітину сперматозоїди повинні мати достатню швидкість та енергію руху, щоб проникнути крізь zona pellucida – це прозора захисна оболонка, яка покриває незапліднену яйцеклітину [31, 32, 27].

Низька рухливість є другою за поширеністю причиною чоловічого безпліддя. Астенозооспермія - це стан, що характеризується зниженням кількості рухливих сперматозоїдів. У більшості випадків це призводить до труднощів із зачаттям. Згідно з визначенням ВООЗ, в нормі не менше 50% сперматозоїдів (або не менше 6 500 000 на мілілітр) повинні мати рухливість. Однією з причин зниження рухливості може бути вроджені генетичні дефекти будови хвоста сперматозоїда, що відповідає за його рух. Наступна причина є зміна складу плазми, а саме наявність слизу, що ускладнює рух сперматозоїдів. Низький вміст вуглеводів в плазмі, які є джерелом енергії для сперматозоїдів, зменшують їх рухливість [13, 32, 33, **Помилка! Джерело посилання не знайдено.**, 43].

Олігозооспермія це стан, що характеризується зниженням кількості сперматозоїдів в еякуляті. У 2010 році Всесвітньою організацією охорони

здоров'я (ВООЗ) було оновлено норми спермограми, які адаптовані під несприятливу тенденцію зростання поширеності чоловічого безпліддя в світі. Причиною цього явища вважається погіршення загального стану здоров'я чоловіків за останні роки. За даними ВООЗ, нормальною вважається концентрація сперматозоїдів не менше 20 млн/мл [4, 5, 13, **Помилка! Джерело посилання не знайдено.**, 43, 44].

Тератозооспермія - це стан, що характеризується порушенням форми сперматозоїдів. При тератозооспермії значна частина сперматозоїдів має неправильну форму. Важка форма тератозооспермії, коли менше 4% сперматозоїдів мають нормальну форму в еякуляті, що значно знижує шанси на запліднення яйцеклітини. Точні причини тератозооспермії невідомі. Причинами розвитку цього фактору можуть слугувати несприятливі фактори середовища а саме: забруднення, хімічні речовини, радіація та патологічні стани (гормональні порушення, генетичні дефекти, запальні захворювання). Також не виключення, що даний стан пов'язаний з вірусними інфекціями [4, 5, **Помилка! Джерело посилання не знайдено.**, 36].

Аналіз морфології сперматозоїда дозволяє оцінити його здатність до запліднення, бо саме морфологічно аномальні сперматозоїди мають знижені шанси на успішне запліднення через низьку здатність до проникнення крізь оболонку яйцеклітини, знижену швидкість руху, труднощі при проходженні через цервікальний слиз, який є селективним бар'єром для сперматозоїдів, порушення акросомальної реакції та реакції гіперактивації при капацитації. Блискуча оболонка яйцеклітини людини вибірково зв'язує сперматозоїди з нормальною морфологією. Від 80% до 100% сперматозоїдів, які запліднюють яйцеклітину, мають нормальну форму [24, 31, 32].

Азооспермія - це найважча форма порушення сперматогенезу, при якій відсутні сперматозоїди в еякуляті. Спостерігається приблизно у 2% чоловіків з проблемами фертильності. Факторами ризику азооспермії є генетичні порушення (аномалії каріотипу, зокрема синдром Клайнфельтера, мікрделеції AZF-регіону (Azoospermia Factor, фактор азооспермії) Y хромосоми, мутації гена CFTR),

токсичні впливи (включаючи алкоголь, хімічні речовини, радіаційне опромінення), запальні захворювання статевих органів, що призводять до порушення прохідності сім'явивідних проток. Виділяють дві форми азооспермії – це обструктивна та секреторна. При обструктивній азооспермії сперматозоїди не потрапляють в еякулят через непрохідність сім'явивідних шляхів, при цьому сперматозоїди можуть мати нормальну морфологію і рухливість. Такий стан спостерігається при мутації гена CFTR, який викликає блокування сім'явиносних протоків, інфекціях та запаленнях репродуктивного тракту, травмах. Секреторна (необструктивна) азооспермія, в основі якої лежить порушення сперматогенезу в яєчках від самого початку **[Помилка! Джерело посилання не знайдено., 37, Помилка! Джерело посилання не знайдено., Помилка! Джерело посилання не знайдено.]**.

Олігоспермія — це патологічний стан, при якому характеризується зменшення об'єму сім'яної рідини, що виділяється при еякуляції, (до 1-1,5мл замість 2-5мл), що також зменшуються шанси на успішне зачаття дитини. Причинами олігоспермії можуть виступати генетичні аномалії, гормональний дисбаланс, алкоголізм, хронічний простатит [6, 13, 24].

Нормальним для чоловічого організму вважається невелика кількість лейкоцитів в спермі. При запальних процесах в сечостатевої системі кількість лейкоцитів може значно зрости. В 1 мл сперми не повинно бути більше 1 млн лейкоцитів, а при мікроскопічному дослідженні в полі зору не повинно бути більше 5 лейкоцитів. Лейкоспермія — підвищений вміст лейкоцитів в еякуляті чоловіка, небезпечна передусім при запаленні яєчок, де відбувається сперматогенез. Підвищення кількості лейкоцитів негативно впливає на репродуктивну функцію чоловіка [6, 13, 24].

Активні форми кисню, які інтенсивно виробляються лейкоцитами при лейкоцитоспермії, пошкоджують мембрани сперматозоїдів, що робить їх більш вразливими та нефункціональними [5].

1.4. Типи гіпоксії та їх вплив

Гіпоксія – патологічний процес, що характеризується зменшенням pO_2 у тканинах та абсолютної або відносної недостатності біологічного окислення в клітині. Гіпоксія призводить до розладу функцій органів та тканин, порушення пластичних та енергетичних процесів в організмі, морфологічних змін клітин. За етіологією виділяють кілька типів гіпоксії, що умовно об'єднуються у дві групи: екзогенні та ендогенні.

До екзогенного типу відносять нормобаричну та гіпобаричну гіпоксію. Причини розвитку нормобаричної гіпоксії – обмеження надходження в організм кисню з повітрям за нормального барометричного тиску. Такі умови складаються під час перебування людини у невеликому та погано вентильованому просторі з порушенням регенерації повітря та подачі кисневої суміші для дихання. Проявляється артеріальною гіпоксемією – зменшення напруги кисню в плазмі артеріальної крові, що веде до зменшення насичення киснем гемоглобіну, загального вмісту кисню у крові та, як наслідок, до порушень газообміну та метаболізму в тканинах [3, 10].

Постійне проживання в гірських районах супроводжується тривалим впливом гіпобаричної гіпоксії — стану, що виникає внаслідок зниження барометричного тиску та відповідного зменшення парціального тиску кисню у вдихуваному повітрі. У таких умовах організм перебуває у стані хронічного обмеженого надходження кисню, що зумовлює формування стійких компенсаторних і адаптаційних змін на рівні дихальної, серцево-судинної, кровотворної систем, обміну речовин і нейрофізіологічних процесів [7, 10].

Ендогенні гіпоксичні стани є результатом патологічних процесів, що призводять до недостатнього транспорту до органів кисню, субстратів обміну речовин та використання їх тканинами.

Гемічна гіпоксія відноситься до ендогенної гіпоксії, що виникає при зменшенні кисневої ємності крові через зниження вмісту гемоглобіну (Hb) в одиниці об'єму крові та порушення транспортних властивостей Hb. Гемічний тип гіпоксії характеризується зменшенням концентрації гемоглобіну в еритроцитах,

який зв'язує кисень в капілярах легень, для подальшого транспортування та віддачі оптимальної кількості його в тканини [22].

Це пов'язано з утворенням карбоксигемоглобіну при вдиханні чадного газу, який має значно вищу спорідненість до гемоглобіну, ніж кисень. У результаті різко знижується здатність крові зв'язувати і транспортувати кисень, що призводить до системного кисневого голодування.

Гістотоксична гіпоксія виникає у випадках, коли кисень надходить у нормальній кількості, але клітини втрачають здатність його ефективно використовувати. Це зумовлено блокадою ферментів дихального ланцюга токсичними речовинами, які утворюються під час горіння синтетичних матеріалів, наприклад, ціанідами. Вони пригнічують активність цитохромоксидази, що призводить до різкого зниження інтенсивності біологічного окиснення, порушення синтезу АТФ і енергетичного дефіциту клітин [24].

1.5. Вплив оксидативного стресу на сперму

Оксидативний стрес (ОС) є ключовим фактором дисфункції сперматозоїдів. Сперматозоїди особливо вразливі до оксидативного стресу через свої унікальні характеристики, включаючи високий вміст поліненасичених жирних кислот у їхніх мембранах, обмежений об'єм цитоплазми та мінімальний антиоксидантний захист [25, 26, 29, 42].

Активні форми кисню в низькій концентрації є незамінними для кількох важливих функцій сперматозоїдів, включаючи рухливість, капацитацію та запліднення, за умови підтримки регульованих концентрацій [25, 26, 29, 42].

Під час капацитації АФК сприяють активації ключових шляхів передачі сигналу, які регулюють фосфорилування тирозину, важливий процес дозрівання сперматозоїдів. Ці шляхи призводять до змін у сперматозоїдній мембрані, які збільшують її текучість тим самим готуючи сперматозоїд до акросомної реакції і запліднення [1, 11, 26, 29, 42].

Але порушення тонкої рівноваги між генерацією АФК та ендогенними механізмами антиоксидантного захисту призводить до підвищеного рівня АФК, що спричиняє патологічний стан оксидативного стресу.

Мембрана сперматозоїдів, багата на поліненасичені жирні кислоти, особливо схильна до перекисного окислення ліпідів – ланцюгової реакції, яка призводить до утворення токсичних побічних продуктів, таких як малоновий діальдегід (МДА) та 4-гідроксиноненаль (4-ГНЕ). Ці побічні продукти ще більше порушують цілісність мембрани сперматозоїдів, впливаючи на її плинність та проникність, які є важливими для підтримки рухливості сперматозоїдів та забезпечення злиття з ооцитом під час запліднення [15, 19, 26, 28, 42].

