

Міністерство охорони здоров'я України
Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Козопас Наталія Михайлівна

УДК: 616.699:616.69-008.8-06:616-056.52-07

**МАРКЕРИ ФЕРТИЛЬНОГО ПОТЕНЦІАЛУ ЧОЛОВІКІВ НА ТЛІ
НАДМІРНОЇ МАСИ ТІЛА ТА ОЖИРІННЯ**

222 – Медицина
22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття ступеня доктора філософії
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Н.М. Козопас

Науковий керівник: Максимюк Ганна Василівна, доктор біологічних наук,
професор.

Львів – 2022

АНОТАЦІЯ

Козонас Н.М. Маркери фертильного потенціалу чоловіків на тлі надмірної маси тіла та ожиріння. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – Медицина (22 – Охорона здоров'я). – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, Львів, 2022.

Дисертаційна робота присвячена оцінці особливостей фертильного статусу чоловіків та функціональних метаболічних змін при надмірній масі тіла / ожирінні. Представлене дослідження було здійснене на базі кафедри клінічної лабораторної діагностики факультету післядипломної освіти Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького впродовж 2018–2022 років.

Попри наявність значної кількості наукових досліджень щодо впливу надлишково накопиченої жирової тканини в тілі на репродуктивну систему, патогенетичні механізми взаємозв'язку між ожирінням та порушенням плідності в чоловіків досі залишаються не до кінця висвітленими та створюють поле для дискусій.

Вплив зростання індексу маси тіла (ІМТ) на показники фертильного потенціалу є предметом обговорень, оскільки результати досліджень у цій галузі доволі часто є суперечливими. Наприклад, метааналіз MacDonald та співавт., 2010 р. включав дані від 4853 пацієнтів та не виявив кореляції ІМТ із концентрацією та кількістю сперматозоїдів. На противагу, аналогічна робота Sermondade та співавт., 2013 р. свідчить, що при високих показниках ІМТ у чоловіків майже вдвічі зростає поширеність азооспермії та олігозооспермії. Водночас емпіричні дані низки експериментів вказують на те, що втрата ваги може сприяти покращенню якості еякуляту.

З'ясування суперечливих питань та прогалин у розумінні взаємозв'язків між ожирінням та плідністю чоловіків є актуальною проблемою сучасної науки та потребує глибшого та системного аналізу маркерів, що потенційно можуть свідчити про функціональний стан репродуктивної системи за умов впливу стресових чинників, зокрема, за надмірного накопичення жирової тканини в організмі. Отримані результати в перспективі дозволять удосконалити прогностичні підходи щодо тактики комплексного лікування безпліддя в чоловіків на тлі надмірної маси тіла / ожиріння з метою досягнення бажаної вагітності.

Для реалізації поставленої мети та сформульованих завдань представлена робота була здійснена у двох напрямках: *перший напрямок* полягав у проведенні проспективного дослідження із залученням чоловіків репродуктивного віку, яких розподілили на три групи залежно від розрахованого ІМТ. У рамках цього етапу були проаналізовані основні параметри спермограми та біохімічні показники еякуляту (згідно з Керівництвом Всесвітньої організації охорони здоров'я по аналізу еякуляту людини, 2010), які є рутинними (стандартними) методиками при діагностиці репродуктивних порушень у чоловіків. Також були проведені додаткові дослідження: визначення концентрації лептину, прозапальних цитокінів ІЛ-1 β , ІЛ-18 у спермальній плазмі; концентрації Ca²⁺, K⁺, Na⁺ у спермальній плазмі та сперматозоїдах.

Другий напрямок роботи передбачав експериментальне вивчення впливу короткотривалого висококалорійного харчування самців щурів на морфометричні параметри тіла та органів; метаболічні показники крові (ліпідограма, вміст глюкози, лептину), показники функціонального стану та мітохондріального дихання сперматозоїдів.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили, використовуючи стандартні методи описової статистики, порівняльного та кореляційного аналізів. Усі результати вважалися вірогідними за умови, якщо $p < 0.05$.

Згідно з розробленим дизайном було проведено обстеження та аналіз зразків еякуляту від 120 чоловіків віком 25–38 років. Залежно від розрахованого ІМТ було сформовано 3 групи: контрольна група (КГ) включала 30 практично здорових чоловіків, які проходили профілактичне обстеження у Медичному Центрі «Інтерсоно», і їхні показники ІМТ були у межах норми (ІМТ 18.5–24.9); група з надмірною масою тіла (ГНМТ) налічувала 50 чоловіків із ІМТ 25.0–29.9; група з ожирінням (ГО) – 40 пацієнтів з ІМТ > 30.0.

Виявлено, що у чоловіків із надмірною масою тіла та з ожирінням значно погіршувалися основні показники спермограми: концентрація сперматозоїдів зменшилась у 1.4–2.3 раза ($p = 0.04$), загальна кількість статевих клітин в еякуляті у 2.1–2.5 раза ($p = 0.04$), відсоток прогресивно рухливих сперматозоїдів знижувався у 1.3 раза лише серед пацієнтів з надмірною масою тіла ($p = 0.04$); життєздатність сперматозоїдів у групах порівняння знижувалася у 1.2 раза ($p < 0.05$), а кількість нормальних морфологічних форм статевих клітин – у 2.1–2.4 раза ($p < 0.05$).

Додаткові розрахунки концентрації / загальної кількості рухливої сперми, детальна морфологічна оцінка сперматозоїдів та визначення індексів множинних дефектів підтвердили несприятливий вплив зростання маси тіла на якість еякуляту.

Встановлено, що у пацієнтів з ожирінням медіана концентрації фруктози була нижчою у 1.2 раза ($p < 0.05$), водночас у ГНМТ рівні фруктози спермальної плазми не суттєво відрізнялися від КГ. Зважаючи на те, що процеси фруктолізу можуть бути більш інтенсивними при високій концентрації сперматозоїдів, була здійснена корекція рівнів фруктози з урахуванням концентрації статевих клітин, а також концентрації рухливої сперми. Показано, що чоловіки з ожирінням мали у 1.3–1.4 раза нижчі скориговані рівні фруктози спермальної плазми в порівнянні з КГ ($p < 0.05$). З огляду на дані, що описані вище, запропоновано розглядати скориговані значення фруктози як більш надійний маркер при оцінці фертильного статусу

чоловіків.

Показано, що у ГНМТ та ГО медіана концентрації лимонної кислоти спермальної плазми була вищою у 1.8–2.0 раза ($p < 0.05$), а показники цинку – у 1.6–2.4 раза ($p < 0.05$). Встановлено, що у пацієнтів із надмірною масою тіла та ожирінням концентрації ІЛ-18 знижувалися у 1.4–1.5 раза ($p < 0.05$), натомість вміст ІЛ-1 β був нижчим у 2.0–2.4 раза ($p < 0.05$) і становив 10.2 [6.3–17.1] пг/мл у групі з надмірною масою тіла, 9.8 [1.38–5.33] пг/мл – у групі з ожирінням ($p < 0.05$). Ці дані свідчать про відсутність ознак прозапального стану в репродуктивному тракті чоловіків при ожирінні. Було виявлено помірний негативний кореляційний зв'язок між ІЛ-18 та концентрацією цинку в еякуляті ($r = -0.38$, $p < 0.05$), що, ймовірно, можна пояснити захисною дією цинку у відповідь на ушкоджувальні патологічні процеси, пов'язані зі збільшенням ІМТ.

Показано, що для пацієнтів з надмірною масою тіла та з ожирінням були притаманні композиційні зміни еякуляту в системі «середовище – клітина»: внутрішньоклітинне зростання Ca^{2+} та зниження K^+ ; позаклітинно – навпаки, реєструвалися вищі концентрації K^+ та нижчі показники Ca^{2+} ($p < 0.05$).

Представлене дослідження є першим проспективним дослідженням, що комплексно оцінює основні та додаткові параметри спермограми, композиційний склад спермальної плазми на предмет маркерів додаткових статевих залоз, лептину, неорганічних іонів, прозапальних цитокінів при надмірній масі тіла / ожирінні у чоловіків репродуктивного віку. Підтверджено, що зростання ІМТ несприятливо позначається на вище зазначених параметрах та, відповідно, негативно впливає на фертильний потенціал пацієнтів.

У рамках другої частини дисертаційної роботи, як інструмент для підтвердження наявних або з'ясування суперечливих спостережень, що отримані під час досліджень біологічного матеріалу чоловіків, були використані тваринні моделі. У експеримент було включено 30 статевозрілих білих нелінійних щурів-самців масою тіла 250–300 г, яких випадковим чином

розподілили на 3 групи (по 10 самців у кожній). Контрольна група (КГ) отримувала стандартний раціон; перша дослідна група тварин перебувала на дієті з високим вмістом жиру (ВЖД) – стандартний корм був доповнений смальцем таким чином, щоб частка жиру становила 45% добового калоражу; друга дослідна група споживала корм з високим вмістом жиру та цукру (ВЖЦД) – 40 % ккал складала жири та 46 % припадало на вуглеводи.

Продемонстровано, що після 7 тижнів перебування щурів на дієті з високим вмістом жиру та цукру, коефіцієнт вісцерального жиру зріс на 40 % ($p < 0.05$), що вказує на значні метаболічні зміни у цій групі та, відповідно, більш ефективно застосування ВЖЦД для моделювання ожиріння в щурів. Запропоновані висококалорійні раціони не спричинили значних змін таких показників, як приріст маси тіла, індекс Лі та гонадосоматичний індекс ($p > 0.05$).

Показано, що на тлі висококалорійного харчування в щурів виявляли характерні ознаки дисліпідемії – концентрації загального холестерину плазми крові у ВЖД групі зросли на 24.5% ($p = 0.035$), у ВЖЦД – на 29.8% ($p = 0.035$); коефіцієнт атерогенності – зріс у 1.8–2.1 раза ($p < 0.05$); а вміст фракції ліпопротеїнів низької щільності у групах зростав у 1.9–2.1 раза ($p = 0.025$). Не виявлено суттєвої різниці щодо рівня глюкози плазми крові між групами ($p > 0.05$). Концентрація лептину крові щурів до початку експерименту між групами не відрізнялася і становила 0.4–0.44 нг/мл ($p = 0.05$), а після 7 тижнів застосування дієт спостерігалось незначне зростання рівнів лептину в усіх групах тварин: у ВЖД на 9.0%, у ВЖЦД – на 14% від початкових даних ($p < 0.05$).

При аналізі епідидимальної сперми виявлено, що рухливість сперматозоїдів погіршувалася: у ВЖД групі була на 13% нижчою, а серед тварин, що споживали ВЖЦД, – на 18% порівняно з КГ ($p < 0.05$). Загальна кількість виділених сперматозоїдів та життєздатність не показали істотної різниці між групами ($p > 0.05$).

У представленій роботі вперше в Україні описано функціональний стан

мітохондрій інтактних сперматозоїдів на тлі дієт-індукованого ожиріння. Було показано, що серед тварин на ВЖЦД базальна швидкість дихання сперматозоїдів становила 0.040 ± 0.013 нМ/О₂/10млн.клітин/хв та майже вдвічі перевищувала показники контролю ($p = 0.015$).

Максимальна швидкість дихання, що є мірою здатності клітин реагувати на підвищену потребу в енергії, у ВЖЦД групі тварин була вищою на 30% ($p = 0.04$). Реєструвалося зниження резервної дихальної здатності мітохондрій сперматозоїдів на тлі харчування висококалорійними дієтами, однак статистично значущої різниці між групами не виявлено ($p > 0.05$). Показано, що оптимальна концентрація протонофора для досягнення максимальних показників дихання інтактних статевих клітин становила 0.5 мкМ/л FCCP (карбоніл-ціанід-*p*-трифлорметоксифенілгідразону). Підтверджено, що вимірювання споживання кисню є досить чутливим маркером функціонального стану мітохондрій. Отримані результати доповнюють наукові дані у сфері біоенергетики сперматозоїдів за фізіологічних умов та дії різних зовнішніх чинників, а також розширюють розуміння впливу надмірного відкладення жирової тканини на показники фертильного потенціалу чоловіків.

Ключові слова: безпліддя чоловіків, фертильний потенціал, надмірна маса тіла / ожиріння, спермограма, спермальна плазма, лептин, ліпидограма, висококалорійні дієти, мітохондріальне дихання сперматозоїдів.

SUMMARY

Kozopas N.M. Markers of male fertility potential against the background of overweight and obesity. – Ph.D. Thesis Manuscript.

Dissertation to obtain the degree of Doctor of Philosophy, specialty 222 – Medicine (22 – Healthcare). – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2022.

The dissertation is devoted to the evaluation of the features of fertility status and functional metabolic changes in overweight / obese men. The presented research was carried out based on the Department of Clinical Laboratory Diagnostics of the FPGE of Danylo Halytsky Lviv National Medical University during 2018 – 2022.

Despite the presence of a significant amount of scientific investigations related to the impact of excessively accumulated adipose tissue in the body on the reproductive system, the mechanisms of the interaction between obesity and male infertility remain incompletely elucidated. The influence of increasing body mass index (BMI) on fertility potential is also a debatable issue, as research results in this area are often conflicting. For example, a meta-analysis by MacDonald et al., 2010 included data from 4853 patients, and found no correlation between BMI and sperm concentration or total count of spermatozoa. In contrast, a similar work by Sermondade et al., 2013 showed that with BMI growth the prevalence of azoospermia and oligozoospermia increased by almost double. Simultaneously, empirical data from some experiments indicate that weight loss can improve sperm quality.

The controversial issues and gaps in understanding the relationship between obesity and male fertility are actual problems of modern science. A deeper and more systematic analysis of markers that can potentially indicate the functional state of the reproductive system under the influence of stress factors, particularly excessive adiposity, is needed. In the future, the obtained results would allow for improving

prognostic approaches regarding the tactics of complex male infertility treatment against the background of excess body weight and obesity to achieve the desired pregnancy.

According to the study design, appropriate goals, tasks, the presented work was carried out in two approaches. The first direction consisted in conducting a prospective study involving men of reproductive age, who were divided into three groups depending on the previously calculated BMI. As part of this stage, sperm analysis and male accessory sex gland markers detection were performed (according to the World Health Organization Guidelines for laboratory manual examination and processing of human semen, fifth edition, 2010). These parameters are routine (standard) methods in the diagnostics of male reproductive disorders. Additional studies were also performed: seminal leptin concentration, pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-18, concentrations of Ca²⁺, K⁺, Na⁺ in seminal plasma and spermatozoa were determined. The second direction of our work consisted of an experimental study: we investigated the short-term high-calorie nutrition effect of male rats on the body and organ morphometric parameters; blood metabolic changes (lipid profile, glucose, and leptin content), indicators of the functional state and sperm mitochondrial oxygen consumption. The standard methods of descriptive statistics, comparative and correlation analyses were used for processing the obtained results. The difference between groups was considered as significant if $p < 0.05$.

We analyzed the sperm samples from 120 patients (25–38 years old) following the developed work design. Participants were examined and divided into 3 groups depending on the previously calculated BMI: the control group (CG) included 30 practically healthy men, who underwent a preventive examination at the "Intersono" Medical Center and whose BMI were within the normal range (BMI 18.5–24.9); the group with excess body weight (overweight) consisted of 50 men with a BMI of 25.0–29.9; obese group (OB) – 40 patients with BMI > 30.0.

It was found that the main sperm parameters of the overweight and obese men were significantly worsened: the sperm concentration decreased by 1.4–2.3 times

($p = 0.04$), the total sperm number – by 2.1–2.5 times ($p = 0.04$), the percentage progressively motile spermatozoa decreased by 1.3 times only among patients with overweight ($p = 0.04$); sperm viability in the groups of comparison decreased by 1.2 times ($p < 0.05$); the number of normal morphological sperm forms decreased by 2.1–2.4 times ($p < 0.05$). Additional calculations of the concentration/total motile sperm, detailed morphological evaluation of spermatozoa, and determination of the indices of multiple defects confirmed the adverse effect of increasing body weight on semen quality.

It was established that in obese patients, the median fructose concentration was 1.2 times lower ($p < 0.01$), while in the overweight group, sperm fructose levels did not significantly differ from the control group. Taking into account that the processes of fructolysis can be more intense with a high sperm concentration, the correction of fructose levels was carried out taking into account the sperm concentration, as well as the concentration of motile sperm. It was shown that obese men had 1.3–1.4 times lower adjusted levels of seminal fructose compared to CG ($p < 0.05$). It was proposed to consider the adjusted values of seminal fructose as a more reliable marker during assessing male fertility status.

Furthermore, it was shown that the median concentration of seminal citric acid in overweight and obese men increased significantly by 1.8–2.0 times ($p < 0.05$), and seminal zinc increased by 1.6–2.4 times ($p < 0.05$). In addition, IL-18 levels decreased by 1.4–1.5 ($p < 0.05$), while IL-1 β content was 2.0–2.4 times lower ($p < 0.05$) and was 10.2 [6.3–17.1] pg/ml in the overweight and 9.8 [1.38–5.33] pg/ml in the obese group ($p < 0.05$). These data do not confirm pro-inflammatory state in the reproductive tract of men with adiposity. A moderate negative correlation was found between IL-18 and zinc concentration in seminal plasma ($r = -0.38$, $p < 0.05$), that could probably be explained by the protective zinc effect in response to harmful pathological processes associated with a BMI increase.

The sperm compositional changes in the "microenvironment – cell" system were detected in overweight and obese patients: intracellular increase of Ca²⁺ and decrease of K⁺; extracellularly – higher concentrations of K⁺ and lower levels of

Ca²⁺ were recorded ($p < 0.05$).

The presented study is the first comprehensive prospective study that evaluates the main and additional sperm parameters, the seminal composition, including markers of accessory sex glands, leptin, inorganic ions, pro-inflammatory cytokines in overweight / obese males. It has been confirmed that a BMI increase adversely affects the above-mentioned parameters and, accordingly, negatively affects the male fertility potential.

The animal models were used as the second direction of the presented work to confirm existing or clarify contradictory observations obtained during human studies. The experimental part included 30 sexually mature white non-linear male rats with a body weight of 250–300 g. All animals were randomly divided into 3 groups (10 males in each). The control group (CG) received a standard chow; the first experimental animal's group was on a high-fat diet (HFD) – the standard feed was supplemented with lard to achieve 45% of daily caloric intake by fat; the second experimental group consumed a diet with a high fat and sugar (HFHSD) – 40% of kcal of fats and 46% of carbohydrates.

It was demonstrated that after 7 weeks of feeding a high-fat high-sugar diet, the visceral fat index significantly increased by 40% ($p < 0.05$), confirming significant metabolic changes in this group and, accordingly, a more effective application of HFHSD for modeling adiposity in rats. The proposed high-calorie diets did not cause significant changes in such indicators as body weight gain, Lee index, and gonadosomatic index ($p > 0.05$).

It was confirmed that high-calorie nutrition during 7 weeks caused typical signs of dyslipidemia – the concentration of total cholesterol in the HFD rat's blood plasma increased by 24.5% ($p = 0.035$), in the HFHSD group – by 29.8% ($p = 0.035$); the atherogenic coefficient was higher by 1.8–2.1 times ($p < 0.05$); and the low-density lipoprotein fraction increased by 2.1 times ($p = 0.025$). No significant difference was found in blood plasma glucose levels between groups ($p > 0.05$). The mean leptin concentration before the start of the experiment did not differ between the groups and was 0.4–0.44 ng/ml ($p = 0.05$), and a slight increase of leptin levels was observed

in all groups after 7 weeks of feeding diets: in the HFD by 9.0%, in the HFHSD – by 14% from the initial data ($p < 0.05$).

The analysis of epididymal suspension showed that sperm motility worsened in the experimental groups: it was 13% lower in the HFD group, and 18% lower in the HFHSD group compared to the CG ($p < 0.05$). The total number of isolated spermatozoa and viability did not show a significant difference between the groups ($p > 0.05$).

In the presented work, for the first time in Ukraine, the mitochondrial functional state of intact spermatozoa is described against the background of diet-induced obesity. The basal respiration rate of spermatozoa was 0.040 ± 0.013 nM/O₂/10 million cells/min among HFHSD animals and was almost twice as high as in CG ($p = 0.015$). The maximal mitochondrial oxygen consumption, which is a measure of the response cells' ability to increase energy demand, was 30% higher in this group of rats ($p = 0.04$); decreasing of the mitochondria reserve respiratory capacity (spare respiratory capacity) was registered, but no statistically significant difference between the groups was found ($p > 0.05$).

It was shown that the optimal concentration of the protonophore for achieving the maximum respiration of intact sperm cells was 0.5 μM/l FCCP. It has been confirmed the oxygen consumption measurement is a fairly sensitive marker of the mitochondrial functional state. The obtained results complement scientific data in the field of sperm bioenergetics under physiological conditions / impact of various external factors, and expand the understanding of the influence of excessive adiposity on the male fertility potential.

Keywords: male infertility, overweight/obesity, sperm analysis, seminal plasma, leptin, lipid profile, high-calorie diets, sperm mitochondrial respiration, oxygen consumption.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

- **Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**
 1. Kozopas N.M., Chornenka O.I., Vorobets M.Z., Lapovets L.Y., Maksymyuk H.V. Body Mass Index and Sperm Quality: Is there a Relationship? J Hum Reprod Sci 2020;13(2):110–113. DOI:10.4103/jhrs.JHRS_15_20. *(Дисертантка особисто провела забір матеріалу, здійснила аналіз, опрацювала отримані результати, оформила статтю до друку. Співавтори надавали консультативну допомогу).*
 2. Kozopas N.M., Boykiv N.D., Dorofeyeva U.S., Fafula R.V., Maksymyuk H.V. Seminal plasma pro-inflammatory cytokines and semen quality in overweight and obese men. Riv Ital Med Lab 2021;17(1):24–30. DOI: 10.23736/S1825-859X.21.00086-4. *(Дисертантка здійснила забір матеріалу, його аналіз, опрацювала та узагальнила отримані результати, провела аналіз науково-фахових джерел літератури, підготувала статтю до друку. Співавтори здійснювали консультативну допомогу).*
 3. Козопас Н.М., Максимюк Г.В. Показники фертильності щурів та рівень лептину в плазмі крові за умов впливу висококалорійних дієт. Медична та клінічна хімія. 2022;23(4):59–63. DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2021.i4.12734. *(Дисертантка особисто провела постановку експериментального дослідження, аналіз та узагальнення отриманих результатів, написала та оформила статтю до друку. Співавторка надавала консультативну допомогу).*

- **Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. Козопас Н.М. Зв'язок компонентів метаболічного синдрому та чоловічого безпліддя (огляд літератури). Міжнародна науково-практична конференція на тему: «Досягнення медичної науки як чинник стабільності розвитку медичної практики» 9–10 березня 2018; Дніпро: Організація наукових медичних досліджень «Salutem». *(Публікація тез. Дисертантка здійснила пошук та аналіз науково-фахових джерел літератури, підготувала тези до друку).*
2. Козопас Н.М., Лаповець Л.Є., Максимюк Г.В. Вміст цинку в спермальній плазмі чоловіків із надмірною масою тіла. Матеріали XXIII Міжнародного медичного конгресу молодих вчених, 15–17 квітня 2019 року; Тернопіль: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України. *(Публікація тез. Дисертантка здійснила забір матеріалу, його аналіз, опрацювала та узагальнила отримані результати, провела аналіз науково-фахових джерел літератури, підготувала тези до друку. Співавтори здійснювали консультативну допомогу).*
3. Kozopas N.M., Maksymyuk H.V., Lapovets L.E., Chornenka O.I., Dorofeeva U.S. The effect of increasing body mass index on sperm quality of subfertile men. J Clin Chim Acta. 2019. 23rd IFCC - EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Barcelona). *(Стендова доповідь та публікація тез. Дисертантка особисто провела забір матеріалу, здійснила аналіз, опрацювала отримані результати, оформила тези до друку, оформила та представила стендову роботу. Співавтори надавали консультативну допомогу).*
4. Kozopas N.M., Kost A.S., Lapovets L.E., Maksymyuk H.V. Impact of obesity and metabolic syndrome on semen quality. Proceedings of the 14th Bialystok International Medical Congress for Young Scientists. 2019 May 17–18; Bialystok, Poland: Educational-Scientific Center, the Faculty of Health

- Sciences, Medical University of Bialystok. *(Усна доповідь та публікація тез. Дисертантка особисто здійснила забір матеріалу та аналіз отриманих результатів, оформила тези до друку, представила роботу науковій спільноті. Співавтори надавали консультативну допомогу).*
5. Козопас Н.М., Бойків Н.Д., Максимюк Г.В. Прозапальні цитокіни та якість еякуляту чоловіків із надмірною масою тіла та ожирінням. Матеріали LXIII науково-практичної конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», 12 червня 2020 року; Тернопіль: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України. *(Публікація тез. Дисертантка здійснила забір матеріалу, його аналіз, опрацювала та узагальнила отримані результати, провела аналіз науково-фахових джерел літератури, підготувала тези до друку. Співавтори здійснювали консультативну допомогу).*
 6. Козопас Н.М., Максимюк Г.В. Інфламасома та розвиток прозапального стану в організмі. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «YOUNG SCIENCE 2.0» Національна медична академія післядипломної освіти імені П. П. Шупика, м. Київ, 20 листопада 2020 року. *(Стендова доповідь та публікація тез. Дисертантка особисто провела забір матеріалу, здійснила аналіз, опрацювала отримані результати, оформила тези до друку, оформила та представила стендову роботу. Співавтори надавали консультативну допомогу).*
 7. Kozopas N.M., Dorofeyeva U.S., Maksymyuk H.V. Is there a relationship between seminal zinc concentration and sperm quality in overweight men? 7th Lublin International Medical Congress 26–28 November 2020, Lublin, Poland. *(Стендова доповідь та публікація тез. Дисертантка особисто провела забір матеріалу, здійснила аналіз, опрацювала отримані результати, оформила тези до друку, оформила та представила стендову роботу. Співавтори надавали консультативну допомогу).*

8. Козопас Н.М, Максимюк Г.В. Оцінка показників морфології сперматозоїдів у чоловіків з надмірною масою тіла та ожирінням. Всеукраїнська міждисциплінарна науково-практична конференція з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень (до 100-річчя від заснування УМСА)» Полтавський державний медичний університет. Полтава 8 жовтня 2021 року. *(Публікація тез. Дисертантка здійснила забір матеріалу, його аналіз, опрацювала та узагальнила отримані результати, провела аналіз науково-фахових джерел літератури, підготувала тези до друку. Співавтори здійснювали консультативну допомогу).*
9. Козопас Н.М. Вплив різнокомпонентних дієт на розвиток аліментарного ожиріння та показники фертильності щурів. 82-а студентська наукова конференція для студентів-медиків та молодих вчених – LYSICon 82, 27–29 жовтня 2021 р. *(Усна доповідь та публікація тез. Дисертантка особисто здійснила забір матеріалу та аналіз отриманих результатів, оформила тези до друку, представила роботу науковій спільноті. Співавтори надавали консультативну допомогу).*
10. Козопас Н.М., Бойків Н.Д., Максимюк Г.В. Вміст лептину спермоплазми у пацієнтів з різним індексом маси тіла. XV всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених з міжнародною участю „Актуальні питання клінічної медицини”, (19 листопада 2021 р., м. Запоріжжя). *(Публікація тез. Дисертантка здійснила забір матеріалу, його аналіз, опрацювала та узагальнила отримані результати, провела аналіз науково-фахових джерел літератури, підготувала тези до друку. Співавтори здійснювали консультативну допомогу).*
11. Kozopas N.M., Manko B.O., Mazur H.M., Maksymyuk H.V. The effects of high-fat or high-fat/high-sugar diets on rat sperm parameters and mitochondrial respiration. J Clin Chim Acta. Nov 28–Dec 02, 2021. EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Munich. *(Публікація тез. Дисертантка здійснила забір матеріалу, його аналіз,*

опрацювала та узагальнила отримані результати, провела аналіз науково – фахових джерел літератури, підготувала тези до друку. Співавтори здійснювали консультативну допомогу).

12. Козопас Н.М., Максимюк Г.В. Зміни вмісту фруктози в еякуляті чоловіків на тлі надмірної маси тіла та ожиріння. ІХ науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів». 22–23 вересня 2022 року; Тернопіль: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України. *(Публікація тез. Дисертантка здійснила забір матеріалу, його аналіз, опрацювала та узагальнила отримані результати, провела аналіз науково-фахових джерел літератури, підготувала тези до друку. Співавтори здійснювали консультативну допомогу).*

- **Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:**

1. Козопас Н.М., Максимюк Г.В., Лаповець Л.Є., Одноріг Л.О. Метаболічний синдром та чоловіче безпліддя: сучасний погляд на проблему. Bull Probl Biol Med. 2018;1(2):26. *(Дисертантці належить ідея роботи, а також самостійно виконала аналіз наукової літератури, опрацювала та сформулювала основні висновки роботи, оформила статтю. Співавтори надали консультативну допомогу).*

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ.....	21
ВСТУП.....	23
РОЗДІЛ 1. ОЖИРІННЯ ТА НАДМІРНА МАСА ТІЛА ЯК ЧИННИКИ ВПЛИВУ НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ЧОЛОВІКІВ (Огляд літератури).....	31
1.1. Особливості змін спермограми на тлі ожиріння та зростання індексу маси тіла в чоловіків.....	31
1.2. Теорії щодо механізму впливу ожиріння на чоловічу фертильність.....	34
1.3. Застосування тваринних моделей для оцінки фертильного статусу самців при ожирінні та супутніх метаболічних змінах.....	47
1.4. Висновки до розділу 1.....	50
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	52
2.1. Дизайн дослідження.....	52
2.2. Дослідження еякуляту людини.....	55
2.2.1. Первинна оцінка еякуляту.....	55
2.2.2. Підрахунок концентрації та загальної кількості статевих клітин.....	56
2.2.3. Вивчення параметрів рухливості.....	57
2.2.4. Вивчення життєздатності сперматозоїдів.....	58
2.2.5. Оцінка морфології сперматозоїдів та розрахунок індексів множинних дефектів	59
2.2.6. Підрахунок кількості лейкоцитів в еякуляті.....	60
2.3. Біохімічні методи дослідження функції придаткових статевих залоз.....	61
2.3.1. Визначення концентрації фруктози спермальної плазми.....	61
2.3.2. Оцінка вмісту лимонної кислоти в спермальній плазмі.....	62
2.3.3. Визначення рівня цинку спермальної плазми.....	63
2.4. Визначення концентрації Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} у спермальній плазмі та сперматозоїдах.....	64

2.5. Імунологічні дослідження.....	66
2.5.1. Визначення концентрацій прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-18 у спермальній плазмі чоловіків.....	66
2.5.2. Визначення вмісту лептину у спермальній плазмі чоловіків.....	67
2.6. Характеристика експериментальних моделей на щурах.....	69
2.7. Дослідження спермограми щурів.....	70
2.7.1. Виділення сперматозоїдів.....	70
2.7.2. Визначення загальної кількості статевих клітин.....	70
2.7.3. Вивчення рухливості сперматозоїдів.....	71
2.7.4. Оцінка життєздатності сперматозоїдів.....	71
2.8. Полярографічне дослідження мітохондріального дихання статевих клітин.....	72
2.9. Біохімічні методи дослідження плазми крові щурів.....	76
2.9.1. Визначення концентрації глюкози.....	76
2.9.2. Оцінка показників ліпідного обміну.....	77
2.10. Статистичні методи обробки результатів.....	82
РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ СПЕРМОГРАМИ ТА МАРКЕРІВ ПРИДАТКОВИХ СТАТЕВИХ ЗАЛОЗ СЕРЕД ПАЦІЄНТІВ З РІЗНИМ ІНДЕКСОМ МАСИ ТІЛА.....	84
3.1. Особливості основних показників спермограми у пацієнтів з надмірною масою тіла та ожирінням	84
3.2. Біохімічні показники еякуляту на тлі надмірної маси тіла та ожиріння.....	92
3.3. Висновки до розділу 3.....	96
РОЗДІЛ 4. ЗМІНИ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СПЕРМАЛЬНОЇ ПЛАЗМИ У ЧОЛОВІКІВ З НАДМІРНОЮ МАСОЮ ТІЛА ТА ОЖИРІННЯМ.....	97
4.1. Особливості цитокінового профілю еякуляту в чоловіків із надмірною масою тіла та ожирінням.....	97

4.2. Зміни вмісту лептину спермальної плазми чоловіків при зростанні індексу маси тіла.....	99
4.3. Зміни концентрацій неорганічних іонів Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у сперматозоїдах та спермальній плазмі чоловіків при надмірній масі тіла та ожирінні.....	101
4.4. Висновки до розділу 4.....	102
РОЗДІЛ 5. ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ КОРОТКОТРИВАЛОМУ ХАРЧУВАННІ ЩУРІВ ВИСОКОКАЛОРИЙНИМИ ДІЄТАМИ.....	
5.1. Зміни морфометричних показників та спермограми щурів за умов утримання на висококалорійних дієтах.....	104
5.2. Біохімічні показники плазми крові щурів за умов утримання на висококалорійних дієтах.....	107
5.2.1. Показники ліпідного профілю плазми крові у дослідних групах.....	107
5.2.2. Глюкоза плазми крові у дослідних групах.....	110
5.2.3. Рівень лептину плазми крові щурів за умов утримання на висококалорійних дієтах.....	111
5.3. Особливості мітохондріального дихання статевих клітин щурів за умов перебування на висококалорійних дієтах.....	112
5.4. Висновки до розділу 5.....	115
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	117
ВИСНОВКИ.....	135
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	138
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	140
ДОДАТКИ.....	165

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активні форми кисню

ВЖД – високожирова дієта

ВЖЦД – дієта з високим вмістом жирів і цукру

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ГНМТ – група з надмірною масою тіла

ГнРГ – гонадотропін-рилізинг-гормон

ГО – група з ожирінням

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ДРТ – допоміжні репродуктивні технології

ЗХС – загальний холестерин

ІДС – індекс дефектності сперматозоїдів

ІМТ – індекс маси тіла

ІТЗ – індекс тератозооспермії

ІФА – імуноферментний аналіз

КА – коефіцієнт атерогенності

КГ – контрольна група

ЛГ – лютеїнізуючий гормон

ЛДГ – лактатдегідрогеназа

ММП – мітохондріальний мембранний потенціал

МС – метаболічний синдром

НАД⁺ – нікотинамідаденіндинуклеотид

НАД-Н – відновлений нікотинамідаденіндинуклеотид

НАДФ⁺ – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

НАДФ-Н – відновлений нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

РДЗ – резервна дихальна здатність мітохондрій

ТГ – тригліцериди

ФСГ – фолікулостимулюючий гормон

ХС-ЛПВЩ – холестерин ліпопротеїнів високої щільності

ХС-ЛПНЩ – холестерин ліпопротеїнів низької щільності

СРБ – С-реактивний білок

ІЛ – інтерлейкін

HEPES – 4-(2-гідроксиетил)-1-піперазинетансульфонова кислота

mT - HEPES – модифікований розчин Тироде, збагачений HEPES

NP – непрогресивна рухливість (non-progressive motility)

PIPES – піперазину-N, N'-біс (буфер етансульфонової кислоти)

PR – прогресивна рухливість (progressive motility)

FCCP – карбоніл-ціанід-р-трифлорметоксифенілгідрозон

ВСТУП

Актуальність теми. Одним із важливих показників репродуктивного здоров'я населення є здатність відтворювати потомство. Наукова спільнота активно зосереджує увагу на вивченні питання безпліддя, оскільки воно є не лише медичною, а й соціальною проблемою [1, 2].

На сьогодні, при скаргах на неможливість зачати дитину протягом одного року регулярного статевого життя без використання контрацептивних засобів, обстеження спрямовується на пошук репродуктивних порушень обох партнерів. Вважається, що чоловічий фактор має вагоме значення у половині випадків безпліддя.

Складові сучасного способу життя – гіподинамія, незбалансоване харчування з високою кількістю простих вуглеводів, рафінованих компонентів та інші шкідливі звички є причиною виникнення ожиріння серед населення [3]. Упродовж останніх десятиліть ця патологія набула глобального масштабу, а її поширеність серед дорослих віком від 18 років і старше збільшилась майже втричі [4]. Нещодавно був опублікований звіт Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) стосовно оновлених даних про поширеність надмірної маси тіла / ожиріння, у якому зазначалося, що приблизно у 60% жителів Європи реєструється ця патологія; окрім того було підкреслено синергічність зв'язку між двома пандеміями – ожирінням та коронавірусним захворюванням (COVID-19), що спричиняє значне підвищення показників смертності серед пацієнтів [5].

Відомо, що зростання ІМТ може бути фактором ризику для розвитку неінфекційних патологій з боку серцево-судинної, опорно-рухової, ендокринної систем та деяких онкологічних станів [3, 6–9]. Окрім того, є дані, що підтверджують зв'язок між жіночим ожирінням та безпліддям. Хоча надмірна маса тіла та ожиріння розглядаються як фактори, що впливають на репродуктивну функцію чоловіків, однак консенсусу стосовно подібного зв'язку у чоловіків не досягнуто, оскільки результати досліджень щодо

кореляції ІМТ та основних параметрів спермограми, що відображають фертильний потенціал, є досить суперечливими [10, 11]. Водночас емпіричні дані низки експериментів показують, що втрата ваги потенційно може сприяти покращенню якості сперми [12, 13].

Робоча група експертів ВООЗ із розробки комплексного посібника з безпліддя у 2012 році проаналізувала ключові чинники стилю життя, що впливають на фертильність, особливу увагу зосереджуючи на проблемі ожиріння. У результаті було рекомендовано консультувати чоловіків з безплідних пар щодо стратегії втрати ваги, якщо їхні морфометричні показники демонстрували ожиріння [14]. Зазначимо, що у державних статистичних звітах України практично відсутня інформація про причини безпліддя у чоловіків.

На сьогодні вчені виділяють наступні механізми несприятливого впливу надмірної маси тіла на параметри плідності: гормональний [15–17], температурний [18, 19], епігенетичний [20, 21] та інші. Слід наголосити, що кожен з механізмів може діяти як ізольовано, так і в комплексі з іншими факторами [22].

Раніше було виявлено, що при ожирінні збільшується кількість макрофагів жирової тканини [23], які стають основним джерелом прозапальних цитокінів [24–26], провокуючи запалення низького ступеня. Була запропонована теорія, що саме прозапальний стан, і, як результат, розвиток оксидативного стресу може забезпечити пояснення прямого впливу ожиріння на нормальний сперматогенез та якість еякуляту [27–29]. Проте лише незначна кількість досліджень присвячена оцінці запалення статевого тракту у пацієнтів із підвищеним індексом маси тіла (ІМТ) [30, 31], у тому числі в Україні, на жаль, це питання ще недостатньо вивчається.

Науковці активно продовжують вивчення медіаторів ожиріння, які можуть негативно впливати на чоловічу репродуктивну систему. На сьогодні значна увага зосереджена на дослідженні впливу гіперінсулінемії,

гіперлептинемії, хронічного запалення та оксидативного стресу на основні параметри спермограми [32].

Аналіз еякуляту вважається золотим стандартом при діагностиці та моніторингу лікування чоловічого безпліддя [33]. Однак часто інтерпретація результатів спермограми є ускладненою, оскільки на якість еякуляту можуть впливати різні фактори, у тому числі підготовка пацієнта та дотримання правил забору матеріалу. Також існує потреба у пошуку нових біомаркерів спермальної плазми для розробки більш удосконалених діагностичних тестів чоловічого фертильного потенціалу [33].

