

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

імені В. Н. Каразіна

Кафедра хімічної метрології

УДК 543.544

До захисту допускаю 

завідувач кафедри хімічної метрології

д.х.н., проф. Олег ЮРЧЕНКО

«15» травня 2024 року

**ВПЛИВ ХІМІЧНИХ ФАКТОРІВ НА АКТИВНІСТЬ ТА ПОКАЗНИКИ
ФУНКЦІОНАЛЬНОСТІ БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ**

Кваліфікаційна робота магістра II курсу

групи ХМ-22

хімічного факультету

ТАМАДАЄВОЇ ВАЛЕРІЇ ОЛЕКСАНДРІВНИ

Науковий керівник

к.х.н., доцент

Наталія НІКІТІНА



ХАРКІВ 2024

РЕФЕРАТ

Об'єм роботи складає 70 сторінок. Кваліфікаційна робота містить 2 розділи, 14 рисунків та 22 таблиці. Було використано 104 літературні джерела.

Об'єкт дослідження: хімічні фактори, такі як рН середовища та концентрація кофеїну, які впливають на рухливість та життєздатність чоловічих статевих клітин (сперматозоїдів).

Мета роботи: вивчення впливу змін хімічного середовища, таких як рН та концентрація кофеїну, на активність та функціональні характеристики сперматозоїдів.

Методи дослідження та апаратура: мікроскопічні методи, іонометрія.

Результати та їх новизна: досліджено вплив хімічних факторів, зокрема вмісту кофеїну та рівня рН середовища, на активність та показники функціональності чоловічих статевих клітин. Добавки кофеїну значно покращують загальну та прогресивну рухливість сперматозоїдів. Збільшення вмісту кофеїну до 2.5 мМ призводить до найбільш вираженого покращення цих параметрів. Оптимальний діапазон рН, що забезпечує максимальну активність та життєздатність сперматозоїдів знаходиться в діапазоні від 7,2 до 8,2 одиниць рН. Відхилення від цього діапазону призводять до зниження мотильності та життєздатності, що підкреслює важливість підтримки суворих умов середовища при зберіганні та обробці сперми.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ДОПОМІЖНІ РЕПРОДУКТИВНІ ТЕХНОЛОГІЇ (ДРТ), ЕКСТРАКОРПОРАЛЬНЕ ЗАПЛІДНЕННЯ (ЕКЗ), рН, МІКРОСКОПІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ, ФУНКЦІОНАЛЬНІСТЬ СПЕРМАТОЗОЇДІВ.

ABSTRACT

The volume of work is 70 pages. The qualifying work contains 2 sections, 14 figures and 22 tables. 104 literary sources were used.

Object of study: chemical factors, such as environmental pH and caffeine concentration, affecting the motility and viability of male germ cells (sperm).

Purpose of the work: to study the effect of changes in the chemical environment, such as pH and caffeine concentration, on the activity and functional characteristics of sperm.

Research methods and equipment: microscopic methods, ionometry.

Results and their novelty: the influence of chemical factors, in particular the caffeine content and the pH level of the environment, on the activity and functionality indicators of male germ cells was investigated. Caffeine supplements significantly improve overall and progressive sperm motility. Increasing the caffeine content to 2.5 mM leads to the most pronounced improvement of these parameters. The optimal pH range, which ensures maximum activity and viability of spermatozoa, is in the range from 7.2 to 8.2 pH units. Deviations from this range lead to reduced motility and viability, which emphasizes the importance of maintaining strict environmental conditions during sperm storage and processing.

KEY WORDS: ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES (ART), IN VITRO FERTILIZATION (IVF), pH, MICROSCOPIC RESEARCH METHODS, SPERM FUNCTIONALITY.

ЗМІСТ

ВСТУП.....	6
1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	8
1.1. Підготовка сперми перед дослідженням у лабораторії ДРТ	8
1.1.1. Роль підготовки сперми перед штучним заплідненням.....	8
1.1.2. Впливання хімічних факторів на якість сперми	9
1.1.3. Методи підготовки сперми у лабораторії ДРТ.....	12
1.2. Вплив рН	16
1.2.1. Загальні принципи рН та його важливість у біологічному контексті ...	16
1.2.2. Механізми регулювання рН	16
1.2.3. Важливість збереження кислотності середовища при підготовці та тривалому зберіганні сперми.....	18
1.2.4. рН і осмолярність	21
1.3. Вплив кофеїну	24
1.3.1. Загальна фізіологія та біохімія сперматозоїдів.....	24
1.3.2. Роль кофеїну у біологічних системах	26
1.4. Методи мікроскопічного дослідження еякуляту	31
1.4.1. Визначення концентрації сперматозоїдів за допомогою камери Маклера.....	31
1.4.2. Визначення життєздатності сперматозоїдів.....	32
1.4.3. Визначення морфології сперматозоїдів.....	32
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	34
2.1. Реактиви та обладнання	34
2.2. Методики дослідження	35
2.2.1. Дослідження концентрації та рухливості сперматозоїдів	35
2.2.2. Дослідження морфології сперматозоїдів.....	35
2.2.3. Дослідження функціональності сперматозоїдів	37
2.2.4. Підготовка сперми до аналізу.....	38

2.2.5. Приготування реактиву EA-50	39
2.2.6. Приготування реактиву помаранчевого G6	39
2.2.7. Приготування реактиву гематоксиліну Гарріса без оцтової кислоти....	40
2.2.8. Приготування реактивів для перевірки життєздатності сперматозоїдів	41
2.2.9. Приготування розчинів з вмістом кофеїну 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ та 5 мМ....	42
2.2.10. Методика дослідження впливу вмісту кофеїну на рухливість сперматозоїдів	42
2.3. Результати та їх обговорення	44
2.3.1. Дослідження впливу рН середовища на рухливість та життєздатність чоловічих статевих клітин.....	44
2.3.2. Результати дослідження впливу кофеїну на загальну та прогресивну рухливість чоловічих статевих клітин	51
ВИСНОВКИ	60
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	61

ВСТУП

Складний шлях зачаття - це диво біологічної координації та точності, в якому активність та функціональність сперматозоїдів відіграють вирішальну роль. У сфері репродуктивної біології розуміння чинників, які впливають на здоров'я сперми, є ключем до вирішення проблем чоловічої фертильності та оптимізації допоміжних репродуктивних технологій. Серед цих факторів концентрація іонів, осмолярність, енергетичні субстрати, антиоксиданти та рН середовища сперматозоїдів виділяється як вирішальний фактор, що визначає здоров'я та функціональність сперматозоїдів. Ця магістерська робота спрямована на вивчення багатогранного впливу хімічних факторів на активність та показники функціональності сперматозоїдів, заглиблюючись у біохімічні та фізіологічні наслідки цього крихкого балансу.

Сперматозоїд - це єдина людська клітина, яка виконує свої функції поза чоловічим організмом. Велике значення має мікрооточення сперматозоїдів — насіннева плазма. Насіннева плазма являє собою суміш секретів яєчок, придатків яєчок і додаткових статевих залоз. Сім'яна плазма містить $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, неорганічні іони, органічні кислоти, цукри, ліпіди, стероїди, амінокислоти, поліаміни, азотисті основи та білки. У результаті сперма має дуже високу буферну здатність, вищу, ніж у більшості інших рідин організму. Таким чином, насіннева рідина, або середовище, що її заміняє у лабораторії екстракорпорального запліднення (ЕКЗ), може відігравати значну роль не тільки в підтримці життєздатності та якості сперми, але й у забезпеченні запліднення.

Тому актуальним є вивчення того, як зміни у навколишньому середовищі впливають на рухливість сперматозоїдів, структурну цілісність сперматозоїдів, метаболічні функції та загальний потенціал запліднення. А також вивчення наслідків коливань рН та впливу кофеїну у контексті зберігання сперми та підготовки до допоміжних репродуктивних методів.

Тому метою роботи стало вивчення впливу змін хімічного середовища, таких як рН та концентрація кофеїну, на активність та функціональні характеристики сперматозоїдів. Робота спрямована на створення вдосконалених протоколів підготовки сперми, що зрештою сприятиме покращенню результатів як природних, так і допоміжних репродуктивних зусиль.

Для досягнення мети необхідно вирішити наступні завдання:

1. Обрати хімічні фактори, які найсильніше впливають на показники рухливості та життєздатності сперматозоїдів.
2. Вивчити методи дослідження та спостереження за станом біологічного матеріалу.
3. Дослідити вплив обраних хімічних факторів на показники рухливості та життєздатності сперматозоїдів.

1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Підготовка сперми перед дослідженнями у лабораторії ДРТ.

1.1.1. Роль підготовки сперми перед штучним заплідненням.

Важливим, але іноді недооціненим етапом у процесі штучного запліднення є підготовка сперми. Забезпечення найвищої якості та функціональності сперми має вирішальне значення для успішного запліднення та подальшого ембріонального розвитку [1].

- 1) Видалення сміття та забруднень: сперма під час еякуляції містить більше, ніж просто сперму. Присутні інші клітинні елементи (лейкоцити, еритроцити і т.п.), білки, ферменти та потенційно шкідливі агенти. Правильна підготовка сперми допомагає у видаленні цих небажаних компонентів, забезпечуючи використання лише здорових і рухливих сперматозоїдів. Також, перед внутрішньоматковою інсемінацією дуже важливо підготувати сперму, щоб не передати шкідливі бактерії жінці [2].
- 2) Збільшення концентрації рухливих сперматозоїдів: особливо у випадках чоловічого безпліддя, важливо мати концентрацію високорухливих сперматозоїдів.
- 3) Видалення нерухомих і дефектних сперматозоїдів: нерухливі або морфологічно аномальні сперматозоїди можуть перешкоджати процесу запліднення. Правильна підготовка сперми гарантує, що ця сперма значною мірою буде видалена зі зразка, який буде використовуватися.
- 4) Усунення активних форм кисню (АФК): високий рівень АФК може пошкодити ДНК сперматозоїдів і знизити потенціал успішного запліднення. Методи підготовки сперми можуть знизити рівень АФК, забезпечуючи цілісність ДНК

сперми [3,4].

- 5) Капацитація: сперматозоїди повинні пройти ряд фізіологічних змін, які називаються капацитацією, щоб отримати здатність запліднити яйцеклітину. Певні методи підготовки сперми можуть ініціювати або підтримувати дієздатність, роблячи сперму готовою до запліднення.
- 6) У деяких випадках, коли чоловік хворіє на гепатит В, гепатит С чи СНІД, в спеціальних лабораторіях також роблять підготовку сперми. Тому, що вірус знаходиться тільки у рідині організму, сперматозоїди без рідни не несуть ніякої загрози, та дають шанс парі народити абсолютно здорову дитину.
- 7) Можливість збереження сперматозоїдів за низьких температур і належним чином забезпечення тривалого зберігання чоловічих статевих клітин у стані метаболічної зупинки, що запобігає клітинному старінню, зберігаючи при цьому їх життєздатність і потенціал запліднення [5]. Зберігання сперми є ефективною стратегією збереження чоловічої репродуктивної здатності після цитотоксичного або хірургічного лікування, яке може спричинити можливу дисфункцію яєчок або еякуляції. Кріоконсервація також може бути регулярно застосована у чоловіків, які піддаються впливу потенційно токсичних агентів, які можуть перешкоджати сперматогенезу, або які починають лікування допоміжної репродукції та, таким чином, мають резервне джерело сперми [6,7].
- 8) Можливість використовувати донорську сперму навіть після дуже тривалої заморозки [7].

1.1.2. Впливання хімічних факторів на якість сперми.

- 1) Високий рівень АФК (активні форми кисню) збільшує дефекти середньої частини сперматозоїду з аномальною формою або відсутніми хвостиками, що може пошкодити дієздатність. Це підвищення індукує окислювальний стрес, який

негативно впливає на основні функції сперматозоїдів, такі як процес дозрівання, гіперактивація та реакція акросоми [8,9]. Крім того, високий рівень АФК може спричинити погану цілісність ДНК, що є основною причиною низького рівня вагітності при ЕКЗ і високого рівня захворювань у нащадків, зачатих за допомогою штучного запліднення [3,4].

- 2) Температура для нормального сперматогенезу 32-35 градусів та її підвищення навіть на 1 градус вже негативно впливає на чоловічій здібності до запліднення. Експерименти на тваринах показали, що підвищення температури на 2 градуси одразу в 25 разів підвищують пошкодження ДНК статевих клітин, що розвиваються. Згодом яйцеклітини, запліднені такими сперматозоїдами, не призвели до народження потомства [10].
- 3) Свинець: хронічний вплив свинцю, особливо у виробництві, може призвести до зниження кількості та рухливості сперматозоїдів [11].
Кадмій: вплив кадмію, який часто зустрічається на промислових робочих місцях, може призвести до зниження кількості та рухливості сперматозоїдів. Також, основним з джерел надходження кадмію (Cd) у організм звичайного населення є куріння [12]. Кадмій має надзвичайно тривалий біологічний період напіврозпаду в організмі людини (20–40 років) [13].
Ртуть: високий рівень ртуті, насамперед через споживання риби, може негативно вплинути на якість сперми [14]. Ртуть спричиняє пошкодження ДНК сперматозоїдів і порушення морфології та рухливості сперматозоїдів [15].
- 4) Надмірне вживання алкоголю пов'язане зі зниженням кількості та рухливості сперматозоїдів, а також з аномальною морфологією. EtOH та його метаболіти, включаючи АФК, можна віднести до генотоксичних агентів. Фактично, вони збільшують швидкість розривів ланцюгів ДНК, що призводить до хромосомних перебудов та/або втрати генетичної інформації, нестабільності геному та утворення мікроядер [16]. Крім того, хронічне вживання алкоголю може підвищувати рівень пролактину в сироватці (гіперпролактинемія), викликаючи

гіпогонадизм, зниження вироблення сперми, імпотенцію та гінекомастію у чоловіків [17,18]. EtOH стимулює активність ароматази, яка перетворює тестостерон на естрадіол [19], що призводить до підвищення рівня естрогену та аномального збільшення грудей, як це спостерігається у важких алкоголіків [20,21].

- 5) Понад 100 пестицидів та гербіцидів (такі як органофосфати, атризин) були класифіковані як ендокринні руйнівники з різними механізмами дії, що спричиняють ендокринні порушення та потенційний вплив на показники фертильності (зниження рівня тестостерону, маси яєчок, ваги насінневих пухирців і збільшення лютеїнізуючого гормону (ЛГ) і фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) [22,23], зниження кількості сперматозоїдів, рухливості, життєздатності та щільності, а також збільшення пошкодження ДНК та аномальної морфології [24].

- 6) Промислові хімікати:

Фталати: це хімічні речовини, які у пластмасах грають роль підвищення гнучкості. Вони можуть вимиватися із пластикових контейнерів і містяться у багатьох засобах особистої гігієни. Фталати пов'язані зі зниженням рухливості сперматозоїдів та збільшенням фрагментації ДНК [25]. Поліхлоровані дифеніли (ПХД): колись широко використовувані в електрообладнанні ці хімічні речовини були пов'язані зі зменшенням кількості і рухливості сперматозоїдів [26].

Бісфенол А (ВФА): вплив ВФА, що використовується при виробництві деяких пластмас та епоксидних смол, може вплинути на кількість, рухливість та морфологію сперматозоїдів [27].

Перфторалکیلні сполуки (ПФС): використовуються в антипригарному посуді та деяких тканинах, ПФС пов'язані з погіршенням якості сперми [28].

- 7) Розчинники: бензол, толуол, ксилол: це звичайні органічні розчинники, які зустрічаються в фарбах, клеях і в багатьох промислових процесах. Вплив може призвести до зменшення кількості сперматозоїдів і збільшення кількості аномальних сперматозоїдів.

8) Ефіри гліколю. Містяться в таких продуктах, як краски, миючі засоби і гальмуюча рідина, вони можуть зменшити кількість сперматозоїдів [29].

9) Гормональні та фармацевтичні засоби:

Діетилstilbестрол (ДЕС): раніше призначений для запобігання викидням, у чоловіків, які зазнали впливу ДЕС внутрішньоутробно, концентрація сперматозоїдів може бути нижчою [30].