Окрім перекисного окислення ліпідів, оксидативний стрес індукує окислення білків, що впливає на функцію ключових білків – актин, тубулін та білки цитоскелету, які беруть участь у рухливості та структурі сперматозоїдів. Ці білки підтримують форму та рухливість сперматозоїдів, але окислювальна модифікація може призвести до втрати рухливості та аномальної морфології.

Окрім перекисного окислення ліпідів, окислювальний стрес викликає значне пошкодження ДНК сперматозоїдів, що призводить до фрагментації ДНК. Сперматозоїди унікальні тим, що їх ДНК сильно ущільнена і щільно упакована в протаміни, які замінюють гістони під час сперматогенезу. Це ущільнення забезпечує певний захист від зовнішнього пошкодження; однак ДНК сперматозоїдів залишається вразливою до окислювального стресу через обмежену доступність механізмів відновлення ДНК і вільну упаковку ДНК у певних місцях, особливо тих, які беруть участь у ранньому ембріональному розвитку. Окислювальне пошкодження ДНК сперматозоїдів відбувається шляхом утворення одноланцюгових і дволанцюгових розривів. Процес фрагментації ДНК починається, коли АФК атакують дезоксирибозний каркас ДНК, що призводить до розщеплення фосфодієфірних зв'язків і утворення розривів ланцюгів. Ці розриви можуть відбуватися як одноланцюгові або дволанцюгові розриви, обидва з яких порушують цілісність геному сперми. Одноланцюгові розриви можуть бути відновлені ооцитом після запліднення, але дволанцюгові

розриви важче відновити і часто пов'язані з серйозним хромосомним пошкодженням [29, 42].

Окрім ендогенних джерел окислювального стресу, сперматозоїди чоловіків також піддаються впливу різноманітних зовнішніх факторів, серед яких важливу роль відіграють умови довкілля та професійна діяльність. Зокрема, постійне перебування в умовах гіпоксії або вплив токсичних компонентів диму суттєво підвищують рівень активних форм кисню у клітинах, що негативно відбивається на параметрах сперми.

У чоловіків, які живуть у гірських регіонах або працюють у середовищі зі зниженим парціальним тиском кисню, організм перебуває у стані хронічного кисневого дефіциту. Це зумовлює компенсаторне підвищення інтенсивності мітохондріального дихання та утворення АФК у клітинах, зокрема у сперматозоїдах. Надлишок АФК призводить до пошкодження мембран сперматозоїдів, порушення рухливості та підвищення фрагментації ДНК, що в кінцевому результаті знижує їх фертильний потенціал.

Пожежники, у свою чергу, часто зазнають впливу гемічної та гістотоксичної гіпоксії. Під час гасіння пожеж у повітрі містяться СО, ціанід, поліциклічні ароматичні вуглеводні та інші токсини, які, потрапляючи в організм через дихальні шляхи, зв'язуються з гемоглобіном і блокують транспорт кисню. Крім того, деякі токсичні сполуки диму інгібують клітинні ферменти дихального ланцюга мітохондрій, що призводить до гістотоксичної гіпоксії — неможливості тканин ефективно використовувати кисень навіть за його достатнього надходження [35].

Такі умови супроводжуються розвитком окисдативного стресу у статевих клітинах, що проявляється надмірним накопиченням АФК, ліпідною пероксидацією мембран, пошкодженням ДНК та білкових структур сперматозоїдів. У пожежників це поєднується з системним запаленням, що додатково погіршує якість сперми. Аналогічні зміни спостерігаються у чоловіків, які тривалий час живуть на висоті, де знижений рівень кисню стимулює гіпоксично-індукований окислювальний стрес у клітинах статевої системи [43].

Таким чином, як гіпобарична гіпоксія у гірських умовах, так і токсичні впливи диму у пожежників, діють через спільний механізм — підвищення рівня активних форм кисню, що призводить до порушення функціональних і генетичних характеристик сперматозоїдів та зниження чоловічої фертильності.

1.6. Адаптація організму до гіпоксії

Чоловіче безпліддя пов'язане з активними формами кисню (АФК). АФК включає високоактивні вільні радикали, а саме супероксидні аніони, перекис водню (H_2O_2), проксил і гідроксил. Для процесу запліднення, акросомальної реакції, гіперактивації необхідний низький рівень АФК. Однак високий рівень АФК нейтралізує антиоксиданти в насінній плазмі та викликає оксидативний стрес.

Каталаза і глутатіонпероксидаза є ключовими ферментами антиоксидантного захисту, які забезпечують підтримання редокс-гомеостазу під час сперматогенезу. Чоловічі статеві клітини характеризуються високою чутливістю до реактивних форм кисню, оскільки мембрани сперматозоїдів збагачені поліненасиченими жирними кислотами, а рівень цитоплазми — мінімальний, що обмежує здатність самих сперматозоїдів синтезувати антиоксидантні ферменти. Люди, що мешкають на великих висотах і зазнають хронічної гірської гіпоксії, мають підвищений рівень каталази та глутатіонпероксидази в репродуктивній системі, зокрема в клітинах яєчок і придатків яєчка. Ця активація є частиною захисного та адаптивного механізму. NRF2, SOD, CAT, GPX, PRX, GRX, TRX і NOS — це ряд антиоксидантних генів, які беруть участь у сперматогенезі. Ферменти, які кодуються цими генами, широко використовуються в антиоксидантних відповідях, покращують оксигенацію та оптимізують метаболізм статевих клітин, забезпечуючи підтримку сперматогенезу в умовах зниженої доступності кисню. Ключовим геном для антиоксидантного захисту є NRF2, тому що це ядерний фактор транскрипції, який може індукувати антиоксидантні ферменти через антиоксидантний чутливий елемент (ARE). У відповідь на оксидативний стрес

NRF2 зв'язується з антиоксидантним чутливим елементом і регулює захисні механізми проти ОС. SOD і CAT є генами, які регулюються сигнальним шляхом NRF2- ARE, і вони захищають сперматозоїди від окисного пошкодження супероксидом і H_2O_2 . SOD викликають руйнування супероксидних радикалів у молекулярному кисні та перекисі водню. CAT - це гемовий фермент, який кодується генами CAT. Він перетворює H_2O_2 до кисню та води, і зрештою підтримує нормальний рівень АФК і захищає сперму від АФК [20, 23].

На тяжкість димових уражень у працівників МНС впливає не лише хімічний склад диму, а й умови, в яких він вдихається. Важливими є такі чинники, як тривалість перебування в зоні задимлення та характер середовища, а саме відкрите чи замкнуте приміщення.

Тривалість впливу диму та виникнення впливу в замкнутому просторі – це два фактори, які допомагають визначити тяжкість легеневих наслідків вдихання диму. Додатковими факторами є характер і кількість продуктів згоряння матеріалів, що поглинаються пожежею, та ступінь, до якої ці продукти вдихаються разом з димом. Ці останні фактори набули особливого значення в останні роки зі зростаючим використанням синтетичних пластикових матеріалів у будівництві будівель [12].

При дії навіть помірної гіпоксії одразу формується поведінкова реакція організму, спрямована на уникнення впливу причини гіпоксії та пошук середовища існування, що забезпечує оптимальний рівень біологічного окиснення. Гіпоксія виступає початковим сигналом, який запускає формування реакцій адаптивної регуляторної системи, метою якої є відновлення і підтримання адекватного рівня біологічного окиснення у клітинах. Ця система забезпечує свою дію через активацію дихального центру, що підсилює вентиляцію легень, стимуляції серцево-судинної системи для збільшення хвилинного об'єму крові, підвищення вмісту еритропоєтину, який стимулює утворення еритроцитів, та мобілізації енергетичного обміну в клітинах шляхом посилення гліколізу й активації ферментів окиснення [5, 12].

Адаптивні реакції поділяють на дві групи екстрену та довготривалу адаптацію. Причиною активації механізмів термінової адаптації організму до гіпоксії є недостатність біологічного окиснення. Це проявляється зниженням вмісту у клітинах АТФ, необхідного для забезпечення оптимального рівня життєдіяльності та пластичних процесів. Ключова ланка екстреної адаптації організму до гіпоксії полягає в активації механізмів транспорту O_2 та субстратів обміну речовин до тканин та органів. Ці механізми вже є в організмі, тому у зв'язку з цим вони активуються одразу у момент виникнення гіпоксії та зниження ефективності біологічного окиснення. Підвищене функціонування систем транспорту кисню та субстратів метаболізму до клітин супроводжується інтенсивною витратою енергії та субстратів обмін речовин. Таким чином, ці механізми мають високу енергетичну та субстратну затратність. Саме це і є лімітуючим фактором ступеня та тривалості гіперфункціонування транспортних систем організму [15, 18, 19].

Причина включення довготривалої адаптації до гіпоксії полягає в повторній та тривалій недостатності біологічного окиснення помірної вираженості. Ключовою умовою переходу організму до стану довготривалою адаптованістю до гіпоксії є активація синтезу нуклеїнових кислот та білків. Синтетичні процеси домінують у тих органах, які забезпечують транспорт кисню та субстратів обміну речовин, а також у тканинах, що інтенсивно функціонують в умовах гіпоксії. Основною ланкою довготривалого пристосування до гіпоксії є суттєве підвищення ефективності процесів біологічного окиснення у клітинах [29, 31].

Одними з перших проявів гіпоксії є метаболічні розлади, що виникають унаслідок енергетичного дефіциту клітин. Зниження вмісту АТФ та креатинфосфату відбувається через пригнічення процесів аеробного окиснення та порушення фосфорилування АДФ і АМФ. Одночасно у тканинах зростає концентрація неорганічного фосфату внаслідок активного гідролізу макроергічних сполук і зниження інтенсивності окисного фосфорилування [37].

Процеси тканинного дихання пригнічуються через дефіцит кисню, субстратів метаболізму та зниження активності ферментів дихального ланцюга. На ранніх стадіях гіпоксії гліколіз активується, компенсуючи енергетичні втрати, однак при наростанні ацидозу цей процес поступово сповільнюється [1, 12].

В умовах дефіциту енергії пригнічується біосинтез білків і нуклеїнових кислот, тоді як протеоліз посилюється через активацію кислотозалежних протеаз. Це призводить до негативного азотного балансу, підвищення рівня залишкового азоту в плазмі крові та накопичення аміаку в тканинах.