Отже, розбіжність результатів досліджень та відсутність однозначного висновку щодо взаємозв'язку надмірної акумуляції жирової тканини в організмі із фертильністю чоловіків, а також недостатнє вивчення проблеми в Україні ще раз визначає необхідність додаткових досліджень у цій області для удосконалення діагностичних підходів та методів корекції порушень фертильного статусу пацієнтів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України на тему «Дослідження ролі системних та паракринних регуляторних механізмів у забезпеченні гомеостазування функціонально-метаболических параметрів організму за умов адаптації до дії екстремальних чинників різної природи» (№ державної реєстрації 0116 U004510). Автор є співвиконавцем вище згаданої теми.

Матеріали виконаної дисертаційної роботи щодо обстеження, проведення лабораторних досліджень відповідають вимогам норм біоетики (протокол №9, від 21 грудня 2018 року; протокол №8, від 26 вересня 2022 року).

Мета дослідження: з'ясувати особливості фертильного статусу та оцінити функціональні параметри метаболічних змін при надмірній масі тіла / ожирінні в межах проспективного дослідження чоловіків та з використанням тваринних моделей (щурів).

Завдання дослідження.

1. Дослідити зміни основних параметрів спермограми в чоловіків із надмірною масою тіла та з ожирінням.
2. З'ясувати особливості композиційного складу спермальної плазми при зростанні ІМТ: вміст маркерів придаткових статевих залоз (фруктози, лимонної кислоти, цинку), прозапальних цитокінів (ІЛ-1 β , ІЛ-18), лептину, іонів Ca²⁺, K⁺ та Na⁺.
3. Проаналізувати морфометричні й метаболічні зміни за умов короткотривалого утримання лабораторних тварин на висококалорійних раціонах з високим вмістом жиру / високим вмістом жиру та цукру.
4. Вивчити особливості основних параметрів сперми щурів на тлі висококалорійного харчування.
5. Оцінити вплив дієт-індукованого ожиріння на мітохондріальне дихання статевих клітин за використання тваринних моделей.

Об'єкт дослідження: чоловічий фертильний потенціал при надмірній масі тіла / ожирінні; параметри сперми та метаболічний профіль крові щурів при харчуванні висококалорійними дієтами.

Предмет дослідження: особливості спермограми, функціонального стану сперматозоїдів, біохімічного складу спермальної плазми, метаболічних змін при надмірній масі тіла та ожирінні.

Методи дослідження:

- біохімічні (визначення рівня фруктози, лимонної кислоти, цинку у спермальній плазмі; ліпідного профілю та глюкози крові спектрофотометричним методом; визначення іонів Ca²⁺, K⁺, Na⁺ методом полум'яної фотометрії);
- імунологічні (визначення цитокінів та лептину імуноферментним методом);

- експериментальні (вивчення фертильного потенціалу самців на тваринних моделях за умов впливу висококалорійних дієт, що використовують для моделювання ожиріння);
- електрохімічні (реєстрація швидкості поглинання кисню клітинами полярографічним методом за допомогою електроду Кларка);
- метод світлової (спермограма) та флюоресцентної мікроскопії (вивчення життєздатності сперматозоїдів);
- математико-статистичні (статистична обробка отриманих результатів).

Наукова новизна. Проведено комплексне системне дослідження показників спермограми, композиційного складу спермоплазми на предмет вмісту маркерів придаткових статевих залоз, лептину, неорганічних іонів, прозапальних цитокінів на тлі надмірної маси тіла та ожиріння в чоловіків репродуктивного віку.

Підтверджено та доповнено наявні наукові дані стосовно несприятливого впливу зростання ІМТ на якість еякуляту та маркери придаткових статевих залоз у спермальній плазмі; визначено, що із прогресивним відкладенням жирової тканини в організмі чоловіків зміни мають більш виражений характер.

Уперше продемонстровано, що при надмірній масі тіла / ожирінні були відсутні ознаки прозапального стану в еякуляті чоловіків; показано, що при ожирінні композиційні зміни вмісту іонів у системі «середовище-клітина» є більш вираженими та можуть свідчити про порушення гомеостазу еякуляту на тлі надмірного відкладення жирової тканини в організмі.

На основі вивчення вмісту лептину в еякуляті чоловіків із різним ІМТ та виявленої негативної кореляції його з показниками якості еякуляту, запропоновано розглядати вивчення лептину спермоплазми як один з маркерів впливу ожиріння на функціональний стан сперматозоїдів.

Продемонстровано, що утримання лабораторних тварин впродовж семи тижнів на дієті із високим вмістом жиру та цукру спричиняло ознаки вісцерального ожиріння (значне зростання відносної частки жирової тканини

у тілі). Однак запропоновані висококалорійні раціони не викликали суттєвих змін таких морфометричних показників, як приріст маси тіла, індекс Лі, гонадосоматичний індекс. Підтверджено, що харчування висококалорійними дієтами викликає ознаки дисліпідемії та гіперлептинемії.

Показано, що на тлі харчування висококалорійними дієтами у щурів спостерігалось зниження рухливості сперматозоїдів і цей показник прогресивно погіршувався зі зростанням коефіцієнта вісцерального жиру.

Вперше вивчено параметри мітохондріального дихання статевих клітин щурів після утримання на висококалорійних раціонах. Продемонстровано, що дієт-індуковане вісцеральне ожиріння викликає з одного боку підвищення функціональної активності мітохондрій сперматозоїдів, а з іншого – вичерпування здатності ефективно адаптуватись до змін енергетичних потреб за умов впливу негативних чинників, що, у результаті, може позначатися на якості сперми.

Практичне значення. Отримані у цій роботі результати розширюють розуміння патофізіологічних та біохімічних механізмів, які лежать в основі взаємозв'язку між ожирінням та фертильністю чоловіків репродуктивного віку, що надалі може значно доповнити як діагностичні підходи, так і тактику ведення пацієнтів із безпліддям.

Матеріали дисертаційної роботи впроваджені та використовуються у навчальному процесі на кафедрі клінічної лабораторної діагностики ФПДО, а також на кафедрі медичної біології, паразитології та генетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України. Результати наукових досліджень впроваджені в клініко-діагностичну практику ТОВ «Медичного центру Святої Параскеви».

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Дисертантка особисто провела патентно-інформаційний пошук, аналіз науково-медичної інформації за темою дисертації, самостійно здійснювала лабораторні дослідження та постановку експерименту на тваринних моделях, статистичну обробку даних та аналіз

отриманих результатів, які оформлено в розділах дисертації. Спільно із науковим керівником розробила програму, визначила мету і завдання дослідження, дизайн та методологію досліджень, сформулювала висновки.

У наукових працях, опублікованих у співавторстві, дисертантці належать фактичний матеріал власних досліджень, аналіз, статистична обробка та узагальнення отриманих результатів, підготовка праць до друку.

Робота виконана на базі лабораторії кафедри клінічної лабораторної діагностики ФПДО (завідувач – доктор медичних наук, професор Л.Є. Лаповець) Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України. Деякі фрагменти дослідження здійснювалися завдяки взаємній співпраці з установами: обстеження пацієнтів, забір біологічного матеріалу, постановка рутинних методик спермограми – на базі медичного центру «Інтерсоно» Medicover Group, ТОВ «Медичного центру Святої Параскеви»; визначення композиційного вмісту іонів еякуляту – на базі Інституту сільського господарства Карпатського регіону НААН України; експериментальна частина з використанням тваринних моделей – на базі Міжуніверситетського центру колективного користування клітинної біології та біоенергетики Львівського національного університету імені Івана Франка. Автор висловлює подяку керівництву та співробітникам вище згаданих закладів, а також науковцям кафедри фізіології людини та тварин біологічного факультету ЛНУ імені Івана Франка за підтримку та допомогу у виконанні фрагментів цієї роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднено на XXIII Міжнародному медичному конгресі молодих вчених (Тернопіль, 2019), 23 rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (Barcelona, 2019), 14th Bialystok International Medical Congress for Young Scientists (Bialystok, 2019), LXIII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (Тернопіль, 2020), науково-практичній конференції з міжнародною участю «YOUNG SCIENCE 2.0» у Національній медичній академії післядипломної

освіти імені П. П. Шупика (Київ, 2020), 7th Lublin International Medical Congress (Lublin, 2020), Всеукраїнській міждисциплінарній науково-практичній конференції з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень (до 100-річчя від заснування УМСА)» (Полтава, 2021), 82-ій науковій конференції для студентів-медиків та молодих вчених - LYSICon 82 (Львів, 2021 р.), XV всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні питання клінічної медицини» (Запоріжжя, 2021), EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, (Munich, 2021), IX науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів» (Тернопіль, 2022).

Публікації. За темою дисертаційної роботи опубліковано 16 наукових праць, з них – 2 статті у наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України та 2 – в іноземних періодичних виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз (Scopus / Web of science), 12 – у збірниках матеріалів наукових конференцій.

Обсяг і структура дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 176 сторінках друкованого тексту, з яких 117 основного тексту. Робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів дослідження, трьох розділів власних досліджень, узагальнення та аналізу отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, 234 джерел літератури, з них 19 кирилицею та 215 латиницею, додатків. Текст ілюстрований 15 таблицями та 20 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОЖИРІННЯ ТА НАДМІРНА МАСА ТІЛА ЯК ЧИННИКИ ВПЛИВУ НА РЕПРОДУКТИВНУ ФУНКЦІЮ ЧОЛОВІКІВ

(Огляд літератури)

1.1. Особливості змін спермограми на тлі ожиріння та зростання індексу маси тіла у чоловіків

Протягом останніх десятиліть, увага світової медичної спільноти активно фокусується на питаннях безпліддя, що згубно впливає на демографічні показники [1], та є не лише медичною, а й соціальною проблемою [2]. Згідно з визначенням Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), неплідною вважається пара, у якої протягом одного року в жінки не настала вагітність, при цьому партнери є в дітородному віці, ведуть регулярне статеве життя і не використовують жодних засобів контрацепції [34]. Раніше причину безпліддя пов'язували лише із репродуктивними проблемами жінки, однак сьогодні вважається, що чоловічий фактор має вагоме значення у половині випадків безпліддя. Аналіз даних Центру медичної статистики Міністерства охорони здоров'я України показує, що за результатами звітності за 2021 рік було зареєстровано 27855 подружніх пар, які використовували допоміжні репродуктивні технології (ДРТ) для досягнення бажаної вагітності. Серед зазначених випадків 42% були пов'язані із жіночим чинником, 15% – із чоловічим, 36% випадків мали сполучену етіологію, і у 7% виявлено ідіопатичне безпліддя [35]. Зазначимо, що у державних статистичних звітах відсутня інформація про причини безпліддя у чоловіків. У 2020 році був опублікований звіт Європейської асоціації репродукції та ембріології людини (ESHRE, European Society of Human Reproduction and Embryology) за 2015 рік зі статистичними даними європейських національних реєстрів по 38 країнах, у якому зазначається, що загалом у 2015 році було здійснено 849811 циклів ДРТ [36]. Отже, ці дані демонструють високі показники випадків звернень за медичною допомогою з причини безпліддя.

Оскільки за останні десятиліття спостерігається значне зниження якості чоловічого еякуляту із загальною тенденцією до зниження чоловічої фертильності [37, 38], постає потреба у більш детальному дослідженні чинників, що залученні в ці процеси. Загалом чоловіче безпліддя поділяють на: секреторне (сюди відносять первинний та вторинний гіпогонадізм), екскреторне (екскреторно-токсичне, яке пов'язане із запальними процесами, та екскреторно-обтураційне), поєднане та інші форми (імунне, психогенне, ідіопатичне тощо). При цьому, найчастіше причиною безпліддя є хронічні простатити (у 40% випадків), варикоцеле, епідидиміт, обтураційна аспермія, а також нездоровий спосіб життя [1, 39–41].

Експерти ВООЗ проаналізували ключові чинники способу життя чоловіків, що впливають на фертильність, фокусуючи особливу увагу на проблемі ожиріння [14]. Згодом Комітет Американського товариства репродуктивної медицини (ASRM, American Society for Reproduction Medicine) в документі 2015 року також висловив думку, що безпліддя у чоловіків може бути пов'язане з ожирінням [42]. Хоча докази стосовно потенційного впливу надмірної маси тіла на репродуктивну функцію виявилися суперечливими, робочою групою було рекомендовано консультувати чоловіків, що мають проблеми із фертильністю, щодо стратегії втрати ваги, якщо їхні показники окружності талії та ІМТ демонстрували ожиріння [14].

Згідно з ВООЗ, надмірна вага та ожиріння визначаються як патологічне накопичення жиру в організмі, при чому, ІМТ понад 25.0 вважається надмірною вагою, понад 30.0 – ожирінням. Ця патологія набула глобального масштабу, а її поширеність серед дорослого населення віком від 18 років і старше, за останні десятиліття, зросла майже втричі [4]. Згідно з даними станом на 2016 рік, 39% чоловіків та 40% жінок у зазначеній віковій категорії мали надлишкову вагу, а близько 13% дорослого населення світу (11% чоловіків та 15% жінок) страждали ожирінням.

Як вже згадувалося вище, з метою досягнення бажаної вагітності, безплідні пари звертаються за допомогою до спеціалізованих клінік. Хоча ДРТ

на сьогодні є досить доступними, та не завжди є можливість одразу досягти ефективності цих процедур, оскільки результат залежить від низки факторів. Зокрема, дані досліджень свідчать, що ожиріння батька негативно впливатиме на клінічні показники вагітності після екстракорпорального запліднення [43, 44]. Це підтверджує необхідність більш детального аналізу чоловічого чинника у проблемі безпліддя.

Особливості спермограми у чоловіків при зростанні індексу маси тіла

Дані щодо кореляції ІМТ та основних параметрів спермограми, що є індикаторами чоловічої фертильності, є висвітлені в багатьох дослідженнях – на сьогодні налічується понад 14 000 статей, де вивчали зв'язок ожиріння або метаболічного синдрому з чоловічим безпліддям. Однак відзначимо, що результати цих досліджень є досить суперечливими та не дають можливості зробити чіткий висновок. До прикладу, один з метааналізів у цій області MacDonald et al., 2010 [10] повідомляв про відсутність кореляції ІМТ із концентрацією та кількістю сперматозоїдів. Варто зауважити, що у цей аналіз було включено результати лише п'яти досліджень (сумарно 4853 чоловіків), оскільки вихідні дані решти опублікованих робіт були надто неоднорідними. Натомість інший аналогічний аналіз Sermondade та ін., 2013 [11], що був здійснений на основі результатів з 21 дослідження та включав 13077 пацієнтів, свідчить, що перевищення ІМТ (понад 40.0) майже вдвічі збільшує поширеність азооспермії та олігозооспермії у чоловіків.

Зв'язок ожиріння з якістю еякуляту також підтверджують дослідження, у яких вивчали зміни фертильного статусу чоловіків після втрати ваги. Внаслідок зміни стилю життя / застосування методів бариатричної хірургії відзначалося зростання загальної кількості сперматозоїдів, об'єму сперми, морфології, нормалізація показників статевих гормонів, а також зниження ДНК-фрагментації сперматозоїдів [12, 13, 45]. У роботі українських дослідників Антонян І. та співавт. [46] оцінювали зміни сперматозоїдів, зокрема їх морфологію «за строгими критеріями Крюгера» у чоловіків з олігоастенотератозооспермією на тлі ожиріння / метаболічного синдрому

після 12 тижнів комплексного лікування (комбінація судинних, гіполіпідемічних препаратів, хоріонічного гонадотропіну у поєднанні зі зміною стилю життя). Зі 118 пролікованих пацієнтів у 102 спостерігалось значне покращення рухливості та морфології сперматозоїдів, що дало змогу розпочати програми ДРТ [46]. Варто зазначити, що в Україні на сьогодні вивчення проблеми безпліддя більше зацентровано на жіночому чиннику, а детальна оцінка чоловічого фактора часто упускається [39].

Отже, досить суперечливі дані досліджень щодо впливу надмірної маси тіла та ожиріння на фертильність чоловіків, а також недостатнє вивчення проблеми в Україні ще раз підкреслюють необхідність додаткових досліджень для визначення механізмів впливу ожиріння на чоловічу репродуктивну систему.

1.2. Теорії щодо механізму впливу ожиріння на чоловічу фертильність

Нутритивний (харчовий) статус людини має безпосередній зв'язок із захворюваністю та перебігом патологій, тривалістю життя та смертністю [47]. Для оцінки нутритивного статусу використовують дієтичні, біохімічні та антропометричні вимірювання. Антропометрія є доступним та неінвазивним методом та включає такі індекси, як вага/вік, ІМТ, співвідношення окружності талії / стегон тощо, які використовуються для інтерпретації стану харчування. ІМТ – простий показник співвідношення маси тіла до зросту, який є одним із найбільш вживаних та зазвичай використовується для класифікації дорослих особин із недостатньою / надлишковою вагою та ожирінням [48].

Відомо, що надмірна маса тіла та ожиріння негативно впливають на функціонування всіх систем організму та пов'язані не лише із ризиком розвитку діабету, серцево-судинних захворювань, а й порушенням репродуктивної системи. Саме тому науковці різних країн намагаються вивчити корелятивні зв'язки між ожирінням та фертильною функцією чоловіків. Вплив ожиріння на чоловічу репродуктивну систему може

здійснювати через численні механізми, включаючи гормональний збій [15–17], температурний вплив [18, 19, 49], сексуальну дисфункцію [50, 51], епігенетичні зміни [20, 21, 52] та інші. Слід наголосити, що кожен з компонентів, який потенційно впливає на порушення сперматогенезу, може діяти як ізольовано, так і в комплексі з іншими факторами [22, 53].

Температурний вплив

Тестикулярна функція чоловіків є дуже чутливою до температурних коливань. Розміщення яєчок поза очеревиною, всередині калитки, функціонування м'яза-підіймача яєчка (*musculus cremaster*) забезпечують терморегуляційні процеси та підтримку оптимальної температури (на 2–4°C нижче від температури тіла) для нормального сперматогенезу. Гіподинамія та ожиріння є причиною надмірного накопичення жирової тканини в організмі, у тому числі у надлобковій області та калитці. Внаслідок цього спостерігається підвищення температури всередині яєчок, порушення нормального сперматогенезу та погіршення параметрів сперми [19, 49].

Сексуальна дисфункція

Необхідною умовою природного зачаття є нормальна потенція. Згідно з оцінками, у когорті чоловіків з ожирінням і надмірною масою тіла поширеність еректильної дисфункції (ЕД) становить близько 30–40% [54]. Патогенез ЕД у чоловіків, що страждають ожирінням, є мультифакторним, проте можна виділити два основних механізми розвитку цього розладу. Найперше, гормональні зміни, а саме зниження рівня тестостерону, спричиняє зниження лібідо [15]. Інша причина – підвищені концентрації прозапальних цитокінів, зокрема фактору некрозу пухлин TNF- α [51] та інтерлейкіну-6 [50], що викликають зниження рівнів нітрогену оксиду і пошкодження ендотелію судин кавернозного тіла, внаслідок чого порушується ендотелій-опосередкована релаксація гладких м'язів статевого члена, яка необхідна для нормальної ерекції.

Епігенетичний механізм

Результати досліджень показують, що за наявності ожиріння у батьків ризик розвитку метаболічних та репродуктивних порушень значно зростає у нащадків. За таких умов сперматозоїди зазнають епігенетичних змін, зокрема таких, як метилювання ДНК, ацетилювання гістонів, пошкодження некодуючої РНК [52, 55, 56]. Ці процеси впливають на експресію генів у клітинах і таким чином можуть позначатися на функції сперматозоїдів, ембріогенезі та здоров'ї нащадків [57].

Гормональний збій

Енергетичний баланс організму має безпосередній вплив на нормальне функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі, тому зміни, що виникають при невідповідності між надходженням енергії та її споживанням індивідумом, можуть спричинити репродуктивну дисфункцію у чоловіків [53]. За нормальних умов гонадотропін-релізинг-гормон (ГнРГ) синтезується та виділяється з гіпоталамуса, запускаючи синтез фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) та лютеїнізуючого гормону (ЛГ) аденогіпофізом. Своєю чергою ФСГ і ЛГ діють на яєчко та стимулюють сперматогенез і стероїдогенез, відповідно. Надлишок периферичної жирової тканини спричиняє перетворення тестостерону шляхом ароматизації в естрадіол, і, як наслідок, це призводить до зниження загальної концентрації тестостерону в сироватці крові [58] (рис. 1.1). Дослідження Giagulli та ін., 1994 [59] показали, що рівень гормонів змінювався залежно від важкості ожиріння: у чоловіків із помірним ожирінням (ІМТ 30.0–35.0) вивільнення ЛГ і вільний тестостерон були нормальними, тоді як у чоловіків із сильним ожирінням (ІМТ >40.0) ЛГ, амплітуда ЛГ і вільний тестостерон знижувалися. Окрім того, при ожирінні спостерігається зниження рівня глобуліну, який зв'язує вільний тестостерон (SHBG, sex hormone-binding globulin), і, як наслідок, більша кількість вільного тестостерону доступна для перетворення в естрадіол [60].

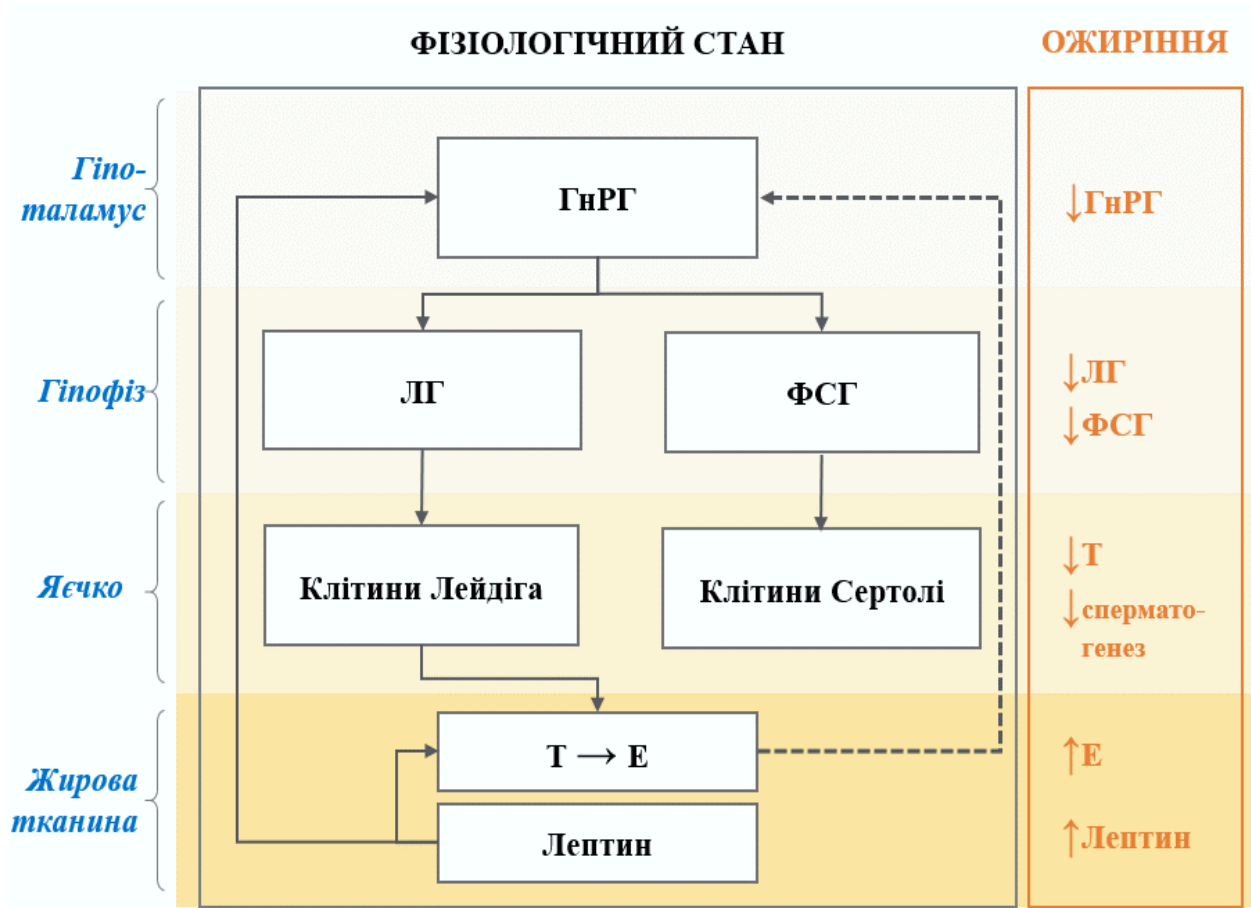


Рис. 1. 1 Зв'язок між репродуктивною віссю та ожирінням у чоловіків (Адаптовано з [17]).

Примітки:

Суцільні стрілки вказують на стимулюючу активність, пунктирні – на інгібіторну.

ГнРГ – гонадотропін-рилізінг-гормон, ЛГ – лютеїнізуючий гормон,

ФСГ – фолікулостимулюючий гормон, Т – тестостерон, Е – естрадіол.

Своєю чергою, підвищення рівня естрадіолу шляхом негативного зворотного зв'язку пригнічує гіпоталамо-гіпофізарно-гонадну вісь (ГГГВ) та біосинтез тестостерону [61]. Зміни, що вказують на гормональний збій у чоловіків з ожирінням, також були підтверджені в останніх дослідженнях [62–64]. Отже, можемо підсумувати, що надмірне відкладання жирової тканини в організмі спричиняє значний гормональний збій, порушення регуляції гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі, як наслідок це може призвести до вторинного гіпогонадізму і, відповідно, до неплідності чоловіків.

Лептин

Жирова тканина є не лише основним резервуаром енергії, але й – ендокринним органом, що синтезує низку біологічно активних сполук для регуляції метаболічного гомеостазу, серед яких лептин [65]. Донедавна побутувала думка, що основною роллю лептину є регуляція маси тіла індивідууму, і це підтверджувалося кореляцією його рівнів у плазмі крові людини з ІМТ та масою жиру [66]. Однак дослідження двох останніх десятиліть показали, що лептин також виконує функцію нейроендокринного гормону: він залучений у метаболізмі глюкози, є важливою ланкою регуляції нормального статевого дозрівання та розмноження. Сам лептин впливає на різні ендокринні осі, головним чином на гіпоталамо-гіпофізарно-гонадну вісь та на метаболізм інсуліну, хоча точний механізм цієї взаємодії ще не встановлений [67].

За фізіологічних умов лептин є необхідним для статевого дозрівання та підтримки фертильності. Це підтверджують дослідження на тваринних моделях: у мишей із нокаутом лептину / рецептора лептину виявляли низькі концентрації гонадотропіну, неповний розвиток репродуктивних органів і відсутність статевого дозрівання, а після відновлення концентрації лептину (шляхом екзогенного введення), індукувалося статево дозрівання, нормалізувалася секреція гонадотропіну та фертильність [68]. Отже, за оптимальних концентрацій лептин підтримує нормальне функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі, головним чином завдяки позитивному впливу на ГнРГ. На противагу, надмірний синтез лептину може мати значний негативний вплив на чоловічу фертильність. Справді, гіперлептинемія та лептинорезистентність, що є типовими для ожиріння, пов'язані з виникненням андрогенної недостатності [69], погіршенням таких показників спермограми, як концентрація сперматозоїдів, їх життєздатність, рухливість [70, 71]. З одного боку це пов'язано з тим, що лептин знижує секрецію ГнРГ, спричиняючи низькі рівні тестостерону, з іншого – під впливом ароматази в периферичних тканинах (здебільшого в адипоцитах) активує ароматизацію

тестостерону в естрадіол [16]. З огляду на те, що рецептори лептину присутні у клітинах Лейдіга, вважається, що лептин має прямий вплив на регуляцію стероїдогенезу в яєчках [72]. Підтверджуючи цю думку, Landry D та співавт., 2017 [73], досліджуючи тваринні моделі, виявили, що висока концентрація лептину пригнічувала експресію стероїдогенних генів у клітинах Лейдіга. Існують також дані про експресію рецептора лептину в клітинах Сертолі людини, які є «годувальницями» (тобто забезпечують живлення) сперматозоїдів у процесі сперматогенезу. Впливаючи на клітини Сертолі, лептин може перешкоджати метаболічній підтримці сперматогенезу [74].

У дослідженні Leisegang та співавт., 2014 [70] виявили, що чоловіки з ожирінням мали значно вищі показники лептину у крові, погіршення якості еякуляту, а також вищий потенціал мембрани мітохондрій сперматозоїдів у порівнянні із групою з нормальною масою тіла. Наявні дослідження, що підтверджують вплив лептину на енергодинаміку мітохондрій [75]. Зокрема, Belinda A. Henry та співавт., 2011 [76] вивчали респіраторні властивості мітохондрій кардіоміоцитів у тварин, які отримували лептин, і зробили висновок, що лептин через зміну мітохондріальної функції викликає підвищення продукції тепла у м'язовій тканині. Вплив високого рівня лептину може призвести до порушення енергетичного обміну та збільшення вивільнення активних форм кисню (АФК) з мітохондрій і, як наслідок, до оксидативного стресу [75]. Отже, попри те, що лептин є необхідним для нормальної репродуктивної функції, його надлишок згубно впливає на чоловічий фертильний потенціал. Ймовірно, лептин можна розглядати як сполучну ланку між ожирінням і безпліддям у чоловіків.

Прозапальний стан

Цитокіни – група речовин білкової природи, що є ендогенними модуляторами клітинної активності – координують міжклітинну взаємодію, проліферацію, диференціацію [77]. Дисбаланс цитокінів може впливати на гомеостаз і перебіг захворювання. Композиційний склад сім'яної плазми також включає фізіологічний спектр цитокінів, які беруть участь у регуляції

сперматогенезу та підтримці функції сперми. Джерелом цитокінів у чоловічому репродуктивному тракті в основному є соматичні тестикулярні клітини (клітини Лейдіга та Сертолі). Вторинні статеві залози – придаток яєчка (епідидиміс), передміхурова залоза, сім'яні міхурці – також беруть участь у локальній продукції цитокінів [78]. Зростання концентрацій прозапальних цитокінів у сім'яній плазмі негативно впливає на нормальний сперматогенез і, відповідно, погіршує характеристики сперми. Дані досліджень підтверджують негативний зв'язок між концентрацією цитокінів спермоплазми та якістю еякуляту [79, 80]. Дисбаланс цитокінового профілю може провокувати збільшення концентрації АФК у сім'яній плазмі. Це призводить до розвитку оксидативного стресу, при якому пошкоджуються і дестабілізуються мембрани сперматозоїдів, порушується упакування та цілісність ДНК в їхніх хромосомах, ініціюється апоптоз сперматозоїдів. Як наслідок, ці процеси негативно позначаються на концентрації, морфології, рухливості сперматозоїдів [17, 24, 31, 81].

Відомо, що ожиріння та метаболічний синдром (МС) пов'язані з системним хронічним запальним процесом [29, 82]. Надмірна маса тіла супроводжується як збільшенням кількості адипоцитів та їхньою гіпертрофією, так і зростанням чисельності макрофагів у жировій тканині, які стають основним джерелом С-реактивного білка (СРБ) та прозапальних цитокінів таких, як TNF- α , IL-6 [23, 83]. Прозапальний стан подібний до гострого запалення на молекулярному рівні, але без таких класичних клінічних ознак, як: набряк (tumor), еритема (rubor), тепло (calor), біль (dolor) [47].

Раніше було запропоноване припущення, що прозапальний стан та подальший розвиток оксидативного стресу може забезпечити патофізіологічне пояснення прямого впливу МС та ожиріння (як компоненту МС) на нормальний сперматогенез та функцію сперми [29, 84]. Група дослідників Weimin Fan та співавт., 2018 [85] намагалися знайти відповідь на питання, чи хронічне запалення, що викликане ожирінням, впливає на

сперматогенез у чоловічих статевих шляхах. З цією метою була досліджена когорта чоловіків з ожирінням, а також тваринні моделі, що перебували на високожировій дієті. У тканинах статевих шляхів (яєчках, придатках яєчка, сім'яних міхурцях, простаті) та сироватці крові мишей з ожирінням вчені виявили підвищені рівні фактора некрозу пухлини (TNF- α), інтерлейкіну-6 (IL-6) і інфламасоми NLRP3 – NOD (nucleotide oligomerization domain)-подібного рецептора сімейства піринового домену-3, що бере участь в утворенні активних форм інтерлейкіну-1 β (IL-1 β) та інтерлейкіну-18 (IL-18). А у чоловіків з надмірною вагою та ожирінням виявили підвищені рівні TNF - α та IL-6 у спермоплазмі, які позитивно корелювали з ІМТ та були обернено пропорційні концентрації та рухливості сперматозоїдів. Згідно з отриманими результатами автори зробили висновок, що хронічний запальний стан низького ступеня у репродуктивному тракті чоловіків з ожирінням може впливати на погіршення показників фертильності.

На противагу, зовсім інші результати були отримані у роботі А. Pilatz та С. Hudemann [86], які вивчали цитокиновий профіль (30 різних цитокінів) у чоловіків з МС та вісцеральним ожирінням – дослідники виявили підвищення рівнів СРБ, IL-6, IL-10 у крові, водночас ознаки прозапального стану в еякуляті та погіршення параметрів спермограми були відсутні. Загалом, ми виявили обмежену кількість досліджень, які оцінювали неінфекційне запалення низького ступеня статевих шляхів у пацієнтів з підвищеним ІМТ [30, 31]. З огляду на такі суперечливі та лімітовані дані, а також відсутність подібних досліджень в Україні, впливає потреба у подальших дослідженнях для вивчення впливу запалення неінфекційного генезу при ожирінні на чоловічу репродуктивну систему.

Зміни мікрооточення

Частка статевих клітин у чоловічому еякуляті складає приблизно 1–5%, решту становить спермальна плазма, яка утворюється здебільшого секретом сім'яних міхурців (65–70%) та простати (25–30%) [87]. Спермальна плазма містить у своєму складі білки та пептиди, амінокислоти, субстрати, цитокіни,

гормони, ферменти, неорганічні іони та мікроелементи, включаючи вітаміни тощо. Наприклад, секрет простати забезпечує вміст протеолітичних ферментів, кислої фосфатази, ліпідів та цинку, а сім'яні міхурці додатково постачають амінокислоти, цитрат, простагландини, білки та вітамін С [47]. Завдяки спермальній плазмі забезпечується оптимальне мікросередовище для модуляції функцій, живлення та підтримки сперматозоїдів, а також для взаємодії з епітелієм і виділеннями жіночих статевих шляхів до моменту запліднення [88].

Склад спермальної плазми залежить від багатьох чинників, у тому числі від харчових звичок індивідууму. Дисбаланс у раціоні мікроелементів (залізо, мідь, селен, цинк, кальцій і марганець), які є важливими компонентами антиоксидантної системи, може сприяти розвитку оксидативного стресу і, відповідно, порушення репродуктивної функції. Ожиріння також чинить несприятливий вплив на функцію придаткових статевих залоз, що, відповідно, позначається на композиційному складі спермальної плазми [89]. У роботі Lozano-Hernández Ricardo, 2017 [89] було підтверджено, що прогресування ожиріння у чоловіків впливає на функції сперми та передміхурової залози, хоча при надмірній масі тіла та ожирінні I ст. ці зміни можуть бути не суттєвими.

Також існують переконливі докази того, що дієта та ожиріння батька можуть впливати не лише на зачаття та перебіг вагітності, а і на розвиток ембріона, фенотипові ознаки та майбутнє здоров'я потомства [52]. Окрім цього, підтверджено, що при ожирінні, на тлі харчування дієтою з високим вмістом жиру, в самців змінюється склад сім'яної плазми. Цей фактор сприяє зміні експресії генів ендометрію та має вплив на імунну адаптацію матері, що необхідна для оптимальної сприйнятливості матки до вагітності [90]. Отже, зважаючи на роль спермальної плазми у репродуктивній функції, прицільне вивчення її композиційного вмісту в майбутньому може бути допоміжним інструментом для кращої діагностики та ведення безплідних чоловіків.

Особливості мітохондрій та їхня роль у забезпеченні функціональності сперматозоїдів

Мітохондрії є клітинними органелами, що мають подвійну мембрану, власний геном у формі мітохондріальної ДНК (мтДНК), та виправдано вважаються «електростанціями» еукаріотичних клітин, оскільки продукують близько 90% енергії шляхом окисного фосфорилування [91]. Основний результат окисного фосфорилування – синтез з АДФ та неорганічного фосфату молекул аденозинтрифосфату (АТФ), що є ключовим у постачанні організму енергією на клітинному рівні. Але цей процес є енергозатратним, тому потребує тісного скоординованого зв'язку з електротранспортним ланцюгом мітохондрій – електрохімічним градієнтом протонів водню та пар електронів на внутрішній мембрані зі злагодженою роботою чотирьох комплексів дихальних ферментів (комплекс I–IV) [92]. Унаслідок перенесення електронів у дихальному ланцюгу мітохондрій від субстратів біологічного окислення до молекулярного кисню вивільняється хімічна енергія для подальшого синтезу АТФ. Своєю чергою головним джерелом субстратів для цих процесів є цикл трикарбонових кислот (ЦТК) – серія ферментативних реакцій окислення ацетил Ко-А з утворенням вуглекислого газу (CO_2) і атомів водню, які також відновлюють коферменти – нікотинамідаденіндинуклеотид (НАД) і флавінаденіндинуклеотид (ФАД). Відновлені форми НАДН та ФАДН працюють як своєрідне паливо для дихального ланцюга. Отже, як бачимо, забезпечення організму енергією у вигляді АТФ вимагає неабиякої координації процесів на молекулярному рівні, зокрема, між дихальним ланцюгом та окисним фосфорилуванням [92].

Для мітохондрій сперматозоїдів характерні деякі особливості, що значно відрізняють їх від мітохондрій соматичних клітин. Насамперед ці органели знаходяться виключно в середній частині сперматозоїда, тоді як основна частина хвостика позбавлена мітохондрій. По-друге, під час сперматогенезу мітохондрії обгортаються навколо аксонем та завдяки дисульфідним місткам, утворених білками, що багаті на цистеїн та пролін, організовуються

у щільну мітохондріальну капсулу. Це забезпечує механічну стабільність та захист мітохондрій сперматозоїдів (в тому числі мтДНК), а також стійкість до гіпоосмотичного стресу [93]. Однак з іншого боку, така структура ускладнює ізоляцію органел, тому експериментальні дослідження зазвичай проводять *in situ* або із застосуванням методик зміни проникності мембрани (пермеабілізації), наприклад, як у дослідженнях Ferramosca A. та ін. [94–96], де індукували гіпоосмотичне набухання сперматозоїдів. Окрім того, мітохондрії сперматозоїдів мають специфічні ізоформи білків та ізоферментів, до прикладу, ізоензимні форми лактатдегідрогенази – ЛДГ-С4 [97] або ЛДГ-Х [98]. Таким чином, ЛДГ-Х присутній і у мітохондріальному матриксі, і в цитозолі сперматозоїдів. Завдяки цьому з одного боку підтримується процес гліколізу з утворенням відновленого нікотинамідаденіндинуклеотиду (НАД-Н), а з іншого боку – через зворотне окислення лактату до пірувату забезпечується прогресування окисного фосфорилування [95].

Оскільки для чоловічих статевих клітин синтез енергії є критично необхідним для підтримки рухливості, тому питання, що стосуються спермобіонергетики, є предметом дискусій науковців протягом останніх років [92, 99]. Двома основними метаболічними шляхами, які забезпечують клітинну енергію у формі аденозинтрифосфату (АТФ), є окисне фосфорилування та гліколіз. У сперматозоїдах ці метаболічні процеси відбуваються в окремих відділах клітин: окисне фосфорилування у середній частині, де локалізовані мітохондрії, а гліколіз – головним чином у волокнистій оболонці джгутика, де наявні гліколітичні ферменти.

Одні дослідники вважають, що саме мітохондріальне дихання з окисним фосфорилуванням є головним шляхом забезпечення сперматозоїдів енергією, передусім тому, що цей процес є значно ефективнішим у генерації АТФ, у порівнянні з гліколізом [100].