Анаболічні стероїди: їх часто зловживають для нарощування м'язової маси, вони можуть зупинити вироблення сперми [31].

10) Діоксини і фурани: ці сполуки, що утворюються в якості побічних продуктів в деяких виробничих процесах і при зжиганні відходів, можуть призвести до зниження рухливості сперматозоїдів і збільшення аномальної морфології [32].

1.1.3. Методи підготовки сперми у лабораторії ДРТ.

Однією з головних цілей штучної репродуктивної технології є імітація процесу суворого відбору, який відбувається в жіночому тракті для покращення репродуктивного результату.

Класичні методи, засновані на рухливості або щільності сперматозоїдів

1) Підплив угору - Swim-Up (SU)

Підплив угору (рис. 1.1.) відомий як найпростіший спосіб підготовки сперматозоїдів. Зразок центрифугують із середовищем, що складається з полісілоксанових мікрочастинок, для видалення сім'яної сироватки, а потім залишають на 60 хвилин з нахилом 45° і шаром середовища, що перекривається. Принцип методики заснований на залученні сперматозоїдів до найбільш збагаченої рідиною ділянки. Ці умови повинні сприяти ємності та міграції: клітини з прогресуючою рухливістю можуть підніматися з гранули через середовище, і їх

можна відібрати з поверхні [33]. Існує також кілька варіантів техніки, які уникають процесу центрифугування, коли сперматозоїди можуть переходити безпосередньо з насінної рідини на поверхню середовища, яке просто поміщають на зразок [34].

Цей метод застосовується як для екстракорпорального запліднення, так і для внутрішньоцитоплазматичної ін'єкції сперми, і рекомендований, коли рухливі сперматозоїди в зразку є низьким відсотком [34]. Незважаючи на наявність центрифугування, підпливання є дуже м'якою технікою, вона створює невелику кількість АФК, але залучає лише зрілі активовані сперматозоїди [35]. З іншого боку, вплив вгору має деякі недоліки. У випадку зразків з великим об'ємом або підвищеною концентрацією метод вимагає розподілу зразка між кількома пробірками, щоб підкреслити область контакту з культуральним середовищем; такий поділ призводить до навантаження на роботу. Іншим слабким місцем є невелика частина отриманих сперматозоїдів; максимум 10% [36] загальної популяції сперматозоїдів стає доступним для подальшого використання. Якщо зразки не центрифугувати обережно, багато рухомих клітин із гранул потенційно можуть закріпитися на дні пробірки та ніколи не досягти шару культурального середовища.

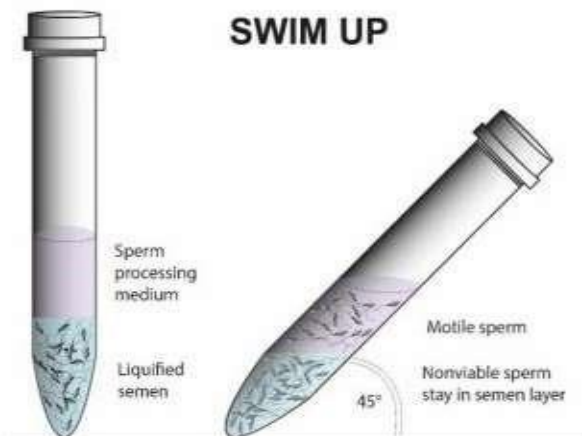


Рисунок 1.1. Схематичне зображення центрифугування з підпливом угору (swim-up).

2) Центрифугування на градієнті густини - Density Gradient Centrifugation (DGC)

У DGC [37] (рис.1.2.) сперматозоїди поміщають на безперервний або преривчастий градієнт густини, а потім центрифугують. Відокремлення відбувається як функція

густини та рухливості; найшвидше сперматозоїди мігруватимуть на дно трубки.

Якщо залишити поверх розчину з більшою густиною зразок, центрифугують приблизно півгодини. Усі сперматозоїди проходять через градієнти, але рухливі сперматозоїди енергійно плавають, а не залишаються під дією кінетики центрифугування. Швидші сперматозоїди утворюють шовковисту гранулу на дні трубки, тоді як нерухомі клітини та залишки залишаються між градієнтами.

Речовина, яка використовується для створення градієнтів, повинна бути не токсичною для сперматозоїдів і стабільною в розчині, щоб уникнути будь яких змін рН або осмолярності.

Зокрема, ми знаходимо гідрофільні органічні молекули, такі як сахароза або сополімери сахарози (Ficoll) [38], які менш токсичні, ніж змішані сполуки, такі як колоїдний кремнезем, покритий полівінілпіролідом (Percoll), що зменшує негативний вплив на сперматозоїди [39]. Цей метод дозволяє виділяти рухливі сперматозоїди навіть із зразка з низькою рухливістю сперматозоїдів. Однак параметри морфології та моторики значно відрізняються в різних дослідженнях у літературі. Причиною такого зміщення можуть бути різні початкові умови, такі як концентрація, об'єм, кількість шарів, застосована сила перевантаження та час центрифугування. Крім того, техніка займає більше часу. DGC малопродуктивний, коли в'язкість сперми змінюється, і він виробляє більшу кількість АФК через механічне навантаження, спричинене центрифугуванням. Коли зразки надмірно концентровані, кластери різних типів клітин перешкоджають руху через градієнти. На жаль, центрифугування в градієнті густини навіть дорожче, ніж класичний підплив угору [36].

Центрифугування, пов'язане з обома методами, може призвести до збільшення АФК, шкідливого для ядерного матеріалу сперматозоїдів [40]. Використовуючи обидва методи в поєднанні, можна отримати кращі результати у відділенні сперматозоїдів з пошкодженою ДНК, видаляючи їх з решти зразка [41].

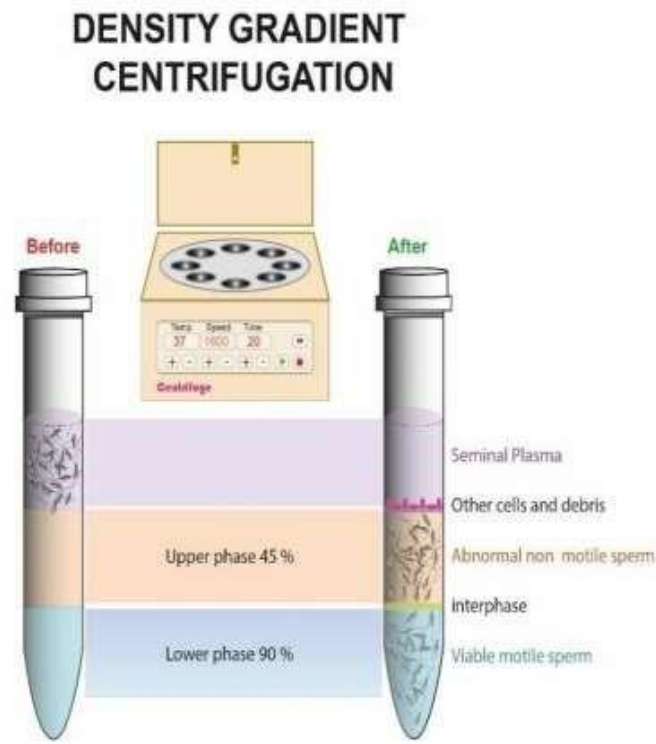


Рисунок 1.2. Схематичне зображення центрифугування з градієнтом густини (DGC).

1.2. Вплив рН

1.2.1. Загальні принципи рН та його важливість у біологічному контексті.

Усі біофізіологічні події у клітинах, пов'язані з ферментами, гормонами та факторами росту, залежать від рН. Будь-яка зміна рН призводить або до пригнічення функції або відхилення функції клітини. Біологічні макромолекули еволюціонували, щоб виконувати свої функції в конкретному клітинному середовищі, і їхня залежність активності та стабільності відображає значення рН. Протон (і його еквівалент) відіграє вирішальну роль у функціонуванні клітин еукаріотів, оскільки всі білки залежать від рН для підтримки своєї структури та функцій. Поряд з цим кожна окрема органела в клітині здатна виконувати функцію встановлення градієнта рН [42].

В непостійному хімічному середовищі сперматозоїдів насіннєва плазма може глибоко впливати на якість сперми, а рН є одним з найбільш важливих факторів, що визначають якість сперми. На сперматозоїди сильно впливає кислотність середовища. Такі функції, як рухливість, життєздатність, концентрація та акросомна реакція залежать від рН. Під час подорожі як чоловічими, так і жіночими статевими шляхами сперматозоїди демонструють точну регуляцію протонного градієнта і, таким чином, регулювання внутрішньоклітинного рН. Дослідження показали відхилення/порушення функцій сперматозоїдів за високого/низького рН, що вказує на існування динамічної системи регуляції рН у сперматозоїдах [43].

1.2.2. Механізми регулювання рН.

Попередні дослідження показали, що сперматозоїди ссавців мають складні механізми регулювання внутрішньоклітинного рН (рис. 1.3.). Наявність протон-залежного каналу у сперматозоїдів виявлено за рівнем іона H^+ у регуляції стандартних параметрів сперматозоїдів [44]. Точна регуляція потоку H^+ регулює внутрішньоклітинний рН сперматозоїдів, а також зв'язується з іншими іонами для регулювання рН. Наявність системи HCO_3^- дає уявлення про простий режим

регулювання рН [45]. Також очевидно, що рух сперматозоїдів від сім'яника до придатка яєчка в чоловічих та жіночих репродуктивних шляхах стикається з різним рН середовища (як вважалося раніше), але сперматозоїди продовжують зберігати позицію запліднення [44]. Цей фон дає динамічну основу регуляції рН у сперматозоїдах. Цитоплазматичний рН сперми може впливати на зовнішній рН сперми за допомогою вбудованого регуляторного механізму. Внутрішньоклітинний рН сперматозоїдів забезпечує лінійний зв'язок із позаклітинним рН, також внутрішньоклітинний рН регулює іонну регуляцію вздовж мембран сперматозоїдів [46].

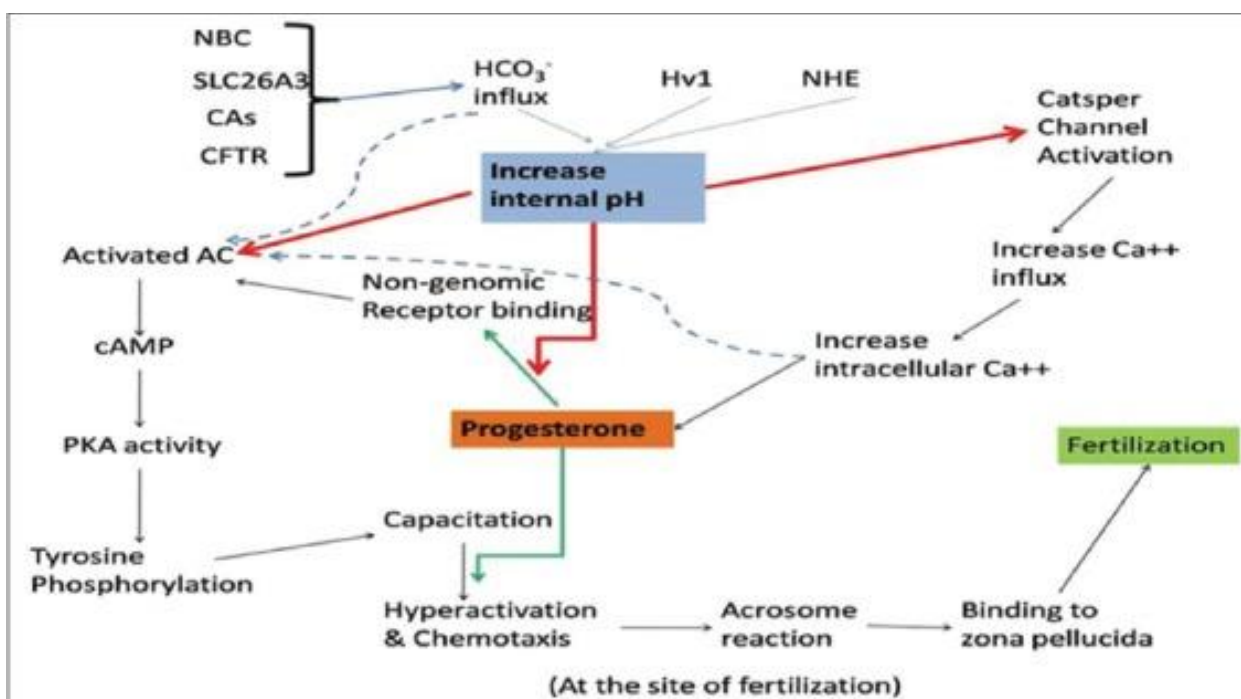


Рисунок 1.3. Схематичне уявлення про регуляцію рН та динамічні сигнальні шляхи в сперматозоїдах савців.

Відповідний внутрішньоклітинний рН необхідний для функціонування сперматозоїдів та досягнення успішного запліднення. Регуляція притоку H⁺ здійснюється припливом HCO₃⁻. Потенціал-керований протонний канал, котранспорт Na⁺/H⁺-обмінника Na⁺/HCO₃⁻ та обмінник Cl⁻/HCO₃⁻, відповідальні за приплив HCO₃⁻, тому Na⁺ і Cl⁻ непрямо беруть участь у регуляції рН. Гормон прогестерон зв'язується з негеномним рецептором та залежить від рН. При припливі HCO₃⁻ та Ca²⁺ активується ферменторозчинна аденілатциклаза, що призводить до збільшення

утворення циклічного аденозин-3',5'-монофосфату та подальшого збільшення активності протеїнкінази А (ПКА). Підвищена активність ПКА призводить до фосфорилування тирозинвмісного білка на сперматозоїдах, який відіграє ключову роль в капацитації та гіперактивації. Зрештою ці події опосередковують взаємодію сперматозоїдів з яйцеклітиною, що призводить до запліднення.

1.2.3. Важливість збереження кислотності середовища при підготовці та тривалому зберіганні сперми.

Збереження сперматозоїдів людини *in vitro* зі збереженням їх функцій і фертильності протягом одного або кількох днів відіграє важливу роль у репродуктивній біології та медицині. Однак добре відомо, що людські сперматозоїди, залишені *in vitro*, з часом незворотно руйнуються внаслідок різноманітних стресів, таких як зміна рН, осмолярності, дефіциту енергії та окислювального пошкодження (рис.1.4.), що призводить до суттєвих обмежень, включаючи необхідність дослідження сперми, збереження фертильності, та допоміжних репродуктивних технологій. Ці проблеми можна вирішити за допомогою методів зберігання без заморожування. Основними та найефективнішими стратегіями збереження є часткова або повна заміна насіннєвої плазми культуральним середовищем. Штучне середовище сперми складається з буферів, осмолітів, антиоксидантів тощо для захисту сперматозоїдів від вищезгаданих несприятливих факторів [47-52].

1) У випадку розведення тварин, таких як жеребці та кабани, транспортування або короткочасне зберігання їхньої сперми перед ДРТ є надзвичайно важливим для їхніх генетичних потреб. Більшість цих процесів може бути завершено протягом 72 годин, тому зберігання сперматозоїдів у рідині вже давно широко використовується в ДРТ для худоби. Під час зберігання *in vitro* їм потрібні методи зберігання в рідині, щоб захистити сперму від швидкого псування [53].

2) Для чоловіків, які можуть бути не в змозі доставити сперму до клініки через відокремлення, труднощі з еякуляцією або олігоастензооспермію, вони можуть зберегти свою сперму в рідкому стані за кілька днів до перевірки або допоміжного запліднення, уникаючи пошкоджень сперми після заморожування та спрощуючи процедури обробки сперми, що забезпечує більшу гнучкість визначення часу проведення ДРТ. Можливість тривалого зберігання людської сперми без заморожування також може призвести до змін у донорстві сперми. Через те, що аналіз сперми є єдиним етапом скринінгового процесу, чоловіки, які планують пожертвувати сперму, повинні відвідати банк сперми, щоб пройти всі етапи скринінгу, такі як медичне обстеження та генетичні тести. Тим не менш, чоловіки, які є донорами сперми, можуть надіслати зразки сперми замість того, щоб записуватися на кілька разів в банк, щоб надати достатню кількість зразків сперми, скориставшись перевагами технології зберігання без заморожування. Це може залучити донорів сперми з віддалених місць [54].