Жировий обмін характеризується активацією ліполізу та пригніченням синтезу ліпідів через нестачу АТФ. Унаслідок цього зростає концентрація вільних жирних кислот і кетонових тіл, які додатково порушують процеси окиснення та фосфорилування, поглиблюючи енергетичний дефіцит.

Порушується також іонний гомеостаз клітин, тому що через нестачу АТФ знижується активність Na^+/K^+ - і Ca^{2+} -АТФаз, пошкоджуються мембрани та іонні канали. Це спричиняє дисбаланс іонів, набряк клітин і розлади водно-електролітного обміну [25, 44].

1.7 Вплив кріоконсервації на сперматозоїди людини

Кріоконсервація також впливає на пошкодження клітин і може призвести, через коливання температури, до шкідливих змін у структурі сперматозоїдів, а саме мембрани, мітохондрій, ДНК. Через це сперма може втрачати свою функцію та частину фертильного потенціалу. Внаслідок змін температур знижується життєздатності та рухливості сперматозоїдів. Зниження рухливості пов'язують із ушкодженням плазматичної мембрани, порушенням функціонування мітохондрій, дефектами структури аксономи, що забезпечує рух. Ці чинники знижують кінетичні властивості сперматозоїдів та зменшують їхню здатність до досягнення та пенетрації яйцеклітини [27, 30].

Одним із найважливіших наслідків кріоконсервації є зростання індексу фрагментації ДНК. Пошкодження генетичного матеріалу проявляється у вигляді

подвійних та одинарних розривів ДНК, зниження ступеня конденсації хроматину, оксидативні модифікації азотистих основ [38].

Ці зміни пов'язують з впливом реактивних форм кисню, механічними ушкодженнями та осмотичним стресом. Підвищена фрагментація ДНК асоціюється зі зниженням частоти нормального ембріонального розвитку.

Оксидативний стрес є центральним елементом патогенезу кріоушкоджень. Під час заморожування та особливо під час розморожування відбувається різке зростання рівня активних форм кисню, активація перекисного окислення ліпідів мембрани, окислювальні ушкодження білків та ДНК, порушення структури ліпідного шару мембрани сперматозоїда [30, 38].

Сперматозоїди особливо вразливі до активних форм кисню через високий вміст поліненасичених жирних кислот у мембранах та обмежений антиоксидантний потенціал цитоплазми, що робить їх схильними до пероксидного ушкодження [30].

РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали

Оцінка якості еякуляту виконувалася відповідно до рекомендацій Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я (ВООЗ) з використанням світлової мікроскопії за допомогою мікроскопа Nikon eclipse E 200 (Японія), камери Маклера та піддавали комп'ютерному аналізу сперми (CASA). Комерційний діагностичний тест Halosperm G2 використовувався як діагностичний тест для виявлення рівня фрагментації ДНК сперматозоїдів. Біохімічний аналіз антиоксидантного статусу проводився за допомогою комерційних діагностичних наборів з подальшою реєстрацією оптичної густини на спектрофотометрі. Усі виміри проводилися з обов'язковим дотриманням температурного режиму 37° що забезпечувалося лабораторним термостатом. Підготовка зразків, включаючи відокремлення спермоплазми для біохімічних аналізів, здійснювалася за допомогою лабораторної центрифуги.

У якості загальних витратних матеріалів використовувалися піпеткові наконечники, пробірки та барвники еозин-нігрозин для фарбування препаратів з метою оцінки морфології. Для виконання кріоконсервування сперматозоїдів використовували гліцерин як кріопротектор та резервуар з рідким азотом для довготривалого зберігання, біоматеріалу.

2.2. Характеристики обстежених пацієнтів

Збір інформації про пацієнтів, забір біологічного матеріалу та лабораторні дослідження проводились в Харківському обласному клінічному центрі урології та нефрології та Івано-Франківській обласній клінічній лікарні. У процесі дослідження використовувались початкові дані про пацієнтів, медичні записи та пробірки з біологічним матеріалом (еякулят). Інформовані згоди підписали всі чоловіки, які брали участь у дослідженні.

Для дослідження використовувався матеріал від 45 чоловіків у віці від 23 до 42 років та розділили на три групи. Для контрольної групи (група 1) із загальної вибірки відібрали 13 чоловіків репродуктивного віку. Вони не

працюють в ДСНС та не мали контакту з продуктами горіння. Проживають у місцевості із нормальним атмосферним тиском та не мають хронічних захворювань, які можуть порушувати сперматогенез. Експериментальну групу склали 31 чоловіків, яких розподілили на категорії: чоловіки, які впродовж тривалого часу жили в регіоні на висоті 800-1500м над рівнем моря; чоловіки, які працюють у підрозділах ДСНС та мають регулярний контакт із димом, продуктами неповного згоряння.

2.3. Аналіз еякуляту

Зразки сперми збирали в стерильні контейнери та залишали в термостаті на 30 хвилин для розрідження. Після розрідження в зразках оцінювались якісні, кількісні та морфологічні параметри сперматозоїдів. Для оцінки показників використовувались критерії ВООЗ [43]. Якісні показники включали в себе колір, запах, в'язкість, об'єм. Зібраний матеріал мав біло-сірий колір з жовтим відтінком, інколи рожевий. Запах сперми мав слабо виражений характер, не маючи різко вираженого запаху. В'язкість сперми оцінюється по довжині безперервної нитки, що утворюється при відриві краплі сперми від голки. Вона складала від 0,1-0,5 см, що є нормою за стандартами ВООЗ. Об'єм еякуляту під час проведення спермограми має велику діагностичну цінність. В даному дослідженні об'єм сягав від 0,1 до 8,5 мл, де від 0,1 до 2 мл вважається олігоспермією, від 2 до 5мл, більше 5 мл може свідчити про тривале утримання. Досліджений еякулят має рН від 7 до 8, де 7 нейтральна кислотність. Нормальні значення рН лежать у проміжку між 7.2 та 8.0. Таким чином сперма має слаболужну реакцію [43].

Основними методами для оцінки рухливості сперматозоїдів є ручний підрахунок і комп'ютерний аналіз сперми (CASA). Тест на дисперсію хроматину сперматозоїдів проводився з використанням набору Halosperm G2.

2.4. Методика кріопрезервації сперми

Кріоконсервування сперматозоїдів здійснювали за стандартним протоколом із застосуванням гліцерину як проникного кріопротектора.

Перший етап – центрифугування. Отриманий зразок еякуляту поміщали у центрифужні пробірки та піддавали центрифугуванню при низьких обертах протягом 5 хвилин. Після центрифугування обережно відбирали та видаляли верхній шар — сім'яну рідину. На дні пробірки залишався осад, що складався з концентрованих сперматозоїдів. Осад сперматозоїдів переносили у стерильні кріопробірки.

Другий етап — замінити внутрішньоклітинну воду на кріопротектор, щоб запобігти утворенню кристалів льоду та осмотичному шоку. До кожної пробірки додавали рівний об'єм гліцериновмісного кріопротекторного середовища та суміші сперматозоїдів у співвідношенні 1:1.

Після додавання кріопротектора суспензію інкубували короткий час при кімнатній температурі для осмотичної рівноваги, після чого переходили до етапу заморожування. Зразки розміщували у парі рідкого азоту для проведення контрольованого зниження температури. Після досягнення критичної точки замерзання пробірки занурювали у рідкий азот ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) для довготривалого зберігання.

2.5. Методика розморожування сперматозоїдів

Розморожування сперматозоїдів проводили за стандартним протоколом швидкої дефростації, спрямованим на мінімізацію кріоіндукованих ушкоджень плазматичних мембран. Кріопробірки зі зразками вилучали з резервуара рідкого азоту безпосередньо перед процедурою та негайно переносили у попередньо підігріту водяну баню.

Розморожування здійснювали шляхом занурення кріопробірки у водяну баню при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ до повного переходу зразка у рідку фазу. Зразок періодично обережно перевертали для рівномірного прогрівання, уникаючи різких механічних впливів.

Після повного розморожування вміст пробірки переносили у стерильну центрифужну пробірку та поступово додавали рівний об'єм підігрітого до $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

культурального середовища. Таке повільне розведення забезпечувало зниження осмотичного стресу, спричиненого високою концентрацією гліцерину.

Суспензію центрифугували **протягом 10 хвилин** з метою видалення кріопротектора. Надосадову рідину, що містила гліцерин, акуратно відбирали, залишаючи осад. Осад сперматозоїдів ресуспендували у невеликому об'ємі середовища та інкубували при 37 °C протягом 5–10 хвилин для відновлення функціональної активності. Отриману клітинну суспензію використовували для подальшого аналізу.

2.6. Методи дослідження

Мікроскопічне дослідження еякуляту включає дослідження рухливості сперматозоїдів, оцінку кількості та морфології сперматозоїдів і клітин сперматогенезу в нативному препараті, використовуючи мікроскоп та камеру Маклера. Для аналізу рухливості сперматозоїдів застосовується система класифікації на основі їхнього типу руху. В обмеженій ділянці поля зору або на всьому його просторі підраховують кількість швидко рухливих і повільно рухливих сперматозоїдів, а також тих, які не рухаються або рухаються в'яло. Оцінка проводиться на основі перегляду 200 сперматозоїдів у відповідній категорії, що дозволяє визначити відсоток рухливих та нерухливих клітин. Рухливість кожного сперматозоїда класифікують за категоріями, використовуючи такі критерії:

1. Категорія А - швидкий поступальний рух;
2. Категорія В - повільний і в'ялий поступальний рух;
3. Категорія С - непоступальний рух;
4. Категорія D - нерухомі сперматозоїди.

Спочатку підраховують усі сперматозоїди категорій А та В в обмеженій ділянці поля зору або, якщо концентрація сперматозоїдів низька, у всьому полі зору (%). Далі у тій же області підраховують сперматозоїди з непоступальним рухом (категорія С) (%) та нерухомі сперматозоїди (категорія D) (%).

Розрахунок ведуть за такою формулою:

$$X = A - (B + C), \text{ де,}$$

A – загальна кількість сперматозоїдів;

B – кількість малорухливих сперматозоїдів;

C – кількість нерухомих сперматозоїдів.