На противагу, інші автори, зважаючи на факт, що джгутик є довгим та тонким, а мітохондрії обмежені лише його проксимальним кінцем, вважають малоімовірним дифундування АТФ (отриманим внаслідок окисного

фосфорилування) через весь джгутик для ефективної підтримки рухливості [101–103]. Окрім того, для окисного фосфорилування необхідні кисень та екзогенні субстрати, а в умовах руху сперматозоїдів репродуктивним трактом жінки вміст цих речовин не є постійним. Тому з цих міркувань фокус багатьох дослідників у питаннях біоенергетики сперматозоїдів був переміщений з окисного фосфорилування на гліколіз, навіть попри те, що він є менш ефективним з огляду на кількість синтезованих молекул АТФ [104]. Відповідно до цієї точки зору, в експериментах було виявлено, що інгібування мітохондрій за наявності глюкози у позаклітинному середовищі не позначалося на рухливості сперматозоїдів мишей [103] і людини [104], у той час, як середовище із піруватом або лактатом (без глюкози) не змогло підтримувати рух джгутиків сперматозоїдів. Отже, беручи до уваги різні думки та результати досліджень, можна підсумувати, що сперматозоїди здатні активувати різні шляхи генерування енергії – як і окисне фосфорилування, так і гліколіз, – відповідно до субстратного складу середовища, у якому вони перебувають.

Мітохондрії відіграють важливу роль у регуляції фізіологічних аспектів репродуктивної функції, починаючи від сперматогенезу до запліднення. Оптимальна мітохондріальна активність є передумовою не лише для рухливості сперматозоїдів, а й для їхньої гіперактивації, капацитації та акросомальної реакції [105]. Мітохондрії, окрім їхньої основної ролі в генерації окисної енергії, також є джерелом АФК [106, 107]. У цих органелах частина поглинутого клітинами кисню через неповне відновлення електроном здатна перетворюватися на АФК, до прикладу, супероксид (O_2^-) і перекис водню (H_2O_2). У сперматозоїдах мітохондріальний комплекс I та комплекс III є основними місцями продукції АФК [107]. Високі рівні АФК / дисбаланс між їхнім виробництвом та антиоксидантними механізмами може негативно впливати на якість і функціонування сперматозоїдів [107]. Сперматозоїди є особливо чутливими до оксидативного стресу, оскільки вони не можуть повноцінно відновлюватися через дефіцит цитоплазматичних ферментів

відновлення [108]. З іншого боку, за фізіологічних концентрацій АФК працюють як вторинні месенджери, підтримують багато клітинних процесів [109, 110]; і не є виключно негативними показниками функції сперми, а навпаки можуть свідчити про більш інтенсивну мітохондріальну активність, що призводить до посилення функції сперми та покращення фертильності [111]. Підсумовуючи дані досліджень, можна стверджувати, що збалансованість у синтезі АФК є ключовою для нормального функціонування сперматозоїдів.

Методи дослідження мітохондрій

За останні десятиліття були розроблені численні інструменти для оцінки функціонального стану мітохондрій сперматозоїдів. Основні напрямки дослідження у цій галузі включають мітохондріальну активність, мітохондріальний мембранний потенціал (ММП), вміст мітохондріального кальцію, вимірювання АФК. Для детекції активних форм кисню та азоту використовують хемілюмінісцентні та флюоресцентні зонди, які є досить чутливими, однак вимагають ретельного підбору та обережності при їхньому використанні [112]. Застосування флюоресцентних зондів для виявлення змін ММП також є популярним інструментом для оцінки функції мітохондрій. Залежно від своїх властивостей флюорохроми можуть накопичуватися у високих концентраціях у гіперполяризованих мітохондріях (високий ММП), тоді, як низькі концентрації будуть реєструватися у деполяризованих мітохондріях та відповідатимуть низькому ММП [113].

На цей час для аналізу сперматозоїдів ссавців та людини широко використовуються такі флюоресцентні барвники, як Mito Tracker Green [114], JC-1 [115], родамін 123 [116]. Результати досліджень показали, що деякі мітохондріальні параметри, такі як цілісність органел, дихальна активність, мембранний потенціал і продукція АФК, тісно пов'язані з якістю сперми [100, 110, 117–121].

Науковці присвячують значну увагу мітохондріальній біоенергетиці сперматозоїдів, а саме визначенню споживання кисню клітинами, оскільки цей

параметр вважається центральним у дослідженні мітохондріальної функції [101, 111]. Багато дослідників для вище згаданих цілей використовували кисневий електрод типу Кларка [122–125]. Цей аналізатор був розроблений у 1960-х роках з метою полярографічного вимірювання швидкості споживання кисню ізольованими мітохондріями або інтактними клітинами в герметичній камері [126]. Згодом ця технологія лягла в основу Oroboros O2k Oxygraph (Інсбрук, Австрія) – високоточну та чутливу систему, яка дозволяє вимірювати в одній камері не лише споживання O_2 , а й водночас інші параметри - мітохондріальний мембранний потенціал, pH, $[Ca^{2+}]$ і NO.

Нещодавно був розроблений аналізатор позаклітинного потоку Seahorse XF (Agilent, Каліфорнія), який дає можливість одночасно вимірювати споживання клітинами кисню в інтактному моношарі, окисне фосфорилування і гліколіз в одному аналізі [127, 128]. Всі ці методи вимірювання споживання кисню можуть бути оптимізовані за допомогою різних інгібіторів, роз'єднувачів і субстратів.

Отже, вимірювання споживання кисню є досить чутливим маркером функціонального стану мітохондрій, а додаткові дослідження у сфері біоенергетики сперматозоїдів за фізіологічних умов та дії різних зовнішніх чинників, удосконалення методик дослідження, може надати краще розуміння шляхів покращення фертильного потенціалу чоловіків.

1.3. Застосування тваринних моделей для оцінки фертильного статусу самців при ожирінні та супутніх метаболічних змінах

Одним з інструментів для вивчення мультифакторного системного впливу ожиріння та супутніх метаболічних змін на організм людини є використання тваринних моделей, в основному за участю гризунів. Найпоширенішими методами індукції ожиріння у щурів, які зазначаються у літературі, є: нейроендокринні моделі з ураженням вентромедіального гіпоталамічного ядра, що досягається дією прямого електричного струму або

введенням глутамату натрію; моделювання генетичних змін; харчування гіперкалорійними дієтами [129, 130].

Застосування дієт для відтворення ожиріння є широкоживаним, ймовірно завдяки подібності моделі до генезу та метаболічних реакцій при ожирінні у людей за умов поєданого впливу таких факторів навколишнього середовища, як надмірне споживання висококалорійної їжі та гіподинамія [131]. Існує кілька типів гіперкалорійних дієт, що вважаються досить ефективними для моделювання ожиріння.

Один із підходів до вивчення розвитку ожиріння у гризунів передбачає харчування тварин «дієтою кафетерію» (cafeteria diet). Цей метод розроблений для точного імітування дієтичних поведінкових патернів сучасної людини, і при ньому тварини мають вільний доступ до оброблених харчових продуктів (наприклад, тістечка, крекери, саямі тощо) [132–134]. Хоча вище згаданий режим харчування гризунів є успішним у контексті набору маси тіла, проте неможливість чітко відстежити кількість спожитої енергії / нутрієнтів робить цей підхід менш надійним [132]. З огляду на це, для забезпечення експериментальної відтворюваності раціони лабораторних тварин комплектуються із точно розрахованим вмістом макро- та мікроелементів.

Найчастіше у дослідницьких цілях використовуються такі гіперкалорійні раціони: високожирова дієта (ВЖД), дієта з високим вмістом цукру (ВЦД) та комбіновані дієти з високим вмістом жирів і цукру (ВЖЦД). Результати досліджень на щурах показують, що застосування ВЖД спричиняє гіпертрофію адипоцитів та зростання маси тіла, порушення інсулінорезистентності, зміни у метаболізмі глюкози, дисліпідемію, печінковий стеатоз [135]. Дієти з високим вмістом цукру завдяки своїм смаковим якостям та високій калорійності також сприяють позитивному енергетичному балансу та збільшенню маси тіла, хоча є дані, що ВЦД є менш ефективними, ніж ВЖД [135–137]. Вважається, що композиційний склад комбінованих ВЖЦД може імітувати раціон сучасної людини (так звану «західну» дієту, що багата на жири та вуглеводи), тому їх доволі часто

застосовують для експериментального моделювання ожиріння [138]. Раніше було підтверджено, що зміни при ВЖЦД у мишей є подібними до ВЖД, а саме: зростання маси тіла та абдомінального жиру, гіперінсулінемія та гіперглікемія [139].

Згідно з даними проаналізованих нами наукових джерел можна зробити висновок, що на ефективність гіперкалорійних дієт впливає багато факторів, а саме: тривалість протоколу утримання тварин на раціоні, вид та вік гризунів, композиційний склад, зокрема для ВЖД – походження жиру (рослинний або тваринний) та його відсотковий вміст (зазвичай 45% і 60% калорій за рахунок жиру). Варто зауважити, що часто результати досліджень є контрверсійними. Наприклад, у роботі Hong Sheng Cheng та співав., 2017 [140] порівняли вплив восьмитижневого харчування ВЖД (60% ккал за рахунок смальцю) та ВЖЦД (60% ккал жиру та 30% вода із сахарозою) на самців типу Sprague Dawley залежно від етапу розвитку тварин – 3 та 8 тижнів. Щурі, що почали харчуватися відповідними раціонами одразу після відлучення (вік - 3 тижні), показали значно більший приріст маси тіла, абдомінальної жирової маси, рівня глюкози натщесерце, холестерину ліпопротеїнів високої щільності у порівнянні з дорослими самцями. При цьому застосування саме ВЖД у молодших щурів викликало виражені зміни, що характерні для метаболічного синдрому та стеатозу печінки. З іншого боку, зрілі самці, що були залучені до дослідження у 8-ми тижневому віці, показали, що ВЖЦД викликала ожиріння та гіпертонію, тоді як ВЖД виявилася неефективною для цієї вікової категорії, оскільки результати набору маси тіла не відрізнялися від контролю. Зовсім інші результати були отримані у дослідженні Shoumen Lasker та співавт., 2018 [141] на зрілих самцях щурів Wistar (віком 10-12 тижнів), які показали, що після 8 тижнів харчування ВЖД (49% ккал жиру) маса тіла зростала у 1.5 раза, збільшувалася частка вісцерального жиру, а також спостерігалися стеатоз, дисліпідемія та ознаки оксидативного стресу.

Отже, зважаючи на різноманітність результатів та відсутність стандартизованого підходу до індукції ожиріння у лабораторних тварин,

неможливо чітко стверджувати, який тип гіперкалорійних дієт (цукор, жир або комбінація цукру та жиру) найповніше репрезентує модель для вивчення впливу метаболічних змін, що пов'язані з ожирінням у людей, на функціонування різних органів та систем.

Попри неможливість детального відтворення ожиріння, яке було б найбільш наближене до людського, тваринні моделі є інструментом для з'ясування суперечливих спостережень щодо впливу надмірного накопичення жиру в організмі на чоловічий фертильний потенціал. Експериментальне використання лабораторних щурів дозволяє дослідникам не лише вивчити взаємозв'язок метаболічних змін та параметрів сперми [142–145], а й більш глибоко оцінити альтерацію на різних рівнях, наприклад, на тканинному рівні – оцінити ступінь морфологічного пошкодження у яєчках та вплив на сперматогенез [146, 147] або на молекулярному рівні визначити протеомні зміни в сперматозоїдах під час дозрівання у придатку яєчка [148, 149]. Таким чином, тваринні моделі можуть бути корисними для виявлення нових біомаркерів у діагностиці / прогнозуванні чоловічого безпліддя, а також для розробки майбутніх методів лікування порушень фертильності на тлі ожиріння.

Висновки до розділу 1:

1. Дані результатів досліджень стосовно взаємозв'язку надмірної акумуляції жирової тканини в організмі із фертильністю чоловіків, а саме з параметрами спермограми, є суперечливими, а в Україні це питання недостатньо вивчене, що у сукупності визначає необхідність додаткового аналізу у цій галузі.
2. Склад спермальної плазми залежить від багатьох чинників, у тому числі від харчового статусу чоловіків, а ожиріння може спровокувати дисбаланс компонентів, що забезпечують оптимальне мікрооточення та функціональність сперматозоїдів. Зважаючи на важливість спермальної плазми у підтримці запліднювальної здатності статевих клітин, прицільне

вивчення її композиційного складу є допоміжним методом у діагностиці та терапії безпліддя чоловіків на тлі надмірної маси тіла / ожиріння.

3. Моделювання дієт-індукованого ожиріння з використанням тваринних моделей є одним із доступних інструментів для вивчення та з'ясування суперечливих спостережень щодо системного впливу ожиріння (та супутніх метаболічних змін) на чоловічий фертильний потенціал.

4. Додаткові дослідження у сфері мітохондріальної біоенергетики сперматозоїдів, зокрема визначення споживання кисню клітинами за фізіологічних умов та дії різних зовнішніх чинників є перспективним науковим напрямком, що може значно доповнити та розширити розуміння механізмів впливу надлишкового відкладення жиру в організмі та функціональний стан сперматозоїдів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Дизайн дослідження

Робота виконана на базі кафедри клінічної лабораторної діагностики факультету післядипломної освіти Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.

З метою досягнення поставленої мети та відповідних завдань дослідження було здійснено у двох напрямках: *перший напрямок роботи* полягав у проведенні проспективного дослідження із залученням чоловіків репродуктивного віку, яких розподіляли у дослідні групи залежно від розрахованого ІМТ. На цьому етапі ми здійснили розширений аналіз спермограми, а також композиційного складу спермальної плазми – біохімічних, імунологічних, гормональних та інших показників.

Другий напрямок роботи передбачав експериментальне вивчення впливу короткотривалого висококалорійного харчування самців щурів на морфометричні параметри тіла та органів; метаболічні параметри крові (ліпідограма, вміст глюкози, лептину), показники функціонального стану та мітохондріального дихання сперматозоїдів. Схема дизайну дослідження подана у таблиці 2.1.

Обстеження та забір еякуляту здійснювали у репродуктивній клініці медичного центру «Інтерсоно» Medicover Group (згідно з Договором №29/10 про співпрацю від 29.10.2018р. між Львівським національним медичним університетом імені Данила Галицького та вище згаданим закладом).

Після звернення пацієнта у медичний заклад, були зібрані та проаналізовані дані щодо скарг пацієнта, його анамнезу захворювання та життя. Узагальнена схема обстеження пацієнтів подана на рис. 2.1. Критеріями включення у дослідження були: скарги на безпліддя – неможливість зачаття протягом 12 міс. при регулярному незахищеному статевому житті; вік пацієнтів 18–45 років; показник ІМТ ≥ 18.5 .

Схема дизайну дослідження

	Параметри плідності чоловіків	Тваринні моделі (щурі)
Формування груп	КГ, n=30; Надмірна маса тіла, n=50; Ожиріння, n=40;	КГ, n=10; ВЖД, n=10; ВЖЦД, n=10;
Спермограма	<ul style="list-style-type: none"> • Макроскопічна оцінка еякуляту; • Рухливість та життєздатність сперматозоїдів; • Концентрація та загальна кількість статевих клітин; • Морфологія 	<ul style="list-style-type: none"> • Виділення сперматозоїдів; • Рухливість сперматозоїдів; • Життєздатність; • Загальна кількість статевих клітин;
Біохімічні параметри	<ul style="list-style-type: none"> • Фруктоза (<i>спермоплазма</i>); • Лимонна кислота та Zn (<i>спермоплазма</i>); 	<ul style="list-style-type: none"> • Глюкоза (<i>плазма крові</i>); • Ліпідограма (<i>плазма крові</i>);
Імунологічні методи	<ul style="list-style-type: none"> • ІЛ-1β та ІЛ-18 (<i>спермоплазма</i>); • Лептин (<i>спермоплазма</i>); 	<ul style="list-style-type: none"> • Лептин (<i>плазма крові</i>);
Інші визначення	<ul style="list-style-type: none"> • Визначення концентрації Ca²⁺, K⁺, Na⁺ методом полум'яної фотометрії (<i>спермоплазма, сперматозоїди</i>); 	<ul style="list-style-type: none"> • Дослідження мітохондріального дихання полярографічним методом (<i>сперматозоїди</i>);
Статистична обробка даних	<ul style="list-style-type: none"> • Нормальність розподілу – тест Шапіро-Уїлка; • Порівняння груп: <ul style="list-style-type: none"> - симетричний розподіл – t-критерій Стьюдента/однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA); - несиметричний розподіл – U-критерій Манна-Уїтні; • Кореляція – критерій Пірсона / непараметричний метод рангової кореляції Спірмена 	

Пацієнтів виключали із дослідження за присутності таких критеріїв як: лейкоспермія ($> 1 \times 10^6$ /мл); азооспермія; наявність спадкових та вроджених патологій репродуктивної системи; наявність гострих, хронічних та

нещодавно перенесених запальних захворювань сечостатевої системи; діагностовані раніше патології: гідроцеле, варикоцеле, простатит; ІМТ < 18.5.

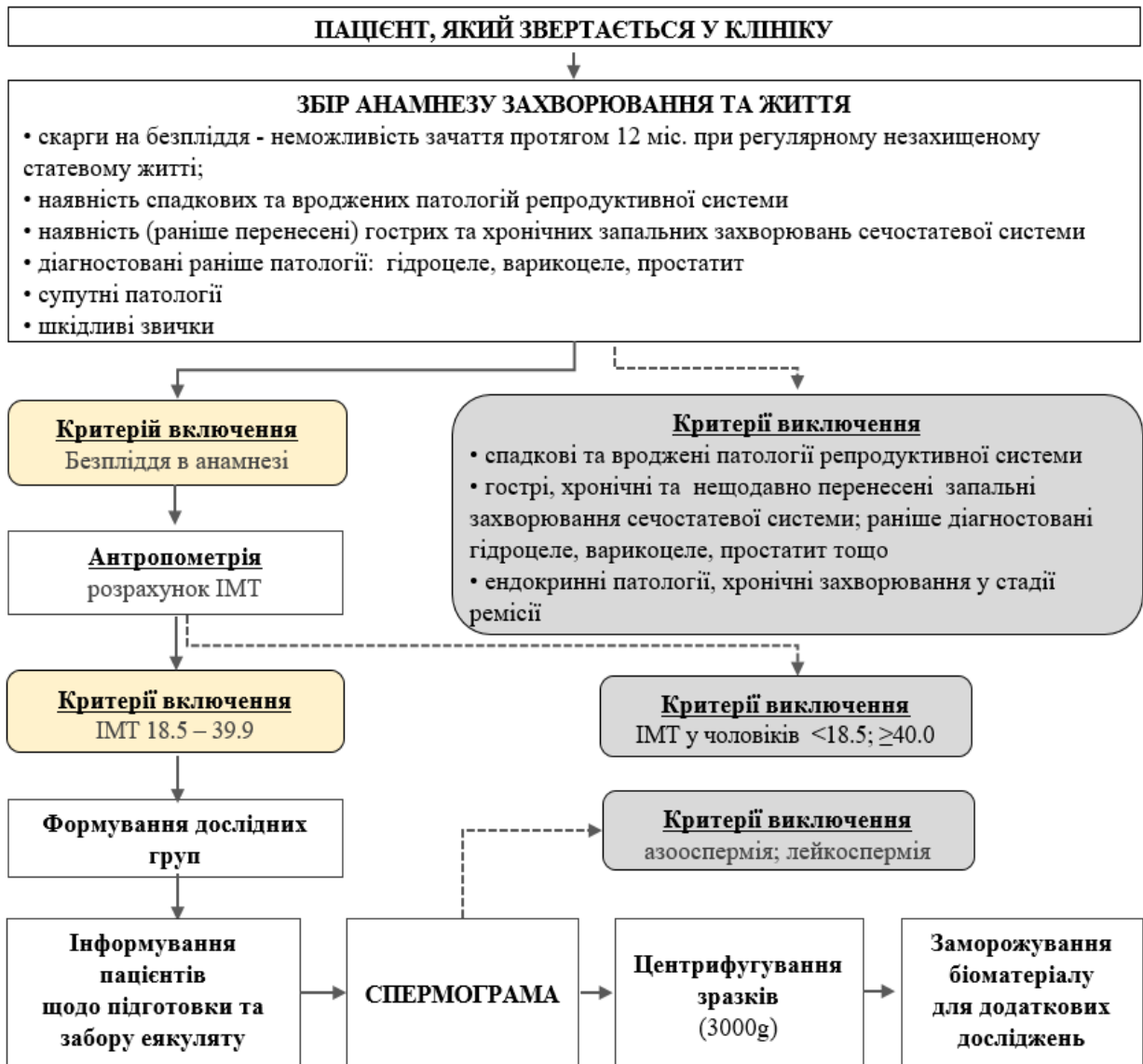


Рис. 2.1 Схема руху пацієнтів та біоматеріалу у рамках проспективного дослідження.

На основі антропометричних вимірювань для кожного пацієнта розраховували ІМТ (2.1), результат вимірювання виражали в кг/м²:

$$\text{ІМТ} = \frac{\text{маса тіла, кг}}{(\text{зріст, м})^2}, \quad (2.1)$$

У дослідження було включено загалом 120 учасників віком 25–38 років, яких розподілили на три групи: контрольна група (КГ) включала 30 осіб з

нормальними значеннями ІМТ (18.5–24.9), а дві дослідні групи налічували 50 чоловіків із надлишковою вагою (25.0–29.9) та 40 чоловіків з ожирінням (ІМТ 30.0–39.9), відповідно.

Чоловіків інформували стосовно основних правил підготовки та процедури забору зразків; з цією метою була розроблена пам'ятка пацієнта (Додаток А). Усі учасники обов'язково були ознайомлені із текстом інформованої добровільної згоди на участь у науковому дослідженні та завіряли її своїм підписом.

Отримання зразків біологічного матеріалу в чоловіків із непліддям проводили після попереднього клінічного обстеження та перед призначенням курсу лікування. Аналіз спермограм проводили згідно з Керівництвом Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ, 2010) [34] після не менше 2-ох та не більше 7-ми днів статевого утримання пацієнта.

2.2. Дослідження еякуляту людини

2.2.1. Первинна оцінка еякуляту

Забір еякуляту та наступний аналіз спермограм проводили згідно з п'ятим виданням Керівництва ВООЗ по дослідженню та обробці еякуляту людини, 2010. Референтні значення деяких досліджуваних показників спермограми згідно з Керівництвом ВООЗ, 2010 подано у Додатку Б. Макроскопічну оцінку зразків здійснювали одразу після розрідження еякуляту (приблизно через 30 хв, але не пізніше, ніж через 1 год після еякуляції), яка включала наступні параметри: в'язкість, об'єм, колір і рН сперми.

Для первинної мікроскопічної оцінки еякуляту готували нативний препарат: на чисте предметне скло наносили аліквоту 0.01 мл добре перемішаного матеріалу та накривали покривним склом розміром 22 × 22 мм. Огляд нативного препарату здійснювали якомога швидше, використовуючи фазово-контрастний мікроскоп. Спочатку, при загальному збільшенні × 100 (комбінація об'єктива × 10 та окуляру × 10) оцінювали еякулят на наявність ниток слизу, агрегації та аглютинації сперматозоїдів, присутність клітин

несперматогенного походження (епітеліоцитів), круглих клітин (лейкоцитів і незрілих статевих клітин), окремих голівок чи джгутиків сперматозоїдів. Надалі, при загальному збільшенні $\times 200$ або $\times 400$ (комбінація об'єктива $\times 20$ або $\times 40$ і окуляра $\times 10$) вивчали рухливість статевих клітин та визначали розведення, необхідне для підрахунку концентрації сперматозоїдів.

2.2.2. Підрахунок концентрації та загальної кількості статевих клітин

Концентрація сперматозоїдів – це кількість клітин на одиницю об'єму еякуляту. Цей параметр не є специфічним показником тестикулярної функції, оскільки більше залежить від об'єму секретів сім'яних міхурців та простати.

Для більш точної оцінки концентрації сперматозоїдів слід визначити необхідне розведення еякуляту. З цією метою проводили підрахунок статевих клітин у нативному препараті при збільшенні $\times 400$. Якщо у полі зору виявляли менше ніж 15 сперматозоїдів – еякулят розводили теплим фізрозчином у співвідношенні 1:5, 15-20 статевих клітин – 1:10, 40-200 – 1:20, понад 200 – 1:50 або 1:100.

Розведений еякулят ретельно перемішували та одразу відбирали 0.01 мл суспензії, щоб уникнути осідання сперматозоїдів. Краплю матеріалу наносили на край притертого до гемоцитометра покривного скла. Таким чином заповнювали два віконця камери Горяєва, щоб оцінити дві аліквоти зразка. Підрахунок клітин проводили через кілька хвилин після внесення матеріалу до камери у 5 великих квадратах, розміщених по діагоналі (при збільшенні $\times 200$ або $\times 400$). До уваги брали лише інтактні сперматозоїди.

Концентрацію клітин (С) в 1 мл визначали за формулою (2.2), а результати обчислення виражали у млн/мл:

$$C = \frac{N}{(V \times n)} \times F \times 1000, \quad (2.2)$$

де N – середня кількість сперматозоїдів, підрахована у 2 аліквотах;

V – об'єм одного великого квадрата (0.004 мкл);

n – кількість підрахованих квадратів;

F – фактор розведення (наприклад, якщо еякулят був розведений 1 : 20, то фактор розведення становитиме 20, відповідно);

1000 – 1000 мкл в 1 мл.

Загальна кількість сперматозоїдів – це сумарна кількість сперматозоїдів у всьому еякуляті, що є показником тестикулярної функції, тобто здатності яєчок продукувати сперматозоїди. Значення отримували шляхом множення концентрації сперматозоїдів в 1 мл на загальний об'єм еякуляту. Результати обчислення виражали у млн/еякулят.

2.2.3. Вивчення параметрів рухливості

Згідно з критеріями, що наведені у керівництві ВООЗ, 2010 виділяють три категорії рухливості сперматозоїдів:

- прогресивно рухливі (*PR, progressive motility*), що рухаються прямолінійно чи по колу з великим радіусом і є активними, незалежно від їхньої швидкості;

- непрогресивно рухливі (*NP, non-progressive motility*) – ті, що рухаються без прогресії по колу невеликого радіуса або коливальними рухами;

- нерухомі (*IM, immotility*), сперматозоїди, у яких відсутній рух.

Для оцінки рухливості статевих клітин визначали кількість PR та NP сперматозоїдів; обраховували показник загальної рухливості (PR+NP). Оцінку рухливості сперматозоїдів здійснювали після розрідження зразка (через 30 хв, але, обов'язково, не пізніше, ніж через 1 год після еякуляції) з метою обмеження впливу дегідратації, коливань рН та температури на показники.

Після ретельного перемішування, аліквоту сперми (0.01 мл) наносили на предметне скло, накривали покривним склом 22 × 22 мм та очікували 1 хв, поки зразок не припинить розтікати. Вивчали препарат при збільшенні × 200

або $\times 400$ із використанням обмежувача Фоніо. Вибір поля зору здійснювався випадковим чином. Аналіз проводили швидко та послідовно, щоб виключити повторну оцінку однієї й тієї ж області препарату. Підраховували щонайменше 200 сперматозоїдів в 5 полях зору: спочатку сперматозоїди категорії PR, згодом NP і в кінці – нерухомі сперматозоїди. До уваги брали лише інтактні сперматозоїди (тобто ті, які мають і голівку, і джгутик). Результат виражали у відсотковому співвідношенні (%).

Розрахунок показників (індексів) концентрації та загальної кількості рухливої сперми

Базуючись на визначених параметрах рухливості сперматозоїдів, розраховували наступні показники:

Концентрація рухливої сперми (КРС) – кількість рухливих сперматозоїдів у 1 мл еякуляту розраховували за формулою (2.3):

$$\text{КРС} = \frac{\text{концентрація клітин, } \frac{\text{млн}}{\text{мл}} \times \text{заг.рухливість, \%}}{100\%}, \quad (2.3)$$

Загальна кількість рухливої сперми (ЗКРС) – кількість рухливих сперматозоїдів у всьому об'ємі еякуляту розраховували за формулою (2.4):

$$\text{ЗКРС} = \text{КРС, млн/мл} \times \text{об'єм еякуляту, мл}, \quad (2.4)$$

2.2.4. Вивчення життєздатності сперматозоїдів

Некрозооспермія (частка неживих клітин, що перевищує 50% усіх статевих клітин в еякуляті) може свідчити про патологію епідидимісу, а велика кількість живих нерухомих клітин – про дефекти джгутика. За допомогою даного тесту можна перевірити правильність попередньої оцінки рухливості сперматозоїдів, оскільки відсоток мертвих клітин не повинен перевищувати кількість нерухомих.

Життєздатність сперматозоїдів оцінювали методом фарбування зразків еозин-нігрозином. Розчин еозину готували на водяній бані, розчиняючи 0.67г еозину і 0.9 г NaCl в 100 мл дистильованої води. Після розчинення зазначених компонентів, до розчину додавали 10 г нігрозину, доводили до кипіння та охолоджували при кімнатній температурі. Готовий розчин фільтрували через фільтрувальний папір і зберігали в затемненій посудині.

У пробірці змішували 0.05 мл попередньо перемішаного еякуляту з еквівалентним об'ємом розчину еозин-нігрозину. Очікували 30 секунд, повторно перемішували та готували мазки, які висушували на повітрі. Підраховували мінімум 200 сперматозоїдів під імерсією при збільшенні $\times 1000$ (комбінація об'єктива $\times 100$ та окуляру $\times 10$), окремо реєструючи число зафарбованих (мертвих) і незафарбованих (живих) клітин. Сперматозоїди, у яких була зафарбована лише шийка, а голівка залишалася незафарбованою, вважалися живими. Результати підрахунку виражали у відсотках (%).

2.2.5. Оцінка морфології сперматозоїдів та розрахунок індексів множинних дефектів

Оцінку морфології сперматозоїдів здійснювали шляхом підрахунку клітин у зафарбованих мазках. Для приготування мазка на край знежиреного предметного скла наносили 0.01 мл попередньо перемішаного еякуляту. Приготовані мазки висушували на повітрі. Фарбували препарати за методом Пеппенгейма-Крюкова.

Оцінку готового препарату здійснювали при збільшенні $\times 1000$ (об'єктив $\times 100$ і окуляр не менше $\times 10$) з імерсійною олією. Аналізували приблизно 200 клітин відповідно до «строгих критеріїв» (Kruger; Menkveld) [150] та визначали кількість морфологічно нормальних і аномальних сперматозоїдів. Результати обчислення виражали у відсотках (%).

Підрахунок індексів множинних дефектів

При вивченні морфології сперматозоїдів кожну аномальну клітину оцінювали щодо наявності дефектів голівки, шийки та хвоста. Відповідно до

морфологічної оцінки клітин у зразках, були розраховані наступні індекси множинних дефектів сперматозоїдів:

Індекс тератозооспермії (ІТЗ) – показує середню кількість дефектів на кожен аномальну клітину. В розрахунок (2.5) беруться всі дефекти голівки, шийки та хвостової частини сперматозоїда:

$$\text{ІТЗ} = \frac{\text{сума дефектів сперматозоїдів}}{\text{кількість аномальних сперматозоїдів}}, \quad (2.5)$$

Індекс дефектності сперматозоїдів (ІДС) – вказує на середнє число аномалій на кожен розрахований сперматозоїд (не лише аномальний) та розраховується за формулою (2.6):

$$\text{ІДС} = \frac{\text{сума дефектів сперматозоїдів}}{\text{загальна кількість сперматозоїдів у зразку}}, \quad (2.6)$$

2.5.6. Підрахунок кількості лейкоцитів в еякуляті

У нативному препараті еякуляту лейкоцити представлені переважно поліморфноядерними (нейтрофільними) формами. Підрахунок лейкоцитів здійснювали у гемоцитометрі після оцінки концентрації сперматозоїдів. Розраховували лейкоцити у 100 великих квадратах камери Горяєва за формулою (2.7):

$$L = \frac{a \times 250}{100} \times F \times 1000, \quad (2.7)$$

де L – кількість лейкоцитів в 1 мл еякуляту;

a – кількість лейкоцитів у 100 великих квадратах;

250 – 1/250 – об'єм одного великого квадрата;

F – ступінь розведення еякуляту;

1000 – 1000 мкл в 1 мл сперми;

100 – кількість квадратів.

2.3. Біохімічні методи дослідження функції придаткових статевих залоз

Еякулят, після повного розрідження та оцінки показників спермограми, центрифугували при 1500g протягом 10 хв. У сім'яній плазмі спектрофотометричним методом визначали рівні фруктози, лимонної кислоти та цинку (Biosystems S.A., Барселона 2011). Решту супернатанту переносили в еппендорфи, маркували та заморожували за температури -20°C для подальших досліджень.

2.3.1. Визначення концентрації фруктози спермальної плазми

У реакційній суміші, в результаті перебігу ферментативних спряжених реакцій, синтезується НАДФ-Н, вміст якого прямо пропорційний концентрації фруктози, що міститься у досліджуваних зразках. Для визначення концентрації фруктози в сім'яній плазмі використовували три вихідні розчини: А, В і С. Реагент А містив 70 мМ/л PIPES, 1.2 мМ/л НАДФ⁺, 15 О/мл гексокінази та 10 О/мл фосфоглюкоізомерази; рН розчину – 7.0. Компоненти реагенту В – 15 мМ/л АТФ і 10 О/мл глюкозо-6-фосфат дегідрогенази; рН розчину – 9.0. Реагент С – стандарт фруктози в концентрації 20.8 мМ/л. Робочий розчин готували безпосередньо перед проведенням дослідження, змішуючи розчини А і В між собою в співвідношенні 4:1.

У пробірку з дослідною пробою вносили 1.2 мл робочого розчину і додавали 0.05 мл розведеної сім'яної плазми (0.2 мл сім'яної плазми змішували із 0.8 мл дистильованої води та ретельно перемішували). Проба з стандартним розчином містила 1.2 мл робочого розчину та 0.05 мл реагенту С. Суміш інкубували при 37°C протягом 5 хв і визначали оптичну густину стандарту та дослідної проби проти бланка (до 1.2 мл робочого розчину додавали 0.05 мл дистильованої води) при довжині хвилі 340 нм. Концентрацію фруктози у дослідній пробі обчислювали за допомогою формули (2.8) та виражали у мМ/л:

$$C = \frac{E_{\text{зразка}}}{E_{\text{стандарту}}} \times 20.8, \quad (2.8)$$

де C - концентрація фруктози в 1 мл еякуляту;

$E_{\text{зразка}}$ – оптична густина зразка;

$E_{\text{стандарту}}$ – оптична густина стандарту;

20.8 – концентрація стандарту фруктози.

2.3.2. Оцінка вмісту лимонної кислоти у спермальній плазмі

Цитрат перетворюється у малат за участі цитратліази та малатдегідрогенази з окисненням НАД-Н до НАД⁺. Концентрація лимонної кислоти в біологічному зразку прямо пропорційна вмісту НАД⁺, рівень якого й вимірюємо спектрофотометрично.

Розчин А містив 40 мМ/л трис, 0.4 мМ/л НАД-Н, рН – 9.5; розчин В готували безпосередньо перед визначенням вмісту цитрату в зразку, змішуючи між собою еквівалентні кількості розчину В₁ (600 мМ/л PIPES, рН – 6.5) та розчину В₂ (активність малатдегідрогенази > 40 О/мл та цитратліази >1 О/мл); розчин С – лимонну кислоту у концентрації 5.2 мМ/л. Перед проведенням аналізу до 0.2 мл спермоплазми додавали 0.8 мл дистильованої води і ретельно перемішували. Розчин, який слугував бланком, містив 1.2 мл розчину А, 0.3 мл розчину В та 0.02 мл дистильованої води. Проба, у якій визначали екстинкцію стандарту містила 1.2 мл розчину А, 0.3 мл розчину В та 0.02 мл розчину С, а проба зі зразком – 1.2 мл розчину А, 0.3 мл розчину В та 0.02 мл розведеної спермоплазми.

Суміш інкубували при 37°C і визначали оптичну густина стандарту та дослідної проби проти бланка при довжині хвилі 340 нм. Концентрацію лимонної кислоти у дослідній пробі обраховували за допомогою формули (2.9) й виражали у мМ/л:

$$C = \frac{E_{\text{зразка}} - E_{\text{бланку}}}{E_{\text{стандарту}} - E_{\text{бланку}}} \times 26.1, \quad (2.9)$$

де C – концентрація цитрату в 1 мл еякуляту;

$E_{зразка}$ – оптична густина зразка;

$E_{стандарту}$ – оптична густина стандарту;

$E_{бланку}$ – оптична густина бланку;

26.1 – концентрація стандарту цитрату.

2.3.3. Визначення рівня цинку спермальної плазми

У лужному середовищі цинк реагує із 2-(5-бромо-2-піридазол)-5-(пропілсульфопроптламіно)-фенолом (5-Br-PAPS) і в результаті складних реакцій утворюється забарвлена сполука, концентрацію якої вимірюють спектрофотометричним методом. З метою визначення концентрації цинку у сім'яній плазмі використовували розчини: А, В і С та біохімічний калібратор (BioSystems cod. 18011). Розчин А готували безпосередньо перед дослідженням, змішуючи реагент А₁ (240 мМ/л карбонату натрію, рН 10.0) та реагент А₂ (170 мМ/л цитрату натрію 24 мМ/л саліцилальдоксиму) між собою у співвідношенні 3:1; розчин В містив з 50 мМ/л карбонату натрію та 0.25 мМ/л 5-Br-PAPS; розчин С – стандарт цинку у концентрації 1529 мкМ/л.

Зразок біологічного матеріалу розводили, додаючи до 0.2 мл спермальної плазми 0.8 мл дистильованої води. Проба для визначення оптичної щільності зразка містила 0.012 мл розведеної сім'яної рідини, 0.96 мл розчину А та 0.24 мл розчину В. У пробірку, що слугувала бланком, вносили 0.012 мл дистильованої води, 0.96 мл розчину А та 0.24 мл розчину В, а бланк зразка містив 0,06 мл біохімічного калібратора та 1.2 мл реагенту А. Проба для визначення екстинкції калібратора включала 0.012 мл стандарту цинку, 0,06 мл біохімічного калібратора, 0.96 мл розчину А та 0.24 мл розчину В.

Вміст пробірок ретельно перемішували, інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хв. Вимірювання оптичної густини при довжині хвилі 560 нм для бланка здійснювали проти дистильованої води, а для зразка та калібратора – проти бланка реагенту. Концентрацію цинку в дослідній пробі

обчислювали за допомогою формули (2.10) та виражали у мМ/л:

$$C = \frac{E_{\text{зразка}} - E_{\text{бланк зразка}}}{E_{\text{калібратора}} - E_{\text{бланк калібратора}}} \times 1529, \quad (2.10)$$

де C – концентрація цинку в 1 мл еякуляту;

$E_{\text{зразка}}$ – оптична густина зразка;

$E_{\text{бланк зразка}}$ – оптична густина бланку зразка;

$E_{\text{калібратора}}$ – оптична густина калібратора;

$E_{\text{бланк калібратора}}$ – оптична густина бланку калібратора;

1529 – концентрація стандарту цинку.

2.4. Визначення концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у спермальній плазмі та сперматозоїдах

Концентрацію іонів лужних металів у спермальній плазмі та сперматозоїдах визначали методом полуменевої фотометрії (Flafo - 4).