3) Тривале зберігання сперматозоїдів у рідині *in vitro* також є необхідною частиною маніпуляцій ЕКЗ. Сперматозоїди підлягають багатьом лабораторним втручанням під час процедури ЕКЗ. Спочатку з усієї сперми необхідно відібрати сперматозоїди з більшою рухливістю та кращою морфологією. Найбільш використовуваними методами відбору сперматозоїдів є метод підпливу та центрифугування через градієнти густини колоїдних частинок кремнезему (DGC). Обидва способи займають багато часу [55]. Дослідження також показали, що ці методи підготовки сперми можуть призвести до фрагментації ДНК [56]. Деякі вдосконалені методи відбору сперматозоїдів, розроблені в останні роки, такі як магнітне сортування клітин (MACS) з кон'югованими кульками анексіну V та інтрацитоплазматична морфологічно відібрана ін'єкція сперматозоїдів (IMSI), потребують більш тривалого культурального часу або обробки, збільшуючи ризик окислювального стресу та подальшого пошкодження ДНК. ICSI, особливо процедури IMSI, швидше за все, займуть додатковий час. По-друге, сперматозоїди можуть інкубуватися протягом тривалого часу в очікуванні процедури інсемінації [57]. Цілі маніпуляції *in vitro* можуть тривати кілька годин, піддаючи сперму багатьом

екзогенним фізичним і хімічним факторам. Ці істотно відрізняється від природного процесу зачаття, включаючи зміну температури, рН, O₂, центрифугування, вплив видимого світла під мікроскопом і, очевидно, тривале зберігання в культуральних середовищах *in vitro*.

4) Пацієнтам з онкологічними захворюваннями настійно рекомендується зберігати свою сперму перед хіміотерапією або променевою терапією, яка може призвести до постійного безпліддя [58]. Крім того, для чоловіків, які займаються роботами з підвищеним ризиком, або навіть для звичайного чоловічого населення, «страхування фертильності» також користується попитом. На сьогоднішній день кріоконсервація є єдиним методом тривалого зберігання сперматозоїдів людини. Однак сперму необхідно заморозити відразу після еякуляції, щоб запобігти її погіршенню. У той же час процес заморожування вимагає спеціального ультранизкотемпературного обладнання, а заморожений зразок сперми повинен зберігатися в акредитованих установах для зберігання сперми. Таким чином, чоловіки, які потребують збереження фертильності, повинні прийти до закладу для збору сперми, який є лише у великих містах. Суворі умови серйозно обмежують їх доступність для тих, хто живе у віддалених місцях, або людей з обмеженими можливостями пересування, що є проблемою для успішного догляду за фертильністю. Розвиток технології зберігання рідини дозволяє більш гнучко вибирати час і місця отримання сперми, наприклад, збирати сперму вдома і доставляти її в установу для кріоконсервації. Протягом цього періоду часу зразки сперми могли зберігати свій потенціал фертильності та досягати порівнянної ефективності після розморожування після відстроченого кріоконсервування, таким чином значно полегшуючи доступність догляду за збереженням чоловічої фертильності [59].

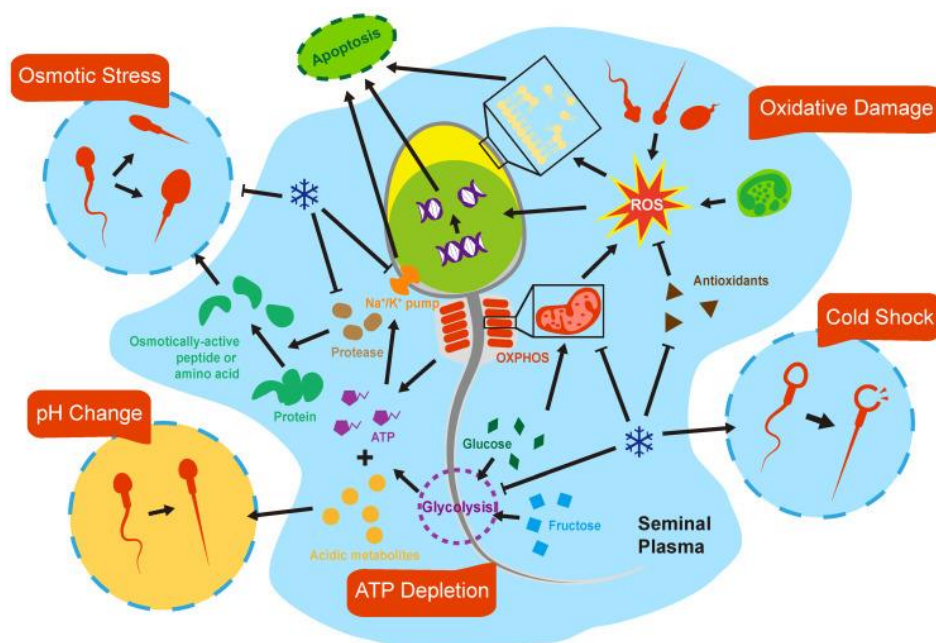


Рисунок 1.4. Біологічний механізм пошкодження сперматозоїдів.

Сперматозоїди піддаються різноманітним стресам, що ставить під загрозу їх тривалість життя.

1.2.4. рН і осмолярність.

Забезпечення та підтримка оптимальних культуральних середовищ є фундаментальними для довговічності сперми під час зберігання в рідкому стані. Два фактори стресу навколишнього середовища, які були визначені як дуже важливі, це рН і осмолярність. Після виведення з організму сперматозоїди можуть піддаватися рН і осмолярності, які значно відрізняються від фізіологічного середовища, що шкодить їхньому життю після еякуляції. рН і осмолярність сперми значною мірою залежать від двох факторів: її індивідуальних особливостей і тривалості часу після еякуляції. Порівняно з ооцитами та ембріонами сперматозоїди мають незначну здатність підтримувати стабільність внутрішньоклітинного рН [60,61]. Навпаки, сперма має майже найвищу буферну ємність серед інших тілесних рідин, в основному похідних від $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$, цитрату та білка в сім'яній плазмі [62].

1) Осмолярність сперми людини різна в окремих людей і залежить від факторів, властивих кожному зразку сперми [63]. Осмолярність сперми в основному визначається цукрами, білками, малими органічними молекулами та концентрацією

іонних солей у насінній плазмі [64]. Розумно, що ненормальна осмоляльність людської сперми призведе до змін сперматозоїдів під час перебування в еякуляті, створюючи ризики осмотичного пошкодження. Щоб протидіяти цьому, сперматозоїди мають здатність ефективно регулювати свій об'єм за допомогою витоку або припливу осмолітів, представлених у клітинній або насінній плазмі, щоб стимулювати рух води, який регулює об'єм клітини. Тим не менш, сперматозоїди вразливі до осмотичного стресу *in vitro*, і як занадто висока, так і занадто низька осмолярність сперми є шкідливими для параметрів сперми [65]. Враховуючи можливу ключову впливову роль осмолярності, вчені розробили багато методів, які допомагають стабілізувати осмолярність при тривалому зберіганні, наприклад, зниження температури зберігання, додавання неорганічних або органічних осмолітів та інгібіторів ферментів. Однак раннє розведення сперми ізотонічними буферами досі вважається найбільш ефективним і зручним способом стабілізації осмолярності під час зберігання рідини [66].

2) Зміна рН у культуральному середовищі, в якому містяться сперматозоїди, може мати значний вплив на їх здоров'я та функціонування. Сперма дуже чутлива до навколишнього середовища, і рН є вирішальним фактором. Ось що може статися, коли в такому середовищі змінюється рН:

1. Змінена рухливість сперми:

Рухливість сперматозоїдів, або здатність до ефективного пересування, сильно залежить від рН навколишнього середовища. Оптимальний рН необхідний для максимальної рухливості.

2. Вплив на морфологію сперми:

Аномальний рівень рН може вплинути на структуру сперми. Наприклад, екстремальні рівні рН можуть призвести до морфологічних дефектів у голівці або хвості сперматозоїда, що може зменшити здатність сперматозоїдів запліднити яйцеклітину.

3. Знижена життєздатність сперми:

Життєздатність сперматозоїдів означає частку живих здорових сперматозоїдів у зразку. Відхилення від оптимального діапазону рН можуть поставити під загрозу життєздатність сперми, збільшуючи відсоток мертвих або вмираючих сперматозоїдів.

4. Капацитація та акросомна реакція:

Капацитація - це процес, який проходить сперматозоїд, щоб отримати здатність запліднити яйцеклітину. Цей процес і наступна акросомна реакція (вивільнення ферментів з головки сперматозоїда) є рН-чутливими. Невідповідний рН може порушити ці важливі етапи, перешкоджаючи здатності сперми до запліднення.

5. Цілісність ДНК:

Екстремальні умови рН можуть спричинити окислювальний стрес або інші клітинні стреси, які можуть пошкодити ДНК сперми. Це може мати наслідки для генетичної якості сперми та потенційного здоров'я ембріона.

6. Метаболічні процеси:

Метаболізм сперматозоїдів, включаючи виробництво енергії, необхідної для рухливості та виживання, може порушуватися зміною рН. Наприклад, більш кисле середовище може пригнічувати метаболічні шляхи, що призводить до зниження доступності енергії для сперми.

7. Наслідки для допоміжних репродуктивних технологій:

У контексті ЕКЗ або інших методів лікування фертильності підтримка правильного рН середовища для зберігання та підготовки сперми має вирішальне значення. Зміни рН можуть вплинути на успішність цих процедур, впливаючи на якість і функцію сперми [67].

Зниження рН сперми може мати місце при таких захворюваннях, як ретроградна еякуляція або обструкція насіннєвих пухирців [68]. Ці типи аномальної насінної плазми, очевидно, на початку є некваліфікованим середовищем для сперматозоїдів [69]. Цікаво, що позаклітинна лужність може відновити рухливість сперматозоїдів після деякого перебування в умовах низького рН або тривалого холодного зберігання в розчині без електролітів [70]. Тому необхідно вводити буферні речовини, які сприяють стабілізації рН протягом усього періоду зберігання рідини, що є критичним для збереження життєздатності сперматозоїдів і здатності до запліднення.

1.3. Вплив кофеїну

1.3.1. Загальна фізіологія та біохімія сперматозоїдів.

Рухливість сперматозоїдів – унікальна характеристика фізіології сперматозоїдів, необхідна для запліднення яйцеклітини. Придбання, підтримка та модуляція рухливості необхідні для чоловічої фертильності. Перші кроки ініціації рухливості розрізняються у багатоклітинних тварин і суворо корелюють із середовищем, у якому відбувається запліднення [71,72].

Рухливість сперматозоїдів пов'язана з активацією сигнальних шляхів, що запускають рух. Ці шляхи переважно залежать від Ca^{2+} , який діє як вторинний посередник. Підтримка адекватної концентрації Ca^{2+} можлива завдяки правильній концентрації інших іонів, таких як K^{+} та Na^{+} , які модулюють потенціал плазматичної мембрани та внутрішньоклітинний рН. Як і в кожній клітині, іонний гомеостаз у сперматозоїдах забезпечується широким спектром іонних каналів, що підтримуються роботою іонних насосів та транспортерів. Щоб досягти успіху в заплідненні, іонні канали сперматозоїдів повинні бути чутливі до різних зовнішніх та внутрішніх факторів. Ця чутливість забезпечується специфічними каналними структурами. Примітно, що найбільш значущим іонним каналом сперматозоїдів є катіонний канал сперматозоїдів (CatSper), який є специфічним для сперматозоїдів Ca^{2+} -канал, необхідний для гіперактивації рухливості сперматозоїдів. Роль інших іонних каналів у сперматозоїдах, таких як потенціал-керовані Ca^{2+} -канали (VGCCs), Ca^{2+} -активовані Cl-канали (CaCCs), SLO K^{+} -канали або потенціал-керовані H^{+} -канали (VGHCs), полягає у забезпеченні активації та модуляції CatSper.

У ссавців, які мають запліднення внутрішнє, сперматозоїди активуються під час проходження через придаток яєчка [73], і після еякуляції більшість популяції сперматозоїдів рухлива. Індукція рухливості придатків яєчка пов'язана з поступовим переходом від фосфатазної до кіназної активності та, отже, з поступовим фосфорилуванням білків. Цей основний тип рухливості характеризується малоамплітудними симетричними рухами хвоста, які забезпечують лінійну рухливість сперматозоїдів; однак, щоб забезпечити успішне запліднення,

сперматозоїди мають стати гіперактивованими після потрапляння до матки. При гіперактивації биття джгутиків сперматозоїдів стає більш інтенсивним, що дозволяє сперматозоїдам проникнути в щільний слиз, відірватися від епітелію яйцеводи та досягти яйцеклітини [74]. Гіперактивація є частиною капацитації сперматозоїдів, яка включає ряд фізіологічних змін, які дозволяють сперматозоїдам запліднювати яйцеклітину [75].

Незважаючи на різні місця та способи запліднення, активація та підтримання рухливості сперматозоїдів у всіх тварин залежить від мембранного потенціалу (V_m), внутрішньоклітинного рН (pH_i) та правильного балансу внутрішньоклітинних іонів. Всі ці фактори тісно взаємопов'язані, і їхня ефективна співпраця забезпечує клітинні сигнали, необхідні для достатньої рухливості сперматозоїдів. Серед усіх іонів, що беруть участь у рухливості сперматозоїдів, найважливішим є Ca^{2+} . Низькі внутрішньоклітинні Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) концентрації (10-40 нМ) викликають симетричне биття джгутика, тоді як більш високі концентрації (100-300 нМ) викликають гіперактивацію сперматозоїдів. Тим не менш, дуже високі концентрації $[Ca^{2+}]_i$ (близько 9 мкМ) пригнічують рухливість. У сперматозоїдах $[Ca^{2+}]_i$ грає роль вторинного месенджера, що бере участь у активації сигнальних шляхів, що регулюють рухливість сперматозоїдів. Одним з них є активація розчинних аденіліциклаз (sAC), які генерують більшу частину циклічного аденозинмонофосфату (сAMP) у сперматозоїдах. Циклічний АМР активує серин/треонінову протеїнкіназу А(РКА), яка запускає каскад подій фосфорилювання білків, що призводять до індукції сперматозоїдної рухливості [76].

Високі концентрації $[Ca^{2+}]_i$, необхідні для гіперактивації, забезпечуються лужним внутрішньоклітинним середовищем [77]. Лужний рНі активує спеціалізовані канали Ca^{2+} (CatSper) та підвищує активність sAC. Примітно, що активація шляху sAC/сAMP/РКА стимулює протеїнтирозинкінази (PTKs), які фосфорилюють тирозин на джгутикових білках, пов'язаних із рухливістю сперматозоїдів [78,79]. Крім того, лужні рівні рНі необхідні динеїнам, які утворюють периферичні дублети аксонем та виявляють АТФазну активність [74,75,76,80,81]. Крім регуляції активності sAC, рНі та V_m регулюють іонні канали, що забезпечують іонний гомеостаз. У сперматозоїдах цей гомеостаз необхідно модулювати, щоб забезпечити рухливість сперматозоїдів та

успішне запліднення. Підтримка належного рівня $[Ca^{2+}]$ і можлива завдяки часовій взаємодії іонних каналів, транспортерів та насосів уздовж мембрани сперматозоїдів. Активність та чутливість цих структур безпосередньо зумовлені їхньою топологією, яка дозволяє їм ефективно реагувати на сигнали зовнішнього та внутрішнього середовища, з якими стикаються сперматозоїди.

1.3.2. Роль кофеїну у біологічних системах.

В даний час кофеїн є одним з найчастіше споживаних речовин, присутнім у багатьох рослинах та продуктах. Він надає як позитивний, так і негативний вплив на організм людини, причому його активність зачіпає різні системи, включаючи центральну нервову систему, імунну систему, травну систему, репродуктивну систему, дихальну систему, сечовивідні шляхи і т.д.