Звідси кількість активно рухливих сперматозоїдів у відсотках становить (Y):

$$Y = X * 100/A.$$

Комп'ютерний аналіз еякуляту (CASA) являє собою комп'ютерну систему для морфологічної характеристики та кількісної оцінки рухливості окремих сперматозоїдів та виявлення стереотипів рухливості. Аналіз здійснюється за рахунок відстеження шляху руху головки сперматозоїда. Сучасне обчислювальне обладнання дозволяє одночасно оцінювати морфокінетичні параметри тисячі сперматозоїдів і розподілити їх за групами за ступенем їхньої рухливості.

Комп'ютерний аналіз здатний оцінювати такі параметри:

1. **VCL** — криволінійна швидкість: середня швидкість руху по фактичній траєкторії. 60–120 мкм/с оптимальний показник швидкості.
2. **VSL** — швидкість по прямій: відстань між початковою і кінцевою точкою поділена на час. 30–60 мкм/с оптимальний показник ефективного спрямованого руху сперматозоїда.
3. **VAP** — середня траєкторна швидкість: швидкість вздовж згладженої середньої траєкторії, яку система обчислює алгоритмічно. Нормальні значення варіюються від 50 до 60 мкм/с.
4. **ALH** — амплітуда бічного відхилення головки: максимальний або середній розмах бокових рухів. Значення 1.5–3 мкм є важливим для гіперактивації сперматозоїда.
5. **MAD** — середнє кутове відхилення: середнє за часом значення величини змін напрямку руху. Від 50° і більше вказують на хаотичний рух, а 30–40° вказує на прямий рух.

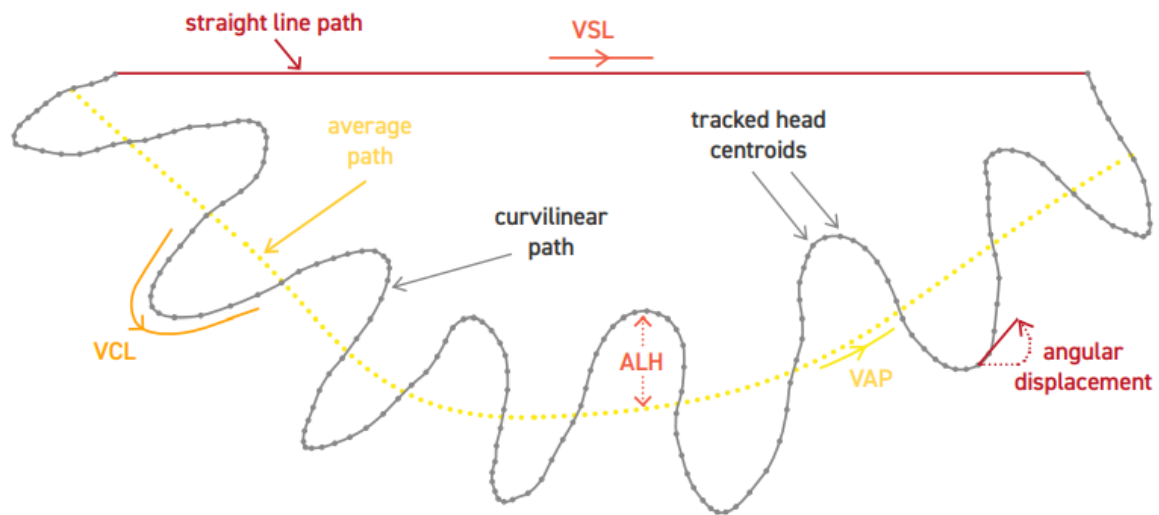


Рис.2 Схематичне зображення параметрів кінетики сперматозоїдів, що визначаються системами CASA

Характеристики рухливості та концентрації сперматозоїдів можна оцінити в нерозведеному еякуляті за умови, що немає надлишку залишків сперми або інших забруднень. Рухливість сперматозоїдів можна розрахувати на зразках з концентрацією сперматозоїдів від 2×10^6 /мл до 50×10^6 /мл.

Оцінка морфології сперматозоїдів також проводиться мікроскопічним методом. Для мазка потрібно взяти 10 мкл сперми на предметне скло, яка рівномірно розподіляється. До скла зі спермою додати гістологічний барвник Романовського-Гімзи, аналізуються з імерсійною олією під об'єктивом $\times 100$. Переходячи від поля до поля, аналізується кожен зі 100. Оцінюється відсоткове співвідношення в еякуляті морфологічно нормальних та змінених сперматозоїдів (загалом і за окремими видами змін). У кожного сперматозоїда характеризуються будова головки, стан акросоми, наявність цитоплазматичної краплі, дефектів середньої частини та хвоста.



Рис. 3 Оцінка морфології сперматозоїдів у забарвленому мазку

Тест дисперсії хроматину сперматозоїдів (тест SCD) – це метод світлової мікроскопії для оцінки схильності ДНК сперматозоїдів до кислотної денатурації. В основу тесту SCD покладено принцип, що інтактні петлі ДНК розширюються після денатурації та екстракції ядерних білків, тоді при фрагментації ДНК дисперсія не розвивається або є мінімальною. Цей метод спирається на здатність інтактного хроматину сперматозоїдів утворювати дисперсійні ореоли після впливу кислоти та лізуючого розчину. Ореоли відповідають розслабленим петлям ДНК, приєднаним до залишкової ядерної структури, які вивільняються після видалення ядерних білків. Розриви ДНК запобігають цій дисперсії, оскільки вони схильні до денатурації.

Залежно від вираженості та розмірів хроматинового гало сперматозоїди класифікують відповідно до критеріїв.

1. Велике гало: ширина гало дорівнює або перевищує менший діаметр ядра. Наявність великого гало свідчить про нормальну структуру хроматину та мінімальний рівень фрагментації ДНК.

2. Середнє гало: розмір гало у цьому випадку є проміжним між великим та малим. Такі сперматозоїди мають помірний рівень деконденсації хроматину, що вказує на незначні або субклінічні ушкодження ДНК.

3. Мале гало: ширина гало дорівнює або не перевищує третину меншого діаметра ядра у сперматозоїдів, віднесених до цієї категорії. Малий розмір гало

свідчить про суттєве ущільнення хроматину та порушену здатність ДНК до нормальної деконденсації, що є характерною ознакою підвищеного ступеня фрагментації.

4. Без гало: сперматозоїди цієї категорії повністю позбавлені гало. Відсутність гало свідчить про значний рівень ушкодження ДНК і критичне порушення структури хроматину.

Індекс фрагментації:

< 20%: нормальне значення

20 – 30%: підвищене пошкодження

> 30%: високий ризик впливу на фертильність

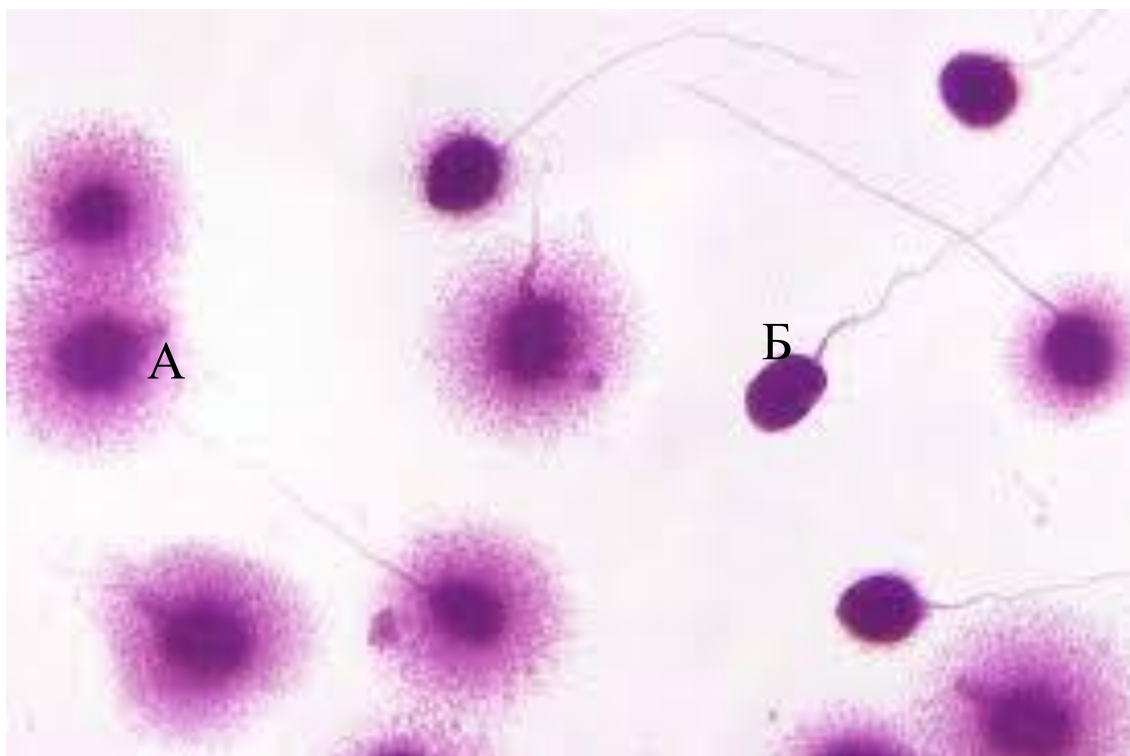


Рис. 4 Дисперсія хроматину сперми:

А – сперматозоїд без фрагментованої ДНК;

Б – сперматозоїд з фрагментованою ДНК.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При статистичному аналізі отриманих даних використовувався тест Краскала-Уолліса, який призначений для порівняння кількох незалежних груп. Групи в досліді сформовані простим випадковим вибором, пацієнти не є родичами та не пов'язані між собою, не піддавались якимсь особливим впливам у межах даного дослідження, отже вибірки є незалежним. Деякі порівнювані групи налічували менше за 30 досліджуваних зразків. Дані отримані в окремих досліджуваних групах характеризуються не нормальним розподілом (попередньо перевірено за допомогою теста Шапіро – Уїлка. Тож ефект від приналежності до певної експериментальної групи оцінювали за допомогою критерія Краскала – Уолліса.