Для проведення експерименту використовували запасні, основні та калібрувальні розчини. Запасні розчини готували в колбах місткістю 1 дм³, у кожному з яких додавали певну наважку солі CaCO_3 , NaCl і KCl . Маса CaCO_3 становила 2.497, NaCl – 1.907 і KCl – 2.542 г. До колби, яка містила CaCO_3 доливали 20 см³ HCl , а до NaCl і KCl незначний об'єм бідистильованої води. Після розчинення солей, об'єм виготовлених розчинів доводили водою до мітки 1.0 дм³. Кінцева концентрація Ca^{2+} , Na^+ , K^+ у розчинах становила 1000 мг/дм³.

Щоб приготувати основний розчин, запасний розчин розводили в 10 разів. З основних розчинів готували серію калібрувальних розчинів, концентрація Ca^{2+} , Na^+ , K^+ у яких складала 50, 20, 10, 5, 2 і 1 мг/дм³ (табл. 2.2).

Схема приготування калібрувальних розчинів

Калібрувальні розчини (№)	Об'єм основного розчину (см ³)	Об'єм бідистиляту (см ³)	Концентрація іонів (мг/дм ³)
1	250	250	50
2	100	400	20
3	50	450	10
4	25	475	5
5	10	490	2
6	5	495	1

Примітка: Калібрувальні розчини не зберігали тривалий час, так як розчинені солі випадають в осад, а утворені кристали забивають капіляр подачі розчину в розпилювач приладу.

Для визначення концентрації Ca^{2+} , Na^+ , K^+ використовували металічні інтерференційні світлофільтри, з довжиною хвилі 621, 588 і 767 нм, відповідно. Показник витрат повітря у приладі фіксували на рівні 250, ацетилену – 40, пропан-бутанової суміші – 13-18 дм³/год. Максимальне значення шкали мікроамперметра для найвищої концентрації Ca^{2+} становило 8, Na^+ – 120, K^+ – 100 поділок.

Визначення концентрації Ca^{2+} , Na^+ , K^+ . Зразки сперми (0.5 см³) центрифугували 5 хв при 800 g, після чого спермальну плазму відокремлювали від клітин і ретельно перемішували. До відцентрифугованих клітини додавали 0.5 см³ бідистильованої води, суміш гомогенізували до дрібнодисперсної однорідної суспензії. У сперматозоїдах та спермальній плазмі визначали концентрацію Ca^{2+} , Na^+ , K^+ .

Кінцеву концентрацію іонів у дослідних пробах знаходили на калібрувальних графіках, які будували за допомогою визначених на шкалі приладу показів відомих концентрацій калібрувальних розчинів. Концентрацію іонів, визначену у мг/дм³ перераховували в мМ, перемножуючи результати вимірювань на коефіцієнти перерахунку, які для Ca²⁺, K⁺ і Na⁺ відповідно становили 0.02495, 0.02597, 0.0435 та враховували ступінь розведення проб.

2.5. Імунологічні дослідження

2.5.1. Визначення концентрацій прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-18 у спермальній плазмі чоловіків

Концентрацію прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-18 визначали імуноферментним методом за допомогою тест-системи IFA-BEST (ТОВ «Вектор-Бест», Україна) на планшетному напівавтоматичному фотометрі Stat-fax-303 (Awareness Technology Inc., USA). Межі чутливості тестів становили <1 пг/мл та <5 пг/мл для IL-1 β і IL-18, відповідно. Основний принцип методу визначення інтерлейкінів за допомогою «сендвіч»-варіанту імуноферментного аналізу (ІФА) полягає у детекції комплексу «антитіло - антиген - мічене антитіло». Визначення концентрації зазначених цитокінів включає три стадії дослідження.

На *1-ому етапі* відбувається зв'язування інтерлейкінів, що наявні у зразках, з іммобілізованими специфічними моноклональними антитілами, нанесеними на лунки планшета. В усі лунки планшета спершу вносили по 0.1 мл розчину для розведення зразків. Далі, у вибрані лунки, додавали по 0.1 мл контрольного та калібрувальних розчинів з певною концентрацією інтерлейкіну (для IL-1 β – 0, 5.0, 20.0, 40.0, 100.0, 250.0 пг/мл; для IL-18 - 12.3, 37.0, 111.0, 333.0, 1000 пг/мл). У решту лунок – по 0.1 мл досліджуваного зразка. Планшет заклеювали плівкою та поміщали в шейкер на 2 год при 700 обертів/хв за 37°C. Після інкубації лунки планшета промивали 5 разів розчином для промивання (до 20 мл концентрату фосфатно-сольового розчину

з твіном додавали 500 мл дистильованої води).

На 2-ому *етані* в усі лунки вносили по 0.1 мл кон'югату №1, що містив поліклональні біотинильовані антитіла до людського інтерлейкіну, та інкубували суміш 1 год при 37°C. Промивання лунок здійснювали аналогічно до першого етапу.

3-ій *етап* полягав у додаванні в лунки по 0.1 мл кон'югату №2 (стрептавідин-пероксидаза хрому). Інкубація проб тривала 30 хв при 37°C, після чого лунки промивали 5 разів, додаючи у кожен лунку по 0.35 мл розчину для промивання. На завершення, у лунки додавали по 0.1 мл хромогену (розчин тетраметилбензидину) та інкубували проби у захищеному від світла приміщенні 25 хв при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли за допомогою додавання 0.1 мл стоп-реагенту та спостерігали за фарбуванням вмісту лунок у жовтий колір, інтенсивність забарвлення розчину є прямо пропорційна кількості інтерлейкіну в зразку.

Вимірювали екстинкцію проб при довжині хвилі 450 нм та за допомогою калібрувального графіка розраховували концентрацію інтерлейкінів спермоплазми. Результати виражали у пг/мл.

2.5.2. Визначення вмісту лептину у спермальній плазмі чоловіків

Для визначення концентрації лептину в спермальній плазмі використовували планшетний напівавтоматичний фотометр Stat-fax-303 (Awareness Technology Inc., USA) та тест-систему DBC (Diagnostics Biochem Canada Inc, Онтаріо, Канада) і використовували матеріал, що був раніше заморожений за температури -20°C. Розморожування зразків здійснювали при кімнатній температурі.

Основний принцип тесту побудований на типовому «сендвіч»-варіанті ІФА. У методиці використовують два типи моноклональних антитіл: моноклональні антитіла до лептину, іммобілізовані на дні мікроплашки, та моноклональні антитіла, що кон'юговані з біотином та є специфічними до іншого епітопу лептину.

У відповідні лунки мікроплашки додавали по 0.02 мл калібраторів (0; 1; 5; 10; 20; 50; 100 нг/мл), контролів (концентрація лептину – 5.91 та 14.5 нг/мл) та зразків. Згодом, у всі лунки вносили по 0.08 мл моноклонального анти-лептин-біотинового кон'югату та інкубували зразки на шейкері протягом 1 год при 200 об/хв за кімнатної температури. На цьому етапі лептин зв'язується з іммобілізованими та з біотинильованими антитілами, утворюючи сендвіч-комплекс. Після зазначеного терміну, плашки тричі промивали розведеним буфером для промивання (50 мл концентрату буфера + 450 мл дистильованої води).

Наступним кроком експерименту було додавання до всіх лунок по 0.1 мл кон'югату стрептавідину-HRP, який готували шляхом розведення 0.24 мл концентрату HRP у 12.0 мл білкового буфера для аналізу. Під час 30 хв інкубації мікроплашки на шейкері, за кімнатної температури, кон'югат стрептавідину-HRP специфічно зв'язувався з біотинильованими антитілами. Після чого лунки промивали таким же чином, як описано раніше. Далі до лунок додавали по 0.1мл субстрату тетраметилбезидину (ТМБ) та знову інкубували на шейкері 10 хв, при цьому розчин набував синього забарвлення.

Ферментативну реакцію зупиняли, додаючи в кожну лунку 0.05 мл стоп-реагенту (1 мМ H_2SO_4) та спостерігали зміну кольору реакційної суміші з синього на жовтий. Зчитували екстинкцію мікроплашок при 450 нм.

Концентрацію лептину спермоплазми розраховували згідно з калібрувальним графіком. Результати виражали у нг/мл.

2.6. Характеристика експериментальних моделей на щурах

У дослідження було включено 30 статевозрілих білих нелінійних щурів-самців масою тіла 250–300 г. Під час роботи керувалися загальними етичними принципами Конвенції з біоетики Ради Європи (1997р.) та Хельсінкської декларації Всесвітньої Медичної асоціації (1996р.), Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 1759-VI від 15 грудня 2009р.).

Лабораторних тварин утримували в стандартних умовах віварію з дотриманням санітарно-гігієнічних норм. Для експерименту були відібрані лише здорові самці. Відповідно до запланованих завдань, випадковим чином сформували три групи, по 10 самців у кожній. Тварин контрольної групи (КГ) отримували на стандартному раціоні. Перша дослідна група тварин була на дієті з високим вмістом жиру (ВЖД) і споживала стандартний корм, який доповнювали тваринним смальцем із розрахунком вмісту загальної частки жиру на рівні 45% добового калоражу. Друга дослідна група – корм з високим вмістом жиру та цукру (ВЖЦД) з добовим калоражем 40% жирів і 46% вуглеводів. Нутритивний склад та калораж дієт, що використовували в дослідженні, наведений у Додатку Г.

Тривалість утримання щурів на вище зазначених раціонах становила 7 тижнів. Протягом даного періоду періодично (кожні 2–3 дні) реєстрували масу тіла тварин. На 50-у добу експерименту, після 12 год голодування, тварин зважували та вимірювали назо-анальну довжину. Декапітацію щурів проводили на фоні інгаляційного наркозу діетиловим ефіром. Після цього у тварин виділяли яєчка, придатки яєчка, вісцеральний жир та зважували їх. На основі отриманих даних, обчислювали індекс Лі, який корелює із жировою масою, за допомогою формули (2.11):

$$\text{Індекс Лі} = \frac{\sqrt[3]{\text{Маса тіла (г)}}}{\text{Назо-анальна довжина (см)}} \times 10000, \quad (2.11)$$

Гонадо-соматичний індекс та коефіцієнт вісцерального жиру

вираховували, використовуючи формули (2.12; 2.13):

$$\text{Гонадо – соматичний індекс} = \frac{\text{Маса яєчок (г)}}{\text{Маса тіла (г)}} \times 100\%, \quad (2.12)$$

$$\text{Коеф. вісцерального жиру} = \frac{\text{Маса вісцерального жиру (г)}}{\text{Маса тіла (г)}} \times 100\%, \quad (2.13)$$

2.7. Дослідження спермограми щурів

2.7.1. Виділення сперматозоїдів

Придатки яєчок швидко виділяли одразу після декапітації тварин, зважували їх, а потім акуратно, за допомогою пінцету та ножиць, відділяли хвостову частину епідидимісу (cauda epididymis). Тканину переносили в чашку Петрі, що містила 3–4 мл попередньо підігрітого до 37°C модифікованого розчину Тироде (131.89 мМ NaCl, 2.68 мМ KCl, 0.49 мМ MgCl₂•6H₂O, 1.2 мМ KH₂PO₄, 1.8 мМ CaCl₂, 20 мМ HEPES, доповнений 5.56 мМ глюкози, 2 мМ натрію пірувату, 4 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, рН 7.4). На кожній каудальній частині епідидимісу робили 4 поперечних та 2 повздовжніх розрізи, після чого залишали його на 5-10 хвилин у розчині Тироде, щоб статеві клітини дифундували в розчин. Отриману суспензію сперматозоїдів переносили в пробірку, використовуючи дозатор зі зрізаним наконечником та реєстрували об'єм виділеного матеріалу.

2.7.2. Визначення загальної кількості статевих клітин

Суспензію клітин розводили теплим розчином Тироде в співвідношенні 1:20 (до 0.02 мл суспензії додавали 0.38 мл розчину Тироде). Підрахунок сперматозоїдів проводили у камері Горяєва, оцінюючи кожен зразок у двох аліквотах. Рахували тільки цілі сперматозоїди (з голівками та джгутіками) всередині 5 великих квадратів, що розташовані по діагоналі камери. Концентрацію статевих клітин (С) в 1 мл визначали за формулою (2.14):

$$C = N \times 50\,000, \quad (2.14)$$

де N - середня кількість, підрахованих у двох аліквотах сперматозоїдів.

Загальну кількість сперматозоїдів у суспензії розраховували, перемноживши отриману концентрацію статевих клітин на об'єм готової суспензії. Результат виражали у мільйонах.

2.7.3. Вивчення рухливості сперматозоїдів

Рухливість сперматозоїдів визначають як відсоткове співвідношення рухливих сперматозоїдів до загальної кількості підрахованих сперматозоїдів. Для оцінки рухливості статевих клітин, краплю суспензії сперми наносили на попередньо підігріте до 37°C предметне скло. Визначення проводили за допомогою світлової мікроскопії шляхом підрахунку мінімум 200 клітин. Рухливими вважали ті сперматозоїди, в яких реєстрували рух джгутиків. Результат виражали в відсотках (%).

2.7.4. Оцінка життєздатності сперматозоїдів

Підрахунок кількості живих сперматозоїдів проводили за допомогою флюоресцентного мікроскопа Olympus IX73.

До попередньо розведеної суспензії клітин додавали 0.25 мкл пропідію йодиду (PI) та інкубували їх кілька хвилин при кімнатній температурі в темряві. На ретельно вимите й підігріте до 37°C предметне скло наносили краплю матеріалу. Флюоресценцію забарвлених PI клітин визначали при детекторі флюоресценції №2. Для кожної проби підраховували щонайменше 200 сперматозоїдів: після обчислення клітини зі свіченням, що вважаються мертвими, рахували кількість незафарбованих (живих) клітин (рис. 2.2). Результат подавали у відсотках

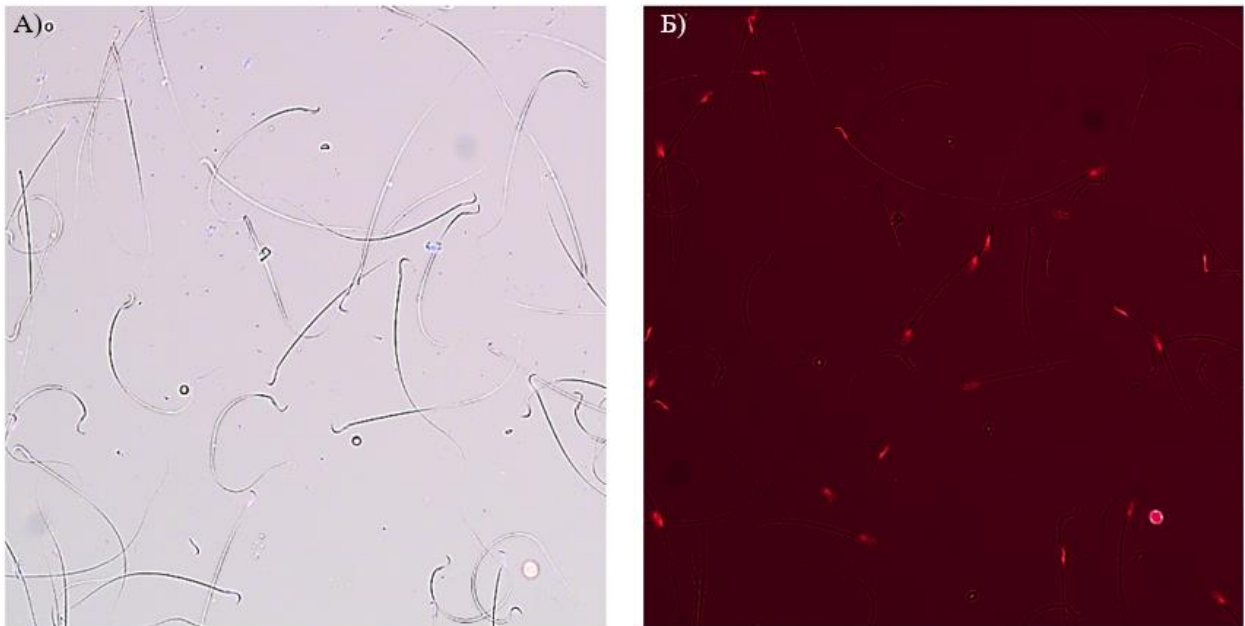
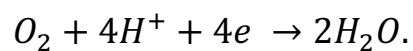


Рис. 2.2 Оцінка життєздатності сперматозоїдів щурів: А – Світлова мікроскопія нативного препарату ($\times 400$); Б – флюоресцентна мікрофотографія того ж оптичного поля після обробки пропідію йодидом ($\times 400$).

2.8. Полярографічне дослідження мітохондріального дихання статевих клітин

Полярографічний метод, який базується на реакції електролізу між двома електродами, дозволяє визначити концентрацію певних речовин у досліджуваному розчині. При застосуванні поляризаційного потенціалу ($0.6V$) на катоді відбувається відновлення розчиненого кисню:



За вказаних умов, між анодом і катодом генерується електричний струм, величина амплітуди якого є пропорційною концентрації кисню в середовищі. Після внесення у полярографічну комірку досліджуваного матеріалу, клітини

споживають кисень і його концентрація, відповідно, знижується, що дає можливість оцінити швидкість дихання статевих клітин.

Для діагностики функціонального стану мітохондрій використовуються протонифори (у нашому випадку – FCCP, карбоніл-ціанід-р-трифлорметоксифенілгідразон). Протонифори є іонними транслокаторами, які, порушуючи синтез АТФ, переміщують протони водню (H^+) через мітохондріальну мембрану. З використанням протонифорів можна створити функціональне навантаження на клітину і таким чином відтворити експериментальну модель дисфункції мітохондрій. З цією метою після реєстрації швидкості базального дихання, до клітин додають FCCP з визначеною концентрацією через певні часові інтервали.

Швидкість дихання мітохондрій та респіраторна реакція на дію протонифора залежить від багатьох факторів: метаболічних процесів у клітині (гліколізу, циклу трикарбонних кислот), компонентів дихального ланцюга мітохондрій, окисних субстратів чи їх комбінацій (глюкоза, піруват тощо).

У представленій роботі, для визначення швидкості поглинання кисню сперматозоїдами, ми використали установку, до складу якої входили: цифровий вольтметр, комп'ютер, термостат, скляна закрита комірка об'ємом 1.6 мл та магнітна мішалка. Схематичне зображення електрода Кларка (YSI 5300, США) представлено на рис 2.3.

На етапі підготовки клітин до визначення мітохондріального дихання, ми вирішили не застосовувати методику A. Ferramosca [94, 95], яка передбачає попередню гіпотонічну обробку та відмивання сперматозоїдів ізотонічним розчином з метою пермеабілізації (тобто збільшення проникності мембрани). Такі рішення були ухвалено на основі серій тестування методики, в ході яких було виявлено, що такі фактори, як гіпотонічна обробка, центрифугування, надмірне коливання температур негативно позначалися на життєздатності клітин та, відповідно, результатах оксиграфічного дослідження, унеможливаючи подальший аналіз.

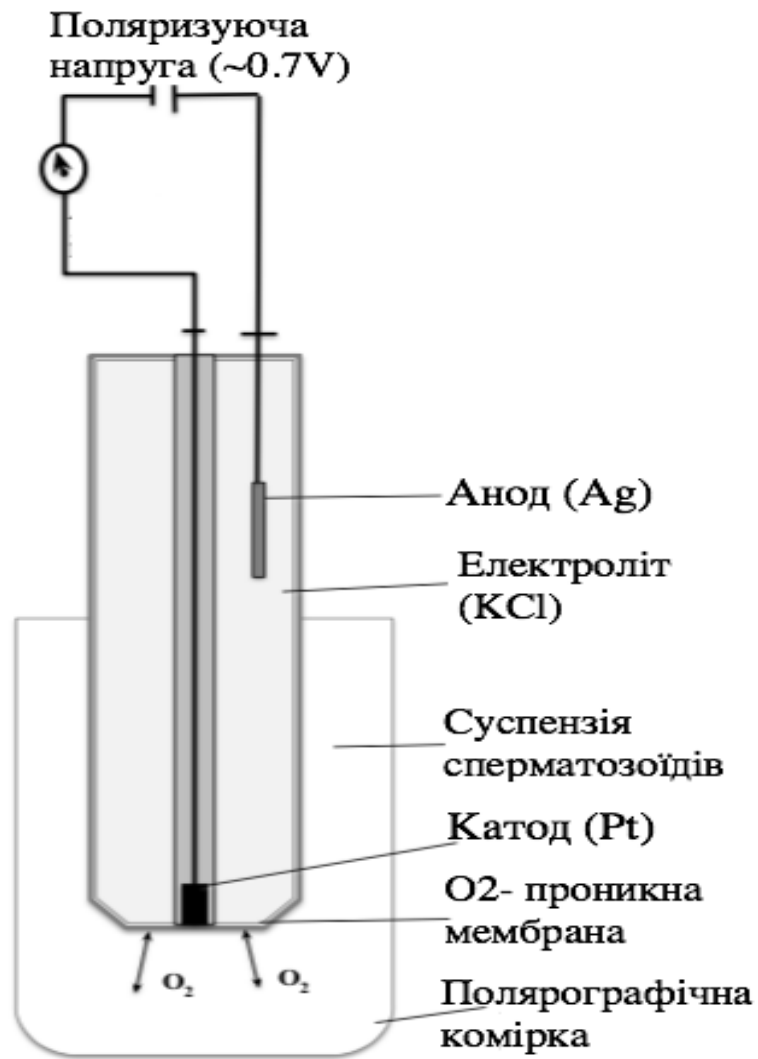


Рис. 2.3 Схематичне зображення електроду Кларка.

З огляду на вище зазначені факти, з метою дослідження адаптаційної здатності мітохондрій ми використовували цілісні клітини. Також перед оксиграфічним дослідженням ми не проводили центрифугування зразків з метою виділення більш рухомої фракції сперматозоїдів, оскільки рухливість клітин у кожному досліджуваному зразку була досить високою та становила понад 50%.

Попередня обробка виділених статевих клітин щурів включала інкубацію протягом 10 хв із модифікованим розчином Тироде (mT – HEPES, 37°C), склад якого ми оптимізували для аналізу дихання мітохондрій сперматозоїдів щурів.

Зазначимо, що перед основною експериментальною частиною ми відпрацьовували детальний протокол дослідження та тестували середовища із різним складом та комбінацією субстратів (фосфотно-сольовий буфер, фосфатний буфер Кребса-Рінгера, розчин Тироде). Завдяки доповненню розчину mT - HEPES такими субстратами, як глюкоза та натрію піруват, ми значно покращили результати, отримавши більш динамічні діапазони значень споживання кисню сперматозоїдами. Подібні дані були отримані у роботі Hisanori Taniguchi та співавт. [120], які досліджували еякулят чоловіків. На підставі цих спостережень розчин mT - HEPES, доповнений глюкозою та піруватом або комбінацією глюкоза+піруват+лактат був обраний як кращий для аналізу сперматозоїдів щурів.

Після підрахунку клітин у камері Горяєва, досліджуваний зразок розводили тим же розчином для інкубації таким чином, щоб концентрація сперматозоїдів становила приблизно 20×10^6 /мл. Далі у дві полярографічні комірки вносили по 1.0 мл суспензії клітин, після чого в одну з комірок додатково додавали 10.0 мМ розчину лактату.

Усі дослідження проводили при сталій температурі 37°C у двох паралелях.

Базальну швидкість дихання сперматозоїдів реєстрували протягом 1.5 хв. Далі, з інтервалом 2 хв, у лунки вносили протонофор FCCP у висхідних концентраціях 0.5, 1.0, 1.5 і 2.0 мМ/л.

На основі отриманих даних, згідно з полярографічними кривими, розраховували швидкість дихання клітин, вважаючи, що в 1.0 мл розчину розчинено 200 нМ O₂. У досліджуваних зразках аналізували базальну та максимальну швидкість дихання, розраховували резервну дихальну здатність мітохондрій (різниця між максимальною та базальною швидкістю), а також визначали оптимальну концентрацію протонофора.

2.9. Біохімічні методи дослідження плазми крові щурів

2.9.1. Визначення концентрації глюкози

Для тесту використовували зразки плазми, що були відібрані та заморожені при -20°C до початку експерименту та одразу після декапітації тварини. Розморожування зразків здійснювали при кімнатній температурі.

Забір крові перед початком експерименту здійснювали із хвостових судин щурів. Для цього тварину фіксували та розігрівали її хвіст шляхом занурення його в теплу воду ($+35^{\circ}\text{C}$). Після обсушування та дезінфекції, гострою бритвою робили навскісний надріз кінчика хвоста по спіралі. Проксимальну частину хвоста легко стискали двома пальцями, спускаючись по шкірі до кінчика. Швидко забирали кров, що витікала самоплином, в еппендорф із краплею гепарину. Зібраний матеріал центрифугували 5 хв при 800g, після чого відбирали та заморожували плазму при -20°C для подальших досліджень.

Концентрацію глюкози в плазмі крові визначали глюкозооксидазним методом за допомогою набору реактивів «Глюкоза-МОНО» (ТОВ «Філісіт-Діагностика», Україна) та спектрофотометру DeNovix DS-11+ (Denovix Inc., USA). Глюкоза за участі глюкозооксидази окислюється до глюконової кислоти та перекису водню, який за дії пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназолом. Продуктом спряжених реакцій є хінонімін червоно-фіолетового забарвлення, концентрація якого – прямопропорційна вмісту глюкози в зразку. Розчин фотометрують при довжині хвилі 550 нм.

Для визначення концентрації глюкози в плазмі крові використовували наступні розчини: монореагент, фізіологічний розчин та калібрувальний розчин з концентрацією глюкози 10.0 мМ/л. Розчин монореагенту містив 1100 О/л пероксидази, 9000 О/л β ,D- глюкозооксидази, 55 мг/л 4-амінофеназону, 190 мг/л фенолу та 0.1 мМ/л фосфатний буфер (рН 7.2–7.4). Перед проведенням аналізу зразки біоматеріалу розморожували при кімнатній температурі.

У пробірки для холостої та дослідної проб вносили по 0.01 мл фізіологічного розчину та зразка, відповідно. Далі у всі пробірки додавали по

1.0 мл монореагенту, суміш ретельно перемішували та інкубували при кімнатній температурі 25 хв. Оптичну гуштину калібрувальної та дослідної проб визначали проти холостої проби при довжині хвилі 500 нм.

Концентрацію глюкози у зразку обчислювали за допомогою формули (2.15) та виражали у мМ/л:

$$C = \frac{E_{\text{дослідн.}}}{E_{\text{калібр.}}} \times 10, \quad (2.15)$$

де C – концентрація глюкози в 1 мл зразка;

$E_{\text{дослідн.}}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{\text{калібр.}}$ – оптична густина калібрувальної проби;

10 – концентрація глюкози у калібрувальному розчині.

2.9.2. Оцінка показників ліпідного обміну

З метою оцінки ліпідного обміну у плазмі крові визначали концентрацію тригліцеридів (ТГ), загального холестерину (ЗХС), холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ХС-ЛПВЩ), холестерину ліпопротеїнів низької щільності (ХС-ЛПНЩ) з використанням реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Україна) за допомогою імуноферментного аналізатора Stat-fax-303 (Awareness Technology Inc., США).

Визначення тригліцеридів плазми крові щурів

Тригліцериди у зразках плазми крові щурів визначали ензиматичним колориметричним методом. Унаслідок ферментативних реакцій гідролізу ліпідів утворюється хінонімін, концентрацію якого визначають фотометрично при довжині хвилі 505 нм.

Для визначення концентрації ТГ в плазмі крові використовували калібрувальний розчин (відповідав концентрації ТГ 2.26 ± 0.10 мМ/л) та реакційну суміш, яка містила 40 мМ/л PIPES, 5мМ/л 4-хлорфенолу, 1 мМ/л MgSO_4 , 0.5 мМ 4-амінофеназону, 1500 МОд/л ліпази, 200 МОд/л

гліцерокінази, 1000 МОд/л гліцерофосфатоксидази, 250 МОд/л пероксидази; рН розчину – 7.5.

У пробірку з дослідною пробою вносили 1.0 мл розчину ферментів та додавали 0.01 мл попередньо розмороженої плазми крові. Калібрувальна та холоста проби містили по 1.0 мл розчину ферментів та по 0.01 мл розчину калібрувального розчину та дистильованої води, відповідно.

Вміст пробірок ретельно перемішували та витримували у термостаті при температурі 37 °С протягом 10 хв. Оптичну щільність дослідної проби ($E_{\text{досл.}}$) і калібрувальної проби ($E_{\text{кал.}}$) вимірювали проти холостої проби. Концентрацію ТГ у зразках розраховували за допомогою формули та виражали у мМ/л (2.16):

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times 2.26, \quad (2.16)$$

де C – концентрація ТГ в 1 мл еякуляту;

$E_{\text{досл.}}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{\text{кал.}}$ – оптична густина калібрувальної проби;

2.26 – концентрація ТГ у стандарті.

Визначення загального холестерину плазми крові щурів

У реакційній суміші, внаслідок ферментативних реакцій утворюється хінонімін. Інтенсивність рожево-червоного або бузкового забарвлення реакційного розчину пропорційна концентрації холестерину.

З метою визначення концентрації загального ХС у плазмі крові використовували калібрувальний розчин (із концентрацією ХС 5.17 ± 0.10) та реакційну суміш, що містила 30.0 ± 1.5 мМ/л трису, 150 ± 15 О/л холестеринестерази, 100 ± 10 О/л холестериноксидази, 5.0 ± 0.5 КО/л пероксидази, 0.3 ± 0.015 мМ/л 4-амінофеназону, 30.0 ± 1.5 мМ/л фенолу.

Дослідна, калібрувальна та холоста проби містили по 1.0 мл розчину ферментів та по 0.01 мл плазми крові, калібрувального розчину ХС та дистильованої води, відповідно.

Розчини у пробірках ретельно перемішували та інкубували при 37 °С протягом 5 хв. Вимірюють оптичну щільність дослідної проби ($E_{\text{досл.}}$) та калібрувальної проби ($E_{\text{кал.}}$) проти холостої проби. Концентрацію ХС у дослідних зразках обчислювали за допомогою формули (2.17) та виражали у мМ/л:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times 5.17, \quad (2.17)$$

де C – концентрація ХС в 1 мл еякуляту;

$E_{\text{досл.}}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{\text{кал.}}$ – оптична густина калібрувальної проби;

5.17 – концентрація загального ХС у стандарті.

Визначення холестерину ліпопротеїнів високої щільності (ХС-ЛПВЩ)

При додаванні до дослідного зразка реагенту для осадження, що містив 0.560 ± 0.028 мМ/л фосфорновольфрамової кислоти та 30.0 ± 1.5 мМ/л хлориду магнію, хіломікрони, ліпопротеїни дуже низької щільності (ЛПДНЩ) і ліпопротеїни низької щільності (ЛПНЩ) випадають в осад. Після центрифугування в супернатанті залишаються лише ліпопротеїни високої щільності (ЛПВЩ). Концентрація холестерину ЛПВЩ у зразках визначається ензиматичним колориметричним методом. Інтенсивність рожево-червоного або бузкового забарвлення реакційного розчину є пропорційною до концентрації ХС-ЛПВЩ.

На початку дослідження 0.25 мл плазми крові змішували із 0.5 мл осаджувального реагенту та інкубували 10 хв при температурі 25 °С. Опісля центрифугували 20 хв при 4000 об/хв та акуратно відбирали прозору надосадову рідину, не допускаючи потрапляння осаду до розчину. У пробірку з дослідною пробою додавали 0.1 мл супернатанту та 1.0 мл реакційної суміші. Для холостої проби додавали 0.1 мл дистильованої води та 1.0 мл ензимного реагенту. Калібрувальна проба була аналогічною за вмістом до холостої, однак

із додаванням 0.01 мл калібрувального розчину холестерину, що відповідав концентрації ХС 5.17 ± 0.10 мМ/л.

Вміст пробірок ретельно перемішували та витримували у термостаті при 37 °С протягом 20 хв. Вимірювали оптичну щільність дослідної та калібрувальної проб проти холостої проби. Концентрацію ЛПВЩ у зразках обчислювали за допомогою формули (2.18) та виражали у мМ/л:

$$C = \frac{E_{\text{досл.}}}{E_{\text{кал.}}} \times 1.551, \quad (2.18)$$

де C – концентрація ХС-ЛПВЩ в 1 мл еякуляту;

$E_{\text{досл.}}$ – оптична густина дослідної проби;

$E_{\text{кал.}}$ – оптична густина калібрувальної проби;

1.551 – значення концентрації ЛПВЩ калібратора з урахуванням розведень калібратора ХС відносно сироватки.

Визначення холестерину ліпопротеїнів низької щільності (ХС-ЛПНЩ)

Холестерин ліпопротеїнів низької щільності (ХС-ЛПНЩ) є основною транспортною формою загального холестерину та тригліцеридів, переносячи їх головним чином у вигляді ефірів холестеролу. Показник ХС-ЛПНЩ вважається найбільш атерогенною фракцією ліпідів та пов'язується з високим ризиком розвитку атеросклерозу.

На першому етапі визначення ХС-ЛПНЩ до дослідного зразка додається маскувальний реагент №1 (25 мМ/л ТРІС, 5000 Од/л холестеринестерази, 5000 Од/л холестериноксидази, 10 КО/л каталази), що захищає ХС-ЛПНЩ від дії ферментів, при чому інші форми ліпопротеїнів зазнають ферментативного гідролізу. На другому етапі після внесення реагенту № 2 (25 ммоль/л ТРІС, 3.4 мМ/л 4-амінофеназон, 10 КО/л пероксидази) унаслідок реакцій окислення утворюється комплекс, забарвлення якого є пропорційне концентрації ХС- ЛПНЩ.

У ході аналізу для дослідної проби змішували 0.004 мл плазми крові та 0.4 мл маскувального реагенту №1. До калібрувальної та холостої проби вносили лише по 0.4 мл маскувального реагенту №1. Зразки витримували 5 хв при температурі 37 °С та опісля вимірювали оптичну щільність дослідної ($E_{\text{досл.1}}$) та калібрувальної ($E_{\text{калібр.1}}$) проб проти холостої проби при довжині хвилі 600 нм.

На другому етапі до всіх пробірок додавали реагент №2, а до калібрувальної проби – додатково 0.004 мл калібрувального розчину з концентрацією ХС 5.17 ± 0.10 мМ/л. Вміст пробірок ретельно перемішували та витримували у термостаті при 37 °С протягом 5 хв. Вимірювали оптичну щільність дослідної ($E_{\text{досл.2}}$) та калібрувальної ($E_{\text{калібр.2}}$) проб проти холостої проби. Концентрацію ХС-ЛПНЩ у зразках обчислювали за допомогою формул (2.19, 2.20) та виражали у мМ/л:

$$\Delta E = (E_1 - E_2) \quad (2.19)$$

$$C = \frac{\Delta E_{\text{досл.}}}{\Delta E_{\text{кал.}}} \times 1.551, \quad (2.20)$$

де C – концентрація ЛПНЩ в 1 мл еякуляту;

$\Delta E_{\text{досл.}}$ – різниця оптичних густин дослідної проби;

$\Delta E_{\text{кал.}}$ – різниця оптичних густин калібрувальної проби;

5.17 – значення концентрації калібратора.

Окрім того, додатково (для перевірки правильності проведеного аналізу) розраховували концентрацію ХС-ЛПНЩ за допомогою формули (2.21), що була запропонована W.T. Friedewald та співавт. [151]:

$$\text{ХС ЛПНЩ} = 3\text{ХС} - \text{ХС ЛПВЩ} - \text{ТГ}/5, \quad (2.21)$$

Визначення вмісту холестерину ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ) проводили за формулою (2.22):

$$\text{ЛПДНЩ} = \text{TГ}/5, \quad (2.22)$$

За попередньо отриманими результатами розраховували коефіцієнт атерогенності (КА) за формулою (2.23):

$$\text{КА} = (\text{ЗХС} - \text{ХС ЛПВЩ})/\text{ЛПВЩ}, \quad (2.23)$$

Також з метою ширшої оцінки атерогенних змін за умов експериментального ожиріння були розраховувані наступні співвідношення: ТГ/ХС-ЛПВЩ, ТГ/ ЗХС, ХС-ЛПВЩ/ХС-ЛПНЩ та ЗХС/ ХС-ЛПВЩ, які потенційно можуть свідчити про ризик розвитку атеросклерозу [152].

2.10. Статистичні методи обробки результатів

Вибір методу статистичного аналізу залежав від симетричності розподілу даних у досліджуваних вибірках. Перевірку нормальності розподілу здійснювали за допомогою тесту Шапіро-Уїлка (Shapiro-Wilk test).

Для обробки даних, які підлягали Гаусівському розподілу, використовували однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA), а для попарних порівнянь – t-тест Стьюдента. За зазначених вище умов, для отриманих показників розраховували середнє арифметичне значення (M) та стандартне квадратичне відхилення ($\pm\sigma$). При несиметричному розподілі даних застосовували непараметричні методи статистичної оцінки. Відмінність між показниками визначали шляхом попарного порівнювання груп із використанням U-критерію Манна-Уїтні (Mann-Whitney U test), обчислюючи медіану та 25 (Q1) і 75 (Q3) кватилі. Результат подавали у форматі медіани (Me) та міжквартильного інтервалу (Q1–Q3).

З метою визначення статистично вірогідної різниці між парними параметрами оцінювальної вибірки до та після експерименту, застосовували t-

критерій Стюдента та Уїлкоксона (Wilcoxon test) для параметричного та непараметричного розподілу даних, відповідно.

Для оцінки напрямку та величини сили кореляційного зв'язку (r) між досліджуваними параметрами, переважно застосовували критерій кореляції Пірсона або ж непараметричний метод рангової кореляції Спірмена (Spearman rank order correlations).

Для статистичної обробки результатів використовували такі програми як Microsoft Excel 2010 та StatPlus (Stat Plus Analyst Soft Inc. version 6.0, США). Для всіх випадків показник $p < 0.05$ був встановлений як статистично значущий.

РОЗДІЛ 3

ОСОБЛИВОСТІ СПЕРМОГРАМИ ТА МАРКЕРІВ ПРИДАТКОВИХ СТАТЕВИХ ЗАЛОЗ СЕРЕД ПАЦІЄНТІВ З РІЗНИМ ІНДЕКСОМ МАСИ ТІЛА

3.1. Особливості основних показників спермограми у пацієнтів з надмірною масою тіла та ожирінням

Отримані нами дані показали, що вік учасників серед груп порівняння статистично не відрізнявся: середній показник у чоловіків з надмірною масою тіла становив 31.5 [25–34] та 34 [31–38] роки у пацієнтів з ожирінням ($p < 0.05$). Загалом, серед усіх обстежених осіб відзначався напрямок до збільшення ІМТ з віком (рис 3.1).

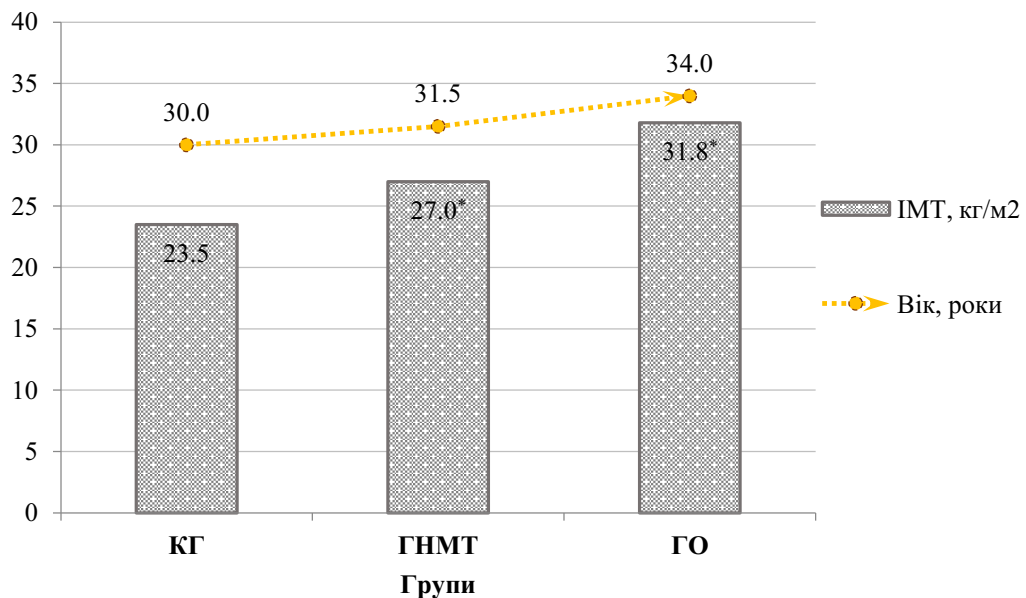


Рис. 3.1 Показники віку та ІМТ у групах порівняння, (Me, n=120).