Кофеїн (1,3,7-триметилксантин або 3,7-дигідро-1,3,7-триметил-1H-пурин-2,6-діон)(рис.1.5.), відомий пуриновий алкалоїд, був описаний Дженнаро [82] як білий порошок без запаху з трохи гіркуватим смаком. Його хімічна формула $C_8H_{10}N_4O_2$. Кофеїн зустрічається більш ніж у 60 видах рослин у всьому світі [83]. Цю речовину отримують екстракцією із зелених кавових зерен, листів чаю та горіхів коли, а також синтетичними методами (наприклад, метилюванням різних ксантинів та теофіліну) [82].

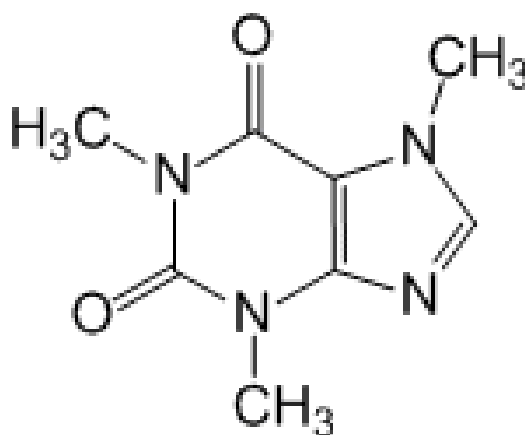


Рисунок 1.5. Структурна формула кофеїну.

Метаболізм кофеїну

В організмі людини кофеїн швидко всмоктується в тонкому кишечнику після перорального введення в організм протягом 45 хв, яке середнє пікове значення припадає на 30 хв [84], що безпосередньо залежить від рН [82] і може продовжуватися при прийомі їжі. [85]. Його метаболічний період напіввиведення становить 3-5 годин [86], і він легко проникає через гематоенцефалічний бар'єр [85]. Перший етап біотрансформації кофеїну опосередковується мікросомальними ферментами печінки - селективний каталіз цитохрому Р450РА в мікросомах печінки людини [82]. Кофеїн метаболізується переважно у печінці (рис.1.6.) за допомогою ізоферменту СYP1A2 (близько 80%), що спричиняє його 3-деметилування до основного метаболіту – 1,7-диметилксантину (параксантину). Більше того, кофеїн сам по собі може підвищувати активність СYP1A2, і цей ізофермент також відповідає за 1- та 7-деметилування кофеїну до 3,7-диметилксантину (теоброміну) та 1,3-диметилксантину (теофіліну), як показано в рис.2.2. Ці метаболіти можуть бути далі первинно деметильовані за допомогою СYP1A2, потім ацетильовані за допомогою N-ацетилтрансферази 2 і окислені за допомогою ксантиноксидази або СYP3A4 з утворенням основних метаболітів, які виводяться переважно з сечею, включаючи 1-метилсечову кислоту, 5-ацетиламіно-6-форміламіно-3-метилурацил, 1-метилксантин (наприклад, після подальшого деметилування параксантину за допомогою СYP1A2), 1,7-диметилмурова кислота та 1,7-диметилксантин (параксантин) [87]. Невеликий відсоток (0,5–4,0%) прийнятої дози кофеїну виводиться у незміненому вигляді із сечею та жовчю, а також виявляється у слині, спермі та грудному молоці [82].

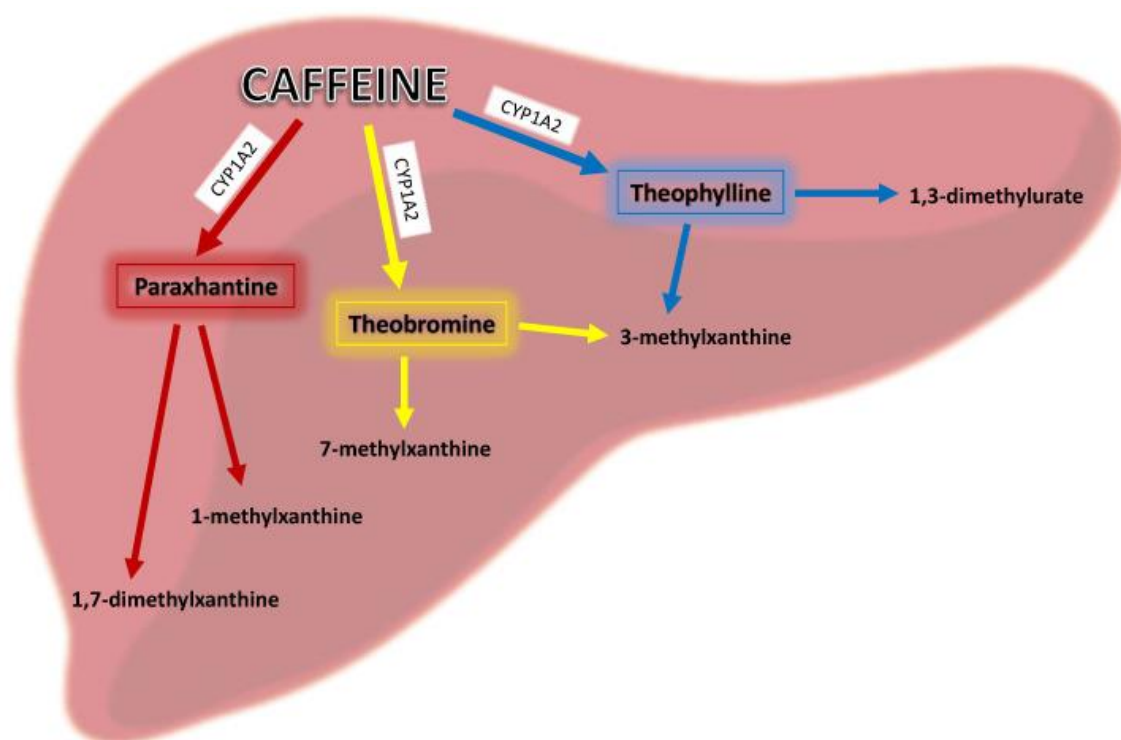


Рисунок 1.6. Основні шляхи метаболізму кофеїну у печінці.

Вплив на рецептори

Кофеїн викликає більшу частину своїх біологічних ефектів за рахунок антагонізму всіх типів аденозинових рецепторів (ARs): A1R, A2AR, A2BR та A3R [88]. Блокада аденозинових рецепторів спостерігається при низьких концентраціях кофеїну (<250 мкМ) [89]. Кофеїн також є агоністом ріанодинових рецепторів (RyRs), стимуляція яких збільшує вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулу (ER), та неселективним конкурентним інгібітором фосфодіестерази (PDEs), ферментів, що розщеплюють циклічний аденозинмонофосфат (сAMP), що призводить до збільшення концентрації сAMP у клітині, але ефект дії кофеїну зі стимуляцією RyRs та блокадою PDEs можливий лише при більш високих дозах (концентрація плазми крові 100 мкМ для RyRs та 2000 мг прийому кофеїну для PDEs) [90].

Кофеїн та мобілізація кальцію

Найраніший запропонований механізм дії кофеїну включав мобілізацію внутрішньоклітинного кальцію. Деякі дії кофеїну на організм пов'язані з іонним кальцієм (Ca^{2+}). Було виявлено, що кофеїн у високих концентраціях перешкоджає

захопленню та зберіганню кальцію в саркоплазматичному ретикулумі поперечносмугастих м'язів і збільшує транслокацію Ca^{2+} через плазматичну мембрану. Кофеїн також може підвищувати чутливість міофіламентів до Ca^{2+} за рахунок його зв'язування з ріанодиновими рецепторами у кальцієвих каналах м'язів та мозку.

Хоча було показано, що кофеїн вивільняє кальцій із внутрішньоклітинних запасів (саркоплазматичної мережі) у скелетних та серцевих м'язах, порогова концентрація, необхідна *in vitro* для спостереження цього ефекту (250 мкМ), суттєво вища, ніж концентрації, необхідні *in vivo* для стимуляції серця (50 мкМ). Отже, ця субклітинна дія кофеїну, ймовірно, не має фізіологічного значення (хоча, можливо, вона може мати значення при токсичних концентраціях кофеїну).

Авторами Ricci та ін. (2017) було розглянуто результати 28 досліджень, що охоплюють 19,967 чоловіків, для оцінки взаємозв'язку споживання кофеїну та різних показників чоловічої фертильності, включаючи якість сперми та цілісність ДНК сперматозоїдів. Більшість досліджень не виявили значного впливу вживання кофеїну на параметри сперми, такі як об'єм, концентрація та рухливість сперматозоїдів. Однак, вживання напоїв, таких як кола, пов'язане зі зниженням обсягу та концентрації сперми.

Однак, Nabavi et al. (2013) використовували мишачі сперматозоїди, оброблені кофеїном у культуральних середовищах T6 та M16, для оцінки їх рухливості та життєздатності, а також для вивчення ймовірностей запліднення в лабораторних умовах.

Рухливість та життєздатність сперматозоїдів: додавання кофеїну в середовище T6 значно покращило рухливість (81.7%) та життєздатність (88.7%) сперматозоїдів порівняно з контрольною групою без кофеїну. Ставки запліднення: У середовищі T6 з кофеїном відсоток запліднених ооцитів становив 67.52%, що значно вище, ніж у контрольній групі.

Дані наголошують, що кофеїн може бути використаний як добавка в середовище для запліднення для підвищення рухливості та життєздатності сперматозоїдів, що, у свою чергу, може покращувати результати запліднення *in vitro*.

Однак, ефективність кофеїну може змінюватись в залежності від середовища, що демонструє важливість вибору оптимальних умов для культури сперматозоїдів та яйцеклітин. Дослідження Nabavi et al. (2013) підтверджує потенціал використання кофеїну як стимулюючого агента для покращення рухливості та життєздатності сперматозоїдів, що може суттєво підвищити ставки запліднення у лабораторних умовах.

1.4. Методи мікроскопічного дослідження еякуляту.

Тривале зберігання людської сперми без заморожування може сприяти проведенню андрологічних лабораторних досліджень. Безпліддям страждають приблизно 15% пар, причому приблизно у половині випадків відповідальні чоловічі чинники[91]. Причини чоловічої безплідності різноманітні, і все більш затребуваними стають поглиблені та комплексні дослідження сперми. Зразки сперми відрізняються від інших рідин організму, таких як кров або мокротиння, оскільки їх необхідно досліджувати негайно, зазвичай, протягом 1 години, інакше деякі з основних параметрів сперми знизяться [92].

1.4.1. Визначення концентрації сперматозоїдів за допомогою камери Маклера.

Підрахунок кількості сперматозоїдів у насінній рідині – найважливіший компонент базового аналізу сперми. Концентрація сперматозоїдів – кількість сперматозоїдів на одиницю об'єму насінневої рідини. Зазвичай цей показник виражають у мільйонах сперматозоїдів на мілілітр (млн/мл).

Лічильна камера Маклера – спеціальний прилад, розроблений для швидкого аналізу сперми. З моменту винаходу в 1980 р. лічильна камера Маклера набула широкого поширення і використовується тепер у багатьох лабораторіях. Головна перевага камери Маклера - відсутність необхідності розбавляти зразок сперми (за винятком випадків вкрай високої концентрації). Крім того, рухливість та прогресивно-поступальний рух можна оцінювати під час обчислення концентрації сперматозоїдів.

Камера складається з двох частин:

1. Нижня частина має металеву основу та дві ручки. У центрі основи знаходиться плоский диск із тонкого оптичного скла, на який міститься зразок.
2. Верхня поверхня є покривне скло, оточене металевим кільцем. У центрі верхньої частини знаходиться сітка, розділена на 100 квадратів.

Коли покривне скло міститься на чотири наконечники, простір, обмежений поруч із 10 квадратів, становить рівно одну мільйонну мл. Отже, кількість головок сперматозоїдів у цих квадратах вказує концентрацію в мільйонів/мл.

Виділяють чотири категорії сперматозоїдів:

- категорія А - сперматозоїди зі швидким прогресуючим рухом;
- категорія В - повільні або інертні сперматозоїди;
- категорія С - сперматозоїди з непрогресуючим рухом;
- категорія D - нерухомі сперматозоїди.

Для визначення рухливості сперматозоїдів необхідно обчислити пропорції (%) чотирьох категорій рухливості [93].

1.4.2. Визначення життєздатності сперматозоїдів.

Життєздатність сперматозоїдів, оцінена шляхом оцінки цілісності мембрани клітин, може бути визначена рутинно на всіх еякулятах, але не є обов'язковою, якщо принаймні 40% сперматозоїдів рухливі. У зразках із поганою рухливістю тест на життєздатність важливий для розрізнення нерухомих мертвих сперматозоїдів від нерухомих живих сперматозоїдів.

Відсоток живих сперматозоїдів оцінюють шляхом виявлення сперматозоїдів з непошкодженою клітинною мембраною, виключенням барвника (мертві клітини мають пошкоджені плазматичні мембрани, які дозволяють входити непроникним для мембрани фарбам). Рекомендованим діагностичним тестом є еозиновий або еозин-нігрозиновий тест.

1.4.3. Визначення морфології сперматозоїдів.

Цінність оцінки морфології сперматозоїдів людини полягає не лише в обмеженій прогностичній цінності щодо спонтанної вагітності або результату ДРТ, але ще більше в діагностичній інформації про функціональний стан чоловічих

репродуктивних органів. Для оцінки чоловічих репродуктивних органів недостатньо лише визначити частку «нормальних» сперматозоїдів.

Важливо оцінити специфічну морфологію голови, ший/середини та хвоста, а також можливу присутність аномальних цитоплазматичних залишків.

За допомогою суворого застосування певних критеріїв морфології сперматозоїдів було встановлено зв'язок між відсотком «нормальних» форм і різними кінцевими точками фертильності (частота вагітності *in vivo* та *in vitro*) [94-100], що може бути корисним для прогнозу фертильності.

2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Реактиви та обладнання.

- 1) Світловий оптичний мікроскоп (зі збільшенням у 20 разів та зі збільшенням у 1000 разів з імерсійним маслом);
- 2) Центрифуга для обробки проб сперми (biohazard);
- 3) Аналітичні ваги;
- 4) рН-метр з комбінованим електродом із водневою функцією;
- 5) Магнітна мішалка чи скляна паличка для перемішування;
- 6) Мірна колба 100 мл;
- 7) Піпетки на 1 мл та 3 мл;
- 8) Мікропіпетки різного об'єму;
- 9) Градієнт густини (стерильна колоїдна суспензія частинок кремнію, стабілізованих ковалентним зв'язком з гідрофільним силаном);
- 10) Культуральний розчин для промивки сперми;
- 11) Культуральні розчини для сперми з рН 5,2, 6,2, 7,2 і 8,2;
- 12) Кофеїн безводний;
- 13) ЕА-50;
- 14) Помаранчевий G6;
- 15) Гематоксилін Гарріса без оцтової кислоти;
- 16) Замінник водопровідної води Скотта;
- 17) Кислий розчин етанолу;
- 18) Еозин Y.

Для приготування розчинів використовували дистильовану воду та реактиви кваліфікації х.ч.

2.2. Методики дослідження.

2.2.1. Дослідження концентрації та рухливості сперматозоїдів.

- 1) Використовуючи піпетку помістити краплю сперми на камеру Маклер;
- 2) Використовуючи мікроскоп із фазово-контрастною оптикою зі збільшенням 200-400х, здійснити підрахунок сперматозоїдів.
- 3) Підрахувати кількість сперматозоїдів у кількох (зазвичай 10) квадратах сітки камери Маклер для визначення концентрації сперматозоїдів в млн/мл.
- 4) Оцінити рухливість сперматозоїдів, записуючи частку загально рухливих (всі рухливі клітини) та прогресивно (прямолінійно) рухливих сперматозоїдів.

2.2.2. Дослідження морфології сперматозоїдів.