Аналіз даних методом Краскала-Уолліса включає формулювання нульової гіпотези (H_0), яка передбачає, що немає статистично значущих відмінностей між медіанами, розрахованими для досліджуваних показників, в групах, та альтернативної гіпотези (H_1), яка передбачає, що така різниця є між групами. Задається рівень значущості ($p = 0,05$), який визначає критичне значення для прийняття або заперечення нульової гіпотези.

Група 1 – контрольна група, чоловіки репродуктивного віку;

Група 2 – група, що проживає в гірському районі;

Група 3 – група чоловіків, що працюють в ДСНС.

3.1. Характеристика концентрації сперматозоїдів чоловіків

Аналіз концентрації сперматозоїдів показав, що еякулят представників 1-ї групи за даним параметром відповідає нормі. Представники 2-ї та 3-ї груп за даним параметром не відповідає нормі.

Був застосований критерій Краскала-Уолліса для перевірки відмінностей у розподілі концентрації сперматозоїдів в еякуляті між трьома групами.

Статистика Краскала-Уолліса (H) склала 20,02 при 2 ступенях свободи, з рівнем значущості $p = 0,0000$.

Отриманий рівень значущості є значно меншим за $\alpha = 0,05$, як висновок є наявність статистично значущих відмінностей у концентрації сперматозоїдів між досліджуваними групами.

Для визначення, які саме пари груп відрізняються, було проведено попарне порівняння за допомогою критерію Манна-Уїтні. Для контролю помилки I роду застосовувалася поправка Бонферроні з коригованим рівнем значущості .

$$\alpha_{\text{Bonferoni}} = \frac{\alpha}{m}$$

Де $\alpha = 0,05$, а m — кількість порівнянь. Новий поріг значущості для кожного попарного тесту буде:

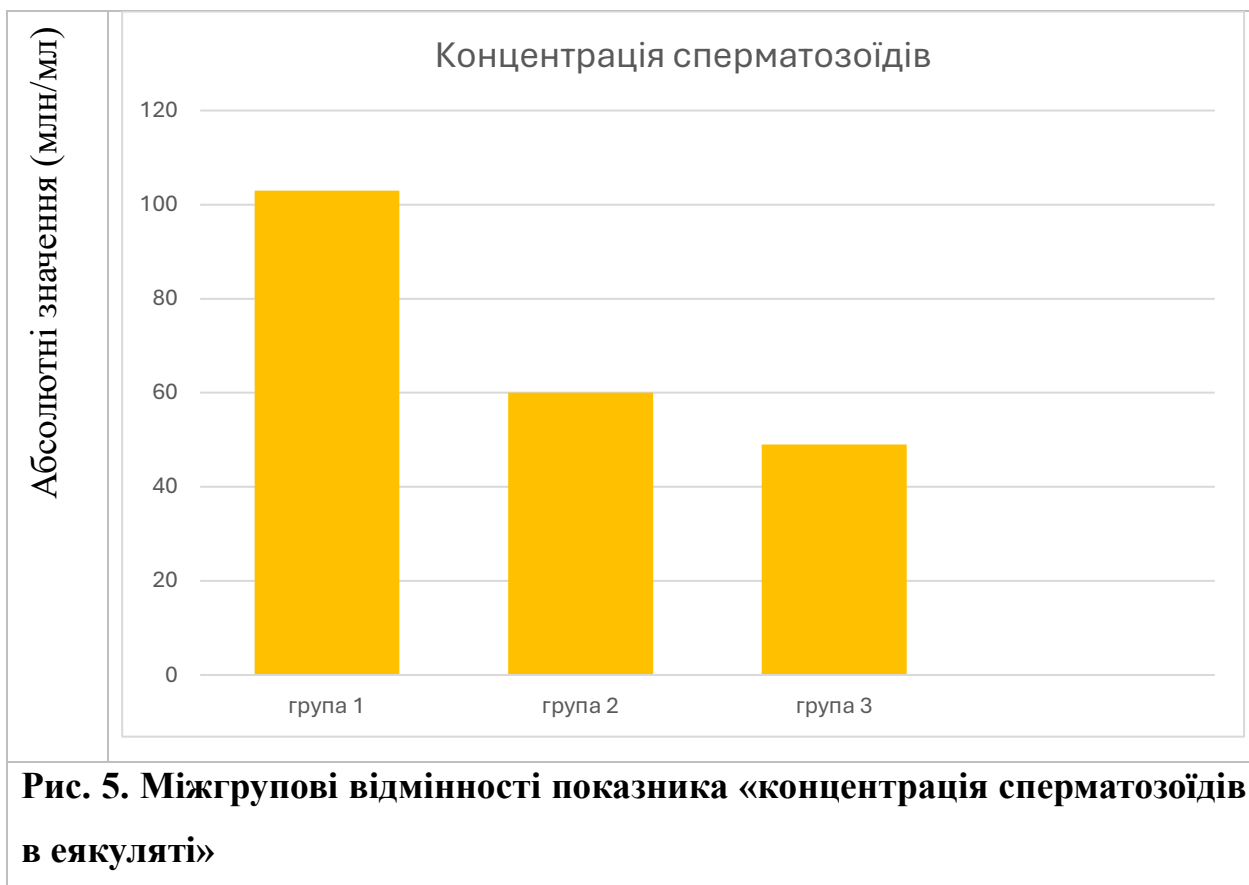
$$\alpha_{\text{Bonferoni}} = \frac{0,05}{3} \approx 0,0167$$

Порівняння здорових чоловіків та працівників ДСНС. Отриманий *p-value* становив 0,000077. Тому встановлено статистично значущу відмінність. Значення концентрації є вищими у групі здорових чоловіків.

Порівняння здорових чоловіків та чоловіків в гірському районі проживання. Отриманий *p-value* становив 0,000999. Встановлено статистично значущу відмінність. Значення показника є вищими у групі здорових чоловіків.

Порівняння працівників ДСНС та чоловіків в гірському районі проживання. Отриманий *p-value* становив 0,22. Оскільки, встановлено відсутність статистично значущої відмінності.

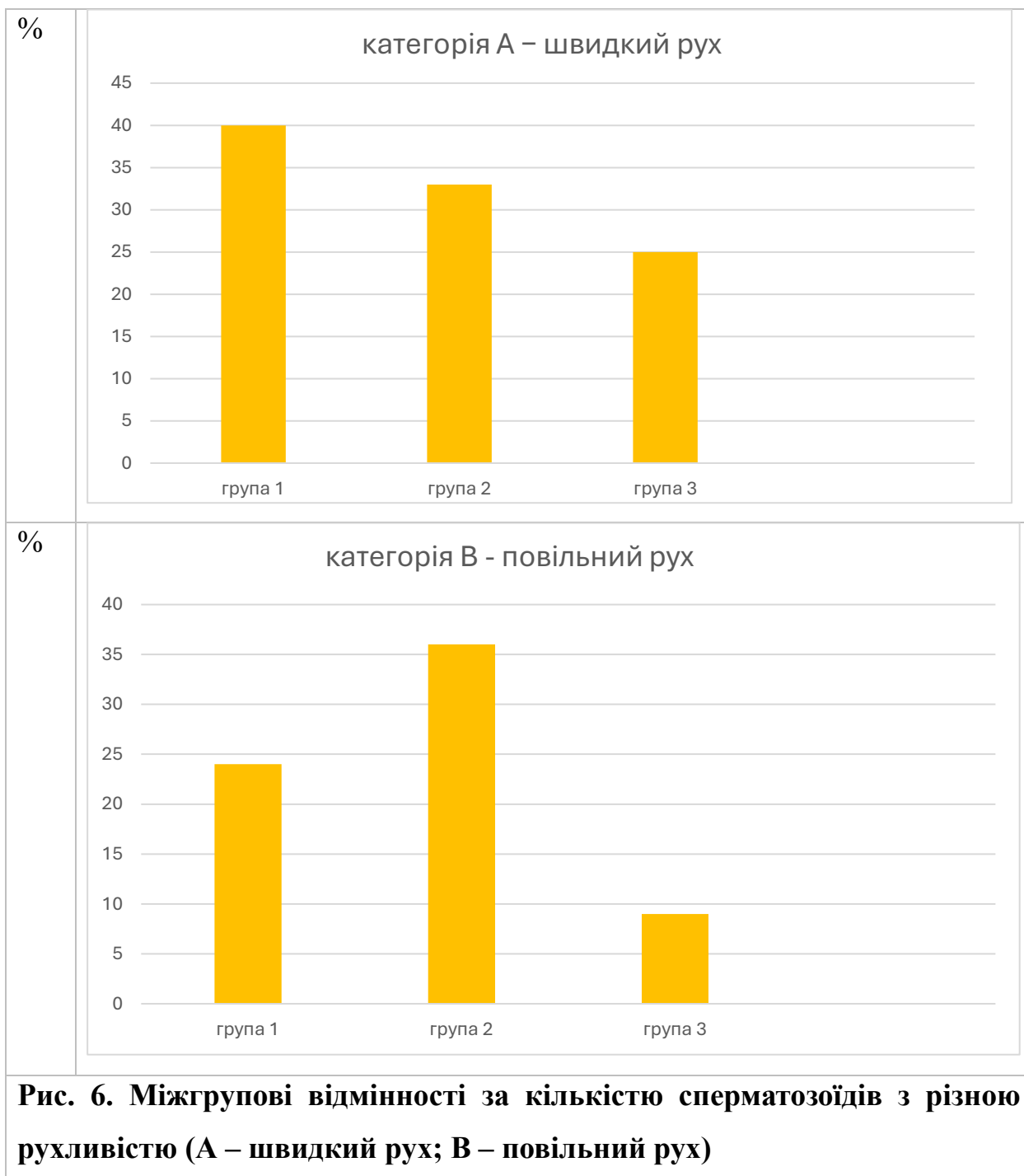
Група здорових чоловіків має статистично значуще вищі значення концентрації сперматозоїдів порівняно як з групою працівників ДСНС, так і з групою чоловіків гірського району проживання. Між групою ДСНС та групою чоловіків гірського району проживання статистично значущих відмінностей за показником не виявлено.