Примітка: * $p < 0.05$.

При аналізі результатів спермограми не виявлено статистичної різниці між показниками об'єму еякуляту у чоловіків із груп порівняння (табл. 3.1). У групі з надмірною масою тіла медіана концентрації сперматозоїдів становила 49.1 млн/мл, що у 1.4 раза нижче порівняно із КГ ($p = 0.04$); тоді як у групі чоловіків з ожирінням цей показник відповідав рівню 29.4 млн/мл та був

нижчим у 2.3 раза у порівнянні із КГ ($p = 0.04$). Аналогічна ситуація спостерігалася стосовно загальної кількості статевих клітин в еякуляті: показник у групі ГНМТ становив 110.7 млн/еякулят, у групі з ожирінням – 89.8 млн/еякулят, що у 2.1 та 2.5 раза нижче у порівнянні з КГ ($p = 0.04$), відповідно.

Таблиця 3.1

**Основні параметри спермограми у групах порівняння,
(Me, Q1–Q3), n=120**

Параметри	КГ	ГНМТ	ГО
Об'єм еякуляту, мл	2.7 [2.5–4.5]	3.5 [2.5–5.0]	3.75 [2.4–5.5]
Концентрація сперматозоїдів, 10^6 /мл	68.4 [33.1–118.1]	49.1 [21.2–85.1]*	29.4 [8.8–70.1]*#
Загальна к-сть сперматозоїдів, 10^6 /еякулят	228.1 [113.5–371.5]	110.7 [81.3–371.9]*	89.8 [30.0–295.9]*#
PR, %	42.2 [37.5–50.3]	31.7 [23.1–46.6]*	35.9 [29.5–47.0]
PR+NP, %	54.9 [51.0–62.1]	48.0 [38.5–60.2]*	46.0 [37.9–58.2]*
Життєздатність (живі клітини), %	71.0 [55.0–80.0]	60.0 [48.0–75.0]*	57.0 [30.0–75.0]*
Частка нормальних морфологічних форм, %	28.0 [21.0–35.0]	13.2 [7.0–17.0]*	11.5 [6.1–27.0]*

Примітки:

PR – прогресивно-рухлива частка сперматозоїдів;

PR+NP – загальна рухливість (прогресивно-рухливі + непрогресивно-рухливі сперматозоїди);

* – $p < 0.05$ порівняно з КГ; # – $p < 0.05$ між ГНМТ та ГО.

При дослідженні параметрів рухливості виявлено, що частка прогресивно-рухливих клітин була нижчою у 1.3 раза у групі з ГНМТ та становила 31.7% ($p = 0.04$), тоді як у групі з ожирінням статистично не відрізнялися із даними КГ ($p > 0.05$). Відзначалося зниження загальної рухливості: у ГНМТ цей параметр становив 48.0 [38.5–60.2], а у ГО – 57.0 [30.0–75.0] %, $p < 0.05$.

Показники життєздатності сперматозоїдів знижувалися у групах порівняння – у 1.2 раза порівняно з КГ ($p < 0.05$). Проте слід відзначити, що частка живих клітин у групі з ожирінням становила 57% і цей показник є нижчим, ніж встановлене ВООЗ референтне значення (*Додаток Б. Референтні значення показників спермограми, які досліджувалися (згідно з Керівництвом ВООЗ, 2010)*)).

Виявлено значне зниження частки нормальних морфологічних форм у групі з ГНМТ – у 2.1 ($p < 0.05$), а у пацієнтів з ожирінням – у 2.4 раза ($p < 0.05$) порівняно із практично здоровими чоловіками із КГ. Результати аналізу основних показників спермограми серед дослідних груп подані у табл. 3.1.

Загалом у групі із надмірною масою тіла у 52% пацієнтів відзначалася нормозооспермія, тоді як патозооспермія була зафіксована у 48% випадків, з переважанням некрозооспермії – у 15% випадків (*Додаток В. Класифікація показників еякуляту згідно з ВООЗ, 2010*). Олігозооспермія спостерігалася у 8%, та олігоастенонекрозооспермія – у 9% випадків. Дані представлені на рис. 3.2 (А).

Серед чоловіків з ожирінням нормозооспермія спостерігалася лише у 31%, натомість патозооспермія була притаманна для 69% пацієнтів. Найбільшу частку патології складала некрозооспермія – 15%, астено- та олігоастенозооспермія – по 13 % випадків, відповідно. Дані щодо розподілу випадків потозооспермії представлені рис. 3.2 (Б).



Рис. 3.2 Розподіл випадків патозооспермії у групі з надмірною масою тіла (А) та ожирінням (Б).

Зміни концентрації та загальної кількості рухливої сперми у дослідних групах

Оскільки деякі дослідники припускають, що концентрація рухливої сперми (КРС) та загальна кількість рухливих сперматозоїдів (ЗКРС) є кращими показниками тяжкості чоловічого безпліддя, ніж система класифікації сперматозоїдів запропонована ВООЗ [153, 154], ми здійснили додаткові обчислення цих параметрів.

Отримавши результати розрахунків (табл. 3.2), ми виявили, що медіана КРС у чоловіків із надмірною масою тіла та у групі з ожирінням була нижчою у порівнянні із КГ, і становила 27.9 та 21.7 млн/мл, відповідно ($p < 0.05$).

Таблиця 3.2

Концентрація та загальна кількість рухливої сперми у групах порівняння, (Me, Q1–Q3), n=120

Параметри	КГ	ГНМТ	ГО
Концентрація рухливої сперми, млн/мл	31.2 [18.6 – 49.6]	27.9 [12.6 – 46.2]*	21.7 [10.2 – 33.1]*#
Загальна кількість рухливої сперми, млн/еякулят	118.3 [77.7 – 212.4]	85.2 [37.7 – 150.2]*	73.9 [30.6 – 123.1]*#

Примітка: * – $p < 0.05$ порівняно з КГ; # – $p < 0.05$ між ГНМТ та ГО.

Загальна кількість рухливої сперми також прогресивно погіршувалася зі зростанням ІМТ: у ГНМТ серединний показник становив 85.2 млн/еякулят, у пацієнтів з ожирінням – 73.9 млн/еякулят, що у 1.4 та 1.6 раза нижче показників серед практично здорових чоловіків, відповідно ($p < 0.05$).

У результаті кореляційного аналізу (табл. 3.3) був виявлений вірогідний прямий зв'язок середньої сили між ІМТ та віком ($r = 0.33$, $p < 0.01$); а також слабкий негативний зв'язок із показниками спермограми: загальною кількістю сперматозоїдів у еякуляті ($r = -0.18$, $p = 0.04$), прогресивною ($r = -0.22$, $p = 0.02$) та загальною рухливістю ($r = -0.21$, $p = 0.02$), загальною кількістю рухливої сперми в еякуляті ($r = -0.22$, $p = 0.02$).

Отже, значне погіршення основних показників спермограми було характерним для обох груп порівняння. У групі з надмірною масою тіла відзначалося статистично значуще погіршення практично всіх параметрів – концентрації та загальної кількості сперматозоїдів, прогресивної рухливості, життєздатності та морфології статевих клітин. Хоча у групі з ожирінням

статистична різниця із КГ була виявлена не для всіх параметрів, проте патозооспермія була характерною для більшої частини обстежених. Показники концентрації та загальної кількості рухливих сперматозоїдів були зниженні у двох дослідних групах порівняно з контролем. Кореляційний аналіз підтвердив попередні результати, показавши, що зі зростанням індексу маси тіла знижуються загальна кількість сперматозоїдів у еякуляті та їхня рухливість.

Таблиця 3.3

Кореляція показників спермограми з ІМТ, (r; p), n=120

Параметри	Коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r)	
	ІМТ	p-value
Вік, роки	0.33	<0.01**
Об'єм еякуляту, мл	-0.13	0.16
Концентрація сперматозоїдів, 10 ⁶ /мл	-0.12	0.19
Загальна к-сть сперматозоїдів, 10 ⁶ /еякулят	-0.18	0.04*
PR, %	-0.22	0.02*
PR+NP, %	-0.21	0.02*
Концентрація рухливої сперми, млн/мл	-0.16	0.08
Загальна кількість рухливої сперми, млн/еякулят	-0.22	0.02*
Життєздатність (живі клітини), %	-0.18	0.06
Частка нормальних морфологічних форм, %	-0.17	0.06

Примітка: * – p<0.05; ** – p<0.01).

Індекси множинних дефектів

Індекс тератозооспермії (ІТЗ) та індекс дефектності сперматозоїдів (ІДС) – додаткові показники, що дозволяють оцінити запліднювальну здатність сперматозоїдів, а також спрогнозувати шанси на природне зачаття чи успіх допоміжних репродуктивних технологій.

Для розрахунку вище зазначених індексів ми здійснили попередню морфологічну оцінку статевих клітин у зразках еякулятів. Результати обчислень показали, що у ГНМТ та ГО групах удвічі частіше, ніж у КГ виявляли аномальні голівки статевих клітин ($p < 0.05$), а дефекти середньої частини зустрічалися у 1.7 рази частіше ($p < 0.05$). Дані подані у табл. 3.4.

Таблиця 3.4

Результати морфологічної оцінки сперматозоїдів у групах порівняння, ($M \pm \sigma$), $n=120$

Параметри		КГ	ГНМТ	ГО
Нормальна морфологія, %		28.0 [21.0–35.0] ^a	13.2 [7.0–17.0] ^{a*}	11.5 [6.1–27.0] ^{a*}
Категорії аномалій сперматозоїдів, %	Голівка	42.1±13.3	76.6±16.3*	88.0±17*
	Середня частина	22.6±7.0	36.5±7.6*	40.1±13.3*
	Хвіст	10.1±3.2	12.6±4.8	12.4±4.8

Примітки: ^a Дані подані як медіана та міжквартильний інтервал, зважаючи на несиметричність розподілу даних.

* – $p < 0.05$ порівняно з КГ.

Показник ІТЗ, що виражає середнє число дефектів на кожен аномальний сперматозоїд, у дослідних групах був вищим у порівнянні з КГ: у чоловіків з надмірною масою тіла на 17%, у групі з ожирінням – на 26% ($p < 0.05$). ІДС є показником середнього числа дефектів на кожен підраховану статеву клітину, а один морфологічно змінений сперматозоїд може налічувати від 1 до 3

дефектів у різних комбінаціях. Ми встановили, що значення ІДС зростали у чоловіків з надмірною масою тіла на 13%, а у групі з ожирінням – на 27% у порівнянні з КГ ($p < 0.05$), відповідно (рис. 3.3). Проте варто зауважити, що згідно з рекомендаціями ВООЗ порогове значення для ІТЗ не має перевищувати 1.72; а для ІДС ця межа сягає 1.62, проте у дослідженні N. Aziz та співавт. [155] раніше було встановлено, що при значеннях ІДС понад 1.6 спостерігається вищий ризик невдалих спроб запліднення *in vitro*. У рамках представленого дослідження індекси множинних дефектів у групах порівняння не перевищували рекомендованих ВООЗ порогових значень.

Отже, розрахунок індексів множинних дефектів, як додаткових показників якості еякуляту, показав, що зростання ІМТ несприятливо позначається на морфології сперматозоїдів, а отже потенційно може впливати на їхню запліднювальну здатність.

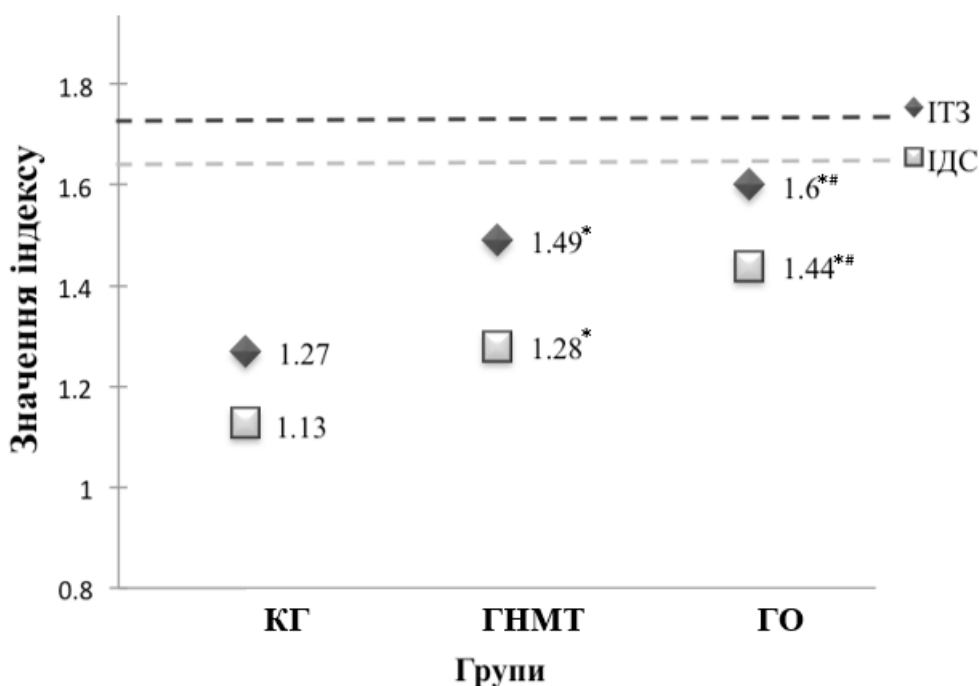


Рис. 3.3 Індекси множинних дефектів у групах порівняння, (Me, n = 120).

Примітки:

ІТЗ – індекс тератозооспермії, ІДС – індекс дефектності сперматозоїдів.

* – $p < 0.05$ порівняно з КГ; # – $p < 0.05$ між ГНМТ та ГО.

3.2. Біохімічні показники еякуляту на тлі надмірної маси тіла та ожиріння

Ми виявили, що у пацієнтів з ожирінням медіана концентрації фруктози у спермальній плазмі становила 12.1 мМ/л та була нижчою в 1.2 раза ($p < 0.05$) порівняно із показником у КГ. Однак у групі із надмірною масою тіла рівні фруктози не відрізнялися від КГ ($p > 0.05$).

Аналогічна різниця у дослідних групах відзначалася після обчислення загального вмісту фруктози у всьому об'ємі еякуляту (рис. 3.4). Проте зазначимо, що рівні фруктози у жодній з груп порівняння не перетинали нижньої контрольної межі (13 мкМ/еякулят), що рекомендована у п'ятому посібнику ВООЗ по дослідженні еякуляту.

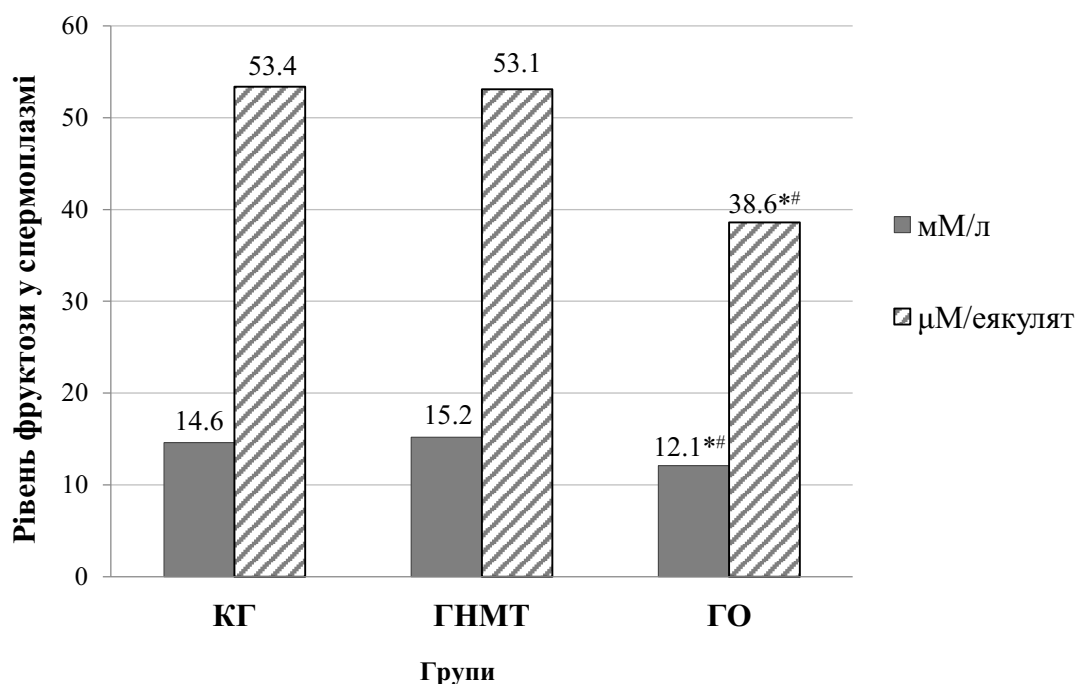


Рис. 3.4 Вміст фруктози у спермальній плазмі чоловіків груп порівняння, (Me, n = 120).

Примітка:

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками КГ ($p < 0.05$);

– $p < 0.05$ при порівнянні ГНМТ та ГО.

Розрахунок значення скоригованої фруктози здійснювали шляхом множення визначеної концентрації фруктози (мМ/л) на логарифм (\log_{10}) концентрації сперматозоїдів / рухливої сперми. Ми виявили, що медіана скоригованих рівнів фруктози спермальної плазми справді була у 1.3–1.4 раза нижчою у пацієнтів з ожирінням у порівнянні з КГ ($p < 0.05$), що підтверджує негативний вплив надмірної маси тіла на цей параметр. Результати представлені у табл. 3.5.

Таблиця 3.5

**Рівні фруктози спермальної плазми (виміряні та обчислені)
у групах порівняння,
(Me, Q1-Q3), n=120**

Параметри	КГ	ГНМТ	ГО
Концентрація фруктози, мМ/мл	14.6 [13.6–19.3]	15.2 [9.9–25.4]	12.1 [9.1–14.1]*#
Скоригований рівень фруктози, мМ/мл×10 ⁶ /мл	26.8 [18.9–29.7]	22.3 [17.3–31.1]	20.5 [16.9–23.4]*
Правдивий скоригований рівень фруктози, мМ/мл×10 ⁶ /мл	21.8 [14.8–24.6]	22.0 [18.1–25.2]	16.2 [14.0–19.8]*#

Примітка: * – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками КГ (* $p < 0.05$).

– $p < 0.05$ при порівнянні ГНМТ та ГО.

Результати нашого дослідження показали значне зростання медіани концентрацій лимонної кислоти у чоловіків обох дослідних груп у 1.8 – 2.0 раза ($p < 0.05$), така ж ситуація у групах спостерігалася при перерахунку вмісту

лимонної кислоти на загальний об'єм дослідного матеріалу ($p < 0.05$), що показано на рис. 3.5.

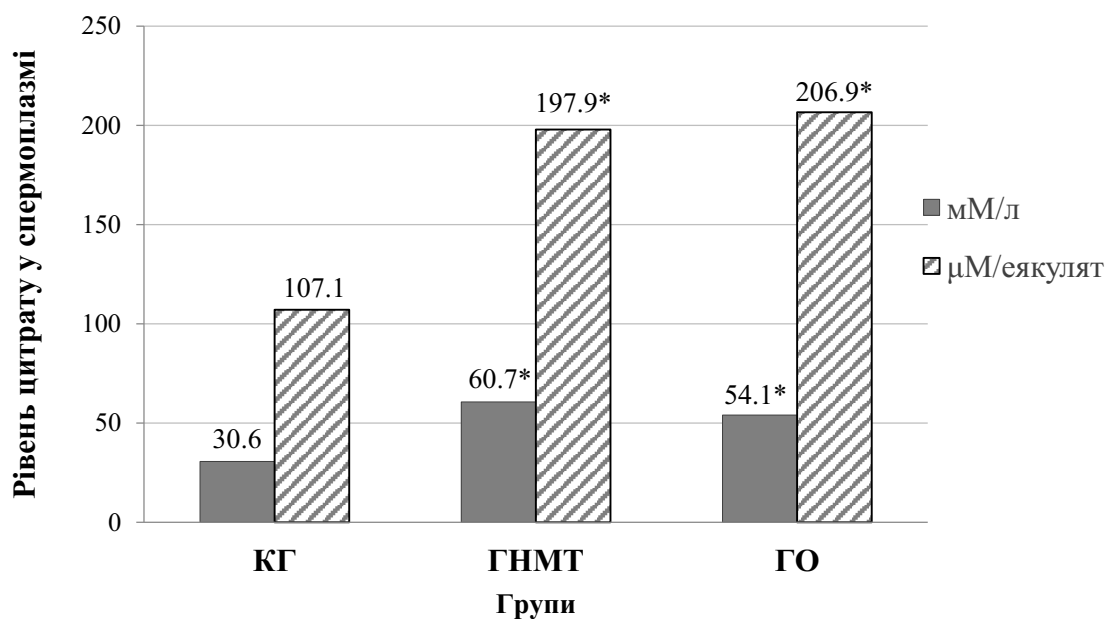


Рис. 3.5 Вміст лимонної кислоти спермальної плазми у групах порівняння, (Me, n=120). Примітка: * $p < 0.05$.

Результати нашого дослідження показали, що зі зростанням ІМТ значно підвищувався вміст Zn у спермальній плазмі чоловіків (рис. 3.6).

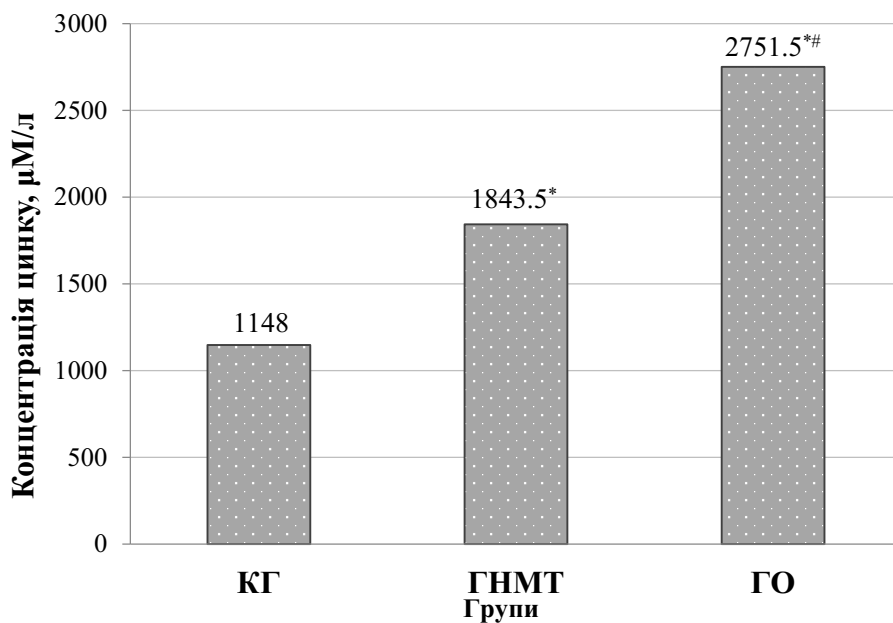


Рис. 3.6 Концентрація цинку спермальної плазми у групах порівняння, (Me, n=120). Примітка: * – $p < 0.05$ порівняно з КГ; # – $p < 0.05$ між ГНМТ та ГО.

У групі з надмірною масою тіла значення медіани концентрації Zn становило 1843.5 мкМ/л, що було у 1.6 разів вище показників КГ ($p = 0.02$). Тоді як у пацієнтів з ожирінням серединний показник дорівнював 2751.5 мкМ/л та перевищував дані КГ у 2.4 раза ($p = 0.04$). Ймовірно, такі результати пов'язані із здатністю цинку забезпечувати захисний вплив на клітини, завдяки його антиоксидантній активності.

За результатами кореляційного аналізу встановлено слабкий негативний зв'язок ІМТ із загальним вмістом фруктози в еякуляті ($r = -0.18$, $p = 0.04$) та слабкий позитивний зв'язок із концентрацією цинку ($r = 0.18$, $p = 0.04$). Результати подані у табл. 3.6.

Таблиця 3.6

**Кореляція біохімічних показників спермальної плазми з ІМТ,
(r ; p), $n=120$**

Параметри	Коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r)	
	ІМТ	p-value
Фруктоза, мМ/л	-0.14	0.13
Фруктоза, μМ/еякулят	-0.18	0.04*
Лимонна кислота, мМ/л	0.12	0.19
Лимонна кислота, μМ/еякулят	0.07	0.45
Цинк, μМ/л	0.18	0.04*

Примітка: * – $p < 0.05$.

Висновки до розділу 3:

1. Зростання ІМТ було пов'язане зі значним зниженням показників якості еякуляту в обох групах порівняння: медіана концентрації сперматозоїдів була значно нижчою – у 1.4–2.3 раза ($p = 0.04$), загальна кількість статевих клітин в еякуляті – у 2.1–2.5 раза ($p = 0.04$), кількість PR сперматозоїдів показала статистично нижчі показники лише у групі ГНМТ – у 1.3 раза ($p = 0.04$); зниження життєздатності сперматозоїдів – у 1.2 раза ($p < 0.05$) та частки нормальних морфологічних форм у 2.1–2.4 раза ($p < 0.05$). Патозооспермія була притаманною для більшої частини обстежених пацієнтів – у групі з ожирінням реєструвалася у 69% пацієнтів. Додатково розраховані дані щодо концентрації та загальної кількості рухливих сперматозоїдів підтвердили погіршення параметрів рухливості при зростанні маси тіла.

2. У чоловіків з надмірною масою тіла та ожирінням відзначалося значне підвищення індексу тератозооспермії ($p < 0.05$) та індексу дефектності сперматозоїдів ($p < 0.05$), що підтверджує несприятливий вплив зростання ІМТ на морфологію сперматозоїдів.

3. Значне зниження рівнів фруктози у спермальній плазмі спостерігалися лише у пацієнтів з ожирінням – в 1.2 раза ($p < 0.05$). Водночас у чоловіків і з надмірною масою та з ожирінням відзначалося суттєве зростання медіани вмісту лимонної кислоти у 1.8–2.0 раза ($p < 0.05$), та цинку спермальної плазми у 1.6–2.4 раза ($p < 0.05$).

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора:
[156–163].

РОЗДІЛ 4

ЗМІНИ БІОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ СПЕРМАЛЬНОЇ ПЛАЗМИ У ЧОЛОВІКІВ З НАДМІРНОЮ МАСОЮ ТІЛА ТА ОЖИРІННЯМ

4.1. Особливості цитокинового профілю еякуляту в чоловіків із надмірною масою тіла та ожирінням

Результати нашого дослідження показали, що медіана концентрації ІЛ-1 β у групі з надмірною масою тіла становила 1.85 [1.2–5.7] пг/мл та 2.2 [1.38–5.33] пг/мл – у групі з ожирінням, що було нижчим у 2.0–2.4 раза, порівняно з КГ ($p = 0.047$ та $p = 0.04$, відповідно). Натомість рівні ІЛ-18 відрізнялися від КГ незначним чином – показники були нижчими на 31–33% і становили 10.2 [6.3–17.1] пг/мл у групі з надмірною масою тіла та 9.8 [1.38–5.33] пг/мл – у групі з ожирінням (рис. 4.1).

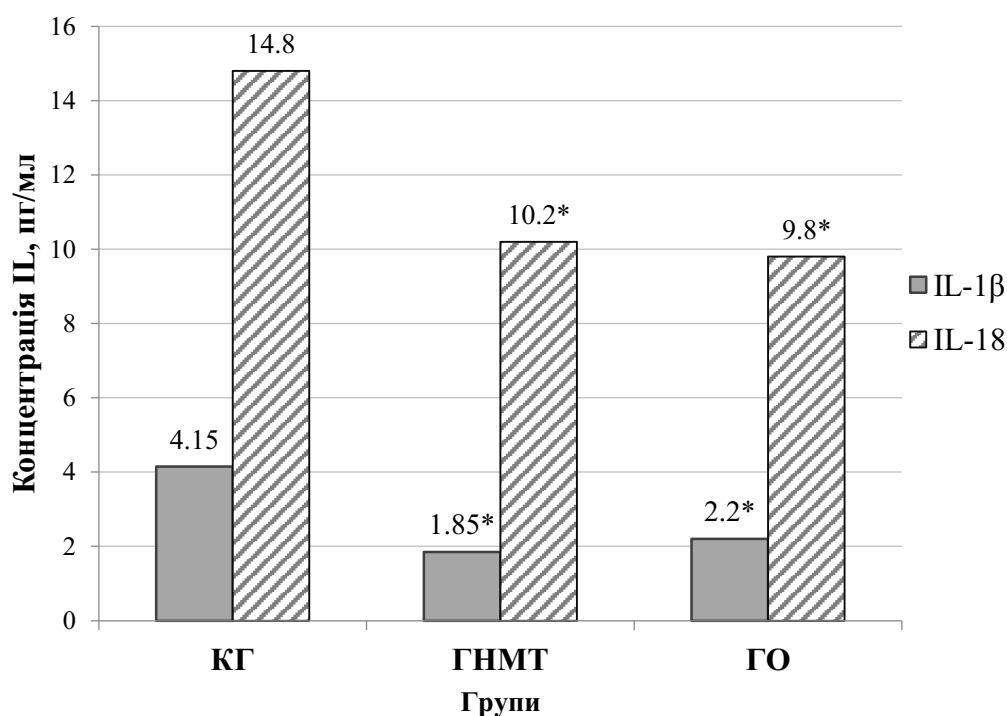


Рис. 4.1 Концентрація ІЛ-1 β та ІЛ-18 у спермальній плазмі у групах порівняння, (Ме, n=120).

Примітка: * $p < 0.05$.

При розрахунку коефіцієнта рангової кореляції Спірмена (табл. 4.1) для IL-1 β виявлено статистично значущий негативний зв'язок середньої сили лише з часткою прогресивно-рухливих сперматозоїдів ($r = -0.32$, $p = 0.045$).

Таблиця 4.1

Кореляція між рівнями IL-1 β та IL-18 у спермальній плазмі, клінічними даними та основними параметрами спермограми, (r), n=120

Параметри	Коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r)	
	IL-1 β	IL-18
Вік, роки	0.11	0.12
ІМТ, кг/м ²	-0.10	-0.24
Об'єм еякуляту, мл	-0.19	-0.39
Концентрація сперматозоїдів, 10 ⁶ /мл	-0.18	0.23
Загальна к-сть сперматозоїдів, 10 ⁶ /еякулят	-0.25	0.08
PR, %	-0.32*	-0.43*
PR+NP, %	-0.19	-0.49*
Життєздатність (живі клітини), %	-0.16	-0.26*
Нормальних морфологічних форм, %	0.18	-0.15
Фруктоза, мМ/л	0.18	-0.06
Фруктоза, мМ/еякулят	0.01	-0.33
Лимонна кислота, мМ/л	-0.02	0.04
Лимонна кислота, мМ/еякулят	-0.22	-0.33
Цинк, мМ/л	-0.14	-0.38*

Примітка: * – $p < 0.05$.

Водночас концентрація IL-18 (табл. 4.1) показала слабкий негативний зв'язок із життєздатністю статевих клітин ($r = -0.26$, $p = 0.04$) та помірний

негативний зв'язок з прогресивною та загальною рухливістю ($r = -0.43, p < 0.01$ та $r = -0.32, p < 0.01$, відповідно), а також із концентрацією цинку спермальної плазми ($r = -0.38, p = 0.041$).

Отже, отримані результати засвідчують відсутність ознак прозапального стану у репродуктивному тракті при зростанні ІМТ, оскільки не було виявлено підвищених рівнів цитокінів. Навпаки, у групі з надмірною масою тіла та ожирінням концентрації ІЛ-1 β та ІЛ-18 були значно нижчими порівняно з КГ. Ці дані відповідають дослідженню Pilatz та співавтор., в якому повідомляється, що при ожирінні ознаки системного запалення низького ступеня характерні для показників сироватки крові, але не для еякуляту.

4.2. Зміни вмісту лептину спермальної плазми чоловіків при зростанні індексу маси тіла

У рамках представленої роботи ми виявили, що концентрація лептину спермальної плазми у КГ становила 0.24 ± 0.02 нг/мл, тоді як у групі з надмірною масою та ожирінням реєструвалися вищі показники 0.31 ± 0.03 нг/мл та 0.35 ± 0.02 нг/мл, відповідно ($p < 0.05$). Дані подані на рис. 4.2.

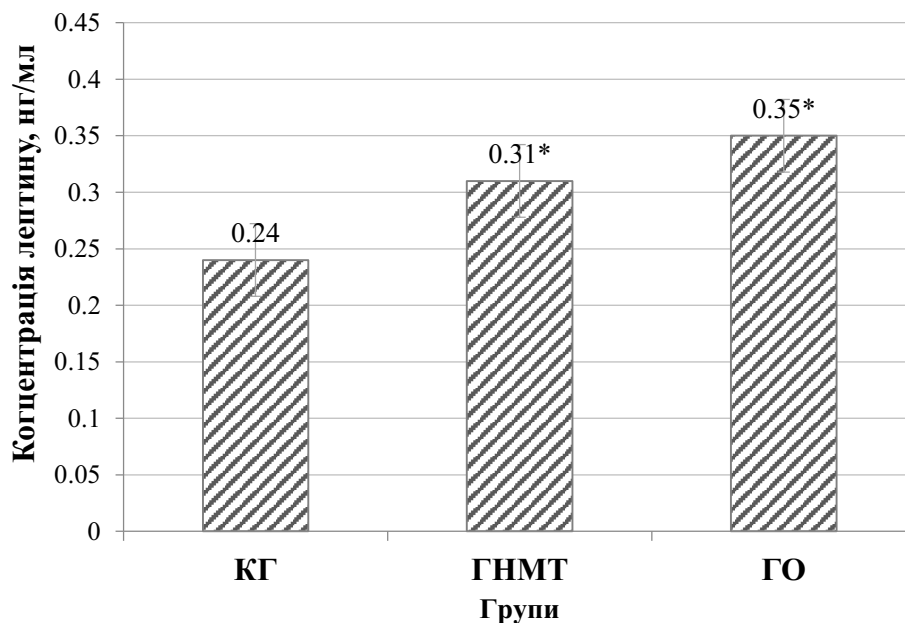


Рис. 4.2 Концентрація лептину у спермальній плазмі чоловіків з досліджуваних груп, ($M \pm \sigma, n=120$). Примітка: * $p < 0.05$.

За результатами кореляційного аналізу (табл. 4.2) виявлено сильний негативний зв'язок між рівнем лептину та такими показниками еякуляту, як концентрація сперматозоїдів ($r = -0.97$, $p < 0.05$), морфологія ($r = -0.96$, $p < 0.05$), прогресивна рухливість ($r = -0.98$, $p < 0.05$), помірний позитивний зв'язок з ІМТ ($r = 0.43$, $p < 0.05$), а також слабкий негативний зв'язок з загальною кількістю сперматозоїдів та загальною рухливістю ($r = -0.18$ та $r = -0.21$, відповідно, $p < 0.05$).

Таблиця 4.2

Кореляція між концентрацією лептину спермальної плазми, деякими клінічними даними та основними параметрами спермограми, (r), n=120

Параметри	Коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r)
	Лептин
Вік, роки	0.33*
ІМТ, кг/м ²	0.43*
Об'єм еякуляту, мл	-0.13
Концентрація сперматозоїдів, 10 ⁶ /мл	-0.97*
Загальна к-сть сперматозоїдів, 10 ⁶ /еякулят	-0.18*
PR, %	-0.98*
PR+NP, %	-0.21*
Життєздатність (живі клітини), %	-0.12
Частка нормальних морфологічних форм, %	-0.96*

Примітки: * – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками КГ (* $p < 0.05$).

Отже, отримані нами результати засвідчують, що для пацієнтів із надмірною масою тіла та ожирінням були характерні вищі показники лептину спермальної плазми; рівні лептину спермоплазми підвищувалися зі

зростанням ІМТ / віку та негативно корелювали з більшістю основних показників спермограми.

4.3. Зміни концентрацій неорганічних іонів Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у сперматозоїдах та спермальній плазмі чоловіків при надмірній масі тіла та ожирінні

Результати нашого дослідження показали, що медіана концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} зростала на +67% ($p = 0.04$) у чоловіків з ожирінням, тоді як у ГНМТ цей показник становив 1.6 [1.4–2.0] мМ і не відрізнявся від даних КГ. Значення медіани концентрації іонів Ca^{2+} у спермальній плазмі чоловіків у групі з надмірною масою тіла та ожирінням становило 3.5 та 3.9 мМ, що на 30% та 22% нижче КГ ($p < 0.05$), відповідно.

Суттєві зміни внутрішньоклітинних рівнів K^+ відзначалися лише у чоловіків із ГНМТ – виявлено зниження на 25% порівняно із КГ ($p < 0.05$). Однак були виявлені значно вищі концентрації K^+ у спермальній плазмі в обох групах зі збільшенням ІМТ: у групі ГНМТ середня концентрація зростала на 18% і сягала 18.6 мМ ($p < 0.05$), а у ГО – до 19.7 мМ ($p < 0.05$). Дані подані у табл. 4.3.

Рівні внутрішньоклітинного Na^+ у групах з надмірною масою тіла та ожирінням становили 19.6 мМ у кожній та незначним чином перевищували показники КГ, однак ці зміни не були статистично значущими. Натомість вірогідне зниження позаклітинної концентрації Na^+ виявлено лише у пацієнтів з ожирінням і відповідало концентрації 92.7 [83.5–94.0] мМ ($p < 0.05$).

Отже, підсумовуючи результати аналізу зразків еякуляту на предмет концентрацій іонів, ми встановили, що зі зростанням ІМТ, відзначалися композиційні зміни у системі «середовище – клітина». А саме ми виявили: внутрішньоклітинне зростання рівнів Ca^{2+} та зниження K^+ , відповідно позаклітинно відзначали зниження рівнів Ca^{2+} , Na^+ та зростання K^+ .

**Концентрації Ca^{2+} , K^+ , Na^+ у сперматозоїдах та
спермальній плазмі серед груп порівняння, (Ме, Q1–Q3), n=120**

Групи	Ca^{2+}		K^+		Na^+	
	Кл. (мМ)	Сп.пл. (мМ)	Кл. (мМ)	Сп.пл. (мМ)	Кл. (мМ)	Сп.пл. (мМ)
КГ	1.5 [1.4– 2.0]	5.0 [4.9– 5.0]	5.6 [4.2– 6.2]	15.7 [15.4– 16.7]	19.1 [18.1– 21.8]	96.6 [91.4– 104.4]
ГНМТ	1.6 [1.4– 2.0]	3.5* [2.4– 4.3]	4.2* [3.5– 5.5]	18.6* [14.1– 19.6]	19.6 [13.2– 20.1]	96.2 [92.7– 100.5]
ГО	2.5* [1.6– 2.7]	3.9* [3.2– 4.4]	6.0 [5.4– 6.2]	19.7* [14.9– 20.0]	19.6 [13.3– 23.1]	92.7* [83.5– 94.0]

Примітка:

Кл. – вміст іонів у клітині; *Сп.пл.* – вміст іонів у спермальній плазмі, поза клітиною;

* – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками КГ (* $p < 0.05$).