Практична оцінка морфології сперми людини складається з наступних етапів:

- 1) Приготування мазка еякуляту на предметному склі;
- 2) Сушіння на повітрі, фіксація та фарбування предметного скла;
- 3) Огляд предметного скла за допомогою світлової оптики при збільшенні у 1000 разів з імерсійним маслом.
- 4) Оцінка приблизно 200 сперматозоїдів, серед яких мінімальний відсоток морфологічно «ідеальних» сперматозоїдів повинен бути не менш 4% (рис.2.1.).

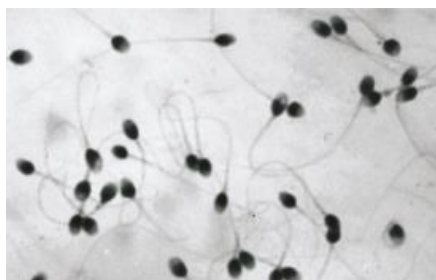


Рисунок 2.1. Морфологічно «ідеальні» сперматозоїди, що пофарбовані за Папаніколау.

Спостерігається дуже мало дефектів на головці сперматозоїда, середній або хвостовій частині.

Етапи фіксації по Папаніколау та фарбування (табл. 2.1.) передбачає наступні кроки:

Таблиця 2.1. Етапи фіксації по Папаніколау та фарбування.

Фіксація				
Etanol		95%	Мінімум 15 хвилин	зафіксувати клітини; це також зневоднює їх
Фарбування				
1	Graded ethanol	80% (Фіксація етанолом викликає дегідратацію клітин. Таким чином, мазки, взяті безпосередньо після етапу фіксації в 95% етанолі, для фарбування можуть знадобитися лише 10 секунд у 80% етанолі, тоді як мазки, які висохли на повітрі після фіксації, повинні залишатися довше (2–3 хвилини) у 50% етанолі.)	30 секунд	поступово регідратувати фіксовані мазки, щоб забезпечити фарбування водорозчинним гематоксиліном
2	Graded ethanol	50%	30 секунд	
3	Purified water		30 секунд	для регідrataції висохлих мазків для водорозчинного фарбування
4	Harris's haematoxylin		4 хвилини	забарвити ядро в синій колір
5	Purified water		30 секунд	для видалення незв'язаного ядерного гематоксиліну
6	Acidic ethanol (додати 1,0 мл концентрованої соляної кислоти до 200 мл 70% етанолу.)		4–8 занурень (Одне занурення відповідає зануренню приблизно на 1 секунду. Почніть з чотирьох занурень; продовжуйте, доки результати не будуть задовільними. Це критично важливий крок, оскільки тривалість знебарвлення різко змінює кінцеву інтенсивність плями. Якщо цей крок пропустити, сперматозоїди та фон будуть темними. Збільшення кількості занурень зробить сперматозоїди та фон тьмянішими.)	для видалення неспецифічно зв'язаного барвника з цитоплазми (знебарвлення)
7	Purified water		30 секунд	для зниження кислотності і повернення синього кольору
8	Running cold tap water		5 хвилин	для ядра; розчин Скотта можна використовувати, якщо водопровідної води недостатньо

9	Ethanol	50%	30 секунд	для зневоднення мазків для фарбування розчинного в етанолі оранжевого кольору G6/EA-50
10	Ethanol	80%	30 секунд	
11	Ethanol	95%	Мінімум 15 хвилин	
12	G-6 orange stain		1 хвилину	забарвлення цитоплазми в рожевий колір
13	Ethanol	95%	30 секунд	
14	Ethanol	95%	30 секунд	
15	Ethanol	95%	30 секунд	
16	EA-50 green stain		1 хвилину	фарбувати цитоплазму і ядерця в рожевий колір
17	Ethanol	95%	30 секунд	
18	Ethanol	95%	30 секунд	
19	Ethanol	100%	15 секунд	поступово зневоднювати пофарбовані мазки, щоб дозволити використовувати розчинні в етанолі розчинники
20	Ethanol	100%	15 секунд	
21	Xylene			дозволити використання розчинників, нерозчинних у етанолі

Примітка: перевірити кислотність очищеної води перед приготуванням різних сортів етанолу. Рівень pH повинен бути 7,0.

2.2.3. Дослідження функціональності (життєздатності) сперматозоїдів.

1. Взяти аліквоту сперми, змішати з рівним об'ємом суспензії еозину або еозину-нігрозину (наприклад, у фарфоровій лунці чи пробірці) і зачекати 30 секунд.
2. Зробити мазок на предметному склі та дати йому висохнути на повітрі.
3. Перевірити відразу після висихання
4. Розглянути предметне скло за допомогою світлопольної оптики при збільшенні $\times 1000$ та масляній імерсії.
5. Підрахувати кількість пофарбованих (мертвих) або незабарвлених (живих) клітин (рис.2.2) за допомогою лабораторного лічильника.
6. Оцінити щонайменше 200 сперматозоїдів, щоб досягти прийнятно низької похибки вибірки [101].

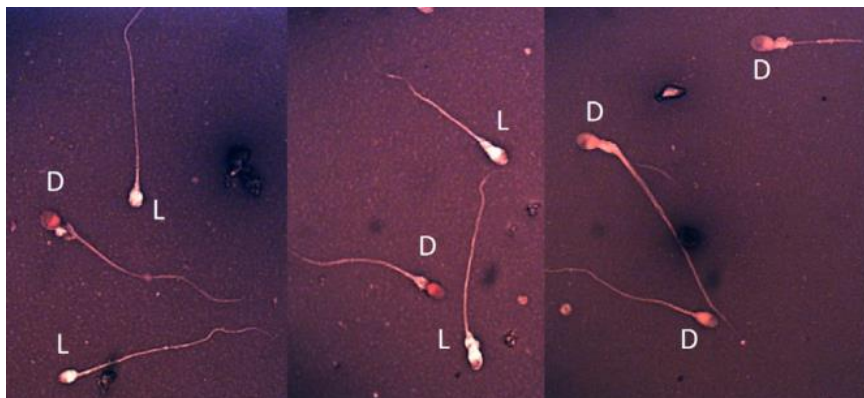


Рисунок 2.2. Еозин-нігрозиновий мазок, спостережуваний у світлопольній оптиці.

Сперматозоїди з червоними або темно-рожевими головками вважаються мертвими (D), тоді як сперматозоїди з білими голівками (L) вважаються живими.

2.2.4. Підготовка сперми до аналізу.

1. Зразки еякують в стерильні контейнери та залишають для розрідження протягом щонайменше 30 хвилин перед обробкою.
2. Для оцінки концентрації та рухливості сперматозоїдів використовується мікроскопічне дослідження за камерою Маклера (рухливість та прогресивно-поступальний рух, що можна оцінити під час обчислення концентрації сперматозоїдів).
3. Практична оцінка морфології сперми людини (для розуміння що чоловіки, що надали зразки мають нормальну якість сперми відповідно до критеріїв Крюгера).
4. Оцінка життєздатності сперматозоїдів.
5. Центрифугування у 60% градієнті густини для видалення насінної плазми, незрілих статевих клітин і епітеліальних клітин.
6. Промивання очищених сперматозоїдів в культуральному розчині для сперми [102,103].
7. Промивання у культуральному розчині для сперми з рН 5,2, 6,2, 7,2 і 8,2.

2.2.5. Методика приготування реактиву ЕА-50:

- Еозин Y (індекс кольору 45380) - 10 г
- Бісмарк коричневий Y (індекс кольору 21000) - 10 г
- Світло-зелений SF, жовтуватий (індекс кольору 42095) - 10 г
- Вода очищена - 300 мл
- Етанол 95% - 2000 мл
- Фосфорновольфрамова кислота - 4 гр
- Насичений водний розчин карбонату літію ($> 1,3$ г/100 мл) - 0,5 мл

Базові розчини

Приготування окремих 10% (100 г/л) розчинів кожної плями таким чином:

1. Розчинити 10 г еозину Y у 100 мл очищеної води.
2. Розчинити 10 г Бісмарка коричневого Y у 100 мл води очищеної.
3. 10 г світло-зеленого SF розчинити в 100 мл води очищеної.

Приготування:

1. Щоб приготувати 2 літри розчину, змішате вищезазначені базові розчини наступним чином:

- 10 мл Бісмарка коричневого Y
- 12,5 мл світло-зеленого SF.

2. Довести до 2000 мл 95% етанолу.
3. Додати 4 г фосфорновольфрамової кислоти.
4. Додати 0,5 мл насиченого розчину літій карбонату.
5. Добре перемішати і зберігати при кімнатній температурі в темно-коричневих щільно закритих пляшках.

Примітка 1: розчин стабільний протягом 2-3 місяців.

Примітка 2: перед використанням пропустити через фільтр 0,45 мкм.

2.2.6. Методика приготування реактиву помаранчевого G6:

- Кристали Orange G (індекс кольору 16230)-10 г
- Вода очищена-100 мл
- 95% (об./об.) етанол-1000 мл

- Фосфорновольфрамової кислоти-0,15 гр

Базовий розчин № 1 (помаранчевий G6, 10% (100 г/л) розчин)

1. Розчинити 10 г помаранчевих кристалів G у 100 мл очищеної води.
2. Добре струсити. Дати постояти в темно-коричневій пляшці або пляшці, покритій алюмінієвою фольгою при кімнатній температурі протягом 1 тижня перед використанням.

Базовий розчин № 2 (помаранчевий G6, 0,5% розчин)

1. До 50 мл вихідного розчину № 1 додати 950 мл 95% (об.) етанолу.
2. Додайте 0,15 г фосфорновольфрамової кислоти.
3. Добре перемішати. Зберігають у пляшках темно-коричневого кольору або закритих алюмінієвою фольгою за кімнатною температурою.

Примітка 1: фільтрувати перед використанням.

Примітка 2: розчин стабільний протягом 2-3 місяців.

2.2.7. Методика приготування реактиву гематоксиліну Гарріса без оцтової кислоти.

- Гематоксилін (темні кристали; індекс кольору 75290)
- 95% (об./об.) етанол
- Додекагідрат сульфату алюмінію амонію ($\text{AlNH}_4(\text{S}_4\text{O}_2) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
- Оксид ртуті (HgO).

Приготування:

1. Розчинити 160 г алюміній сульфату амонію в 1600 мл води очищеної шляхом нагрівання.
2. Розчинити 8 г кристалів гематоксиліну в 80 мл 95% (об.) етанолу.
3. Додати розчин гематоксиліну до розчину алюміній сульфату амонію.
4. Нагріти суміш до 95 °C.
5. Зняти суміш з вогню та повільно додати 6 г оксиду ртуті, перемішуючи.

Примітка: розчин матиме темно-фіолетовий колір.

6. Негайно занурити ємність у ванну з холодною водою.
7. Коли розчин охолоне, процедити.

8. Зберігати в темно-коричневих пляшках або пляшках, покритих алюмінієвою фольгою, при кімнатній температурі.
9. Перед використанням дайте постояти 48 годин.
10. Необхідну кількість розвести рівною кількістю очищеної води.
11. Знову відфільтрувати.

Складові замісники водопровідної води Скотта:

Примітка: розчин Скотта використовується лише тоді, коли звичайної водопровідної води недостатньо для повернення синього кольору ядру; його слід часто змінювати, напр. після змивання 20–25 предметних стекол.

- 3,5 г бікарбонату натрію (NaHCO_3)
- 20,0 г магнеію сульфату гептагідрату ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- Декілька кристалів тимолу (при необхідності як консервант)
- 1000 мл води очищеної.

Складові кислого розчину етанолу:

- 300 мл етанолу 99,5%
- 2,0 мл концентрованої соляної кислоти (HCl)
- 100 мл очищеної води.

2.2.8. Методика приготування реактивів для перевірки життєздатності сперматозоїдів.

1. Еозин Y: розчинити 0,67 г еозину Y (індекс кольору 45380) і 0,9г хлориду натрію (NaCl) у 100 мл очищеної води при слабкому нагріванні.
2. Еозин-нігрозин: до 100 мл розчину еозину Y додати 10 г нігрозину (індекс кольору 50420).
3. Закип'ятити суспензію, потім дати охолонути до кімнатної температури.
4. Відфільтрувати через фільтрувальний папір, щоб видалити грубі та желатинові осади, і зберігати в герметичній пляшці з темного скла.

Складові культурального розчину для промивки сперматозоїдів.

NaCl -670.8 мг;

KCl-35.6 мг;

CaCl₂·2H₂O-147 мг/мл, 171 мкл;

KH₂PO₄-16.3 мг;

MgSO₄·7H₂O-29.3 мг;

NaHCO₄-210.6 мг;

D-glucose-100 мг;

60% Na·lactate-0.37 мл;

HEPES-238 мг;

Penicillin-6 мг, розчинений у 100 мл стерильної води [104].

2.2.9. Методика приготування розчинів з вмістом кофеїну 1 мМ, 2 мМ, 3 мМ та 5 мМ.

- Кофеїн безводний;
- Аналітичні ваги для зважування;
- Мірна колба на 100 мл;
- Піпетки чи мірні циліндри;
- Магнітна мішалка чи скляна паличка для перемішування.

Розрахунки:

Молярна маса кофеїну (C₈H₁₀N₄O₂) дорівнює 194.19 г/моль. Розрахунок маси кофеїну для кожної концентрації:

Для розчину 1 мМ:

$$1 \text{ мМ} \times 194.19 \frac{\text{г}}{\text{моль}} = 19.419 \text{ мг}$$

Для розчину 2 мМ:

$$2 \text{ мМ} \times 194.19 \frac{\text{г}}{\text{моль}} = 38.838 \text{ мг}$$

Для розчину 3 мМ:

$$3 \text{ мМ} \times 194.19 \frac{\text{г}}{\text{моль}} = 58.257 \text{ мг}$$

Для розчину 5 мМ:

$$5 \text{ мМ} \times 194.19 \frac{\text{г}}{\text{моль}} = 97.095 \text{ мг}$$

Приготування розчинів:

- 1) Зважити необхідну кількість кофеїну.
- 2) Перенести наважку в мірну колбу місткістю 100 мл
- 3) Розчинити кофеїн у невеликому обсязі культурального розчину для промивки сперми та долити розчин до кінцевого об'єму;
- 4) Добре перемішати.

Отримані розчини мають концентрацію кофеїну 0.194 мг/мл, 0.388 мг/мл, 0.583 мг/мл та 0.971 мг/мл відповідно.

2.2.10. Методика дослідження впливу вмісту кофеїну на рухливість сперматозоїдів

Аліквоти розчинів із концентрацією кофеїну 0.194 мг/мл, 0.388 мг/мл, 0.583 мг/мл та 0.971 мг/мл об'ємом 0.5 мл додавали до аліквоти біологічного матеріалу об'ємом 0.5 мл. Таким чином концентрація кофеїну у досліджуваних розчинах становила: 0.097 мг/мл, 0.194 мг/мл, 0.291 мг/мл та 0.486 мг/мл або вміст кофеїну: 0.5 мМ, 1 мМ, 1.5 мМ та 2.5 мМ.

Після контакту утвореного розчину зі зразками сперми протягом від 60 хв до 300 хв зразок досліджували за методикою 2.2.1.

2.3. Результати та їх обговорення

2.3.1. Дослідження впливу рН середовища на рухливість та життєздатність чоловічих статевих клітин.

Загалом у цьому дослідженні взяли участь 5 чоловіків-добровольців із середнім віком $24,8 \pm 3,7$ (середнє значення $\pm$ стандартне відхилення). Сперма, що піддавалася аналізу, була від здорових добровольців чоловічої статі. Ці чоловіки мали підтверджену фертильність і нормальну якість сперми відповідно до критеріїв Всесвітньої організації охорони здоров'я (2010). Зразки сперми були отримані шляхом мастурбації після щонайменше 3 днів утримання. В усіх наступних експериментах використовувалася очищена методами «Центрифугування на градієнті густини - Density Gradient Centrifugation (DGC)» та «Підплив угору – (Swim-Up)» сперма, зібрана від 5 добровольців, розділена на 4 порції, і всі експерименти проводилися щонайменше в трьох повторах (у таблиці вказані середнє значення з трьох повторів).