3.2. Характеристика рухливості сперматозоїдів у чоловіків

Для оцінки рухливості сперматозоїдів в еякуляті (категорія А – швидкий прогресивний рух) основний тест Краскела-Уолліса вказав на наявність відмінностей ($p = 0,04$), аналіз Манна-Уїтні не підтвердив статистичної значущості жодної з попарних відмінностей після застосування поправки Бонферроні ($\alpha_{\text{Bonferoni}} = 0,0167$). Це свідчить про те, що загальний ефект є слабким, і не можна стверджувати, що будь-яка з груп значуще краща чи гірша за іншу за цим показником.

Встановлено найбільш виражені та високо значущі відмінності за показником повільного руху – категорія В (Рис. 6). Після поправки Бонферроні всі три пари груп статистично значуще відрізняються одна від одної ($p < 0,000001$ для всіх пар). Була зафіксована чітка ієрархія, що найвища рухомість виявлена у групі чоловіків, які проживали в гірських районах, проміжний результат — у контрольної групи і найнижчий показник — у працівників ДСНС.



За показником непрогресивного руху —категорія С (Рис. 7), значущі відмінності після поправки Бонферроні були виявлені лише між групами працівників ДСНС та чоловіків з проживанням у гірських районах ($p = 0,004$). Група працівників ДСНС демонструє статистично значуще вищі показники непрогресивного руху порівняно з групою гірських мешканців. Контрольна група не відрізняється статистично від жодної з експериментальних груп.

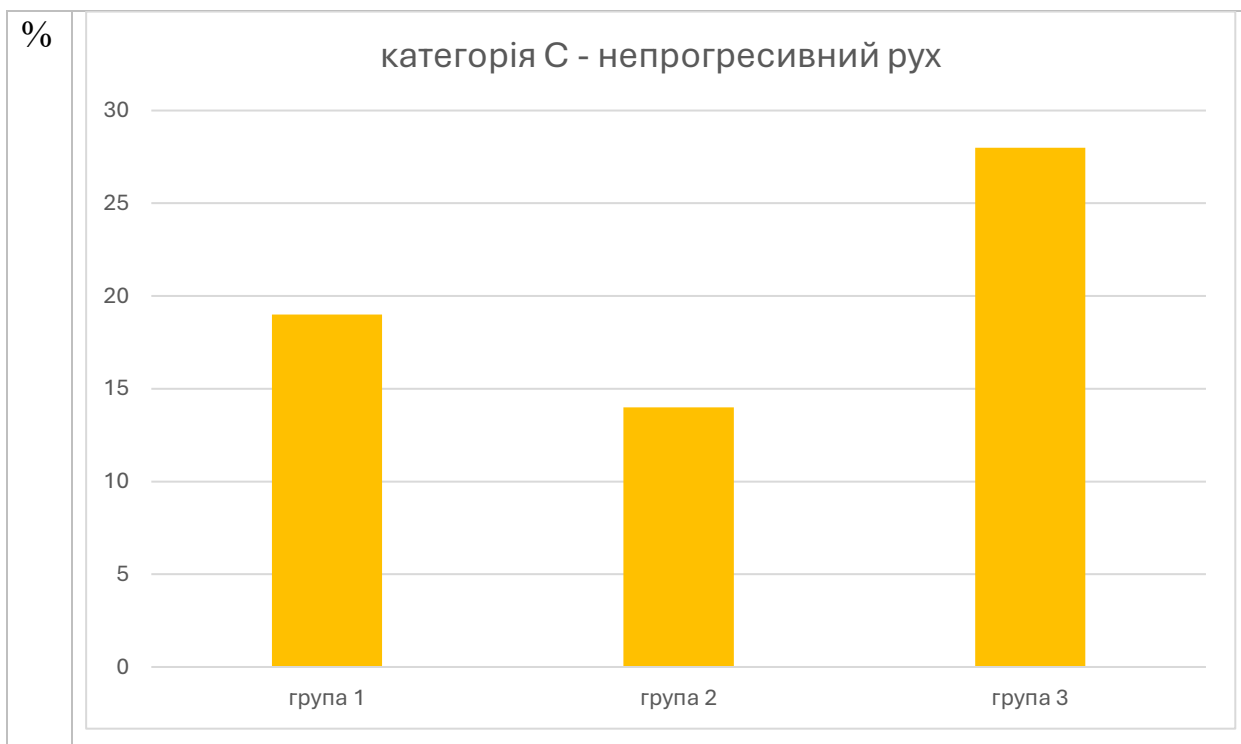


Рис. 7. Міжгрупові відмінності за показником непрогресивного руху

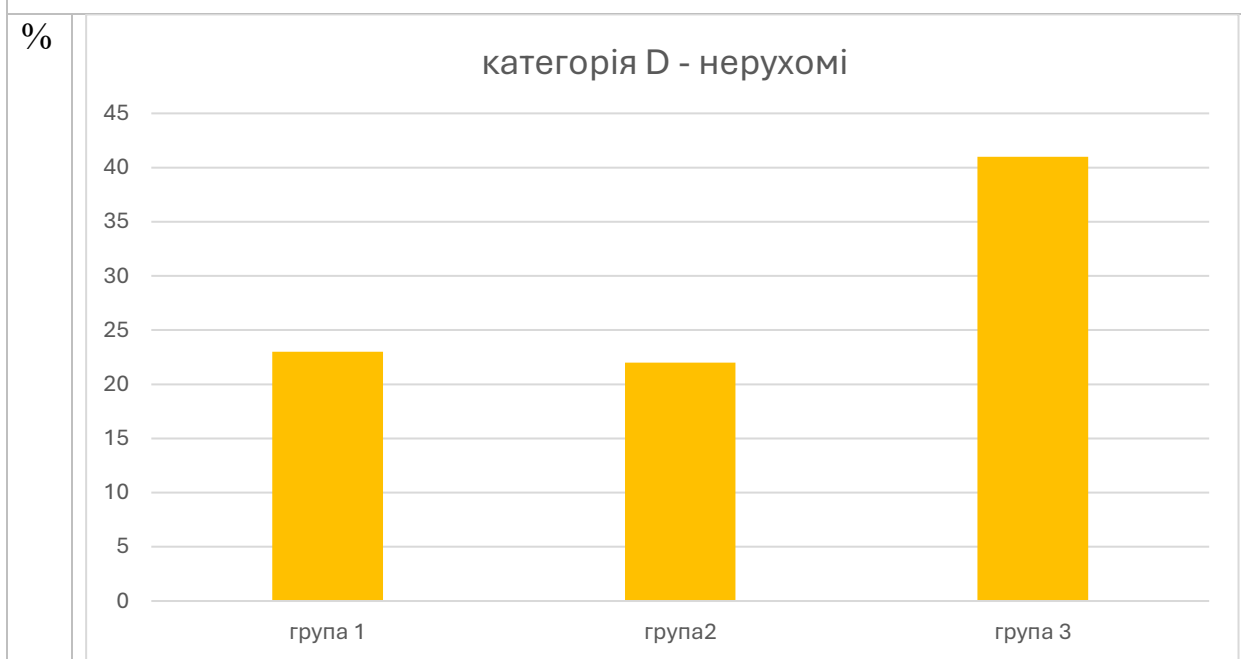


Рис. 8. Міжгрупові відмінності за кількістю нерухомих сперматозоїдів

Аналіз нерухомих сперматозоїдів — категорія D — не виявив статистично значущих відмінностей між групами ані за основним критерієм Краскела-Уолліса ($p = 0,0207$), ані за попарним порівнянням із поправкою Бонферроні. Хоча група працівників ДСНС має найвищий середній ранг, це підвищення є статистично незначущим порівняно з іншими групами.

3.3. Характеристика морфології сперматозоїдів в еякуляті чоловіків

Після проведення статистичного аналізу відсотка нормальних форм сперматозоїдів було підтверджено наявність високо значущих відмінностей між досліджуваними групами за критерієм Краскала-Уолліса ($p = 0,0002$).

Застосування аналізу Манна-Уїтні з поправкою Бонферроні показало, що група працівників ДСНС має статистично значуще нижчий відсоток нормальних форм порівняно з контрольною групою ($p = 0,0005$). Це свідчить про дефекти процесу сперматогенезу та підтверджує, що вплив факторів ризику в цій групі призвів до порушення структурної цілісності сперматозоїдів.

Відмінності в морфології між групою працівників ДСНС та групою чоловіків, які проживають у гірських районах) виявилися статистично незначущими після поправки Бонферроні ($p = 0,022$), так само як і між контрольною групою та групою 2 ($p = 0,261$).

3.4. Характеристика кінематичних показників сперматозоїдів в еякуляті чоловіків

За показниками кінематики встановлено високо значущі відмінності між групами. Критерій Манна-Уїтні для попарного порівняння з поправкою Бонферроні підтвердив, що група здорових чоловіків має статистично значуще кращі показники кінетики порівняно як з групою працівників ДСНС ($p = 0,0001$), так і з групою чоловіків, які мешкають в гірських районах ($p = 0,001$).

За показником середньої швидкості просування (VAP), що є найкращим індикатором ефективності руху, група працівників ДСНС значуще відстає від інших досліджувальних груп. Схожа картина спостерігається і для криволінійної (VCL) та прямолінійної (VSL) швидкостей. Група працівників ДСНС має значуще нижчі VCL, VSL порівняно з іншими групами.

Водночас, відмінності між здоровими чоловіками та гірськими мешканцями за VAP, VCL та VSL визнані статистично незначущими для VAP $p = 0,31$, VCL $p = 0,050140$, VSL $p = 0,34$).

За показником Амплітуди латерального зміщення голівки (ALH), який відображає потенціал гіперактивації, група працівників ДСНС має статистично значуще нижчу ALH порівняно зі здоровими чоловіками ($p = 0,0004$), що вказує на слабку здатність до гіперактивації.