Висновки до розділу 4:

1. Показано, що у чоловіків із надмірною масою тіла та ожирінням показники ІЛ-1 β були нижчими у 2.0–2.4 раза ($p = 0.047$ та $p = 0.04$, відповідно). Натомість рівні ІЛ-18 були нижчими на 31–33% і становили 10.2 [6.3–17.1] пг/мл у групі з надмірною масою тіла та 9.8 [1.38–5.33] пг/мл – у групі з ожирінням ($p < 0.05$). Ці дані засвідчують відсутність ознак запалення низького ступеня у репродуктивному тракті чоловіків з ожирінням. Цікаво, що ІЛ-18 при кореляційному аналізі показав помірний негативний зв'язок із концентрацією цинку в еякуляті. Припускаємо, що нижчі показники ІЛ-18 та значне зростання концентрацій Zn у спермальній плазмі пацієнтів з ожирінням

(обернений взаємозв'язок) зумовлені залученням цинку у захисні та імунорегуляторні процеси в еякуляті.

2. Встановлено, що для пацієнтів із надмірною масою тіла та ожирінням були характерні вищі показниками лептину спермальної плазми ($p < 0.05$); рівні лептину спермоплазми зростали зі зростанням ІМТ / віку та негативно корелювали з більшістю основних показників спермограми – концентрацією та загальною кількістю сперматозоїдів, прогресивною рухливістю, морфологією.

3. Виявлено, що зі зростанням ІМТ відзначалися композиційні зміни еякуляту у системі «середовище – клітина»: внутрішньоклітинне зростання рівнів Ca^{2+} на 67% ($p = 0.04$) у пацієнтів з ожирінням та зниження K^+ на 25% ($p < 0.05$) у ГНМТ; натомість позаклітинно відзначалося суттєве зниження Ca^{2+} в обох групах на 22 – 30% ($p < 0.05$), та зростання K^+ на +18% ($p < 0.05$).

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора:
[164–167].

РОЗДІЛ 5

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ МЕТАБОЛІЧНИХ ПРОЦЕСІВ ПРИ КОРОТКОТРИВАЛОМУ ХАРЧУВАННІ ЩУРІВ ВИСОКОКАЛОРИЙНИМИ ДІСТАМИ

5.1. Зміни морфометричних показників та спермограми щурів за умов утримання на висококалорійних дістах

За результатами нашого експерименту встановлено, що після семитижневого утримання щурів на ВЖД та ВЖЦД їхня кінцева маса тіла, суттєво не відрізнялася від КГ, яка перебувала на стандартному раціоні (рис. 5.1). Зазначимо, що у ВЖЦД групі приріст маси тіла становив лише 19%, тоді як у контрольній та ВЖД групах відзначалося збільшення маси в середньому на 26%, порівняно з вихідними даними.

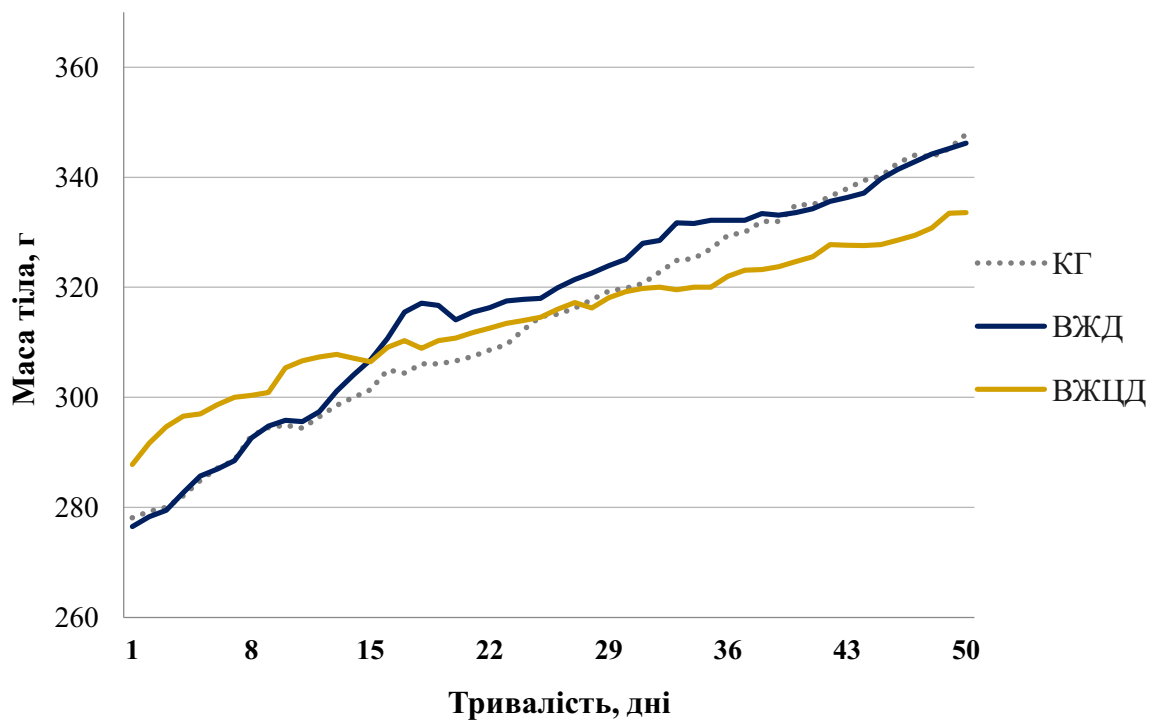


Рис. 5.1 Динаміка приросту маси тіла у досліджуваних групах щурів.

Після відповідних обчислень було встановлено, що найбільш показова

різниця між дослідними групами тварин після дієтичного харчування стосувалася коефіцієнта вісцерального жиру: не дивлячись на найменший приріст маси тіла у групі ВЖЦД, він був на 40% вищим у порівнянні з КГ ($p = 0.04$), тоді як група ВЖД не показала статистичних відмінностей між КГ, однак напрямком до зростання цього параметра спостерігався.

Різниці між значеннями індексу Лі у досліджуваних групах не було виявлено ($p = 0.59$), гонадосоматичний індекс був практично ідентичним у всіх групах тварин (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

**Морфометричні показники тіла самців за умов впливу
висококалорійних дієт, ($M \pm \sigma$), $n=30$**

Показники	КГ	ВЖД	ВЖЦД
Приріст маси тіла, %	25.5 ± 9.0	26.0 ± 10.0	19.0 ± 5.0
Індекс Лі, $г/см^3$	325.2 ± 7.9	329.6 ± 5.2	333.2 ± 7.9
Коефіцієнт вісцерального жиру, %	2.1 ± 0.3	2.4 ± 0.8	$2.9 \pm 0.5^{*#}$
Гонадосоматичний індекс, %	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.3

Примітка: * – $p < 0.05$ порівняно з КГ; # – $p < 0.05$ між ВЖД та ВЖЦД.

Отже, вище зазначені параметри вказують на те, що термін перебування тварин (7 тижнів) на висококалорійному харчуванні виявився недостатнім для значного набору маси тіла. Однак попри це було встановлено, що дієта з високим вмістом жиру та цукру навіть протягом нетривалого часового інтервалу все ж викликає метаболічні зміни, на що вказує значне зростання відносної частки жирової тканини у тілі.

При аналізі основних показників спермограми щурів показано, що

медіана загальної кількості виділених сперматозоїдів у КГ становила 200 млн. клітин, у тварин на ВЖД – 243 млн., на ВЖЦД – 185.0, однак ці дані не репрезентували статистично істотної різниці між дослідними групами ($p = 0.72$). Результати подані у табл. 5.2.

Таблиця 5.2

**Основні параметри епідидимальної сперми щурів у дослідних групах,
($M \pm \sigma$), $n=30$**

Показники	КГ	ВЖД	ВЖЦД
Загальна кількість сперматозоїдів, млн.	200.0 (153.0; 296.0) ^a	243.0 (168.0; 297.0) ^a	185.0 (155.0; 249.0) ^a
Рухливість, %	78.0 ± 9.0	65.0 ± 11.0*	60.0 ± 11.0*#
Життєздатність, %	47.0 ± 17.0	44.0 ± 16.0	39.0 ± 19.0

Примітки:^a Дані подані як медіана та міжквартильний інтервал, зважаючи на несиметричність розподілу даних. * – $p < 0.05$ порівняно з КГ; # – $p < 0.05$ між ВЖД та ВЖЦД.

Аналогічна ситуація була виявлена стосовно показника життєздатності статевих клітин – відсутність статистично значущої різниці між групами ($p = 0.87$). Натомість частка рухливих сперматозоїдів у ВЖД групі була на 13%, а у ВЖЦД – на 18% нижчою порівняно з КГ ($p < 0.05$).

Відповідно до результатів кореляційного аналізу (табл. 5.3) ми не виявили статистично вірогідного зв'язку між параметрами епідидимальної сперми щурів та індексом Лі. Водночас коефіцієнт вісцерального жиру корелював лише із відсотком рухливих сперматозоїдів – виявлено зворотний зв'язок середньої сили ($r = 0.49$, $p < 0.05$).

**Кореляція показників спермограми з індексом Лі та коефіцієнтом
вісцерального жиру, (r; p), n=30**

Параметри епідимальної сперми	Коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (r)	
	Індекс Лі	Коефіцієнт вісцерального жиру
Загальна кількість сперматозоїдів, млн.	0.11	-0.26
Рухливість, %	-0.22	-0.49*
Життєздатність (живі клітини), %	-0.07	-0.18

Примітка: * p<0.05.

5.2. Біохімічні показники плазми крові щурів за умов утримання на висококалорійних дієтах

5.2.1. Показники ліпідного профілю плазми крові у дослідних групах

З метою вивчення впливу надмірної маси тіла на чоловічу репродуктивну дисфункцію, ми намагалися змодельовати ожиріння у лабораторних тварин і таким чином відтворити аналогічні патофізіологічні процеси, спричинені ожирінням у людей. Згідно з нашим експериментальним протоколом ми утримували щурів-самців на дієтах із великим вмістом сала (жиру), а, отже, високим вмістом насичених жирних кислот, що гіпотетично розцінювалося як критичний фактор, здатний викликати метаболічні зміни.

Цей фрагмент експерименту був здійснений з метою виявлення особливостей ліпідного профілю крові щурів за умов утримання на раціонах з високим вмістом жиру та жиру / цукру, відповідно.

Ми зафіксували, що у тварин з ВЖД групи рівень тригліцеридів становив 1.51 ± 0.27 мМ/л та суттєво не відрізнявся від рівня контрольної групи –

1.47 ± 0.08 мМ/л, проте, як бачимо, напрямом до зростання цього показника спостерігався (рис. 5.2). Виявлено значне зростання у плазмі крові ЗХС – його середня концентрація сягала 3.51 ± 0.47 мМ/л і на 24.5% перевищувала КГ (p = 0.035).

Фракція ХС-ЛПВЩ у тварин на ВЖД була нижчою у порівнянні із КГ – 1.56 ± 0.23 та 1.65 ± 0.21 мМ/л, відповідно, проте різниця між показниками не була статистично значущою (p = 0.13). Концентрація ХС-ЛПНЩ у плазмі крові тварин на раціоні з високим вмістом жиру становила 1.64 ± 0.25 мМ/л та у 1.9 раза перевищувала показники КГ (p = 0.025), натомість показник ЛПДНЩ був аналогічним до КГ (p = 0.07).

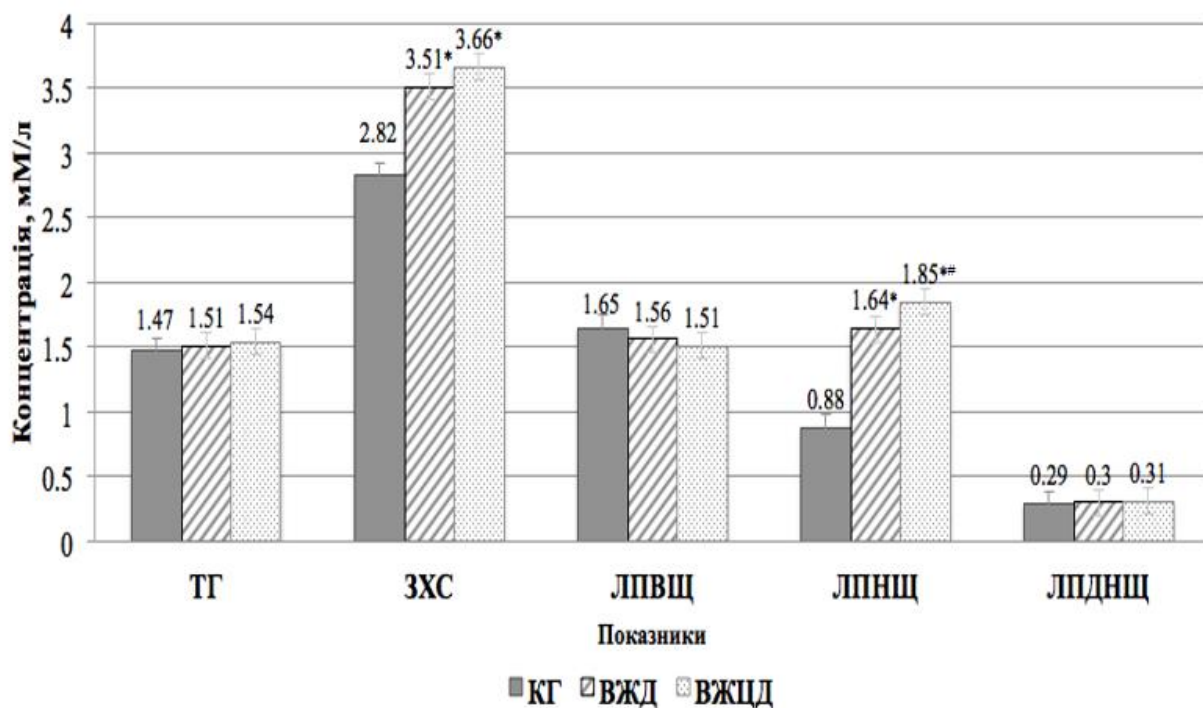


Рис. 5.2 Показники ліпідного спектру плазми крові в експериментальних групах тварин, (M±σ, n=30).

Примітка: * – p<0.05 порівняно з КГ; # – p<0.05 між ВЖД та ВЖЦД.

Більш виражені зміни спостерігалися у самців із групи ВЖЦД (рис.5.2). У плазмі крові тварин зростання середнього рівня ЗХС на 29.8% (p = 0.035), зниження фракції ХС-ЛПВЩ на 8.5% на тлі значного підвищення у 2.1 раза

фракції ХС-ЛПНЦ ($p = 0.025$) у порівнянні із показниками контрольної групи. Було зафіксовано незначне зростання концентрації тригліцеридів, однак різниця між результатами ТГ поміж групами не досягла статистичної значущості ($p > 0.05$).

Відповідно до отриманих результатів коефіцієнт атерогенності (КА) у ВЖД групі зріс у 1.8 раза, а у ВЖЦД – у 2.1 раза порівняно з КГ ($p < 0.05$), і становив 1.25 ± 0.12 , 1.47 ± 0.42 проти 0.7 ± 0.24 ум.одиниць, відповідно (табл. 5.4). Окрім того, спостерігався тренд до зростання у дослідних групах порівняно з КГ таких співвідношень, як ТГ / ХС-ЛПВЦ, ХС-ЛПВЦ / ХС-ЛПНЦ та ЗХС / ХС-ЛПВЦ. Дані представлені у табл. 5.4.

Таблиця 5.4

Зміни коефіцієнта атерогенності та інших співвідношень ліпідного обміну в дослідних групах тварин, ($M \pm \sigma$), $n=30$

Показники	КГ	ВЖД	ВЖЦД
КА	0.7 ± 0.24	$1.25 \pm 0.13^*$	$1.47 \pm 0.43^{* \#}$
ТГ / ХС	0.53 ± 0.07	0.43 ± 0.06	0.43 ± 0.05
ТГ / ХС-ЛПВЦ	0.91 ± 0.11	0.97 ± 0.14	1.04 ± 0.16
ТГ / ХС-ЛПНЦ	1.71 ± 0.24	2.25 ± 0.13	2.47 ± 0.43
ХС-ЛПВЦ / ХС-ЛПНЦ	2.17 ± 0.64	2.71 ± 0.88	2.85 ± 0.84

Примітки: КА – коефіцієнт атерогенності, ТГ – тригліцериди, ХС – холестерин, ХС-ЛПВЦ – ліпопротеїни високої щільності;

* – $p < 0.05$ порівняно з КГ; # – $p < 0.05$ між ВЖД та ВЖЦД.

Отже, у дослідних тварин, що перебували на висококалорійних раціонах протягом семи тижнів, були зафіксовані ознаки дисліпідемії, а саме

гіперхолестеринемії, яка характеризувалася підвищенням у плазмі крові рівнів ЗХС, ЛПНЩ на тлі зниження ЛПВЩ.

5.2.2. Глюкоза плазми крові у дослідних групах

Цей фрагмент дослідження був здійснений з метою вивчення впливу дієт, що використовуються для моделювання ожиріння, на маркер вуглеводного обміну – рівень глюкози крові. Ми виявили, що у тварин із контрольної групи, які споживали стандартний корм, концентрація глюкози крові становила 8.06 мМ/л, у групі на високожировій дієті – 8.56 мМ/л, а у щурів, що утримувалися на раціоні з високим вмістом жиру та цукру, рівень глюкози у середньому становив 8.62 мМ/л (рис. 5.3).

За результатами статистичного аналізу показника глюкози у плазмі крові ми не виявили значущої різниці між дослідними групами ($p = 0.79$).

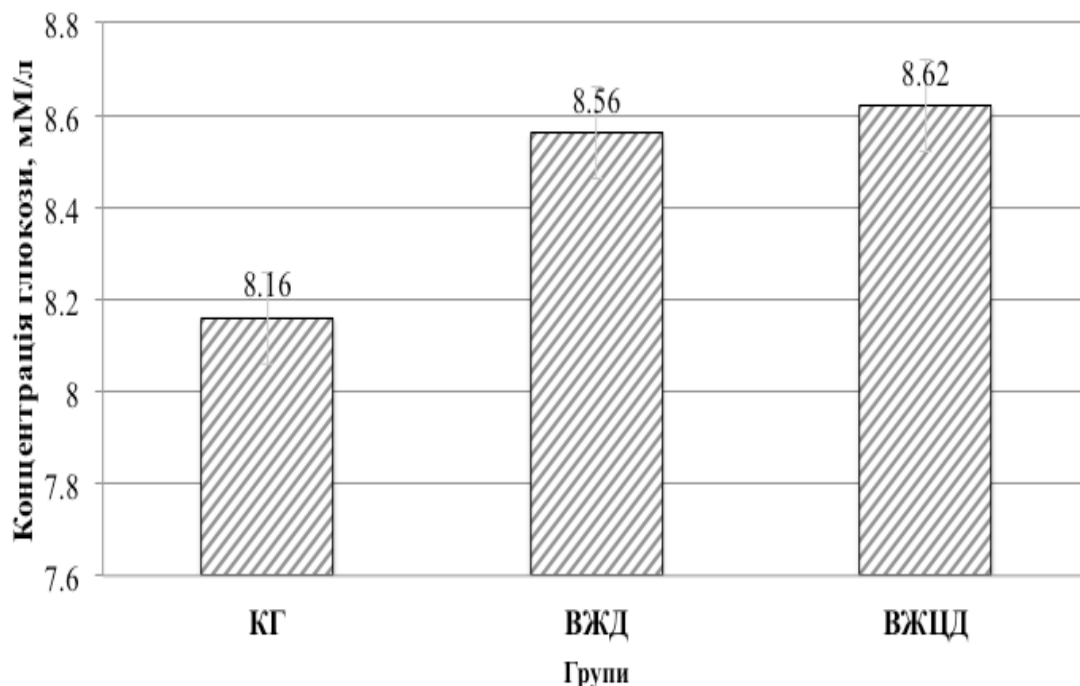


Рис. 5.3 Концентрація глюкози у плазмі крові серед експериментальних груп тварин, ($M \pm \sigma$, $n=30$).

5.2.3. Рівень лептину плазми крові щурів за умов утримання на висококалорійних дієтах

При порівнянні вмісту лептину плазми крові до та після експерименту, встановлено, що його середня концентрація на початку дослідження не відрізнялася поміж групами та становила 0.4–0.44 нг/мл ($p = 0.05$), а після семитижневого дієтичного харчування зростала у всіх досліджуваних групах. У групі тварин, які перебували на раціоні з високим вмістом жиру концентрація лептину зростала на +9.0%, а самці, що утримувалися на дієті з високим вмістом цукру та жиру показали найбільш істотне підвищення рівня лептину – на 14% від початкових даних ($p = 0.04$). Дані щодо концентрації лептину плазми крові до та після експериментальної частини подано на рис. 5.4.

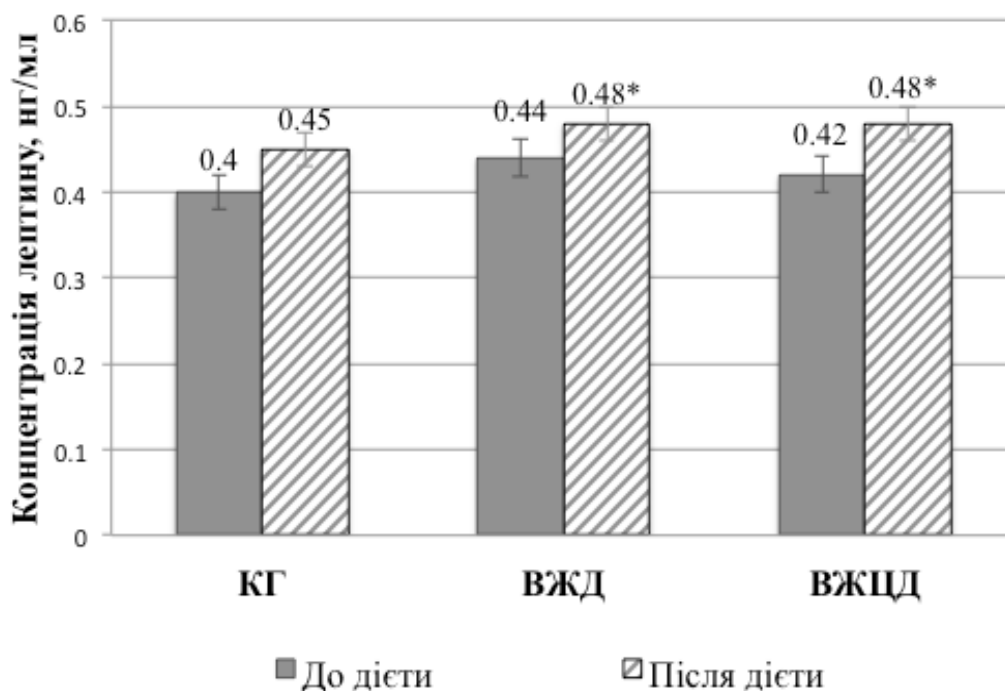


Рис. 5.4 Концентрація лептину в плазмі крові щурів до та після утримання тварин на висококалорійних дієтах, ($M \pm \sigma$, $n=30$).

Примітка: * – статистично значущі відмінності у порівнянні з показниками щурів із КГ ($p < 0.05$).

5.3. Особливості мітохондріального дихання статевих клітин шурів за умов перебування на висококалорійних дієтах

Було виявлено, що базальна швидкість дихання сперматозоїдів із mT - HEPES розчином, збагаченим глюкозою та піруватом, у ВЖЦД групі майже удвічі перевищувала показники контролю і становила 0.040 ± 0.013 та 0.023 ± 0.008 нМ/О₂/10млн.клітин/хв ($p = 0.015$), відповідно. В той самий час група, що перебувала на ВЖД, не показала відмінних від КГ результатів (рис. 5.5 А).

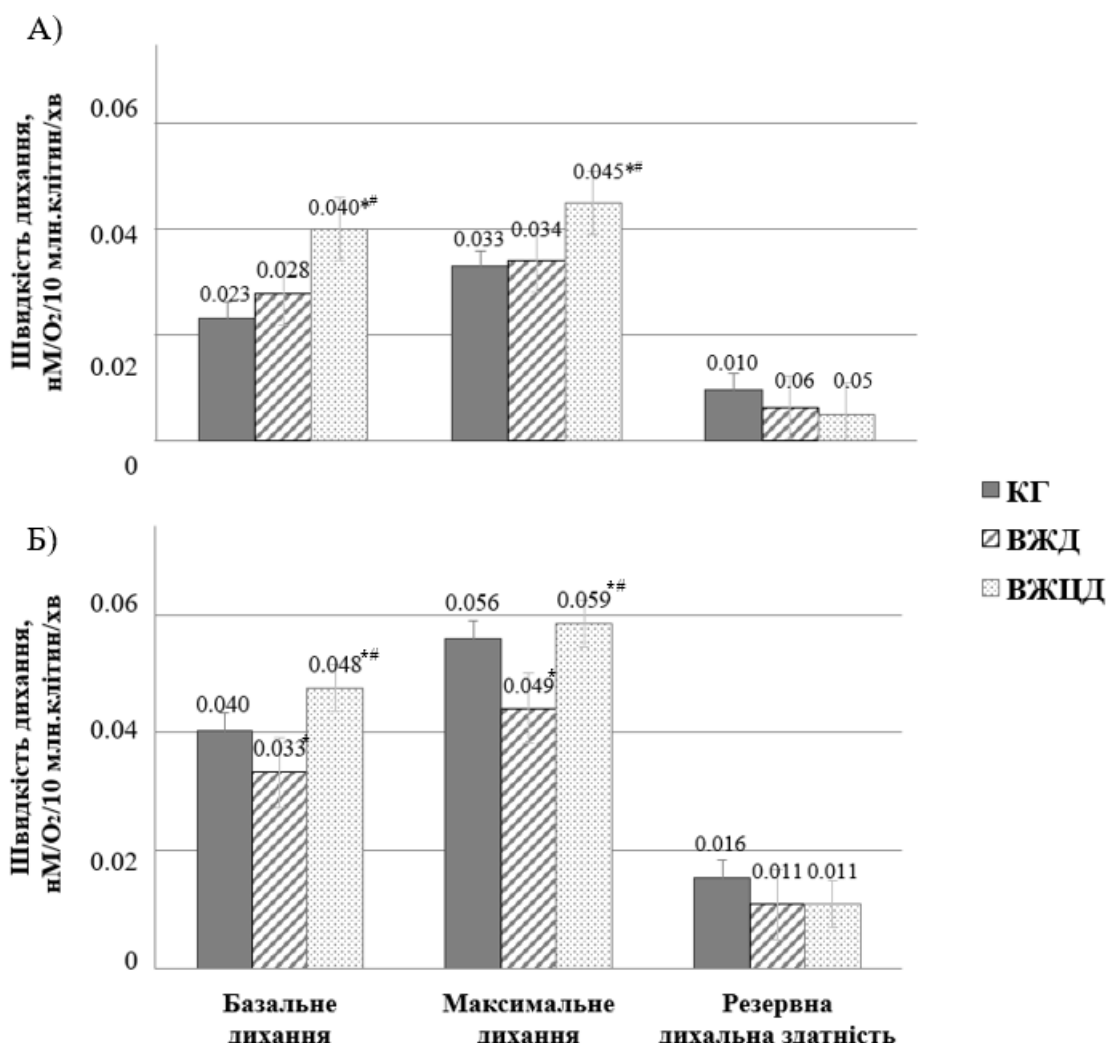


Рис. 5.5 Показники базальної, максимальної FCCP-стимульованої швидкості споживання кисню та резервної дихальної здатності мітохондрій за умов окиснення різних субстратів: А) глюкоза+піруват; Б) глюкоза+піруват+лактат, ($M \pm \sigma$, $n=30$).

Примітка: * – $p < 0.05$ порівняно з КГ; # – $p < 0.05$ між ВЖД та ВЖЦД.

Додавання до комірки лактату викликало збільшення базального споживання кисню клітинами (порівняно із серією без лактату): у КГ в середньому на 74%, у ВЖД групі лише на 18%, а у ВЖЦД – на 23% (рис.5.5 Б).

У нашому експерименті максимальна швидкість дихання за окислення субстратів глюкоза + піруват у ВЖД не відрізнялася від контролю, тоді як у ВЖЦД групі показники на 30% були вищими у порівнянні із КГ та становили 0.045 ± 0.015 та 0.033 ± 0.006 нМ/О₂/10млн.клітин/хв ($p = 0.04$), відповідно. Водночас в обох групах, які перебували на висококалорійних раціонах, відзначалося зниження резервної дихальної здатності порівняно з контролем, але ця різниця не була статистично значущою (рис. 5.5 А).

Доповнення суспензії клітин лактатом покращувало максимальну швидкість FCCP-дихання сперматозоїдів у групах (порівняно із серією без лактату), зокрема на +70% у КГ, +29.4% у ВЖД та +31% у ВЖЦД. За таких умов хоч і відзначалося деяке покращення показників резервної дихальної здатності, проте аналогічно до серії без лактату відзначено рух до зниження цього показника у ВЖД та ВЖЦД групах (рис. 5.5 Б).

Більш детальний аналіз показав, що при додаванні до полярографічної комірки 0.5 мкМ/л FCCP середня швидкість дихання сперматозоїдів незалежно від субстратів окислення досягала максимальних показників у всіх групах, за винятком контрольної групи при використанні лактату. У контрольній групі при окисленні комбінації субстратів глюкоза+піруват+лактат максимальна швидкість дихання була отримана при внесенні 1.0 мкМ/л протонофора. Подальше внесення вищих концентрацій FCCP спричиняло інгібування швидкості дихання сперматозоїдів за окислення всіх субстратів (рис. 5.6). Відзначимо, що у разі використання mT - NERES із глутаматом та піруватом швидкість дихання сперматозоїдів у ВЖД групі суттєво не відрізнялася від КГ на всіх етапах внесення протонофора. Разом з тим, як зазначалося вище, показники дихання ВЖЦД групи були вищими у порівнянні з КГ, хоча зміни споживання кисню клітинами при внесенні різних концентрацій FCCP не були динамічним (рис. 5.6 А). У разі використання

лактату швидкість FCCP-стимульованого дихання зростала у всіх дослідних групах (порівняно із середовищем без лактату), проте найкращі показники відзначалися у ВЖЦД групі: а найвища швидкість дихання за цих умов була зареєстрована при додаванні 0.5 мкМ/мл протонофора і на 10% перевищувала показники дихання за окиснення лише глюкози та пірувату (рис. 5.6 Б).

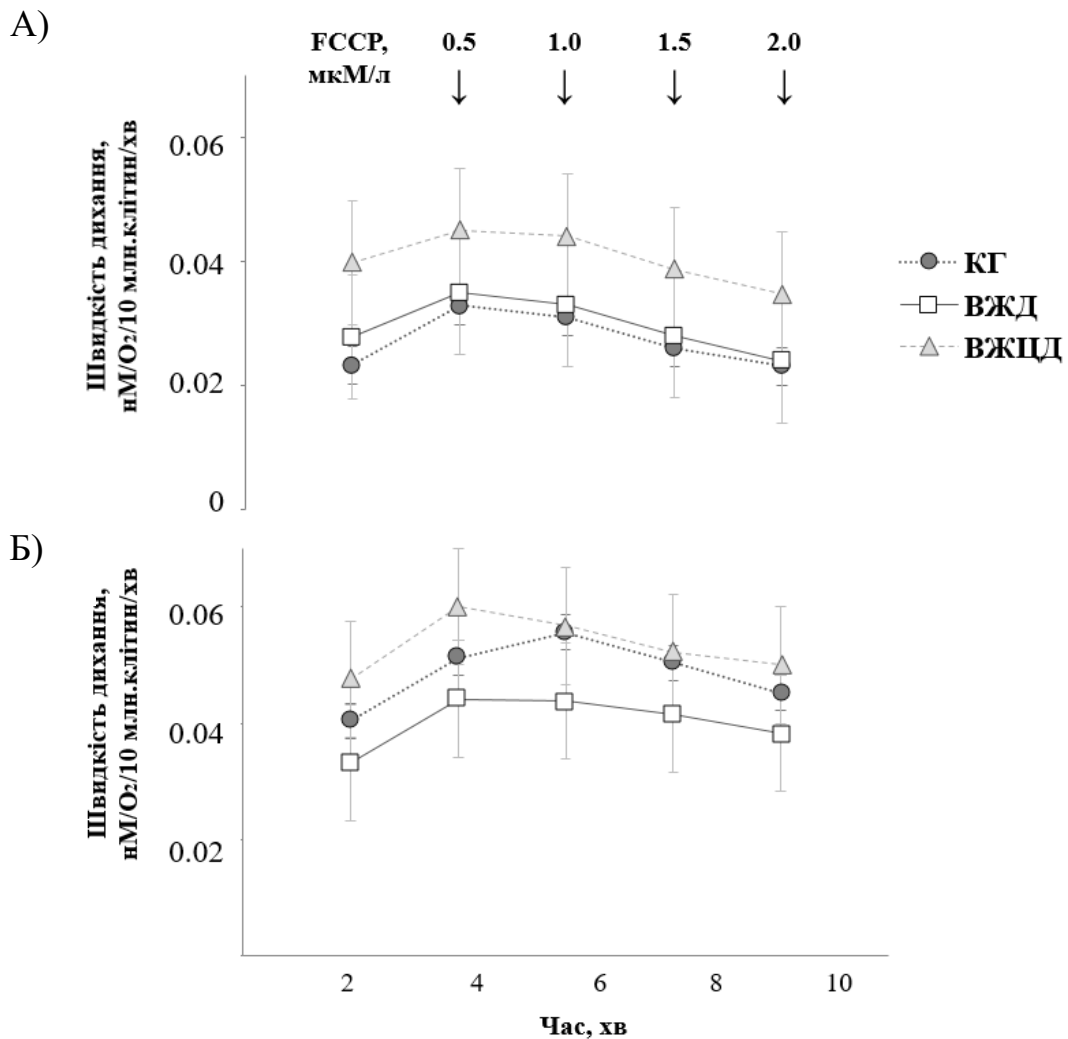


Рис. 5.6 FCCP - стимульована швидкість споживання кисню у дослідних групах, за умов окиснення різних субстратів: А) глюкоза+піруват, якими доповнювали розчин інкубації, Б) глюкоза+піруват+лактат, ($M \pm \sigma$, $n=30$).

Отже, отримані результати свідчать, що FCCP-стимульоване дихання інтактних сперматозоїдів щурів залежить від субстрату окиснення, а комбінація субстратів глюкоза+піруват+лактат здатна підтримувати високі значення швидкості дихання при навантаженні протонофором.

Ймовірно такий ефект можна пояснити тим, що метаболізм пірувату та лактату є взаємопов'язаний, головним чином за рахунок ферментативної активності лактатдегідрогенази (ЛДГ). Окрім того, лактат може безпосередньо надходити всередину мітохондрій за допомогою транспортеру лактату, та надалі завдяки наявності специфічної ізоферментної форми ЛДГ зворотно перетворюватися до пірувату та забезпечувати прогресування окисного фосфорилування [92, 168].

Висновки до розділу 5:

1. Показано, що після семи тижневого перебування на дієті з високим вмістом жиру та цукру, коефіцієнт вісцерального жиру у тварин був на 40% вищим у порівнянні з КГ ($p = 0.04$), що може свідчити про більшу ефективність цього раціону для моделювання ожиріння у щурів. Натомість на висококалорійних дієтах приріст маси тіла, індекс Лі, гонадосоматичний індекс не суттєво відрізнялися від КГ ($p > 0.05$).

У щурів на тлі харчування висококалорійними раціонами, виявлено ознаки дисліпідемії, а саме: зростання у плазмі крові концентрацій загального холестерину у групі ВЖД на 24.5% ($p = 0.035$), у ВЖЦД – на 29.8% ($p = 0.035$); зростання рівнів ліпопротеїнів низької щільності було більш виражене у самців із групи ВЖЦД - у 2.1 раза ($p = 0.025$). Показники глюкози у плазмі крові не відрізнялися між дослідними групами. Середня концентрація лептину плазми крові щурів до початку експерименту не відрізнялася поміж групами і становила 0.4–0.44 нг/мл ($p = 0.05$), а після 7 тижнів застосування дієт спостерігалось незначне зростання рівнів лептину в усіх групах тварин ($p = 0.04$).

2. Встановлено, що рухливість сперматозоїдів значно погіршувалася у дослідних групах: у ВЖД групі була нижчою на 13%, а у ВЖЦД – на 18% порівняно з КГ ($p < 0.05$). Продемонстровано, що базальна швидкість дихання сперматозоїдів у ВЖЦД групі майже удвічі перевищувала показники контролю ($p = 0.015$), а максимальна швидкість споживання кисню з

використанням протонатора FCCP була вищою на 30% ($p = 0.04$). Виявлено, що оптимальною концентрацією протонатора для досягнення максимальних показників є 0.5 мкМ/л FCCP, а після внесення вищих концентрацій спостерігається інгібування швидкості дихання сперматозоїдів. Відзначалася тенденція до зниження резервної дихальної здатності мітохондрій у групах, що перебували на дієтах.

Основні положення цього розділу викладені у публікаціях автора: [169–171].

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

За останні десятиліття спостерігається значне погіршення якості чоловічого еякуляту, що підтверджує загальну тенденцію до зниження чоловічої фертильності [172]. Окрім того, спостерігаємо зростання попиту на застосування допоміжних репродуктивних технологій [36], що свідчить про актуальність безпліддя як медичної та соціальної проблеми, і спонукає наукову спільноту шукати шляхи її подолання. Безумовно, сучасний спосіб життя, виникнення нових пандемій, високий рівень стресу, які супроводжуються гіподинамією та позначаються на харчових звичках людства та призводять до глобальних масштабів іншої проблеми – ожиріння. Відомо, що надмірне відкладення жирової тканини може чинити негативний вплив на функціонування всіх систем організму, зокрема і на репродуктивну. Саме тому, науковці різних країн намагаються глибше вивчити зв'язки між ожирінням та безпліддям. Проаналізувавши літературні наукові джерела, ми встановили, що дані досліджень щодо впливу надмірної маси тіла та ожиріння на фертильність чоловіків часто є доволі суперечливими та фрагментарними, а вивчення цієї проблеми в Україні на сьогодні є, на жаль, дуже обмеженим.

Таким чином, вище зазначені факти визначили доцільність нашої роботи та проведення досліджень у цій галузі з метою з'ясування особливостей показників фертильного потенціалу чоловіків при надмірній масі тіла / ожирінні, що надалі може бути корисним для розуміння взаємозв'язків між безпліддям та ожирінням, а також для розробки нових діагностичних підходів та майбутніх методів лікування цих патологій у чоловіків.

З метою досягнення поставленої мети та відповідних завдань, дослідження було здійснено у двох напрямках. *Перший напрямок* полягав у проведенні проспективного дослідження із залученням чоловіків віком 25–38 років, які проходили обстеження в репродуктивній клініці впродовж 2018–2019 років. Всього було обстежено 120 пацієнтів і, опираючись на розрахований ІМТ, розподілено їх у три групи: чоловіки із надмірною масою

тіла (n=50), пацієнти з ожирінням (n=40) та контрольна група з нормальними показниками ІМТ (n=30). Пацієнтів, у яких був наявний хоча б один із нижче наведених критеріїв, виключали із дослідження: лейкоспермія ($>1 \times 10^6/\text{мл}$); азооспермія; спадкові та вроджені патології репродуктивної системи; наявність гострих, хронічних та нещодавно перенесених запальних захворювань сечостатевої системи; діагностовані раніше гідроцеле, варикоцеле, простатит; $\text{ІМТ} < 18.5$. На цьому етапі ми проаналізували основні параметри спермограми та біохімічні показники еякуляту (відповідно до Керівництва ВООЗ по дослідженню еякуляту людини, 2010). Зокрема, в спермальній плазмі визначили концентрації лептину та прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-18; у спермальній плазмі та сперматозоїдах вміст Ca^{2+} , K^+ , Na^+ ; а також кореляційні зв'язки між зазначеними показниками та ІМТ.