Оцінка руху сперматозоїдів до градієнту густини та обробки культуральними розчинами наведена у табл. 2.2.

Таблиця 2.2. Оцінка параметрів сперми до обробки культуральними розчинами.

Зразок №	1	2	3	4	5
Об'єм (мл)	3	1.5	2.5	3	2
Концентрація сперматозоїдів (млн/мл) ($\times 10^6$)	63	52	34	39	71
% Рухливих сперматозоїдів	78	42	47	82	39
% Сперматозоїдів у прогресивному руху	35	31	35	59	32
% Морфологічно недефектних сперматозоїдів	5	4	4	6	5

Оцінка руху сперматозоїдів після градієнту густини та обробки культуральним розчинами наведена у табл. 2.3.

Таблиця 2.3. Оцінка руху сперматозоїдів після градієнту густини та обробки культуральним розчинами.

Зразок №	1	2	3	4	5
Об'єм (мл)	2	2	2	2	2
Концентрація сперматозоїдів (млн/мл) ($\times 10^6$)	33	13	15	37	21
% Рухливих сперматозоїдів	97	92	93	92	95

Для оцінки впливу кислотності середовища на активність та показники функціональності біологічного матеріалу аналізувались відсоток рухливих та життєздатних сперматозоїдів до і після обробки у культуральному середовищі з рН=5.2, 6.2, 7.2, 8.2. За допомогою камери Маклера, фарбування еозином, фарбуванням за Папаніколау ми виявили концентрацію сперматозоїдів, відсоток загально рухливих сперматозоїдів та сперматозоїдів з прогресивним рухом; кількість морфологічно «нормальних» та життєздатних сперматозоїдів до та після обробки культуральними середовищами. У дослідженні за допомогою камери Маклера та фарбуванням еозином ми порівняли кількість рухливих та життєздатних сперматозоїдів за різним значенням рН.

Оцінка руху сперматозоїдів після додавання культуральних розчинів із заданим рН через 15, 30, 60 та 90 хвилин наведено в табл. 2.4-2.7.

Також було перевірено життєздатність сперматозоїдів після обробки матеріалу культуральними розчинами із заданим рН через 15, 30, 60 та 90 хвилин. Дані наведено в табл. 2.9-2.12.

Таблиця 2.4. Оцінка руху сперматозоїдів через 15 хвилин після додавання культуральних розчинів із заданим рН.

% Загально рухливих сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
рН					
5.2	88	85	86	84	83
6.2	90	87	87	86	88
7.2	95	92	90	90	92
8.2	95	91	92	91	93

Таблиця 2.5. Оцінка руху сперматозоїдів через 30 хвилин після додавання культуральних розчинів із заданим рН.

% Загально рухливих сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
рН					
5.2	83	81	79	80	81
6.2	85	86	86	85	86
7.2	92	91	88	89	90
8.2	93	90	90	89	91

Таблиця 2.6. Оцінка руху сперматозоїдів через 60 хвилин після додавання культуральних розчинів із заданим рН.

% Загально рухливих сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
рН					
5.2	66	68	66	65	66
6.2	70	69	70	68	71
7.2	89	90	87	88	89

8.2	90	91	89	88	90
-----	----	----	----	----	----

Таблиця 2.7. Оцінка руху сперматозоїдів через 90 хвилин після додавання культуральних розчинів із заданим рН.

% Загально рухливих сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
рН					
5.2	51	56	53	49	48
6.2	64	69	66	64	63
7.2	85	80	83	81	83
8.2	86	87	85	84	85

Оцінка життєздатності сперматозоїдів після градієнту густини та обробки культуральним розчинами наведена в табл. 2.8.

Таблиця 2.8. Оцінка життєздатності сперматозоїдів після градієнту густини та обробки культуральним розчином.

Зразок №	1	2	3	4	5
Відсоток життєздатності	100	100	98	99	100

- 1) Оцінка життєздатності сперматозоїдів після додавання культурального розчину із заданим рН (табл. 2.9-2.12).

Таблиця 2.9. Оцінка життєздатності сперматозоїдів через 15 хвилин після додавання культурального розчину із заданим рН.

% Життєздатних сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
рН					
5.2	80	79	81	83	80

6.2	88	85	83	80	81
7.2	99	100	100	98	98
8.2	100	100	99	97	99

Таблиця 2.10. Оцінка життєздатності сперматозоїдів через 30 хвилин після додавання культурального розчину із заданим рН.

% Життєздатних сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
рН					
5.2	70	68	65	66	68
6.2	80	78	77	79	76
7.2	99	96	98	97	95
8.2	98	98	96	97	96

Таблиця 2.11. Оцінка життєздатності сперматозоїдів через 60 хвилин після додавання культурального розчину із заданим рН.

% Життєздатних сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
рН					
5.2	73	68	65	64	70
6.2	80	75	71	70	74
7.2	96	95	94	96	94
8.2	95	94	95	96	95

Таблиця 2.12. Оцінка життєздатності сперматозоїдів через 90 хвилин після додавання культурального розчину із заданим рН.

% Життєздатних сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
рН					
5.2	50	53	51	59	54

6.2	59	60	53	54	50
7.2	90	88	89	93	90
8.2	89	88	86	89	85

На рис.2.3 представлена залежність загальної рухливості сперматозоїдів від рівня рН культурального середовища. З графіка видно, що є чіткий оптимальний діапазон рН (7.2-8.2), при якому рухливість сперматозоїдів максимальна. Поза цим діапазоном рухливість різко знижується, що підкреслює значущість підтримки строго контрольованого рівня рН для збереження функціональності сперми.

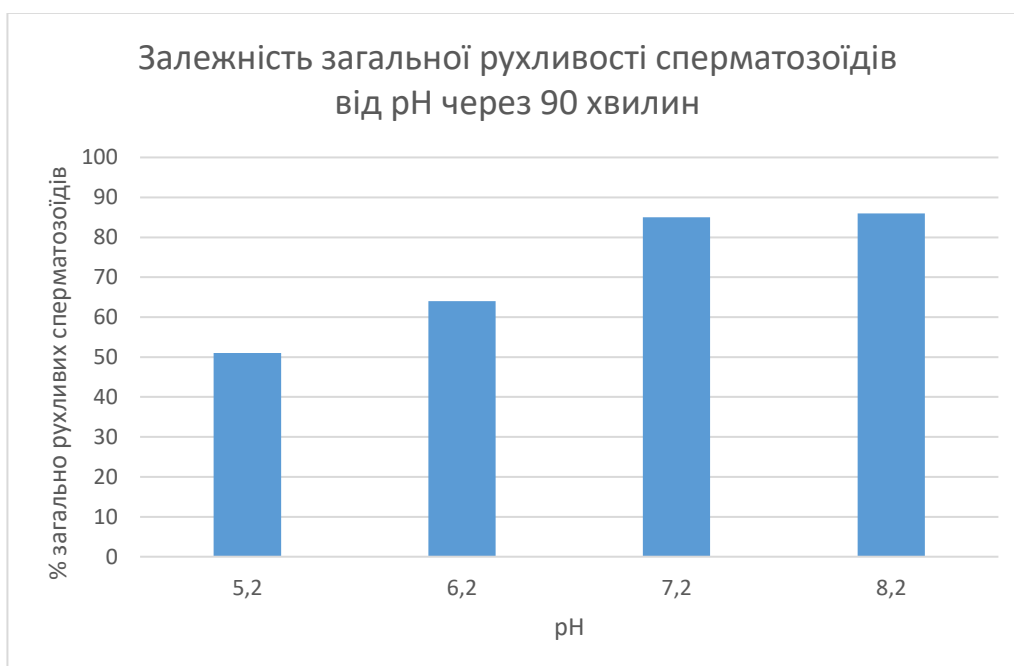


Рисунок 2.3. Залежність рухливості сперматозоїдів від рН культурального середовища.

Рис. 2.4 ілюструє, як життєздатність сперматозоїдів змінюється залежно від рН середовища. Спостерігається аналогічна тенденція з попереднім графіком: існує певний рівень рН (7.2-8.2), за якого життєздатність сперматозоїдів знаходиться на піку. Це підтверджує важливість контролю рН у процесах обробки та зберігання сперми.

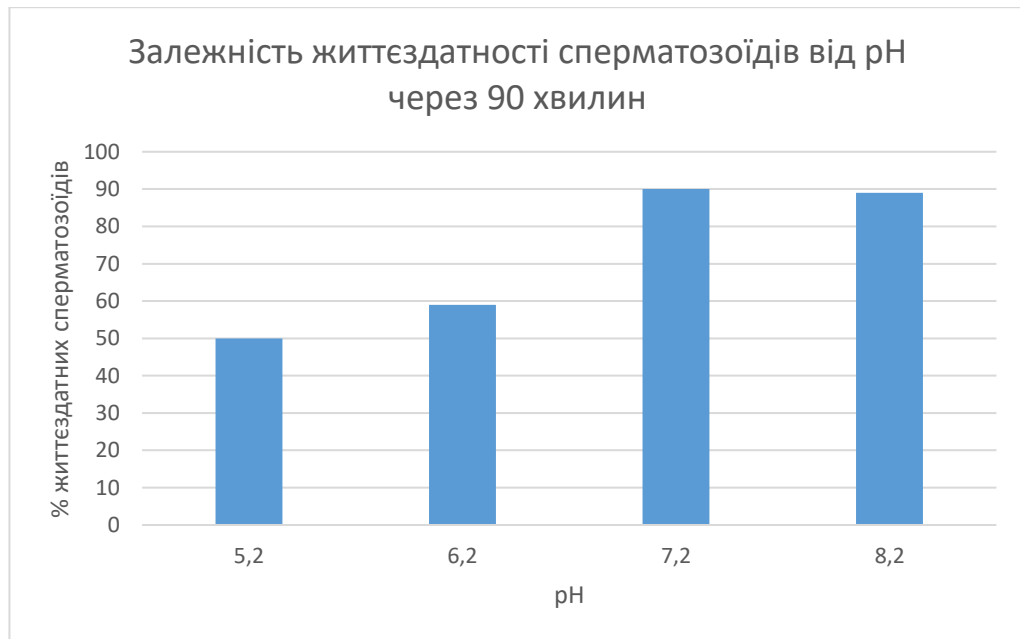


Рисунок 2.4. Залежність життєздатності сперматозоїдів від рН культурального середовища.

За результатами нашого дослідження ми бачимо, що при рН=5.2 та рН=6.2 кількість рухливих та життєздатних сперматозоїдів помітно зменшується із часом, порівняно з рН=7.2 та рН=8.2, що практично не змінили свої показники упродовж всього часу.

З цього ми можемо зробити висновок, що найкраще рН для культурального середовища сперматозоїдів від 7.2-8.2.

2.3.2. Результати дослідження впливу кофеїну на загальну та прогресивну рухливість чоловічих статевих клітин.

Загалом у цьому дослідженні взяли участь 5 чоловіків-добровольців із середнім віком $28.6 \pm 3,44$ (середнє значення $\pm$ стандартне відхилення). Сперма, що піддавалася аналізу, була від здорових добровольців чоловічої статі. Зразки сперми були отримані шляхом мастурбації після щонайменше 3 днів утримання. В усіх наступних експериментах використовувалася очищена методом «Підплив угору – (Swim-Up)» сперма, зібрана від 5 добровольців, розділена на 5 порцій, і всі експерименти проводилися щонайменше в трьох повторах (у таблиці вказані середнє значення з трьох повторів).

Це дослідження було розроблено для оцінки впливу різного вмісту кофеїну (0 мМ (контрольний зразок), 0.5 мМ, 1 мМ, 1.5 мМ, 2.5 мМ) на загальну та прогресивну рухливість сперматозоїдів через 1, 2, 4 та 5 годин після впливу кофеїну на сперматозоїди з низькою та нормальною рухливістю у чоловіків.

Результати оцінки руху сперматозоїдів до обробки культуральними розчинами наведено в табл. 2.13.

Таблиця 2.13. Оцінка параметрів сперми до обробки культуральними розчинами.

Зразок №	1	2	3	4	5
Об'єм (мл)	1.5	4	3.5	1	6
Концентрація сперматозоїдів (млн/мл) ($\times 10^6$)	16	117	53	5	8
% Загально рухливих сперматозоїдів	54	73	40	80	20
% Сперматозоїдів у прогресивному руху	36	61	31	40	18
% Життєздатних сперматозоїдів	88	93	70	94	48

Оцінка руху сперматозоїдів після обробки культуральним розчином наведена в табл. 2.14.

Таблиця 2.14. Оцінка руху сперматозоїдів після обробки культуральним розчином.

Зразок №	1	2	3	4	5
Об'єм (мл)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Концентрація сперматозоїдів (млн/мл) ($\times 10^6$)	5	46	35	2	8
% Загально рухливих сперматозоїдів	60	65	42	50	25
% Сперматозоїдів у прогресивному руху	40	54	28	50	12.5

Оцінка загального руху сперматозоїдів після додавання культуральних розчинів із заданою концентрацією кофеїну в залежності від часу контакту наведено в табл. 2.15-2.18.

Таблиця 2.15. Оцінка загального руху сперматозоїдів через 60 хвилин після додавання культуральних розчинів із заданою концентрацією кофеїну.

% Загально рухливих сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
вміст (кофеїну), мМ					
0	58	63	40	48	23
0.5	60	65	42	50	25
1	62	67	44	52	27
1.5	64	70	46	54	29
2.5	70	75	52	60	34

Таблиця 2.16. Оцінка загального руху сперматозоїдів через 120 хвилин після додавання культуральних розчинів із заданою концентрацією кофеїну.

% Загально рухливих сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
С (кофеїну), мМ					
0	56	61	38	46	21
0.5	59	64	41	49	24
1	63	68	45	53	28
1.5	66	71	48	56	31
2.5	72	77	54	62	38

Таблиця 2.17. Оцінка загального руху сперматозоїдів через 240 хвилин після додавання культуральних розчинів із заданою концентрацією кофеїну.

% Загально рухливих сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
С (кофеїну), мМ					
0	52	57	34	42	17
0.5	55	60	37	45	18
1	59	64	41	49	22
1.5	62	67	44	52	25
2.5	68	73	50	58	32

Таблиця 2.18. Оцінка загального руху сперматозоїдів через 300 хвилин після додавання культуральних розчинів із заданою концентрацією кофеїну.

% Загально рухливих сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
С (кофеїну), мМ					
0	50	55	32	40	15
0.5	53	58	35	43	18

1	57	62	39	47	22
1.5	60	65	42	50	25
2.5	66	71	48	56	32

Оцінка прогресивного руху сперматозоїдів після додавання культуральних розчинів із заданою концентрацією кофеїну (табл. 2.19-2.22).

Таблиця 2.19. Оцінка прогресивного руху сперматозоїдів через 60 хвилин після додавання культуральних розчинів із заданою концентрацією кофеїну.

% Прогресивно рухливих сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
С (кофеїну), мМ					
0	38	52	26	48	11
0.5	40	54	28	50	13
1	42	56	30	52	15
1.5	44	58	32	54	17
2.5	50	64	38	60	21

Таблиця 2.20. Оцінка прогресивного руху сперматозоїдів через 120 хвилин після додавання культуральних розчинів із заданою концентрацією кофеїну.

% Прогресивно рухливих сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
С (кофеїну), мМ					
0	36	50	24	46	9
0.5	39	53	27	49	12
1	43	57	31	53	15
1.5	46	60	34	56	19
2.5	52	66	40	62	26

Таблиця 2.21. Оцінка прогресивного руху сперматозоїдів через 240 хвилин після додавання культуральних розчинів із заданою концентрацією кофеїну.

% Прогресивно рухливих сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
С (кофеїну), мМ					
0	32	46	20	42	5
0.5	35	49	23	45	8
1	39	53	27	49	12
1.5	42	56	30	52	15
2.5	48	62	36	58	22

Таблиця 2.22. Оцінка прогресивного руху сперматозоїдів через 300 хвилин після додавання культуральних розчинів із заданою концентрацією кофеїну.