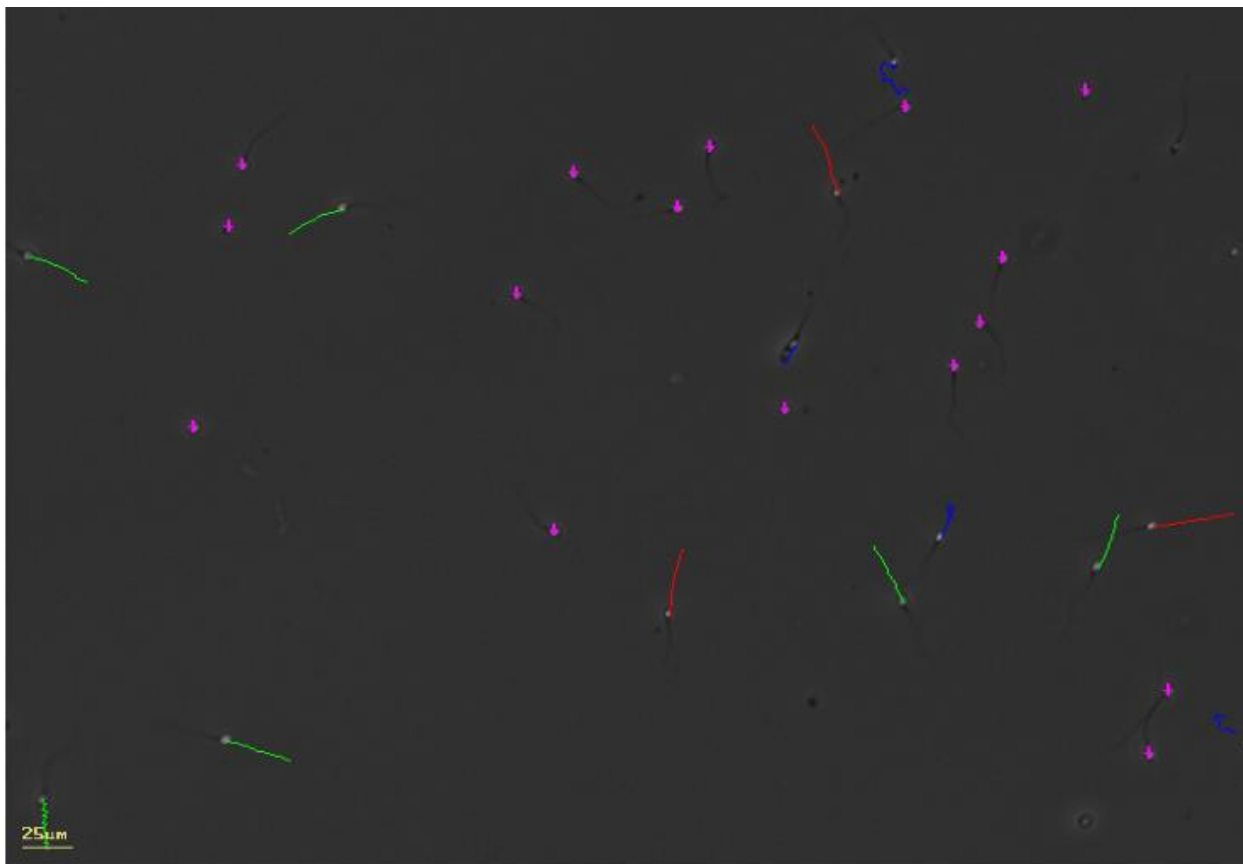


Рис. 9. Комп'ютерний аналіз рухливості сперматозоїдів (CASA):

Червоний колір – швидка прогресуюча рухливість (тип А);

Зелений колір – повільна прогресуюча рухливість (тип В);

Синій колір – непрогресуюча рухливість (тип С);

Фіолетовий колір – нерухомість.

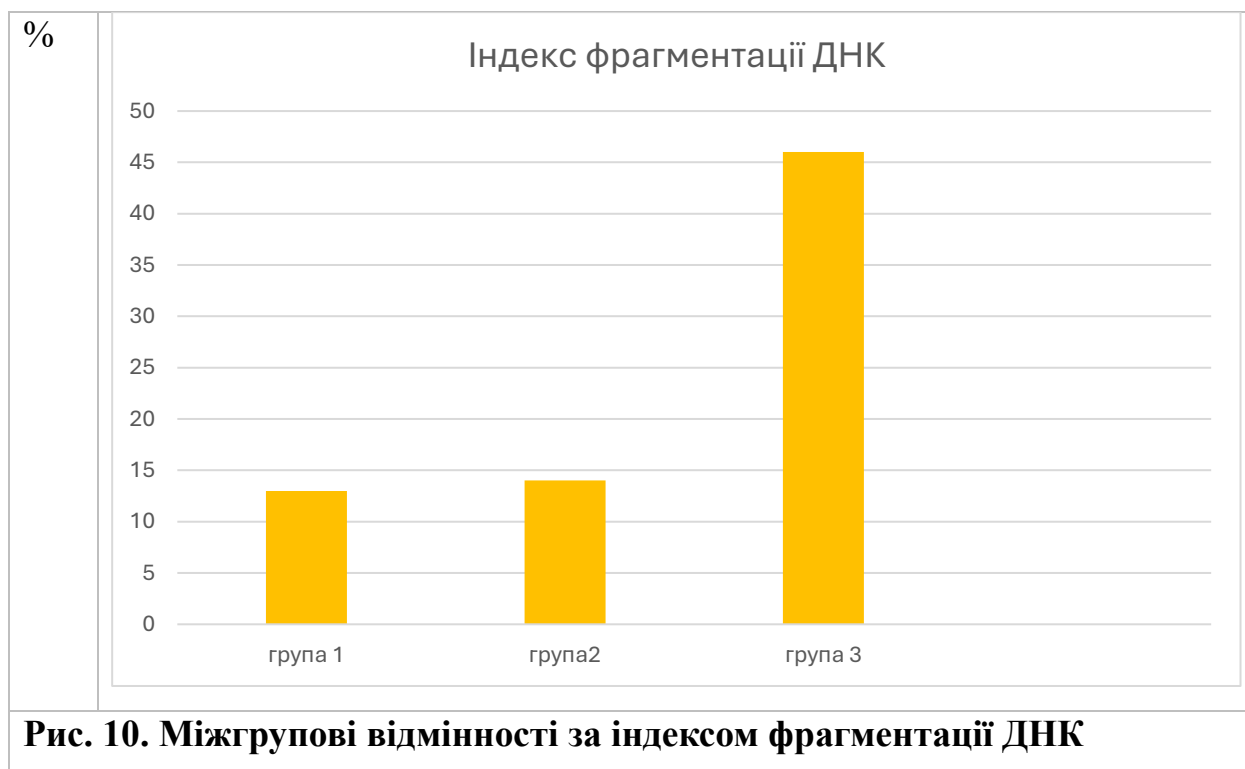
3.5. Характеристика фрагментації ДНК сперматозоїдів в еякуляті чоловіків

Аналіз індексу фрагментації ДНК сперматозоїдів є критично важливим для оцінки генетичної цілісності сперми та її здатності до запліднення.

Застосовувався критерій Краскала-Уолліса для встановлення загальних відмінностей між трьома групами. Результат тесту ($H = 27,07$) показав високу

статистичну значущість відмінностей ($p = 0,0000$), що свідчить про те, що показники індексу фрагментації у групах різняться.

Для ідентифікації конкретних груп, між якими існують ці відмінності, застосовувався критерій Манна-Уїтні з використанням поправки Бонферроні ($\alpha_{\text{Bonferoni}} = 0,02$).



При порівнянні здорових чоловіків та працівників ДСНС встановлено високо статистично значущу відмінність ($p = 0,000001$). Показники індексу фрагментації значуще вищі у групі працівників ДСНС.

При порівнянні працівників ДСНС та чоловіків в гірському районі проживання також встановлено високо статистично значущу відмінність ($p = 0,000001$). Показники індексу фрагментації значуще вищі у групі працівників ДСНС.

При порівнянні здорових чоловіків та чоловіків в гірському районі проживання статистично значущих відмінностей не виявлено ($p = 0,42$).

3.6. Характеристика активності ферментів у чоловіків

Статистичний аналіз активності ключових антиоксидантних ферментів, каталази та глутатіонпероксидази, виявив високо статистично значущі відмінності між трьома досліджуваними групами. Застосування критерію Краскела-Уолліса підтвердило загальну значущість відмінностей для обох ферментів.

Для ідентифікації конкретних груп, між якими існують ці відмінності, застосовувався критерій Манна-Уїтні з використанням поправки Бонферроні ($\alpha_{\text{Bonferoni}} = 0,02$), встановлено, що група працівників ДСНС демонструє найнижчу активність обох ферментів, що свідчить про системний і критичний дефіцит антиоксидантного захисту.

Аналіз також дозволив уточнити відмінності між контрольною групою та групою чоловіків з проживанням у гірських районах.

У групі гірських мешканців активність каталази статистично значуще нижча порівняно з контрольною групою ($p = 0,000001$). Активність глутатіонпероксидази між контрольною групою та групою 2 статистично значуще не відрізняється ($p = 0,31$).

3.7. Аналіз показників сперми після кріопрезервації

Аналіз проводився за допомогою Манна-Уїтні. Результати статистичного аналізу показників сперми після кріоконсервування демонструють статистично значущі відмінності між контрольною групою та групою працівників ДСНС, за такими параметрами як концентрація, рухливість категорії А та рухливість категорії В.

Виявлена високо значуща різниця ($p = 0,000007$) вказує на те, що клітини з група ДСНС не витримують температурне навантаження процедури, що призводить до значно більшої їхньої загибелі порівняно з контрольною групою.

Зниження відсотка прогресивно рухливих клітин (тип А, $p = 0,000212$; тип В, $p = 0,000002$) після розморожування підтверджує, що пошкодження

мітохондрій та мембранної цілісності, спричинені хронічним оксидативним стресом у групі ДСНС знижують енергетичний потенціал сперматозоїдів.

Висновок

Комплексний аналіз, що охоплював кількісні, функціональні, генетичні, структурні та біохімічні показники, чітко встановив значний та багатофакторний негативний вплив досліджуваних чинників на якість сперматогенезу.

Група працівників ДСНС продемонструвала найглибше та найбільш всебічне порушення за всіма без винятку проаналізованими параметрами, що свідчить про системну деградацію чоловічої репродуктивної функції.

Встановлено критичний дефіцит в активності обох ключових антиоксидантних ферментів — каталази та глутатіонпероксидази. Це є первинною причиною, що робить сперматозоїди вразливими перед оксидативним стресом.

Як прямий наслідок дефіциту захисту, група ДСНС має надзвичайно високий рівень фрагментації ДНК, який клінічно оцінюється як високий ризик для фертильності та генетичної передачі.