Другий напрямок роботи передбачав вивчення впливу семитижневого висококалорійного харчування лабораторних тварин на морфометричні параметри тіла та органів і показники функціонального стану сперматозоїдів, а саме: загальну кількість статевих клітин, їх життєздатність, рухливість та адаптаційну здатність мітохондрій. Оцінювали також вплив дієт-індукованого ожиріння на метаболічні параметри – вміст глюкози, лептину та показники ліпідограми у плазмі крові.

З цією метою в дослідження було включено 30 статевозрілих білих нелінійних щурів-самців масою тіла 250–300 г. Випадковим чином було сформовано три експериментальні групи, по 10 самців у кожній. Контрольну групу тварин утримували на стандартному раціоні. Перша дослідна група тварин перебувала на дієті з високим вмістом жиру. Щури даної групи споживали стандартний корм, що був доповнений смальцем таким чином, щоб 45% добового калоражу становили жири. Друга дослідна група споживала раціон з високим вмістом жиру та цукру із добовою калорійністю 40% жирів і 46% вуглеводів.

Чи впливає зростання ІМТ чоловіків на основні параметри спермограми?

Спермограма є основним рутинним діагностичним тестом для оцінки чоловічого фертильного потенціалу та надає загальну інформацію про функціональний стан сперматозоїдів (кількість, життєздатність, рухливість і морфологію). Зв'язок між ожирінням, як потенційним фактором, що може впливати на репродуктивну систему, та основними параметрами спермограми на сьогодні є висвітлений у багатьох дослідженнях [173–176]. Однак, консенсусу щодо відповіді на це питання не досягнуто, оскільки результати досліджень є доволі суперечливими. Тому одним із першочергових завдань у рамках нашої роботи було з'ясування впливу надмірної маси тіла / ожиріння на параметри якості еякуляту.

У результаті обстеження 120 чоловіків ми встановили, що у двох дослідних групах із показниками ІМТ, які характерні для надмірної маси тіла / ожиріння, спостерігалось погіршення практично всіх параметрів спермограми, а саме: концентрації та загальної кількості сперматозоїдів, прогресивної рухливості, життєздатності та морфології статевих клітин. Загалом випадки патозооспермії в групі із надмірною масою тіла були виявлені у 48% пацієнтів, тоді як у групі з ожирінням патозооспермію зафіксували частіше – у 69% чоловіків. Для групи з надмірною масою тіла було притаманним виражене зниження концентрації сперматозоїдів та їх загальної кількості – у 1.4 і 2.1 раза у порівнянні із КГ, відповідно ($p = 0.04$). Натомість у групі з ожирінням ці зміни були більш виражені (зниження концентрації сперматозоїдів та їх загальної кількості у 2.3 і 2.5 раза, відповідно), а також відзначалося суттєвіше зниження життєздатності статевих клітин та кількості патологічних форм. Зокрема, частка живих клітин була нижчою за рекомендоване ВООЗ референтне значення, а кількість нормальних морфологічних форм сперматозоїдів – у 2.4 раза нижчою, у порівнянні з КГ ($p < 0.01$).

Розрахунок індексів множинних дефектів (ІТЗ та ІДС), як додаткових показників якості еякуляту, дозволив з'ясувати наступне. Значення індексу тератозооспермії в чоловіків з надмірною масою тіла були вищими на 17%, а у групі з ожирінням – на 26% у порівнянні із КГ. Аналогічну ситуацію виявили також щодо індексу дефектності сперматозоїдів – показники були вищими на 13% та 27% у ГНМТ та ГО, відповідно. Однак відзначимо, що в пацієнтів із ожирінням середнє значення індексу дефектності сперматозоїдів сягало показника 1.6. Раніше N. Aziz та співавт. [155] виявили, що індекс дефектності сперматозоїдів є більш надійним предиктором результату запліднення *in vitro*, ніж показник частки нормальних морфологічних форм; визначили, що при рівні ІДС понад 1.6, різко знижуються шанси на запліднення та настання вагітності. Зважаючи на те, що в нашому дослідженні у групі ожиріння індекс дефектності сперматозоїдів є на пограничній межі, це підтверджує несприятливий вплив ІМТ на морфологію статевих клітин. Назагал, у групах порівняння аномалії голівок сперматозоїдів зафіксували удвічі частіше, а дефекти середньої частини – у 1.7 рази частіше у порівнянні зі КГ.

Аналізуючи типи рухливості сперматозоїдів, ми встановили, що частка прогресивно-рухливих клітин була нижчою в 1.3 раза в пацієнтів із надмірною масою тіла та становила 31.7% ($p = 0.04$), тоді як група з ожирінням не показала статистично значущої різниці у порівнянні із КГ. Однак у кількох дослідженнях [153, 154] концентрація рухливої сперми (КРС) та загальна кількість рухливих сперматозоїдів розглядаються як більш інформативні показники для оцінки чоловічого фертильного статусу, ніж класифікація рухливості сперматозоїдів, що запропонована ВООЗ. Здійснивши додаткові розрахунки, ми виявили, що медіана КРС у чоловіків із надмірною масою тіла та у групі з ожирінням була нижчою порівняно із КГ, і становила 27.9 та 21.7 млн/мл, відповідно. Медіана КРС у чоловіків із надмірною масою тіла була нижчою в порівнянні з КГ майже на 11%, а в групі з ожирінням – на 30%. Зміни загальної кількості рухливої сперми були більш вираженими, а саме – прогресивне погіршення показника зі зростанням ІМТ. У ГНМТ серединний

показник становив 85.2 млн/еякулят, а у пацієнтів з ожирінням – 73.9 млн/еякулят, що у 1.4 та 1.6 раза нижче показників КГ, відповідно. При аналізі кореляційних зв'язків було виявлено слабкий негативний зв'язок ІМТ із показниками спермограми, зокрема: загальною кількістю сперматозоїдів у еякуляті ($r = -0.18$, $p = 0.04$), прогресивною ($r = -0.22$, $p = 0.02$) та загальною рухливістю ($r = -0.21$, $p = 0.02$), загальною кількістю рухливої сперми у матеріалі ($r = -0.22$, $p = 0.02$).

Підсумовуючи вище описане, ми можемо стверджувати, що згідно з результатами нашої роботи зростання ІМТ несприятливо позначається на основних параметрах спермограми. Припускаємо, що із збільшенням відкладень жирової тканини в організмі чоловіків, погіршення показників спермограми буде мати більш виражений характер, а отже, це впливатиме на фертильний статус пацієнтів.

Як змінюється композиційний склад спермальної плазми чоловіків на тлі надмірної маси тіла та ожиріння?

Під час еякуляції концентрована суспензія сперматозоїдів з епідидимісу змішується та розріджується завдяки секрету придаткових чоловічих статевих залоз [34]. Після центрифугування еякуляту отримують осад, що відповідає приблизно 5% об'єму усього матеріалу та складається зі сперматозоїдів, клітин сперматогенезу та клітинного дебрису. Сім'яна плазма – це супернатант, що залишається після центрифугування і становить майже 95%. Компоненти сім'яної плазми забезпечують відповідне середовище для живлення, транспортування та дозрівання сперматозоїдів під час транзиту через чоловічий репродуктивний тракт від моменту еякуляції до запліднення, а погіршення якості еякуляту також може бути наслідком аномальної секреторної здатності придаткових статевих залоз [177]. В межах рутинної діагностики репродуктивних порушень у лабораторіях, окрім спермограми, визначають такі компоненти спермальної плазми, як фруктозу, лимонну кислоту і цинк. Окрім визначення вище перерахованих сполук, для виконання

мети та завдань дисертаційної роботи, нами були проведені додаткові дослідження еякуляту: вивчення концентрації лептину, прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-18 у спермальній плазмі; концентрації Ca²⁺, K⁺, Na⁺ у спермальній плазмі та сперматозоїдах. Надлишкова вага може мати несприятливий системний вплив на весь організм людини, зокрема, на функцію придаткових статевих залоз – передміхурову залозу, бульбоуретральні залози, сім'яні міхурці [177]. Вивчення біохімічних маркерів сім'яної плазми є допоміжним індикатором для оцінки впливу надмірної маси тіла та ожиріння на фертильний потенціал чоловіків.

Фруктоза – є важливим біомаркером роботи сім'яних міхурців та вважається основним енергетичним джерелом для клітин, тому її концентрація пов'язана із рухливістю сперматозоїдів. Ми встановили, що в групі пацієнтів із надмірною масою тіла не зафіксовано суттєвих змін рівнів фруктози в спермоплазмі, водночас у пацієнтів з ожирінням медіана концентрації фруктози становила 12.1 мМ/л та була нижчою в 1.2 раза ($p < 0.01$) порівняно із показником у КГ. Після обчислення загального вмісту фруктози у всьому об'ємі еякуляту у групах порівняння зберігалася аналогічна різниця, при цьому рівні фруктози в жодній із груп порівняння не перетинали нижньої контрольної межі, що рекомендована ВООЗ.

Результати досліджень, які отримано при оцінці концентрації фруктози в сім'яній плазмі при ожирінні, є доволі суперечливими. Наприклад, група науковців Pilatz та ін. [86, 178] не виявили зв'язку між ІМТ та рівнем фруктози, тоді як в інших дослідженнях – навпаки, виявлена позитивна кореляція між цими показниками [89, 174]. Зважаючи на те, що процеси фруктолізу можуть бути більш вираженими при високій концентрації сперматозоїдів (оскільки фруктоза є основним джерелом енергії для забезпечення рухливості сперматозоїдів) [177], ми здійснили корекцію рівнів фруктози з урахуванням концентрації статевих клітин, а також концентрації рухливої сперми. Зокрема, дослідники вважають, що скориговані таким чином параметри фруктози є більш надійними, ніж ті, що виявлені рутинним аналітичним способом [177,

179–181]. Згідно з нашими обрахунками, у пацієнтів із ожирінням скориговані рівні фруктози спермальної плазми в 1.3–1.4 раза були нижчими в порівнянні з КГ. Низькі концентрації фруктози еякуляту є притаманними для запальних процесів або атрофії сім'яних міхурців, а повна відсутність фруктози в складі еякуляту свідчить про обструктивну азооспермію або вроджену відсутність сім'явивідної протоки. Раніше у праці Gonzales та співавт. [180] на основі аналізу еякулятів 340 чоловіків повідомляли, що скоригований рівень фруктози спермоплазми був значно нижчим у пацієнтів з астенозооспермію, а також у чоловіків із низьким рівнем тестостерону в сироватці крові (менш як 3 нг/мл) або з ознаками обструктивного процесу в репродуктивному тракті. Згодом, ця ж група дослідників отримала подібні результати від 19 чоловіків і підтвердила, що 71% пацієнтів із низьким рівнем тестостерону в сироватці крові мали низький рівень скоригованої фруктози спермоплазми, а лише 28% тих самих суб'єктів – низький рівень фруктози (нескоригована фруктоза) [182].

Схоже, зниження скоригованих рівнів фруктози спермоплазми на тлі ожиріння чоловіків може слугувати не лише маркером впливу надмірної маси тіла на секреторну здатність сім'яних міхурців, а й корелюватиме з низьким вмістом андрогенів у репродуктивному тракті.

Лимонна кислота та цинк. У рамках нашої роботи ми виявили значне зростання концентрацій лимонної кислоти та цинку у спермальній плазмі чоловіків на тлі зростання ІМТ: медіана лимонної кислоти в обох групах порівняння перевищувала показники КГ у 1.8–2.0 раза ($p < 0.05$); вміст Zn у групі з надмірною масою тіла був у 1.6 разів вище показників КГ ($p = 0.02$), а в пацієнтів з ожирінням – у 2.4 раза ($p = 0.04$). Лимонна кислота та цинк вважаються маркерами секреторної здатності передміхурової залози. Лимонна кислота є основним лігандом цинку, чинить антиоксидантну та протизапальну дію за умов пошкодження тканин за дії несприятливих факторів зовнішнього середовища. Концентрація цитрату, як у випадку з фруктозою, регулюється тестостероном. Раніше R. Lozano Hernández було виявлено, що у спермі 109

чоловіків з ожирінням II–III ст. спостерігалися значно знижені рівні лимонної кислоти, тоді як при надмірній масі тіла та ожирінні I ст. її рівні дещо зростали, проте ці показники не були статистично значущими [89]. З іншого боку, в одному з найновіших досліджень G.Shemshaki, 2021 [183] повідомляється про нижчі рівні цитрату в пацієнтів з оліго- та азооспермією у порівнянні з чоловіками, спермограма яких була в межах референтних значень, проте, цікаво, що при ідіопатичному безплідді цей показник навпаки був значно вищим, ніж у контрольній групі.

Цинк, як кофактор багатьох ферментів, є надзвичайно важливим для сперматогенезу, стабілізації мембран і хроматину сперматозоїдів, регуляції рухливості сперми. Окрім того, цинк захищає статеві клітини від процесів окислення та виконує антиоксидантні функції [177, 184]. Є дані, що демонструють позитивний ефект вживання добавок цинку не лише на об'єм еякуляту, рухливість, відсоток нормальних морфологічних форм сперматозоїдів, а й на синтез металотіонеїнів (низькомолекулярних стрес-реактивних Zn-зв'язуючих білків), які мають властивість покращувати якість сім'яної плазми та захищають сперматозоїди від пошкоджень [185]. У багатьох дослідженнях встановлено значно нижчі рівні цинку спермальної плазми у безплідних пацієнтів [186–188]. Однак, також наявні результати, у яких різниця між неплодними та здоровими чоловіками щодо спермального цинку не виявлена [189, 190]. O. Akinloye та співавт., 2011 [191] виявили тенденцію до зростання концентрації цинку спермоплазми в пацієнтів з оліго- та азооспермією. У рамках нашої роботи встановлено, що зі зростанням ІМТ, вмісту Zn у спермальній плазмі чоловіків значно підвищувався: у ГНМТ у 1.6 разів, у ГО – у 2.4 раза порівняно з даними КГ, відповідно.

Отже, результати нашої роботи показали зростання концентрацій цинку та цитрату на тлі надмірної маси тіла та ожиріння. Беручи до уваги вище зазначені факти, можна припустити, що ці зміни пов'язані із захисною дією цитрату та цинку у відповідь на ушкоджувальні патологічні процеси, пов'язані зі збільшенням ІМТ.

Слід відзначити, що необхідні додаткові дослідження з залученням більшої кількості пацієнтів із наступним розподілом за ступенями ожиріння для того, щоб прослідкувати, як прогресування патології впливає на параметри плідності.

Прозапальні цитокіни. Фізіологічний вміст цитокінів у спермальній плазмі чоловіків є необхідним для підтримки функціональної здатності статевих клітин, а порушення балансу концентрації цитокінів може мати негативний вплив на якість еякуляту [78, 80, 192, 193]. Раніше була запропонована теорія, що надлишкове відкладення жирової тканини спричиняє спершу локальні прозапальні зміни, а згодом – системне запалення низького ступеня і призводить до подальшого розвитку оксидативного стресу [85, 194], що в сумарному рахунку може забезпечити патофізіологічне пояснення прямого впливу метаболічного синдрому (МС) та ожиріння (як одного з компонентів МС) на нормальний сперматогенез та функцію сперми [29, 70]. Проте, кількість досліджень, які присвячені вивченню ознак системного запалення в репродуктивному тракті чоловіків при зростанні ІМТ, є невеликою [31, 178, 195].

У представленій роботі була здійснена спроба з'ясувати, чи будуть характерними для пацієнтів з надмірною масою тіла / ожирінням ознаки прозапального стану в спермоплазмі. Ми акцентували увагу на вивченні рівнів ІЛ-1 β та ІЛ-18, оскільки ці цитокіни є структурно подібними членами сімейства ІЛ-1. ІЛ-1 β є прозапальним цитокіном, що залучений у процеси регуляції запалення, апоптозу, диференціювання та проліферації клітин [196–198]. Що стосується ІЛ-18, то наявні дані про підвищення його рівнів у людей з ожирінням [199–203]. Підтверджують цю думку дослідження, під час яких виявлено, що втрата ваги за допомогою бариатричної хірургії супроводжувалася зниженням сироваткових концентрацій ІЛ-18 [202]. На противагу, результати Netea та співавт. [203] показали, що дефіцит ІЛ-18 у мишей викликав гіперфагію і призводив до метаболічних змін, ожиріння, резистентності до інсуліну та цукрового діабету. Є припущення, що ІЛ-18 є

більшою мірою захисним, ніж прозапальним цитокином [80]. Очевидно, такі дані засвідчують, що однією з ключових функцій IL-18 є регуляція гомеостазу.

У межах нашого дослідження ми не виявили зростання концентрацій IL-1 β та IL-18, навпаки, в групі з надмірною масою тіла та ожирінням їхні рівні були нижчими порівняно з КГ. Отже, отримані результати свідчать про відсутність ознак прозапального стану в репродуктивному тракті при зростанні ІМТ. Наші дані збігаються із результатами роботи Pilatz та співавтор. [86], які при вивченні цитокинового профілю сироватки крові та спермальної плазми у пацієнтів з ожирінням та метаболічним синдромом, повідомляли про відсутність передачі системного запалення із крові у сперму чоловіків із морбідним ожирінням. Цікаво, що здійснений нами кореляційний аналіз показав помірний негативний зв'язок між IL-18 та концентрацією цинку в еякуляті ($r = -0.38$, $p < 0.05$). Отже, можна припустити, що отримані результати свідчать про активне залучення цинку у процеси регуляції гомеостазу еякуляту головним чином завдяки його імуномодуючим властивостям.

Концентрації неорганічних іонів Ca^{2+} , K^+ , Na^+ . Іони Ca^{2+} , K^+ та Na^+ залучені до багатьох фізіологічних процесів, можуть бути показником функціонального стану сперматозоїдів та якості еякуляту. Дисбаланс цих компонентів у системі «середовище – клітина» однозначно негативно позначається на функції сперматозоїдів [204]. Відомо, що Ca^{2+} є тригером для запуску акросомної реакції у сперматозоїдах ссавців, а також критично необхідний для регуляції капацитації, гіперактивації, рухливості статевих клітин. Натомість згідно з експериментальними дослідженнями, результатом видалення іонів K^+ із сім'яної плазми шляхом застосування K^+ іонофору та інгібіторів калієвих каналів було порушення внутрішньоклітинного рН та значне пригнічення рухливості сперматозоїдів [205]. Інкубація капацитованих клітин із калію хлоридом призводила до дозозалежного збільшення іонів Ca^{2+} у сперматозоїдах [206, 207]. Отже, синергетичний баланс цих елементів

створює гомеостатично регульоване середовище для підтримки якості еякуляту.

Згідно з результатами нашого дослідження концентрація внутрішньоклітинного Ca^{2+} значно зростала лише у групі з ожирінням (+67%), а позаклітинний вміст Ca^{2+} був дещо знижений як у групі з надмірною масою тіла (-30%), так і у групі з ожирінням (-22%). Суттєві зміни внутрішньоклітинних рівнів K^+ відзначалися лише у чоловіків із надмірною масою (-25%), однак вищі позаклітинні концентрації K^+ у спермоплазмі реєструвалися в обох групах: середня концентрація калію зростала при надмірній масі тіла на 18%, при ожирінні – на 25%. Вміст внутрішньоклітинного Na^+ в групах суттєво не змінювався, а позаклітинного незначно знижувався лише у пацієнтів з ожирінням (-4%). Узагальнюючи отримані дані, можемо відзначити, що при ожирінні зміни композиційного вмісту іонів (зростання рівнів внутрішньоклітинного Ca^{2+} та позаклітинного K^+) є більш виражені. Це може свідчити про порушення гомеостазу еякуляту на тлі надмірного відкладення жирової тканини у чоловіків. Отже, детекція цих компонентів може бути допоміжною при оцінці фертильного статусу чоловіків на тлі різних патологій, у тому числі й при ожирінні.

Лептин є пептидним гормоном, який, головним чином, синтезується адипоцитами жирової тканини та регулює харчову поведінку, підтримуючи енергетичний гомеостаз організму. Відомо, що у людей з ожирінням концентрація сироваткового лептину може у кілька разів перевищувати показники осіб з нормальною масою тіла. Зростання рівнів лептину у відповідь на збільшення маси тіла, за фізіологічних умов мало б викликати більші енергетичні витрати [208, 209]. Однак при гіперлептинемії часто розвивається резистентність до лептину, пов'язана з пригніченням його сигнальних шляхів у нейронах гіпоталамуса, а також безпосередньо зі зниженням експресії рецепторів лептину [210]. Окрім того, роль лептину не обмежується лише регуляцією харчової поведінки та підтримкою енергетичного гомеостазу організму. Лептин є нейроендокринним регулятором чоловічої

репродуктивної системи через модуляцію гіпоталамо-гіпофізарної-гонадної осі [208, 211]. Також чинить неопосередковану дію на стероїдогенез в яєчках [72] і, таким чином, є важливою ланкою регуляції нормального статевого дозрівання та розмноження [67]. Відомо також, що лептин присутній у сім'яній плазмі, проте його вплив на параметри еякуляту досі залишається нез'ясованим [70, 212]. Надлишок лептину може призвести до пригнічення гіпоталамо-гіпофізарно-гонадної осі, і, як наслідок, до андрогенної недостатності [69]; а на молекулярному рівні – до порушення енергетичного обміну, збільшення вивільнення активних форм кисню (АФК) з мітохондрій і надалі – до оксидативного стресу [213, 214].

У представленому дослідженні ви виявили незначне зростання вмісту лептину в спермальній плазмі при збільшенні ІМТ, також було виявлено негативну кореляцію з концентрацією / загальною кількістю сперматозоїдів, морфологією, прогресивною та загальною рухливістю. Наші результати зіставляються із даними К. Leisegang, 2014 [70]. Ця група дослідників виявила значне підвищення сироваткових та спермальних рівнів лептину у чоловіків з ожирінням, погіршення концентрації та життєздатності сперматозоїдів, а також зростання ДНК-фрагментації та мембранного мітохондріального потенціалу клітин. Отже, все вище описане дає підстави розглядати вивчення лептину спермальної плазми, як маркер впливу ожиріння на функціональний стан сперматозоїдів.

Як харчування висококалорійними дієтами позначається на морфометричних та метаболічних показниках лабораторних щурів?

Попри те, що повністю відтворити людське ожиріння на тваринних моделях неможливо, протягом двох останніх десятиліть дослідниками активно використовується модель дієт-індукованого ожиріння для оцінки метаболічних змін при наборі маси тіла. Варто зазначити, що вимірювання антропометричних даних дозволяє легко оцінити нутритивний статус людини, а ВООЗ, опираючись на показники ІМТ, дає чітке визначення нормальної,

надмірної маси тіла та ожиріння. Однак, ідентифікувати та класифікувати ступінь ожиріння в експериментальних дослідженнях із використанням лабораторних тварин дуже важко. Крім того, слід також враховувати, що кожна порода та стать по-різному реагують на дієтичне харчування. Зазвичай ожиріння у тварин розглядається як будь-яке значне збільшення маси тіла порівняно з контролем [215, 216].

У міру розвитку ожиріння збільшуються жирові відкладення в інтра- та ретроперитонеальній областях, а на більш пізніх стадіях – акумуляція жиру відбувається також у внутрішніх органах (печінка, м'язи, підшлункова тощо) та навколо них. У експериментальних умовах на щурах дослідники використовують кілька морфометричних параметрів, таких як маса тіла та її приріст за визначений період, індекс Лі, що був запропонований у 1928 році як аналог ІМТ [130, 215]; коефіцієнт вісцерального жиру, тобто сума мас білої жирової тканини у тілі (мезентеріальна, епідидимальна, заочеревинна та навколониркова жирова тканина) [145, 217, 218]. У рамках нашої роботи ми встановили, що після 7-ми тижневого утримання безпорідних білих самців щурів на висококалорійних дієтах, більшість морфометричних показників тіла, у тому числі індекс маси Лі, суттєво не відрізнялися між групами, однак у тварин на ВЖЦД коефіцієнт вісцерального жиру зріс на 40 %. Ці дані узгоджуються з рядом досліджень [136, 137, 219]. Отже, на основі отриманих результатів можна стверджувати, що коефіцієнт вісцерального жиру є хорошим індикатором ожиріння в експериментальних умовах.

Проаналізувавши наукову літературу, ми виявили, що найкоротший термін перебування лабораторних щурів на висококалорійних дієтах з метою відтворення ожиріння становив 4–8 тижнів [95, 218, 220–222], проте у більшості робіт тривалість такого харчування складала від 10–12 тижнів та більше [126, 130, 136, 223]. На етапі розробки дизайну нашого дослідження було вирішено утримувати статевозрілих щурів на висококалорійних раціонах впродовж 7 тижнів (при цьому цей термін розглядався як короткотривалий), а на 50-ий день здійснювалася декапітація тварин на тлі ефірного наркозу.

Ми оцінили метаболічні наслідки після споживання висококалорійних раціонів серед дослідних груп: на тлі ВЖД та ВЖЦД у щурів виявили ознаки дисліпідемії (зростання концентрацій загального холестерину, ЛПНЩ та коефіцієнту атерогенності), незначне зростання вмісту лептину. Зміни рівнів глюкози крові не були суттєвими після 7 тижнів дієтичного харчування. Аналогічні детермінанти були показані в інших дослідженнях [65, 217, 224]. Слід зазначити, що більш виражені метаболічні зміни спостерігали в самців із групи ВЖЦД, що вказує на більш ефективне застосування цієї дієти для моделювання ожиріння в статевозрілих білих нелінійних самців щурів.

Зважаючи на вище описані результати та факти, можна стверджувати, що для кращої оцінки розвитку дієт-індукованого ожиріння у лабораторних тварин до експериментального протоколу дослідження варто включати аналіз як ряду морфометричних показників, так і метаболічних параметрів, зокрема, ліпідного профілю та концентрацій лептину у крові.

Чи впливає харчування раціонами, що використовуються для відтворення ожиріння у тварин, на функціональну здатність та мітохондріальне дихання сперматозоїдів?

За даними досліджень дієт-індуковане ожиріння негативно впливає на кількість та рухливість епідидимальної сперми щурів [225, 226]. У роботі Н. Neudagi та співавт., 2021 [227] автори перевірили, чи можуть фізичні вправи запобігти репродуктивним порушенням у щурів на тлі ВЖД і виявили, що фізичне навантаження не лише покращило параметри сперми, а й спричинило зниження ознак оксидативного стресу та апоптозу.

Результати нашої роботи показали, що загальна кількість виділених сперматозоїдів та їхня життєздатність суттєво не відрізнялися між групами тварин. Разом з тим, відзначалося погіршення показників рухливості сперматозоїдів: у ВЖД групі кількість рухливих статевих клітин була на 13% нижчою порівняно з КГ, а у ВЖЦД – на 18% ($p < 0.05$).

Оптимальна мітохондріальна активність є необхідною умовою для забезпечення рухливості в сперматозоїдів, оскільки на внутрішній мембрані мітохондрій генерується близько 90% енергії у вигляді АТФ і це вимагає неабиякої координації процесів на молекулярному рівні, зокрема, між дихальним ланцюгом та окисним фосфорилуванням [91]. За рахунок здатності мітохондрій ефективно адаптуватись до змін енергетичних потреб забезпечується нормальна життєдіяльність клітини. Проте, мітохондрії, окрім їхньої основної енергетичної ролі, також є джерелом АФК, які за фізіологічних умов необхідні для підтримки функціонального стану сперматозоїдів, зокрема, для їхньої гіперактивації, капацитації та акросомальної реакції. Результати досліджень продемонстрували кореляцію між порушеннями активності мітохондрій, окисативним стресом, фрагментацією ДНК сперматозоїдів та якістю еякуляту [94, 105, 110, 228, 229]. Все це підкреслює виняткову роль мітохондрій у регуляції фізіологічних аспектів репродуктивної функції, починаючи від сперматогенезу до запліднення.

Одним із центральних параметрів оцінки мітохондріальної функції є споживання кисню клітинами [101, 111]. Дослідження на експериментальних тваринах показали, що мітохондріальне дихання корелює з традиційними параметрами функції сперматозоїдів, найперше із рухливістю. Наприклад, у своїх дослідженнях А. Ferramosca та співавт. [94, 100] виявили значно нижчу ефективність дихання сперматозоїдів у пацієнтів з астенозооспермією в порівнянні зі здоровими чоловіками. У роботі А. Stendardi та співавт., 2011 [230] проводили оксиграфічне дослідження зразків сперми чоловіків із нормозооспермією до та після процедури swim-up (методика відділення найбільш рухомої фракції сперматозоїдів та додаткова інкубація в середовищі капацитації). Згідно з отриманими результатами, мітохондрії відібраних клітин показали виняткову швидкість споживання кисню, яка у 20 разів перевищувала показники базальних зразків. Як виявилось, дослідження А. Ferramosca та А. Stendardi є пов'язаними, оскільки вчені належать до однієї наукової школи університету Саленто, Італія. Напротывагу, інша група

дослідників Н. Taniguchi та співавт., 2022 [120] вивчала рухливість, життєздатність та швидкість споживання кисню сперматозоїдами за різних умов – при низькій температурі (4°C) та оптимальній для статевих клітин температурі (37°C). Автори не виявили істотної різниці в диханні за досліджуваного діапазону температур, хоча й відзначали значне зниження рухливості клітин при 4°C, та зростання за таких умов резервної дихальної здатності мітохондрій. Отже, можна припустити, що на тлі стресових чинників більш інтенсивна мітохондріальна активність забезпечує підтримку функцій сперматозоїдів.

Важливо зауважити про відсутність достатньої кількості досліджень, які б дали відповідь на питання, як ожиріння чи надмірна маса тіла впливають на споживання кисню спермальними мітохондріями. У роботі А. Ferramosca та співавт., 2016 [95] вивчали вплив ВЖД на компоненти дихального ланцюга мітохондрій на тваринних моделях. Автори продемонстрували, що на тлі дієт-індукованого ожиріння в щурів знижувалася рухливість сперматозоїдів, погіршувалися показники мітохондріального дихання зі зменшенням вмісту АТФ, а також зростали рівні перокисного окислення ліпідів.

На початку типового оксиграфічного дослідження клітин визначають базальну швидкість дихання, що показує поточний оборот в електрон-транспортному ланцюзі. Додавання інгібіторів, дозволяє ширше дослідити метаболічні процеси у мітохондріях. Наприклад, додавання олігоміцину А (інгібітором АТФ-синтази) зупиняє протонні помпи, збільшує протонний витік, запобігаючи таким чином мітохондріальному диханню. Інший інгібітор – антиміцин – пригнічує активність комплексу III дихального ланцюга транспортування електронів і може допомогти продемонструвати, чи здатні сперматозоїди компенсувати втрату окисного фосфорилування за допомогою синтезу АТФ під час гліколізу [231]. Використання середовищ з різним вмістом гліколітичних та респіраторних субстратів, також може дати цінну інформацію про біоенергетику сперматозоїдів [111]. Наприклад, при диханні клітин у середовищі, де присутня лише глюкоза, можна зробити висновок про

дифундування продуктів гліколізу до мітохондрій для подальших метаболічних реакцій [232]. Для оцінки функціонального стану мітохондрій ми визначали максимальну швидкість дихання з використанням протоніофорів, які деполяризують внутрішню мембрану мітохондрій, активуючи максимальну реакцію дихального ланцюга. Зазвичай з цією ціллю використовуються іоннофори FCCP, карбонілціанід-4-(трифтор-метокси) фенілгідрозону або CCCP, карбонілціанід м-хлорфенілгідрозону, які роз'єднують дихання на внутрішній мембрані мітохондрій і також дозволяють визначити резервну дихальну здатність (РДЗ). Останній показник є мірою здатності клітини реагувати на підвищену потребу в енергії шляхом синтезу додаткових молекул АТФ [233].

У межах представленої дисертаційної роботи ми визначали базальне та максимальне дихання й обчислювали резервну дихальну здатність (РДЗ) мітохондрій. За фізіологічних умов клітини працюють на базальному рівні, тобто на частині своїх загальних біоенергетичних можливостей [234]; при додаванні протоніофору ми створюємо модель дисфункції мітохондрій і можемо оцінити максимальні показники дихальної активності. Резервну дихальну здатність (РДЗ) мітохондрій визначається як різниця між максимальним та базальним рівнями і є мірою здатності клітини реагувати на підвищену потребу в енергії шляхом синтезу додаткових молекул АТФ [233]. Необхідність додаткової енергії виникає у відповідь на збільшення робочого навантаження або дію стресових чинників. Неспроможність мітохондрій забезпечити відповідну кількість АТФ може спричинити порушення функції, старіння та загибель клітини. Наші результати засвідчують, що ВЖД не показала статистичної відмінності між КГ по параметрах мітохондріального дихання, тоді як базальна швидкість дихання сперматозоїдів у ВЖЦД групі майже удвічі перевищувала показники контролю, а максимальна швидкість дихання – на 30% ($p < 0.05$). При цьому спостерігалось зниження РДЗ у даній групі, проте ця різниця не показала статистичної значущості. Все вище описане дозволяє зробити висновок, що при дієт-індукованому ожирінні, за

рахунок підвищеної потреби в енергії для забезпечення клітинних функцій, зростає мітохондріальна активність та споживання кисню сперматозоїдами, проте резервна дихальна здатність за таких умов може знижуватися, що впливатиме на показники якості сперми. Отже, вимірювання споживання кисню є досить чутливим маркером функціонального стану мітохондрій сперматозоїдів, проте, зважаючи на лімітованість результатів у цій галузі, необхідна більша кількість досліджень для формулювання подальших висновків.

На основі отриманих результатів та даних наукової літератури запропонована загальна схема взаємозв'язку між ожирінням та безпліддям у чоловіків (рис. 6.1):

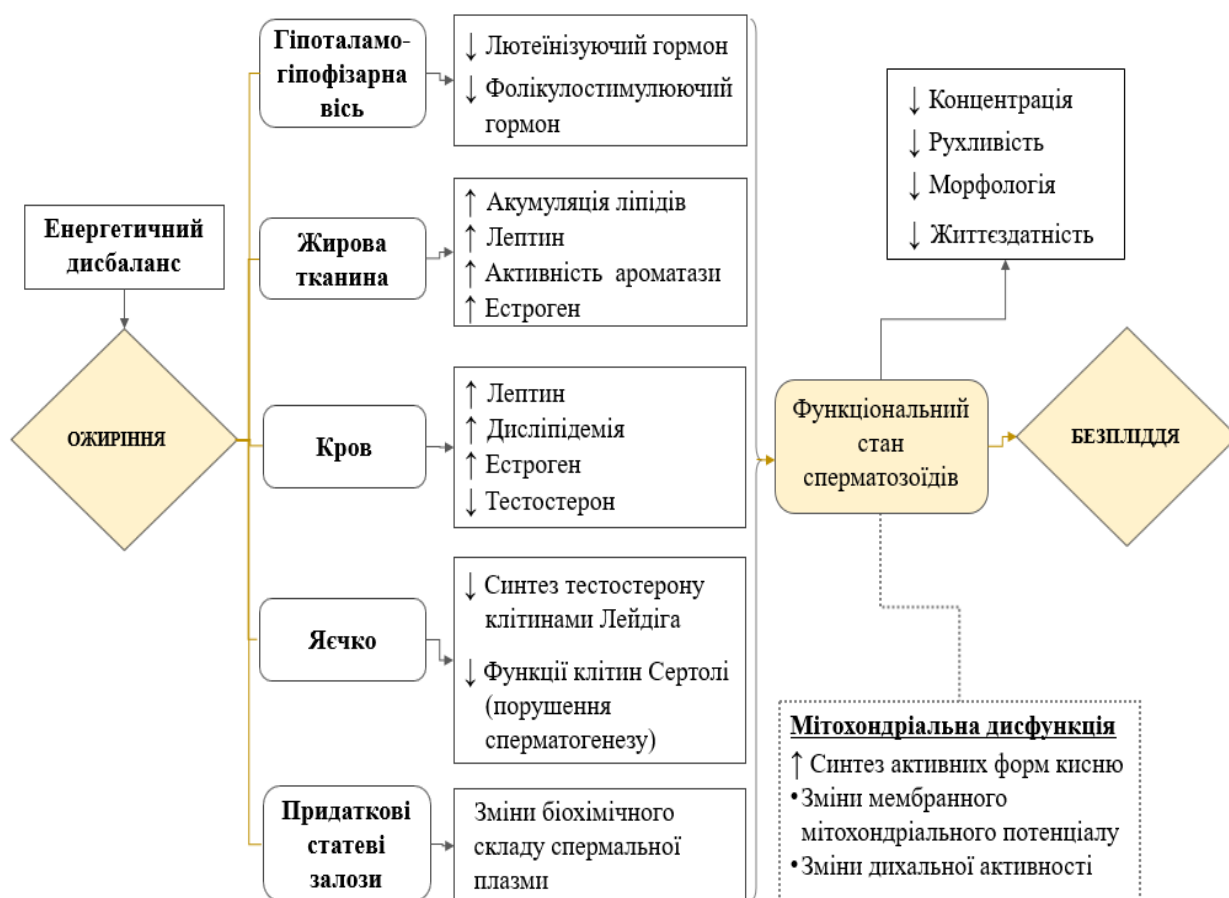


Рис. 6.1 Схема взаємозв'язку між ожирінням та безпліддям у чоловіків.

ВИСНОВКИ

У представленій дисертаційній роботі проведено оцінку особливостей фертильного статусу чоловіків та функціональних метаболічних змін на тлі надмірної маси тіла та ожиріння.

На основі аналізу отриманих результатів можна виділити наступні висновки:

1. У чоловіків із надмірною масою тіла та з ожирінням виявлено значне погіршення основних параметрів спермограми: концентрація сперматозоїдів зменшилась у 1.4–2.3 рази ($p = 0.04$), загальна кількість статевих клітин в еякуляті у 2.1–2.5 рази ($p = 0.04$); частка прогресивно-рухливих клітин була нижчою у 1.3 рази серед пацієнтів з надмірною масою тіла ($p = 0.04$), тоді як у групі з ожирінням параметри рухливості статистично не відрізнялися порівняно зі здоровими чоловіками ($p > 0.05$); життєздатність сперматозоїдів у групах порівняння знижувалася у 1.2 рази ($p < 0.05$), а відсоток нормальних морфологічних форм у 2.1–2.4 рази ($p < 0.05$).

У чоловіків з надмірною масою тіла та ожирінням відзначалося значне підвищення індексу тератозооспермії ($p < 0.05$) та індексу дефектності сперматозоїдів ($p < 0.05$), що підтверджує несприятливий вплив зростання ІМТ на морфологію сперматозоїдів.

2. Вміст фруктози в спермальній плазмі та її скоригований рівень у пацієнтів з ожирінням зменшились у 1.2–1.3 рази ($p < 0.05$). Запропоновано розглядати скориговані значення фруктози (з урахуванням концентрації рухливої сперми) як більш надійний маркер при оцінці фертильного статусу чоловіків. У ГНМТ та ГО значно зросла медіана концентрації лимонної кислоти у 1.8–2.0 рази ($p < 0.05$), та цинку спермальної плазми у 1.6–2.4 рази ($p < 0.05$).

У чоловіків із надмірною масою тіла та ожирінням показники ІЛ-18 знижувалися у 1.4–1.5 ($p < 0.05$), натомість вміст ІЛ-1 β був нижчим у 2.0–

2.4 раза ($p < 0.05$) і становив 10.2 [6.3–17.1] пг/мл у групі з надмірною масою тіла та 9.8 [1.38–5.33] пг/мл – у групі з ожирінням ($p < 0.05$). Вміст ІЛ-18 показав помірний негативний кореляційний зв'язок із концентрацією цинку в еякуляті ($r = -0.38$, $p < 0.05$).