% Прогресивно рухливих сперматозоїдів					
Зразок №	1	2	3	4	5
С (кофеїну), мМ					
0	30	44	18	40	3
0.5	33	47	22	43	6
1	37	51	25	47	10
1.5	40	54	28	50	13
2.5	46	60	34	56	20

Результати показали, що кофеїн може значно стимулювати загальну та прогресивну рухливість сперматозоїдів, особливо на більш високому вмісті (1.5 мМ та 2.5 мМ). Пацієнти з низьким початковим рівнем рухливості (наприклад, пацієнт 5) показали помітне поліпшення рухливості та життєздатності сперматозоїдів, що вказує на потенційну користь кофеїну для покращення фертильності у випадках низької активності сперматозоїдів. Пацієнти з вищим початковим рівнем рухливості (наприклад, пацієнт 2) також показали поліпшення, хоча загальний приріст менш

виражений. Це може вказувати на насичення ефекту кофеїну при вищих вихідних рівнях рухливості. Підвищення вмісту кофеїну понад 1.5 мМ призводить до додаткових, хоча що зменшуються, поліпшень, що може вказувати на насичення рецепторів або можливі токсичні ефекти кофеїну при високих дозах.

На рис. 2.5 демонструється вплив різних концентрацій кофеїну на загальну рухливість сперматозоїдів через 300 хвилин. Помітно, що зі збільшенням концентрації кофеїну загальна рухливість сперматозоїдів збільшується.

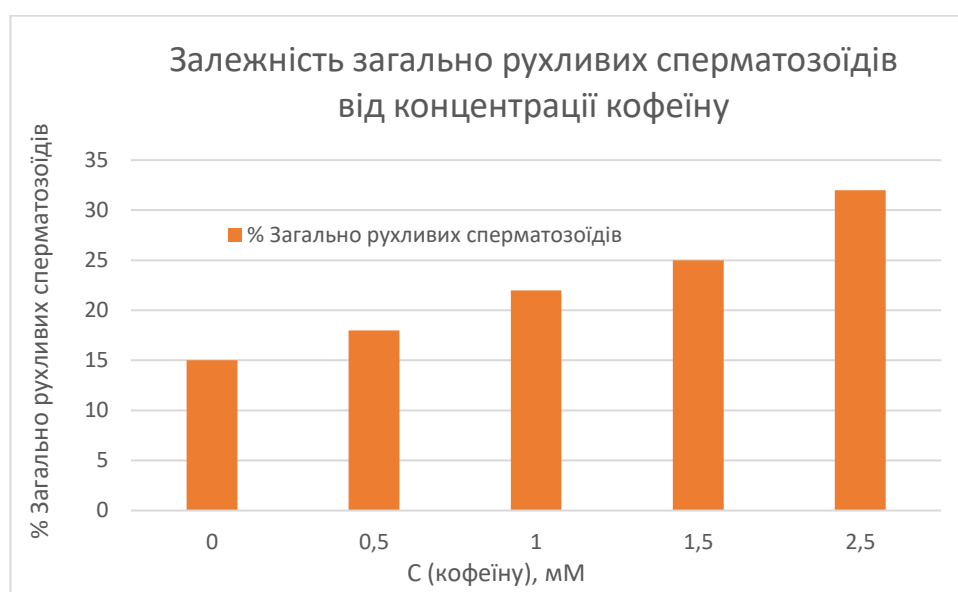


Рисунок 2.5. Залежність загальної рухливості сперматозоїдів від вмісту кофеїну через 300 хвилин після додавання.

Рис. 2.6 показує, як концентрація кофеїну впливає на частку прогресивно рухливих сперматозоїдів. Спостерігається позитивна кореляція між концентрацією кофеїну та поліпшенням прогресивної рухливості, що підкреслює потенціал кофеїну як засобу для покращення якості сперми у медичних та лабораторних умовах.

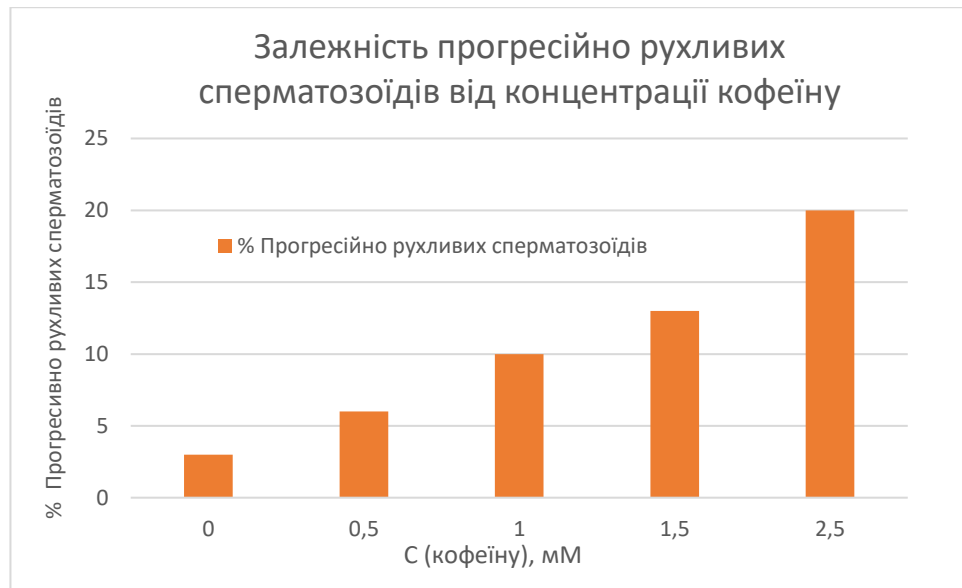


Рисунок 2.6. Залежність прогресійно рухливих сперматозоїдів від вмісту кофеїну.

Рис.2.7 ілюструє зміну загальної рухливості сперматозоїдів у часі за концентрації кофеїну 2.5 мМ. З графіка видно, що початкове покращення рухливості згодом зменшується, що може свідчити про тимчасові ефекти стимуляції або настання фази втоми сперматозоїдів.

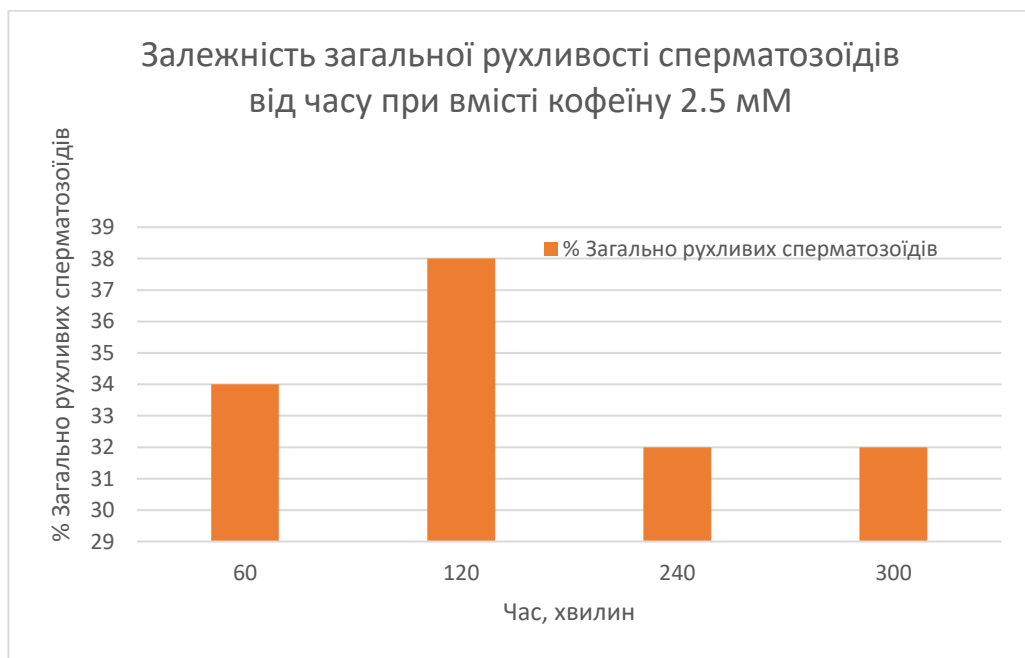


Рисунок 2.7. Залежність загальної рухливості сперматозоїдів від часу при концентрації кофеїну 2.5 мМ.

На рис.2.8 представлено зміну прогресивної рухливості сперматозоїдів залежно від часу за однієї з вищих досліджених концентрацій кофеїну - кількість речовини кофеїну складала 2.5 мМ. Подібно до попереднього графіка, спостерігається зменшення прогресивної рухливості після початкового поліпшення, що підкреслює необхідність подальших досліджень для визначення оптимального часу впливу кофеїну на сперматозоїди.



Рисунок 2.8. Залежність прогресивної рухливості сперматозоїдів від часу при кількості речовини кофеїну 2.5 мМ.

Аналіз даних показав, що кофеїн покращує рухливість сперматозоїдів у дозозалежному порядку. Найбільше поліпшення рухливості спостерігалось при кількості речовини кофеїну 2.5 мМ, що робить цей вміст потенційно оптимальним для використання у клінічній практиці. Динаміка впливу кофеїну показала, що стимулюючий ефект найбільш виражений протягом перших годин після введення кофеїну з поступовим зменшенням ефекту в міру часу. Це наголошує на необхідності точного контролю часу впливу кофеїну на сперматозоїди, особливо при підготовці до процедур інсемінації або ЕКЗ. Результати дослідження пропонують реальні можливості для покращення протоколів підготовки сперми до асистованих репродуктивних технологій. Оптимізація концентрації та часу дії кофеїну може

значно підвищити якість сперми, збільшуючи шанси на успішне запліднення. Ці дані можуть бути використані для формування рекомендацій щодо обробки сперми, що покращить результати лікування безпліддя та підвищить загальну ефективність репродуктивних технологій.

ВИСНОВКИ

Досліджено вплив хімічних факторів, зокрема вмісту кофеїну та рівня рН середовища, на активність та показники функціональності чоловічих статевих клітин, а саме на загальну та прогресивну рухливість сперматозоїдів та на рухливість та життєздатність цих клітин.

Показано, що:

1. Добавки кофеїну значно покращують загальну та прогресивну рухливість сперматозоїдів. Збільшення вмісту кофеїну до 2.5 мМ призводить до найбільш вираженого покращення цих параметрів.
2. Оптимальний діапазон рН, що забезпечує максимальну активність та життєздатність сперматозоїдів знаходиться в діапазоні від 7,2 до 8,2 одиниць рН. Відхилення від цього діапазону призводять до зниження мотильності та життєздатності, що підкреслює важливість підтримки суворих умов середовища при зберіганні та обробці сперми.



СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- [1] Foote R.H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J. Anim. Sci.* 2002;**80**:1–10. doi: 10.2527/animalsci2002.80E-Suppl_21a.
- [2] Morrell J.M., Wallgren M. Alternatives to antibiotics in semen extenders: A review. *Pathogens*. 2014;**3**:934–946. doi: 10.3390/pathogens3040934.
- [3] Aitken RJ, Iuliis GND. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproduct Biomed Online* 2007; 14: 727–733.
- [4] Tremellen K, Miari G, Froiland D, et al. A randomised control trial examining the effect of an antioxidant (Menevit) on pregnancy outcome during IVF-ICSI treatment. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2007; 47: 216–221.
- [5] Sharma Y., Sharma M. Sperm Cryopreservation: Principles and Biology. *J. Infertil. Reprod. Biol.* 2020;**8**:43–48. doi: 10.47277/JIRB/8(3)/43.
- [6] Parekh N.V., Lundy S.D., Vij S.C. Fertility considerations in men with testicular cancer. *Transl. Androl. Urol.* 2020;**9**:S14–S23. doi: 10.21037/tau.2019.08.08.
- [7] Tvrdá E., López-Fernández C., Sánchez-Martín P., Gosálvez J. Sperm DNA fragmentation in donors and normozoospermic patients attending for a first spermiogram: Static and dynamic assessment. *Andrologia*. 2018;**50**:e12986. doi: 10.1111/and.12986.
- [8] Potts JM, Pasqualotto FF. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Andrologia* 2003; 35: 304–308.
- [9] Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online* 2014; 28: 684–703.
- [10] Werdelin L, Nilsson A. The evolution of the scrotum and testicular descent in mammals: a phylogenetic view. *J Theor Biol.* 1999;**196**:61–72. doi: 10.1006/jtbi.1998.0821.
- [11] Condorelli RA, La Vignera S, Giaccone F, Iacoviello L, Vicari E, et al. *In vitro* effects of nicotine on sperm motility and bio-functional flow cytometry sperm parameters. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2013;**26**:739–46.

- [12] Lugon-Moulin N, Martin F, Krauss MR, Ramey PB, Rossi L. Cadmium concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) from different countries and its relationship with other elements. *Chemosphere*. 2006;63:1074–86.
- [13] Klaassen CD, Liu J, Diwan BA. Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;238:215–20.
- [14] Ernst E, Lauritsen JG. Effect of organic and inorganic mercury on human sperm motility. *Pharmacology & toxicology*. 1991;68:440–444.
- [15] Choy CM, Yeung QS, Briton-Jones CM, Cheung CK, Lam CW, Haines CJ. Relationship between semen parameters and mercury concentrations in blood and in seminal fluid from subfertile males in hong kong. *Fertility and sterility*. 2002b;78:426–428.
- [16] Kotova N., Vare D., Schultz N., Meesters D.G., Stepnik M., Grawé J., Helleday T., Jenssen D. Genotoxicity of alcohol is linked to DNA replication-associated damage and homologous recombination repair. *Carcinogenesis*. 2013;34:325–330. doi: 10.1093/carcin/bgs340.
- [17] Rachdaoui N., Sarkar D.K. Pathophysiology of the effects of alcohol abuse on the endocrine system. *Alcohol Res*. 2017;38:255–276.
- [18] Condorelli R.A., Calogero A.E., Vicari E., La Vignera S. Chronic consumption of alcohol and sperm parameters: Our experience and the main evidences. *Andrologia*. 2015;47:368–379. doi: 10.1111/and.12284.
- [19] Gordon G., Southren A.L., Vittek J., Lieber C.S. The effect of alcohol ingestion on hepatic aromatase activity and plasma steroid hormones in the rat. *Metabolism*. 1979;28:20–24. doi: 10.1016/0026-0495(79)90163-X.
- [20] Adler R.A. Clinical review 33: Clinically important effects of alcohol on endocrine function. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1992;74:957–960.
- [21] Hansen M.L., Thulstrup A.M., Bonde J.P., Olsen J., Håkonsen L.B., Ramlau-Hansen C.H. Does last week's alcohol intake affect semen quality or reproductive hormones? A cross-sectional study among healthy young Danish men. *Reprod. Toxicol*. 2012;34:457–462. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.06.004.

- [22] Martin SA, Harlow SD, Sowers MF, et al. DDT metabolite and androgens in African-American farmers. *Epidemiology* 2002;13:454-8. 10.1097/00001648-200207000-00014
- [23] Ben Rhouma K, Tébourbi O, Krichah R, et al. Reproductive toxicity of DDT in adult male rats. *Hum Exp Toxicol* 2001;20:393-7. 10.1191/096032701682692946
- [24] Mehrpour O, Karrari P, Zamani N, et al. Occupational exposure to pesticides and consequences on male semen and fertility: a review. *Toxicol Lett* 2014;230:146-56. 10.1016/j.toxlet.2014.01.029
- [25] Benjamin S., Masai E., Kamimura N., Takahashi K., Anderson R.C., Faisal P.A. Phthalates impact human health: Epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *J. Hazard. Mater.* 2017;340:360–383. doi: 10.1016/j.jhazmat.2017.06.036.
- [26] Jurewicz J, Hanke W, Radwan M, et al. Environmental factors and semen quality. *Int J Occup Med Environ Health* 2009;22:305-29. 10.2478/v10001-009-0036-1
- [27] Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, et al. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol* 2007;24:178-98. 10.1016/j.reprotox.2007.05.010
- [28] Jenardhanan P, Panneerselvam M, Mathur PP. Effect of environmental contaminants on spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2016;59:126-40. 10.1016/j.semcdb.2016.03.024 .
- [29] Yu S (1997) Clinical basic laboratory medicine. 314–5, The Peoples Medical Publishing House, Beijing.
- [30] Dohle GR, Smit M, Weber RF. Androgens and male fertility. *World J Urol.* 2003;21:341–345. doi: 10.1007/s00345-003-0365-9.
- [31] Grokett BH, Ahmad N, Warren DW. The effects of an anabolic steroid (oxandrolone) on reproductive development in the male rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992;126:173–178.
- [32] Fernandez-Gonzalez R, Yebra-Pimentel I, Martinez-Carballo E, Simal-Gandara J, A critical review about human exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) through foods, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr* 55 (2015) 1590–1617.