Сперматозоїди цієї групи мають найгірші показники поступального руху (VAP, VSL, VCL). Це призводить до збільшення частки нерухомих форм та зниження потенціалу для гіперактивації (ALH), що є критичним для успішного запліднення.

Зафіксовано значуще зниження відсотка нормальних форм, що вказує на порушення процесу дозрівання сперматозоїдів.

Група гірських мешканців показала, що самі по собі умови проживання не призводять до критичних якісних порушень.

За показниками кінематики, морфології та індексу фрагментації ДНК група статистично не відрізняється від контрольної групи. Але у цій групі спостерігається зниження концентрації сперматозоїдів та нижча активність каталази порівняно з контрольною групою. Це свідчить про вплив умов на кількісний резерв та окремі ланки захисту, але цей вплив є недостатнім для виклику масових функціональних дефектів.

Список використаних джерел

1. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A. et al. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol* 13, 37 (2015).
2. Aitken R.J., Bronson R., Smith T.B., De Iuliis G.N. The source and significance of DNA damage in human spermatozoa; a commentary on diagnostic strategies and straw man fallacies. *Mol Hum Reprod* 2013
3. Angerer P, Nowak D. Working in permanent hypoxia for fire protection-impact on health. *Int Arch Occup Environ Health*. 2003
4. Anifandis G., Bounartzi T., Messini C., Dafopoulos K., Sotiriou S., Messinis I.E. The impact of cigarette smoking and alcohol consumption on sperm parameters and sperm DNA fragmentation (SDF) measured by Halosperm. *Arch. Gynecol. Obstet.* 2014;290:777–782.
5. Barati E, Nikzad H, Karimian M. Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. *Cell Mol Life Sci.* 2020
6. Bundhun PK, Janoo G, Bhurtu A, Teeluck AR, Soogund MZS, Pursun M, Huang F. Tobacco smoking and semen quality in infertile males: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health*. 2019
7. Boos CJ, Mellor A, O'Hara JP, Tsakirides C, Woods DR. The Effects of Sex on Cardiopulmonary Responses to Acute Normobaric Hypoxia. *High Alt Med Biol.* 2016
8. Carroll, K., Pottinger, A. M., Wynter, S., & DaCosta, V. (2020). Marijuana use and its influence on sperm morphology and motility: identified risk for fertility among Jamaican men. *Andrology*, 8(1), 136–142.
9. Chemes H. E., Rawe V. Y. The making of abnormal spermatozoa: cellular and molecular mechanisms underlying pathological spermiogenesis *Cell Tissue Res.* 2010;341(3):349–57.
10. Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial /G. Balercia [et al.] // *Fertil. Steril.*-2009.- Vol. 91, № 5. - P. 1785-1792.

11. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*. 2003
12. Cornejo-Guerra C, Salazar-Ardiles C, Morales P, Andrade DC. Consequences of Exposure to Hypobaric Hypoxia Associated with High Altitude on Spermatogenesis and Seminal Parameters: A Literature Review. *Cells*. 2024
13. Cytogenetics of infertile men / E.V. Van Assche [et al.] // *Hum. Reprod*. 1996. – Vol. 11. – Suppl. 4. – P. 1-24.
14. Dai C., Zhang Z., Jahangiri S. Automated motility and morphology measurement of live spermatozoa. *Andrology*. 2021
15. Dai J.-B., Wang Z.-X., Qiao Z.-D. The hazardous effects of tobacco smoking on male fertility. *Asian J. Androl*. 2015.
16. Dearing C., Jayasena C., Lindsay K. Can the Sperm Class Analyser CASA-Mot system for human sperm motility analysis reduce imprecision and operator subjectivity and improve semen analysis? *Hum. Fertil*. 2021
17. Elshal MF, El-Sayed IH, Elsaied MA, El-Masry SA, Kumosani TA. Sperm head defects and disturbances in spermatozoal chromatin and DNA integrities in idiopathic infertile subjects: association with cigarette smoking. *Clin Biochem*. 2009 May;42(7-8):589-94.
18. Engelsman M, Toms LL, Wang X, Banks APW, Blake D. Effects of firefighting on semen parameters: an exploratory study. *Reprod Fertil*. 2021 Mar
19. Esteves S.C., Roque M., Garrido N. Use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with high sperm DNA fragmentation: a SWOT analysis. *Asian J Androl* 2018
20. Fleming SD, Thomson LK. The Oxidative Stress of Human Sperm Cryopreservation. *Antioxidants (Basel)*. 2025
21. Gallagher M., Smith D., Kirkman-Brown J. CASA: tracking the past and plotting the future. *Reprod. Fertil. Dev*. 2018
22. Genovesi MG, Tashkin DP, Chopra S, Morgan M, McElroy C. Transient hypoxemia in firemen following inhalation of smoke. *Chest*. 1977

23. Hsieh YY, Chang CC, Lin CS. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int J Biol Sci*. 2006
24. Kumar S., Murarka S., Mishra V.V., Gautam A.K. Environmental and lifestyle factors in deterioration of male reproductive health. *Indian J. Med. Res*. 2014;140(Suppl): S29–35.
25. Lewis, S. E. M. The place of sperm DNA fragmentation testing in current day fertility management / S. E. M. Lewis // *Middle East Fertil. Soc. J.*- 2013. Vol. 18, № 2. - P. 78-82.
26. Li Z, Wang S, Gong C, Hu Y, Liu J, Wang W, Chen Y, Liao Q, He B, Huang Y, Luo Q, Zhao Y, Xiao Y. Effects of Environmental and Pathological Hypoxia on Male Fertility. *Front Cell Dev Biol*. 2021
27. Lin H, Wu M, Wu W. Incorporating sperm DNA fragmentation index with computer-assisted semen morphokinematic parameters as a better window to male fertility. *Chin. J. Physiol*. 2022
28. Muratori M., De Geyter C. Chromatin condensation, fragmentation of DNA and differences in the epigenetic signature of infertile men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2019.
29. Muratori M., Tamburrino L., Marchiani S. et al. Investigation on the origin of sperm DNA fragmentation: role of apoptosis, immaturity and oxidative stress. *Mol Med* 2015;
30. Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D, Karahuseyinoglu S. Effects of cryopreservation on sperm parameters and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet*. 2008
31. Ramlau-Hansen C.H., Thulstrup A.M., Aggerholm A.S., Jensen M.S., Toft G., Bonde J.P. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum. Reprod*. 2007; 22:188–196.
32. Robbins W.A., Elashoff D.A., Xun L., Jia J., Li N., Wu G., Wei F. Effect of lifestyle exposures on sperm aneuploidy. *Cytogenet. Genome Res*. 2005; 111:371–377.

33. Sakkas D., Mariethoz E., St John J.C. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. *Exp Cell Res* 1999;
34. Saleh R.A., Agarwal A., Sharma R.K., Nelson D.R., Thomas A.J. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil. Steril.* 2002;78:491–499.
35. Schubert B., Badiou M., Force A. Computer-aided sperm analysis, the new key player in routine sperm assessment. *Andrologia.* 2019
36. Sharma R., Harlev A., Agarwal A., Esteves S.C. Cigarette smoking and semen quality: a new meta-analysis examining the effect of the 2010 World Health Organization laboratory methods for the examination of human semen. *Eur. Urol.* 2016;70:635–645.
37. Sun, F. Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology? [Electronic resource] /F. Sun, E. Ko, R. H. Martin // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2006. Vol. 4. P. 1. Mode to access: URL: <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-4-1>
38. Tamburrino L, Traini G, Marcellini A, Vignozzi L, Baldi E, Marchiani S. Cryopreservation of Human Spermatozoa: Functional, Molecular and Clinical Aspects. *Int J Mol Sci.* 2023
39. Tao HP, Jia GX, Zhang XN, Wang YJ, Li BY, Yang QE. Paternal hypoxia exposure impairs fertilization process and preimplantation embryo development. *Zygote.* 2022
40. Tomlinson M., Naeem A. CASA in the medical laboratory: CASA in diagnostic andrology and assisted conception. *Reprod. Fertil. Dev.* 2018
41. Treatment of idiopathic asthenozoospermia, either isolated or oligoasthenozoospermia, with a-lipoic acid: a placebo-controlled, double-blind study/F. Mohamed [et al.] // *Hum. Androl.* - 2012. - Vol. 2, № 4.
42. Wang Y, Fu X, Li H. Mechanisms of oxidative stress-induced sperm dysfunction. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2025.

43. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen/World Health Organization. 5th ed. Geneva, 2010.
44. Zini A., Albert O., Robaire B. Assessing sperm chromatin and DNA damage: clinical importance and development of standards. *Andrology*. 2014;(2):322–325.
45. Zhibin Li, Shuying Li, Yufeng Xiao, Junfeng Guo, Jianchun Zhou, Yang Chen, Juan Yang, Chunli Gong, Bing He, Yuyun Wu, Nannan Gao, Huan Yang, Limin Gao, Hua Hu, Yunfang Zhang, Shiming Yang, Hypoxia exposure impairs male fertility via inhibiting Septin2-mediated spermatogonial proliferation, *Human Reproduction Open*, Volume 2025, Issue 3, 2025
46. Zribi N, Feki Chakroun N, El Euch H, Gargouri J, Bahloul A, Ammar Keskes L. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril*. 2010
47. Біологія індивідуального розвитку. Частина І. Практикум : навч. посіб. / М. Е. Держинський, Н. В. Скрипник, О. К. Вороніна, Л. М. Пазюк ; упорядкування Н. В. Скрипник – К. : Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2014. – 271 с.
48. Біологія індивідуального розвитку: навч. посіб. Для студентів денної та заочної форми навчання спеціальності 6.070402 – Біологія / укладач: І.А. Ігнатенко – Черкаси; ПП. «Дар-Гранд», 2011, - 123 с.
49. Біологія розвитку / М. Дж. ф. Барресі, С. ф. Гілберт ; пер.з англ. під ред. д-ра біол. наук А. В. Васильєва. — М. : Лабораторія знань, 2022. — 800 с
50. Зінченко О. П., Степанюк Я. В. Біологія індивідуального розвитку: Методичні рекомендації. – Луцьк, РВВ “Медіа”, 2015.– 36 с.