- [33] Mahadevan M., Baker G. *Assessment and Preparation of Semen for in Vitro Fertilization Clinical in Vitro Fertilization, and A. Trounson*. Springer; London, UK: 1984. pp. 83–97.
- [34] World Health Organization . *WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. 6th ed. World Health Organization; Geneva, Switzerland: 2021.
- [35] Bui A.D., Sharma R., Henkel R., Agarwal A. Reactive oxygen species impact on sperm DNA and its role in male infertility. *Andrologia*. 2018;50:e13012. doi: 10.1111/and.13012.
- [36] Henkel R.R., Schill W.B. Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003;1:108. doi: 10.1186/1477-7827-1-108.
- [37] Harrison R.A. A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1976;48:347–353. doi: 10.1530/jrf.0.0480347.
- [38] Lee D., Jee B.C. Evaluation of normal morphology, DNA fragmentation, and hyaluronic acid binding ability of human spermatozoa after using four different commercial media for density gradient centrifugation. *Clin. Exp. Reprod. Med.* 2019;46:8–13. doi: 10.5653/cerm.2019.46.1.8.
- [39] Strehler E., Baccetti B., Sterzik K., Capitani S., Collodel G., De Santo M., Gambera L., Piomboni P. Detrimental effects of polyvinylpyrrolidone on the ultrastructure of spermatozoa (Notulae seminologicae 13) *Hum. Reprod.* 1998;13:120–123. doi: 10.1093/humrep/13.1.120.
- [40] Muratori M., Tarozzi N., Carpentiero F., Danti S., Perrone F.M., Cambi M., Casini A., Azzari C., Boni L., Maggi M., et al. Sperm selection with density gradient centrifugation and swim up: Effect on DNA fragmentation in viable spermatozoa. *Sci. Rep.* 2019;9:7492. doi: 10.1038/s41598-019-43981-2.
- [41] Jayaraman V., Upadhya D., Narayan P.K., Adiga S.K. Sperm processing by swim-up and density gradient is effective in elimination of sperm with DNA damage. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2012;29:557–563. doi: 10.1007/s10815-012-9742-x.
- [42] Casey J.R, Grinstein S, Orlowski J. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010;11:50–61.

- [43] Zhou J, Chen L, Li J, Li H, Hong Z, Xie M, Chen S, Yao B. The semen pH affects sperm motility and capacitation. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132974.
- [44] Lishko P.V, Botchkina I.L, Fedorenko A, Kirichok Y. Acid extrusion from human spermatozoa is mediated by Flagellar voltage-gated proton channel. *Cell*. 2010;140(3):327–337.
- [45] Demarco I.A, Espinosa F, Edwards J, Sosnik J, De La Vega-Beltran J.L, Hockensmith J.W, Kopf G.S, Darszon A, Visconti P.E. Involvement of a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J. Biol. Chem*. 2003;278:7001–7009.
- [46] Gatti J.L, Chevrier C, Paquignon M, Dacheux J.L. External ionic conditions, internal pH and motility of ram and boar spermatozoa. *J. Reprod. Fertil*. 1993;98:439–449.
- [47] Makler A., Zaidise I., Paldi E., Brandes J.M. Factors affecting sperm motility. I. In vitro change in motility with time after ejaculation. *Fertil. Steril*. 1979;31:147–154. doi: 10.1016/S0015-0282(16)43815-X.
- [48] Makler A., Urbach Y., Lefler E., Merzbach D. Factors affecting sperm motility. Vi. Sperm viability under the influence of bacterial growth in human ejaculates. *Fertil. Steril*. 1981;35:666–670. doi: 10.1016/S0015-0282(16)45562-7.
- [49] Makler A., David R., Blumenfeld Z., Better O.S. Factors affecting sperm motility. Vii. Sperm viability as affected by change of pH and osmolarity of semen and urine specimens. *Fertil. Steril*. 1981;36:507–511. doi: 10.1016/S0015-0282(16)45802-4.
- [50] Makler A., Deutch M., Vilensky A., Palti Y. Factors affecting sperm motility. Viii. Velocity and survival of human spermatozoa as related to temperatures above zero. *Int. J. Androl*. 1981;4:559–569. doi: 10.1111/j.1365-2605.1981.tb00738.x.
- [51] Cicaré J., Caille A., Zumoffen C., Ghersevich S., Bahamondes L., Munuce M.J. In vitro incubation of human spermatozoa promotes reactive oxygen species generation and DNA fragmentation. *Andrologia*. 2015;47:861–866.
- [52] Holmes E., Björndahl L., Kvist U. Post-ejaculatory increase in human semen osmolality in vitro. *Andrologia*. 2019;51:e13311. doi: 10.1111/and.13311.

- [53] Wiebke M., Hensel B., Nitsche-Melkus E., Jung M., Schulze M. Cooled storage of semen from livestock animals (part i): Boar, bull, and stallion. *Anim. Reprod. Sci.* 2021;106822. doi: 10.1016/j.anireprosci.2021.106822.
- [54] Hossain A.M., Osuamkpe C.O., Nagamani M. Extended culture of human spermatozoa in the laboratory may have practical value in the assisted reproductive procedures. *Fertil. Steril.* 2008;89:237–239. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.01.170.
- [55] World Health Organization (WHO) *Who Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen*. WHO; Geneva, Switzerland: 2021.
- [56] Balasuriya A., Serhal P., Doshi A., Harper J.C. Processes involved in assisted reproduction technologies significantly increase sperm DNA fragmentation and phosphatidylserine translocation. *Andrologia*. 2014;46:86–97. doi: 10.1111/and.12052.
- [57] Baldi E., Muratori M., Marchiani S., Tamburrino L., Degl’Innocenti S. Main effects of in vitro manipulation of human spermatozoa; Proceedings of the XIIIth International Symposium on Spermatology; Stockholm, Sweden. 9–13 May 2021; pp. 263–272.
- [58] Brannigan R.E., Fantus R.J., Halpern J.A. Fertility preservation in men: A contemporary overview and a look toward emerging technologies. *Fertil. Steril.* 2021;115:1126–1139. doi: 10.1016/j.fertnstert.2021.03.026.
- [59] Agarwal A., Sharma R., Singh A., Gupta S., Sharma R. Standardisation of a novel sperm banking kit–nextgen®–to preserve sperm parameters during shipment. *Andrologia*. 2016;48:662–669. doi: 10.1111/and.12497.
- [60] Hamamah S., Magnoux E., Royere D., Barthelemy C., Dacheux J.L., Gatti J.L. Internal ph of human spermatozoa: Effect of ions, human follicular fluid and progesterone. *Mol. Hum. Reprod.* 1996;2:219–224. doi: 10.1093/molehr/2.4.219.
- [61] Swain J.E. Optimizing the culture environment in the ivf laboratory: Impact of ph and buffer capacity on gamete and embryo quality. *Reprod. Biomed. Online*. 2010;21:6–16. doi: 10.1016/j.rbmo.2010.03.012.
- [62] Owen D.H., Katz D.F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J. Androl.* 2005;26:459–469. doi: 10.2164/jandrol.04104.

- [63] Owen D.H., Katz D.F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J. Androl.* 2005;26:459–469. doi: 10.2164/jandrol.04104.
- [64] Owen D.H., Katz D.F. A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J. Androl.* 2005;26:459–469. doi: 10.2164/jandrol.04104.
- [65] Barati F., Papahn A.A., Afrough M., Barati M. Effects of tyrode's solution osmolarities and milk on bull sperm storage above zero temperatures. *Iran J. Reprod. Med.* 2011;9:25–30.
- [66] Holmes E., Björndahl L., Kvist U. Possible factors influencing post-ejaculatory changes of the osmolality of human semen in vitro. *Andrologia.* 2019;51:e13443. doi: 10.1111/and.13443.
- [67] Mandal A., Bhattacharyya A.K. Differences in osmolality, ph, buffering capacity, superoxide dismutase and maintenance of sperm motility in human ejaculates according to the degree of coagulation. *Int. J. Androl.* 1988;11:45–51. doi: 10.1111/j.1365-2605.1988.tb01215.x.
- [68] Makler A., David R., Blumenfeld Z., Better O.S. Factors affecting sperm motility. Vii. Sperm viability as affected by change of ph and osmolarity of semen and urine specimens. *Fertil. Steril.* 1981;36:507–511. doi: 10.1016/S0015-0282(16)45802-4.
- [69] Liu C.H., Dong H.B., Ma D.L., Li Y.W., Han D., Luo M.J., Chang Z.L., Tan J.H. Effects of ph during liquid storage of goat semen on sperm viability and fertilizing potential. *Anim. Reprod. Sci.* 2016;164:47–56. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.11.011.
- [70] Saito K., Kinoshita Y., Kanno H., Iwasaki A. The role of potassium ion and extracellular alkalization in reinitiation of human spermatozoa preserved in electrolyte-free solution at 4 degrees c. *Fertil. Steril.* 1996;65:1214–1218. doi: 10.1016/S0015-0282(16)58341-1.
- [71] Watanabe, A.; Takayama-Watanabe, E.; Vines, C.A.; Cherr, G.N. Sperm motility-initiating substance in newt egg-jelly induces differential initiation of sperm motility based on sperm intracellular calcium levels. *Dev. Growth Differ.* 2011, 53, 9–17.

- [72] Hansbrough, J.R.; Garbers, D.L. Speract. Purification and characterization of a peptide associated with eggs that activates spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 1981, 256, 1447–1452.
- [73] Morton, B.E.; Sagadraca, R.; Fraser, C. Sperm motility within the mammalian epididymis: Species variation and correlation with free calcium levels in epididymal plasma. *Fertil. Steril.* 1978, 29, 695–698.
- [74] Freitas, M.J.; Vijayaraghavan, S.; Fardilha, M. Signaling mechanisms in mammalian sperm motility. *Biol. Reprod.* 2017, 96, 2–12.
- [75] Suarez, S.S. Control of hyperactivation in sperm. *Hum. Reprod. Update* 2008, 14, 647–657.
- [76] Pereira, R.; Sá, R.; Barros, A.; Sousa, M. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J. Androl.* 2017, 19, 5–14.
- [77] Demarco, I.A.; Espinosa, F.; Edwards, J.; Sosnik, J.; De La Vega-Beltran, J.L.; Hockensmith, J.W.; Kopf, G.S.; Darszon, A.; Visconti, P.E. Involvement of a Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter in mouse sperm capacitation. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 7001–7009.
- [78] Ficarro, S.; Chertihin, O.; Westbrook, V.A.; White, F.; Jayes, F.; Kalab, P.; Marto, J.A.; Shabanowitz, J.; Herr, J.C.; Hunt, D.F.; et al. Phosphoproteome analysis of capacitated human sperm. Evidence of tyrosine phosphorylation of a kinase-anchoring protein 3 and valosin-containing protein/p97 during capacitation. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 11579–11589.
- [79] Harrison, R.A. Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. *Mol. Reprod. Dev.* 2004, 67, 337–352.
- [80] Rubén, D.P.-A.; Carmen, Y.V.; María, I.C.; Sandy, P.; Teresa, P.; Elizabeth, M.; Reinaldo, M.; Fulgencio, P. ATPases, ion exchangers and human sperm motility. *Reproduction* 2015, 149, 475–484.
- [81] Jin, S.-K.; Yang, W.-X. Factors and pathways involved in capacitation: How are they regulated? *Oncotarget* 2017, 8, 3600–3627.
- [82] IARC Coffee, tea, mate, methylxanthines and methylglyoxal. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* 1991;51:1–513.

- [83] Barone J.J., Roberts H. *Caffeine*. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 1984. Human Consumption of Caffeine; pp. 59–73.
- [84] Blanchard J., Sawers S.J.A. The absolute bioavailability of caffeine in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1983;24:93–98. doi: 10.1007/BF00613933.
- [85] Tavares C., Sakata R. Caffeine in the Treatment of Pain. *Braz. J. Anesthesiol.* 2012;62:387–401. doi: 10.1016/S0034-7094(12)70139-3.
- [86] Fredholm B.B. Adenosine, Adenosine Receptors and the Actions of Caffeine. *Pharmacol. Toxicol.* 1995;76:93–101. doi: 10.1111/j.1600-0773.1995.tb00111.x.
- [87] Arnaud M.J. *Methylxanthines*. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 2010. Pharmacokinetics and Metabolism of Natural Methylxanthines in Animal and Man; pp. 33–91.
- [88] Ribeiro J.A., Sebastio A.M. Caffeine and adenosine. *J. Alzheimer's Dis.* 2010;20:S3–S15. doi: 10.3233/JAD-2010-1379.
- [89] McLellan T.M., Caldwell J.A., Lieberman H.R. A review of caffeine's effects on cognitive, physical and occupational performance. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2016;71:294–312. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.09.001.
- [90] Kong H., Jones P.P., Koop A., Zhang L., Duff H.J., Chen S.R.W. Caffeine induces Ca^{2+} release by reducing the threshold for luminal Ca^{2+} activation of the ryanodine receptor. *Biochem. J.* 2008;414:441–452. doi: 10.1042/BJ20080489.
- [91] Gualtieri R., Kalthur G., Barbato V., Longobardi S., Di Rella F., Adiga S.K., Talevi R. Sperm oxidative stress during in vitro manipulation and its effects on sperm function and embryo development. *Antioxidants*. 2021;10:1025. doi: 10.3390/antiox10071025.
- [92] Makler A., Zaidise I., Paldi E., Brandes J.M. Factors affecting sperm motility. I. In vitro change in motility with time after ejaculation. *Fertil. Steril.* 1979;31:147–154. doi: 10.1016/S0015-0282(16)43815-X.
- [93] https://meduniver.com/Medical/Ginecologia/ocenska_spermatozoidov.html MedUniver
- [94] Menkveld R, Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, Hodgen GD. Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Mol Reprod Dev.* 1991;30(4):346-52.

- [95] Eggert-Kruse W, Schwarz H, Rohr G, Demirakca T, Tilgen W, Runnebaum B. Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Hum Reprod*. 1996;11(1):139-46.
- [96] Coetzee K, Kruger TF, Lombard CJ. Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Hum Reprod Update*. 1998;4(1):73-82.
- [97] Toner JP, Mossad H, Grow DR, Morshedi M, Swanson RJ, Oehninger S. Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. *Andrologia*. 1995;27(3):143-8.
- [98] Van Waart J, Kruger TF, Lombard CJ, Ombelet W. Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI): a structured literature review. *Hum Reprod Update*. 2001;7(5):495-500.
- [99] Garrett C, Liu DY, Clarke GN, Rushford DD, Baker HW. Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Hum Reprod*. 2003;18(8):1643-9.
- [100] Liu DY, Garrett C, Baker HW. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Hum Reprod*. 2003;18(11):2382-9.
- [101] Mortimer D. A technical note on the assessment of human sperm vitality using eosin-nigrosin staining. *Reprod Biomed Online*. 2020;40(6):851-5.
- [102] Gandini L, Lenzi A, Lombardo F, Pacifici R, Dondero F. Immature germ cell separation using a modified discontinuous Percoll gradient technique in human semen. *Hum Reprod*. 1999; 14:1022–7. pmid:10221236
- [103] Zhao C, Huo R, Wang FQ, Lin M, Zhou ZM, Sha JH. Identification of several proteins involved in regulation of sperm motility by proteomic analysis. *Fertil Steril*. 2007; 87:436–8. pmid:17074334
- [104] WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Sixth Edition.