При збільшенні ІМТ були притаманними композиційні зміни еякуляту в системі «середовище – клітина»: внутрішньоклітинне зростання рівнів Ca^{2+} на 67% ($p = 0.04$) у пацієнтів з ожирінням та зниження K^+ на 25% ($p < 0.05$) у ГНМТ; натомість позаклітинно відзначалося суттєве зниження Ca^{2+} у обох групах на 22–30% ($p < 0.05$), та зростання K^+ на +18% ($p < 0.05$).

3. Після утримання щурів на дієті з високим вмістом жиру та цукру протягом семи тижнів, коефіцієнт вісцерального жиру зріс на 40 % ($p < 0.05$), що вказує на значні метаболічні зміни у цій групі та, відповідно, більш ефективно застосування ВЖЦД для моделювання ожиріння в щурів. Висококалорійні раціони не спричинили значних змін приросту маси тіла, індексу Лі та гонадосоматичного індексу ($p > 0.05$).

На тлі запропонованого харчування в щурів виявили ознаки дисліпідемії – концентрації загального холестерину плазми крові зросли у ВЖД групі на 24.5% ($p = 0.035$), у ВЖЦД – на 29.8% ($p = 0.035$); коефіцієнт атерогенності – зріс у 1.8–2.1 раза ($p < 0.05$); підвищувався вміст фракції ліпопротеїнів низької щільності – у 1.9–2.1 раза ($p = 0.025$).

Концентрація лептину плазми крові щурів до початку експерименту не відрізнялася поміж групами та становила 0.4–0.44 нг/мл ($p = 0.05$), а після 7 тижнів застосування дієт спостерігалось незначне зростання рівнів лептину в усіх групах тварин: у ВЖД на 9.0%, у ВЖЦД – на 14% від початкових даних. ($p < 0.05$). Суттєвої різниці щодо рівня глюкози плазми крові між групами не виявлено ($p > 0.05$).

4. Рухливість сперматозоїдів погіршувалася у дослідних групах щурів: у ВЖД групі була на 13%, а у ВЖЦД – на 18% нижчою порівняно з КГ ($p < 0.05$). Загальна кількість виділених сперматозоїдів та їхня життєздатність не показали істотної різниці між групами ($p > 0.05$).

5. Базальна швидкість дихання сперматозоїдів у ВЖЦД групі становила 0.040 ± 0.013 нМ/О₂/10млн.клітин/хв та майже удвічі перевищувала показники контролю ($p = 0.015$). Максимальна швидкість дихання з використанням протонофора FCCP у цій групі тварин була вищою на 30% у порівнянні із КГ ($p = 0.04$); реєструвалося зниження резервної дихальної здатності мітохондрій, однак статистично значущої різниці між групами не досягнуто ($p > 0.05$). Оптимальна концентрація протонофора, при якій реєстрували максимальні показники дихання сперматозоїдів, становила 0.5 мкМ/л протонофора FCCP.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. При обстеженні пацієнтів зі скаргами на неможливість зачаття дитини протягом одного року при регулярному незахищеному статевому житті пари, а також при підозрі ідіопатичного непліддя слід доповнити дані анамнезу та клінічного огляду результатами антропометричних вимірювань, оскільки ожиріння негативно впливає на показники спермограми.
2. Для оцінки фертильного статусу чоловіків з надмірною масою тіла / ожирінням рекомендується здійснювати комплексний аналіз якості еякуляту, який включає не лише рутинні показники спермограми та маркери спермальної плазми, але також додатково розраховані дані щодо індексів множинних дефектів, концентрації та загальної кількості рухливих сперматозоїдів, скоригованого вмісту фруктози в еякуляті. Вище згадані параметри можуть бути більш надійними маркерами для моніторингу ефективності терапії безпліддя у чоловіків.
3. Рекомендовано розширити діагностичний алгоритм чоловічого фактора безпліддя при зростанні показників ІМТ шляхом дослідження ліпідного профілю та вмісту лептину крові пацієнтів, оскільки ці параметри корелюють зі ступенем жирових відкладень у тілі та є індикаторами метаболічних змін при надмірній масі тіла / ожирінні.
4. З метою визначення патогенетичних зв'язків між надмірною акумуляцією жирової тканини та параметрами фертильного потенціалу чоловіків, слід розширювати дослідження у сфері біоенергетики сперматозоїдів, а саме мітохондріальної активності клітин. Оцінка споживання кисню статевими клітинами за фізіологічних умов та за впливу різних факторів є чутливим та перспективним інструментом для аналізу їхньої запліднювальної здатності.

На основі даних, що наведені у представленій роботі, можна рекомендувати наступну схему клініко-лабораторного діагностичного алгоритму фертильного потенціалу чоловіків із надмірною масою тіла / ожирінням (рис. 7.1):



Рис. 7.1 Схема клініко-лабораторного алгоритму для діагностичної оцінки фертильного потенціалу чоловіків із надмірною масою тіла / ожирінням.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Горпинченко И.И. Мужчина в XXI веке. Сексологические и андрологические аспекты. Здоровье мужчины. 2012;4:15–18.
2. Маркова М. В., Кришталь Є. В. ВПП. Клінічні прояви , механізми Формування та психокорекція порушення життєдіяльності сім'ї при безплідді у чоловіка. Урологія и андрологія. 2015;1–2(02):11–18.
3. Wen X, Zhang B, Wu B, Xiao H, Li Z, Li R, et al. Signaling pathways in obesity: mechanisms and therapeutic interventions. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):298.
4. World Health Organization. WHO | Obesity and overweight. WHO fact sheet; <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. 2017; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
5. Boutari C, Mantzoros CS. A 2022 update on the epidemiology of obesity and a call to action: as its twin COVID-19 pandemic appears to be receding, the obesity and dysmetabolism pandemic continues to rage on. *Metabolism.* 2022;133:155217.
6. Piché ME, Tchernof A, Després JP. Obesity Phenotypes, Diabetes, and Cardiovascular Diseases. *Circ Res.* 2020;126(11):1477–1500.
7. Armstrong A, Berger M, Al-Safi Z. Obesity and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2022;34(4):184–189.
8. Friedenreich CM, Ryder-Burbidge C, McNeil J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol Oncol.* 2021;15(3):790–800.
9. Kim DS, Scherer PE. Obesity, Diabetes, and Increased Cancer Progression. *Diabetes Metab J.* 2021;45(6):799–812.
10. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2010;16(3):293–311.

11. Sermondade N, Faure C, Fezeu L, Shayeb AG, Bonde JP, Jensen TK, et al. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. *Hum Reprod Update*. 2013;19(3):221–31.
12. Mir J, Franken D, Andrabi SW, Ashraf M, Rao K. Impact of weight loss on sperm DNA integrity in obese men. *Andrologia*. 2018;50(4):e12957.
13. Samavat J, Cantini G, Lotti F, Di Franco A, Tamburrino L, Degl’Innocenti S, et al. Massive Weight Loss Obtained by Bariatric Surgery Affects Semen Quality in Morbid Male Obesity: a Preliminary Prospective Double-Armed Study. *Obes Surg*. 2018;28(1):69–76.
14. Barratt CLR, Björndahl L, De Jonge CJ, Lamb DJ, Osorio Martini F, McLachlan R, et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance—challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update*. 2017;23(6):1–21.
15. Kelleher S, Conway AJ, Handelsman DJ. Blood Testosterone Threshold for Androgen Deficiency Symptoms. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(8):3813–3817.
16. Lee MJ, Fried SK. Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion. *Am J Physiol Metab*. 2009;296(6):E1230–8.
17. Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis DG. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism*. 2013;62(4):457–478.
18. Thonneau P, Bujan L, Multigner L, Mieusset R. Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Hum Reprod*. 1998;13(8):2122–2125.
19. Paul C, Murray AA, Spears N, Saunders PTK. A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice. *Reproduction*. 2008;136(1):73–84.
20. Fullston T, Ohlsson-Teague EMC, Print CG, Sandeman LY, Lane M. Sperm microRNA Content Is Altered in a Mouse Model of Male Obesity, but the Same Suite of microRNAs Are Not Altered in Offspring’s Sperm. Ovilo C, editor. *PLoS One*. 2016;11(11):e0166076.

21. Craig JR, Jenkins TG, Carrell DT, Hotaling JM. Obesity, male infertility, and the sperm epigenome. *Fertil Steril*. 2017;107(4):848–59.
22. Reis LO, Dias FGF. Male fertility, obesity, and bariatric surgery. *Reprod Sci*. 2012;19(8):778–85.
23. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796–808.
24. Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, DeSouza CA. Influence of Metabolic Syndrome on Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation in Obese Adults*. *Obesity*. 2006;14(12):2127–31.
25. Bremer AA, Devaraj S, Afify A, Jialal I. Adipose tissue dysregulation in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(11):E1782-8.
26. Divoux A, Moutel S, Poitou C, Lacasa D, Veyrie N, Aissat A, et al. Mast Cells in Human Adipose Tissue: Link with Morbid Obesity, Inflammatory Status, and Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(9):E1677–85.
27. Katib A. Mechanisms linking obesity to male infertility. *Cent Eur J Urol*. 2015;68(1):79–85.
28. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2169–2180.
29. Morrison CD, Brannigan RE. Metabolic syndrome and infertility in men. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2015;29(4):507–515.
30. Lotti F, Corona G, Colpi GM, Filimberti E, Innocenti SD, Mancini M, et al. Elevated body mass index correlates with higher seminal plasma interleukin 8 levels and ultrasonographic abnormalities of the prostate in men attending an andrology clinic for infertility. *J Endocrinol Invest*. 2011;34(10):e336–42.
31. Tunc O, Bakos HW, Tremellen K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia*. 2011;43(2):121–128.
32. Leisegang K, Sengupta P, Agarwal A, Henkel R. Obesity and male infertility: Mechanisms and management. *Andrologia*. 2021;53(1):e13617.

33. Kumar N, Singh NK. “Emerging role of Novel Seminal Plasma Bio-markers in Male Infertility: A Review.” *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2020;253:170–179.
34. World Health Organization. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. World Health Organization. 2010. 286 p.
35. Центр медстатистики. Статистичні дані системи МОЗ. 2021. <http://medstat.gov.ua/ukr/statdanMMXIX.html>
36. De Geyter C, Calhaz-Jorge C, Kupka MS, Wyns C, Mocanu E, Motrenko T, et al. ART in Europe, 2015: results generated from European registries by ESHRE. *Hum Reprod Open.* 2020;2020(1):1–17.
37. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkeblek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992;305:609–613.
38. Abayomi Bolaji Ajayi, Victor Dayo Ajayi, Ifeoluwa Oyetunji, Oluwafunmilola Biobaku, Happiness Aikhuele, Atiba Adedamilola, I. Ibukun Ayelehin BMA. Are semen parameters worsening? Comparing semen parameters 10 years apart. *Niger Med J.* 2017;58(2):72.
39. Горпинченко І.І., Нуріманов К.Р., Сайдакова Н.О. Чоловіче безпліддя в Україні: статистика та тенденції. *Мужское бесплодие.* 2012;4:132–141.
40. Горпинченко І.І. РМГ. Чоловіче безпліддя: етіологія, патогенез, діагностика та сучасні методи лікування. *Здоровье мужчины.* 2016;1(56):8–17.
41. М.В. Поворознюк. Стан репродуктивного здоров'я чоловіків із безпліддям у шлюбі. *Здоров'я України «Урологія Нефрологія Андрологія».* 2020;3(20):30–31.
42. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Obesity and reproduction: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2015;104(5):1116–1126.
43. Merhi ZO, Keltz J, Zapantis A, Younger J, Berger D, Lieman HJ, et al. Male adiposity impairs clinical pregnancy rate by in vitro fertilization without affecting day 3 embryo quality. *Obesity.* 2013;21(8):1608–1612.

44. Yang Q, Zhao F, Hu L, Bai R, Zhang N, Yao G, et al. Effect of paternal overweight or obesity on IVF treatment outcomes and the possible mechanisms involved. *Sci Rep.* 2016;6:29787.
45. Håkonsen LB, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Olsen J, Bonde JP, Andersen CY, et al. Does weight loss improve semen quality and reproductive hormones? Results from a cohort of severely obese men. *Reprod Health.* 2011;8:24.
46. Антонян И.М., Березная Т.В. Зміни показника «строкої морфології за крьюгером» як результат лікування чоловіків з безпліддям на тлі метаболічного синдрому. *Nor J Dev Int Sci.* 2021;58:12–15.
47. Leisegang K. Malnutrition and Obesity. *Oxid Antioxidants Impact Oxidative, Academic Press, Status Male Reprod.* 2019;117–134.
48. Gurinović M, Zeković M, Milešević J, Nikolić M, Glibetić M. Nutritional Assessment. *Ref Modul Food Sci, Elsevier,* 2017.
49. Garolla A, Torino M, Miola P, Caretta N, Pizzol D, Menegazzo M, et al. Twenty-four-hour monitoring of scrotal temperature in obese men and men with a varicocele as a mirror of spermatogenic function. *Hum Reprod.* 2015;30(5):1006–1013.
50. Burnett AL, Strong TD, Trock BJ, Jin L, Bivalacqua TJ, Musicki B. Serum Biomarker Measurements of Endothelial Function and Oxidative Stress After Daily Dosing of Sildenafil in Type 2 Diabetic Men With Erectile Dysfunction. *J Urol.* 2009;181(1):245–251.
51. Araña Rosáinz M de J, Ojeda MO, Acosta JR, Elías-Calles LC, González NO, Herrera OT, et al. Imbalanced Low-Grade Inflammation and Endothelial Activation in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Erectile Dysfunction. *J Sex Med.* 2011;8(7):2017–2030.
52. Rando OJ. Daddy issues: paternal effects on phenotype. *Cell.* 2012;151(4):702-708
53. Козопас Н. М., Максимюк Г. В., Лаповець Л. Є., Одноріг Л. О. Метаболічний синдром та чоловіче безпліддя: сучасний погляд на

- проблему. Вісник проблем біології і медицини. 2018;1(2):26-30.
54. Han TS, Tajar A, O'Neill TW, Jiang M, Bartfai G, Boonen S, et al. Impaired quality of life and sexual function in overweight and obese men: the European Male Ageing Study. *Eur J Endocrinol*. 2011;164(6):1003–11.
 55. Ou XH, Zhu CC, Sun SC. Effects of obesity and diabetes on the epigenetic modification of mammalian gametes. *J Cell Physiol*. 2019;234(6):7847–55.
 56. Barbagallo F, Condorelli RA, Mongioì LM, Cannarella R, Cimino L, Magagnini MC, et al. Molecular Mechanisms Underlying the Relationship between Obesity and Male Infertility. *Metab*. 2021;11(12):840.
 57. Deshpande SS, Nemani H, Arumugam G, Ravichandran A, Balasinor NH. High-fat diet-induced and genetically inherited obesity differentially alters DNA methylation profile in the germline of adult male rats. *Clin Epigenetics*. 2020;12(1):179.
 58. Lima N, Cavaliere H, Knobel M, Halpern A, Medeiros-Neto G. Decreased androgen levels in massively obese men may be associated with impaired function of the gonadostat. *Int J Obes*. 2000;24(11):1433–1437.
 59. Giagulli VA, Kaufman JM, Vermeulen A. Pathogenesis of the decreased androgen levels in obese men. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(4):997–1000.
 60. Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, et al. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril*. 2004;82(4):863–870.
 61. Kahn BE, Brannigan RE. Obesity and male infertility. *Curr Opin Urol*. 2017;27(5):441–445.
 62. Martini AC, Tissera A, Estofán D, Molina RI, Mangeaud A, De Cuneo MF, et al. Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. *Fertil Steril*. 2010;94(5):1739–1743.
 63. Ehala-Aleksejev K, Punab M. The effect of metabolic syndrome on male reproductive health: A cross-sectional study in a group of fertile men and male partners of infertile couples. *PLoS One*. 2018;13(3).

64. Zhong O, Ji L, Wang J, Lei X, Huang H. Association of diabetes and obesity with sperm parameters and testosterone levels: a meta-analysis. *Diabetol Metab Syndr.* 2021;13(1):1–12.
65. Melo BF, Sacramento JF, Ribeiro MJ, Prego CS, Correia MC, Coelho JC, et al. Evaluating the Impact of Different Hypercaloric Diets on Weight Gain, Insulin Resistance, Glucose Intolerance, and its Comorbidities in Rats. *Nutrients.* 2019;11(6):1197
66. Wauters M, Considine R V., Van Gaal LF. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol.* 2000;143(3):293–311.
67. Wójcik-Gładysz A, Wańkowska M, Misztal T, Romanowicz K, Polkowska J. Effect of intracerebroventricular infusion of leptin on the secretory activity of the GnRH/LH axis in fasted prepubertal lambs. *Anim Reprod Sci.* 2009;114(4):370–383.
68. Donato J, Cravo RM, Frazão R, Gautron L, Scott MM, Lachey J, et al. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J Clin Invest.* 2011;121(1):355–368.
69. Fernandes Negrís Lima T, Nackeeran S, Rakitina E, Fernandes Negrís Lima G, Arora H, Kargi AY, et al. Association of Leptin with Total and Free Testosterone: Results from the National Health and Nutrition Examination Surveys. *Androg Clin Res Ther.* 2020;1(1):94–100.
70. Leisegang K, Bouic PJD, Menkveld R, Henkel RR. Obesity is associated with increased seminal insulin and leptin alongside reduced fertility parameters in a controlled male cohort. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12(1):34
71. Önel T, Ayla S, Keskin İ, Parluyan C, Yiğitbaşı T, Kolbaşı B, et al. Leptin in sperm analysis can be a new indicator. *Acta Histochem.* 2019;121(1):43–49.
72. Caprio M, Fabbrini E, Ricci G, Basciani S, Gnessi L, Arizzi M, et al. Ontogenesis of Leptin Receptor in Rat Leydig Cells. *Biol Reprod.* 2003;68(4):1199–1207.
73. Landry DA, Sormany F, Haché J, Roumaud P, Martin LJ. Steroidogenic genes

- expressions are repressed by high levels of leptin and the JAK/STAT signaling pathway in MA-10 Leydig cells. *Mol Cell Biochem.* 2017;433(1–2):79–95.
74. Martins AD, Moreira AC, Sá R, Monteiro MP, Sousa M, Carvalho RA, et al. Leptin modulates human Sertoli cells acetate production and glycolytic profile: a novel mechanism of obesity-induced male infertility? *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2015;1852(9):1824–1832.
 75. Almabhoh F, Abdul Aziz NAA, Durairajanayagam D, Singh HJ. Could leptin be responsible for the reproductive dysfunction in obese men? *Reprod Biol.* 2020;20(1):106–110.
 76. Henry BA, Andrews ZB, Rao A, Clarke IJ. Central Leptin Activates Mitochondrial Function and Increases Heat Production in Skeletal Muscle. *Endocrinology.* 2011;152(7):2609–2618.
 77. Chauhan D, Bartok E, Gaidt MM, Bock FJ, Herrmann J, Seeger JM, et al. BAX/BAK-Induced Apoptosis Results in Caspase-8-Dependent IL-1 β Maturation in Macrophages. *Cell Rep.* 2018;25(9):2354-2368.e5.
 78. Fraczek M, Kurpisz M. Cytokines in the male reproductive tract and their role in infertility disorders. *J Reprod Immunol.* 2015;108(2):98–104.
 79. Eggert-Kruse W, Kiefer I, Beck C, Demirakca T, Strowitzki T. Role for tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 1-beta (IL-1 β) determination in seminal plasma during infertility investigation. *Fertil Steril.* 2007;87(4):810–823.
 80. Havrylyuk A, Chopyak V, Boyko Y, Kril I, Kurpisz M. Cytokines in the blood and semen of infertile patients. *Cent J Immunol.* 2015;40(3):337.
 81. Pini T, Parks J, Russ J, Dzieciatkowska M, Hansen KC, Schoolcraft WB, et al. Obesity significantly alters the human sperm proteome, with potential implications for fertility. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37(4):777–787.
 82. De Heredia FP, Gómez-Martínez S, Marcos A. Chronic and degenerative diseases: Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc.* 2012;71(2):332–8.
 83. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral Fat

- Adipokine Secretion Is Associated With Systemic Inflammation in Obese Humans. *Diabetes*. 2007;56(4):1010–3.
84. Leisegang K, Udodong A, Bouic PJD, Henkel RR. Effect of the metabolic syndrome on male reproductive function: a case-controlled pilot study. *Andrologia*. 2014;46(2):167–76.
 85. Fan W, Xu Y, Liu Y, Zhang Z, Lu L, Ding Z. Obesity or Overweight, a Chronic Inflammatory Status in Male Reproductive System, Leads to Mice and Human Subfertility. *Front Physiol*. 2018;8(1):1117.
 86. Pilatz A, Hudemann C, Wolf J, Halefeld I, Paradowska-Dogan A, Schuppe HC, et al. Metabolic syndrome and the seminal cytokine network in morbidly obese males. *Andrology*. 2017;5(1):23–30.
 87. Wang F, Yang W, Ouyang S, Yuan S. The Vehicle Determines the Destination: The Significance of Seminal Plasma Factors for Male Fertility. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):1–20.
 88. Rodriguez-Martinez H, Martinez EA, Calvete JJ, Peña Vega FJ, Roca J. Seminal Plasma: Relevant for Fertility? *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021;22(9):4368.
 89. Lozano-Hernández R, Gualdrón J, Camejo MI, Judith V, Antonio V. Markers of accessory glands and seminal parameters in infertile men with overweight and obesity. *J Metab Syndr*. 2017;6(3):1–4.
 90. Schjenken JE, Moldenhauer LM, Sharkey DJ, Chan HY, Chin PY, Fullston T, et al. High-fat Diet Alters Male Seminal Plasma Composition to Impair Female Immune Adaptation for Pregnancy in Mice. *Endocrinology*. 2021;162(10):1–20.
 91. Zick M, Rabl R, Reichert AS. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1793(1):5–19.
 92. Ferramosca A, Zara V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *Biomed Res Int*. 2014;2014.
 93. Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to

- embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update*. 2009;15(5):553–572.
94. Ferramosca A, Focarelli R, Piomboni P, Coppola L, Zara V. Oxygen uptake by mitochondria in demembrated human spermatozoa: a reliable tool for the evaluation of sperm respiratory efficiency. *Int J Androl*. 2008;31(3):337–345.
 95. Ferramosca A, Conte A, Moscatelli N, Zara V. A high-fat diet negatively affects rat sperm mitochondrial respiration. *Andrology*. 2016;4:520–525.
 96. Ferramosca A, Lorenzetti S, Di Giacomo M, Lunetti P, Murrieri F, Capobianco L, et al. Modulation of Human Sperm Mitochondrial Respiration Efficiency by Plant Polyphenols. *Antioxidants*. 2021;10(2):217.
 97. Odet F, Duan C, Willis W, Goulding E, Kung A, Eddy M, et al. Lactate Dehydrogenase-C4 (LDH-C4) Is Essential for Sperm Function. *Biol Reprod*. 2008;78(Suppl_1):187–187.
 98. Goldberg E. Lactic and Malic Dehydrogenases in Human Spermatozoa. *Science*. 1963;139(3555):602–603.
 99. Piomboni P, Focarelli R, Stendardi A, Ferramosca A, Zara V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl*. 2012;35(2):109–124.
 100. Ferramosca A, Provenzano SP, Coppola L, Zara V. Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology*. 2012;79(4):809–814.
 101. Castellini C, D'andrea S, Cordeschi G, Totaro M, Parisi A, Di Emidio G, et al. Pathophysiology of mitochondrial dysfunction in human spermatozoa: Focus on energetic metabolism, oxidative stress and apoptosis. *Antioxidants*. 2021 May 1;10(5):695/
 102. Takei GL, Miyashiro D, Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays an important role in energy transfer from the base to the distal end of the flagellum in mouse sperm. *J Exp Biol*. 2014;217(Pt 11):1876–1886.
 103. Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. *Biol Reprod*.

2004;71(2):540–7.

104. Nascimento JM, Shi LZ, Tam J, Chandsawangbhuwana C, Durrant B, Botvinick EL, et al. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. *J Cell Physiol*. 2008;217(3):745–751.
105. Park YJ, Pang MG. Mitochondrial Functionality in Male Fertility: From Spermatogenesis to Fertilization. *Antioxidants*. 2021;10(1):98.
106. Carrageta DF, Guerra-Carvalho B, Sousa M, Barros A, Oliveira PF, Monteiro MP, et al. Mitochondrial Activation and Reactive Oxygen-Species Overproduction during Sperm Capacitation are Independent of Glucose Stimuli. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Aug; 9(8): 750.
107. Chianese R, Pierantoni R. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) Production Alters Sperm Quality. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2021;10(1):1–19.
108. Chen SJ, Allam JP, Duan YG, Haidl G. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;288(1):191–199.
109. Aitken RJ. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Mol Reprod Dev*. 2022;84(10):1039–1052.
110. Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*. 2013;146(5):R163–74.
111. Moraes CR, Meyers S. The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Anim Reprod Sci*. 2018 Jul 1;194:71–80.
112. Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med*. 2007 Oct 1;43(7):995–1022.
113. Srivastava N, Pande M. Mitochondrion: Features, functions and comparative analysis of specific probes in detecting sperm cell damages. *Asian Pacific J Reprod*. 2016 Nov 1;5(6):445–452.

114. Petersen CG, Mauri AL, Vagnini LD, Renzi A, Petersen B, Mattila M, et al. The effects of male age on sperm DNA damage: an evaluation of 2,178 semen samples. *JBRA Assist Reprod*. 2018;22(4):323.
115. Condorelli RA, La Vignera S, Mongioi LM, Alamo A, Calogero AE. Diabetes Mellitus and Infertility: Different Pathophysiological Effects in Type 1 and Type 2 on Sperm Function. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(5):25.
116. Glazar AI, McCue PM. Assessment of Sperm Mitochondrial Function. *Equine Reprod Proced*. 2021;637–638.
117. M Cedíková. [Sperm mitochondrial function in men with normozoospermia and asthenozoospermia]. *Ces Gynekol*. 2014;79(1):22–28.
118. Paoli D, Gallo M, Rizzo F, Baldi E, Francavilla S, Lenzi A, et al. Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil Steril*. 2011;95(7):2315–2319.
119. Fariello RM, Pariz JR, Spaine DM, Cedenho AP, Bertolla RP, Fraietta R. Association between obesity and alteration of sperm DNA integrity and mitochondrial activity. *BJU Int*. 2012;110(6):863–867.
120. Taniguchi H, Matsuo Y, Shimoi K, Yoshimura M, Hirota K, Kinoshita H. Establishment of a novel assessment of the quality of human spermatozoa measuring mitochondrial oxygen metabolism. *BMC Res Notes*. 2022;15(1):1–6.
121. Marchetti C, Obert G, Deffosez A, Formstecher P, Marchetti P. Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Hum Reprod*. 2002;17(5):1257–1265.
122. Boell EJ, Burkus LK. Oxygen consumption and motility of mouse sperm as affected by oxidizable substrates and oxygen tension. *Carlsb Res Commun*. 1984;49:147–154.
123. Boell EJ. Oxygen Consumption of Mouse Sperm and Its Relationship to Capacitation. *J Exp Zool*. 1985;234:105–116.
124. Cardullo RA, Cone RA, Jenkins TC. Mechanical Immobilization of Rat Sperm

- Does Not Change Their Oxygen Consumption Rate'. *Biol Reprod.* 1986;34:820–830.
125. Ferramosca A, Pinto Provenzano S, Montagna DD, Coppola L, Zara V. Oxidative Stress Negatively Affects Human Sperm Mitochondrial Respiration. *Urology.* 2013;82(1):78–83.
 126. Silva AM, Oliveira PJ. Evaluation of respiration with clark-type electrode in isolated mitochondria and permeabilized animal cells. *Methods Mol Biol.* 2018;1782:7–29.
 127. Nolfi-Donagan D, Braganza A, Shiva S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. *Redox Biol.* 2020;37:101674.
 128. Tourmente M, Villar-Moya P, Rial E, Roldan ERS. Differences in ATP Generation Via Glycolysis and Oxidative Phosphorylation and Relationships with Sperm Motility in Mouse Species. *J Biol Chem.* 2015;290(33):20613–20626.
 129. Von Diemen V, Trindade EN, Trindade MRM. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirúrgica Bras.* 2006;21(6):425–429.
 130. Malafaia AB, Nassif PAN, Ribas CAPM, Ariede BL, Sue KN, Cruz MA. Obesity induction with high fat sucrose in rats. *Arq Bras Cir Dig.* 2013;26(1):17–21.
 131. Rosini TC, Ramos da Silva AS, de Moraes C. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev da Assoc Médica Bras English Ed.* 2012;58(3):383–387.
 132. MacEdo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, et al. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides.* 2012;38(1):189–196.
 133. Holemans K, Caluwaerts S, Poston L, Van Assche FA. Diet-induced obesity in the rat: A model for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;190(3):858–65.
 134. Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM.

- Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004;20(2):218–224.
135. Preguiça I, Alves A, Nunes S, Fernandes R, Gomes P, Viana SD, et al. Diet-induced rodent models of obesity-related metabolic disorders-A guide to a translational perspective. *Obes Rev*. 2020;21(12):e13081.
 136. Matias AM, Estevam WM, Coelho PM, Haese D, Kobi JBBS, Lima-Leopoldo AP, et al. Differential Effects of High Sugar, High Lard or a Combination of Both on Nutritional, Hormonal and Cardiovascular Metabolic Profiles of Rodents. *Nutrients*. 2018;10(8):1071.
 137. Matias AM, Coelho PM, Marques VB, dos Santos L, de Assis ALEM, Nogueira BV, et al. Hypercaloric diet models do not develop heart failure, but the excess sucrose promotes contractility dysfunction. *PLoS One*. 2020;15(2):e0228860.
 138. Nilsson C, Raun K, Yan FF, Larsen MO, Tang-Christensen M. Laboratory animals as surrogate models of human obesity. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(2):173–181.
 139. Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism*. 1995;44(5):645–651.
 140. Cheng HS, Ton SH, Phang SCW, Tan JBL, Abdul Kadir K. Increased susceptibility of post-weaning rats on high-fat diet to metabolic syndrome. *J Adv Res*. 2017;8(6):743–752.
 141. Lasker S, Rahman MM, Parvez F, Zamila M, Miah P, Nahar K, et al. High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. *Sci Rep*. 2019;9(1):20026.
 142. Working PK, Hurtt ME. Computerized ideomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *J Androl*. 1987;8:330–337.
 143. Fernandez CDB, Bellentani FF, Fernandes GSA, Perobelli JE, Favareto APA, Nascimento AF, et al. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:32.

144. Palmer NO, Bakos HW, Owens JA, Setchell BP, Lane M. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2012;302(7):768–780.
145. Adamkovicova M, Toman R, Martiniakova M, Omelka R, Babosova R, Krajcovicova V, et al. Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016;14(42).
146. Li Y, Liu L, Wang B, Xiong J, Li Q, Wang J, et al. Impairment of reproductive function in a male rat model of non-alcoholic fatty liver disease and beneficial effect of N-3 fatty acid supplementation. *Toxicol Lett.* 2013;222(2):224–232.
147. Luo D, Zhang M, Su X, Liu L, Zhou X, Zhang X, et al. High fat diet impairs spermatogenesis by regulating glucose and lipid metabolism in Sertoli cells. *Life Sci.* 2020;257:118028.
148. Aitken RJ, Nixon B, Lin M, Koppers AJ, Lee YH, Baker MA. Proteomic changes in mammalian spermatozoa during epididymal maturation. *Asian J Androl.* 2007;9(4):554–564.
149. Silva KM, Carvalho MG, Aristizabal VH V., Ortiz PEO, Paranzini CS, Melchert A, et al. Effects of Obesity and Diabetes on Sperm Cell Proteomics in Rats. *J Proteome Res.* 2021;20(5):2628-2642.
150. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1986;46(6):1118–1123.
151. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499–502.
152. Park B, Jung DH, Lee HS, Lee YJ. Triglyceride to HDL-Cholesterol Ratio and the Incident Risk of Ischemic Heart Disease Among Koreans Without Diabetes: A Longitudinal Study Using National Health Insurance Data. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:716698.
153. Hamilton JAM, Cissen M, Brandes M, Smeenk MJJ, De Bruin JP, Kremer

- JAM, et al. Total motile sperm count: A better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. *Hum Reprod.* 2015;30(5):1110–1121.
154. Ayala C, Strinberger E, Smith DP. The Influence of Semen Analysis Parameters on the Fertility Potential of Infertile Couples. *J Androl.* 1996;17(6):718–725.
 155. Aziz N, Buchan I, Taylor C, Kingsland CR, Lewis-Jones I. The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization in vitro. *Fertil Steril.* 1996;66(6):1000–1008.
 156. Kozopas NM, Chornenka OI, Vorobets MZ, Lapovets LY MH. Body Mass Index and Sperm Quality: Is there a Relationship? *J Hum Reprod Sci.* 2020;13(2):110–113.
 157. Kozopas N, Maksymyuk H, Lapovets L, Chornenka O, Dorofeyeva U. The effect of increasing Body Mass Index on sperm quality of subfertile men. *Clin Chim Acta.* 2019;493:S301.
 158. NM Kozopas, A.S. Kost, L.E. Lapovets HVM. Impact of obesity and metabolic syndrome on semen quality [Internet]. 14th Bialystok International Medical Congress for Young Scientists. 2019. p.117. Available from: <http://bimc.umb.edu.pl/regulations/>
 159. Kozopas NM, Dorofeyeva US, Maksymyuk HV. Is there a relationship between seminal zinc concentration and sperm quality in overweight men? 7th Lublin International Medical Congress 26-28 November 2020, Lublin, Poland. [Internet]. [Lublin, Poland]: 7th Lublin International Medical Congress; 2020. p.215. Available from: <https://ppm.edu.pl>
 160. Козопас Н.М. Зв'язок компонентів метаболічного синдрому та чоловічого безпліддя (огляд літератури). Міжнародна науково-практична конференція на тему: «Досягнення медичної науки як чинник стабільності розвитку медичної практики». [Дніпро]: Організація наукових медичних досліджень «Salutem»; 2018. с.51-55.
 161. Козопас НМ, Лаповець ЛЄ, Максимюк ГВ. Вміст цинку в спермальній

плазмі чоловіків із надмірною масою тіла. Матеріали XXIII Міжнародного медичного конгресу молодих вчених, 15-17 квітня 2019 року; Тернопіль: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України. Тернопіль: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.; 2019. с.113-115.

162. Козопас Н.М., Максимюк Г.В. Оцінка показників морфології сперматозоїдів у чоловіків з надмірною масою тіла та ожирінням. Всеукраїнська міждисциплінарна науково-практична конференція з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень (до 100-річчя від заснування УМСА)» присвячена 100-річчю заснування Української медичної стоматологічної академії. 8 жовтня 2021 року. Полтава: Полтавський державний медичний університет; 2021. с.76-68.
163. Козопас Н.М., Максимюк Г.В. Зміни вмісту фруктози в еякуляті чоловіків на тлі надмірної маси тіла та ожиріння. ІХ науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів». 22 – 23 вересня 2022 року; Тернопіль: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України. Тернопіль: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України; 2022. с.114-116.
164. Kozopas NM, Boykiv ND, Dorofeyeva US, Fafula R V., Maksymyuk H V. Seminal plasma proinflammatory cytokines and semen quality in overweight and obese men. Riv Ital della Med di Lab. 2021;17(1):24–30.
165. Козопас НМ, Бойків НД, Максимюк ГВ. Прозапальні цитокіни та якість еякуляту чоловіків із надмірною масою тіла та ожирінням. Матеріали LXIII науково-практичної конференції "Здобутки клінічної та експериментальної медицини", 12 червня 2020 року; Тернопіль: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я.

Горбачевського МОЗ України. [Тернопіль]: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України; 2020. с.17-18.

166. Козопас Н.М., Максимюк Г.В. NLRP3-інфламасома та розвиток прозапального стану в організмі. Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика . [Київ]: Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика ; 2020. с.53-54.
167. Козопас Н.М., Бойків Н.Д., Максимюк Г.В. Вміст лептину спермоплазми у пацієнтів з різним індексом маси тіла; XV всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених з міжнародною участю „Актуальні питання клінічної медицини”. Запоріжжя: «Запорізька медична академія післядипломної освіти Міністерства охорони здоров'я України»; 2021. с.113-115.
168. Passarella S, de Bari L, Valenti D, Pizzuto R, Paventi G, Atlante A. Mitochondria and l-lactate metabolism. FEBS Lett. 2008 Oct 29;582(25–26):3569–3576.
169. Козопас НМ, Максимюк ГВ. Показники фертильності щурів та рівень лептину в плазмі крові за умов впливу висококалорійних дієт. Медична та клінічна хімія. 2022;(4):59–63.
170. Козопас Н.М. Вплив різнокомпонентних дієт на розвиток аліментарного ожиріння та показники фертильності щурів. 82-а студентська наукова конференція для студентів-медиків та молодих вчених - LYSICon 82, 27-29 жовтня 2021 р. [Львів]: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького; 2021. с.41-42.
171. Kozopas N.M., Manko V.O., Mazur H.M., Maksymyuk H.V. The effects of high-fat or high-fat / high-sugar diets on rat sperm parameters and mitochondrial respiration. J Clin Chim Acta. Nov 28-Dec 02, 2021. EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Munich. Vol. 59, Clinical chemistry and laboratory medicine. Munich: NLM (Medline); 2021. S332.

172. Ajayi AB, Ajayi VD, Oyetunji I, Biobaku O, Aikhuele H, Adedamilola A, et al. Are semen parameters worsening? Comparing semen parameters 10 years apart. *Niger Med J*. 2017;58(2):72.
173. Keltz J, Zapantis A, Jindal SK, Lieman HJ, Santoro N, Polotsky AJ. Overweight men: clinical pregnancy after ART is decreased in IVF but not in ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27(9–10):539–544.
174. Martini AC, Tissera A, Estofán D, Molina RI, Mangeaud A, de Cuneo MF, et al. Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. *Fertil Steril*. 2010;94(5):1739–1743.
175. Bieniek JM, Kashanian JA, Deibert CM, Grober ED, Lo KC, Brannigan RE, et al. Influence of increasing body mass index on semen and reproductive hormonal parameters in a multi-institutional cohort of subfertile men. *Fertil Steril*. 2016;106(5):1070–1075.
176. Alshahrani S, Ahmed AF, Gabr AH, Abalhassan M, Ahmad G. The impact of body mass index on semen parameters in infertile men. *Andrologia*. 2016;48(10):1125–1129.
177. Lozano-Hernández R. Male Accessory Glands and Sperm Function. In: *Spermatozoa - Facts and Perspectives* [Internet]. London: InTechOpen; 2018. p. 101–112.
178. Pilatz A, Halefeld I, Hudemann C, Schultheiss D, Renz H, Schuppe HC, et al. Impact of metabolic syndrome on seminal inflammation and sperm parameters: A case-control study. *Eur Urol Suppl*. 2014; 13(1):e254.
179. Gonzales GF, Villena A. True corrected seminal fructose level: a better marker of the function of seminal vesicles in infertile men. *Int J Androl*. 2001;24(5):255–260.
180. Gonzales GF, Garcia-Hjarles M, Napuri R. Corrected seminal fructose levels: index of secretory activity of seminal vesicles. *Arch Androl*. 1988;21(2):135–142.
181. Gonzales GF. Corrected seminal fructose test. *Arch Androl*. 1994;33(1):17–22.

182. Gonzales GF. Test for androgen activity at the male reproductive tract in infertile men. *Arch Androl.* 1994;32(3):235–242.
183. Shemshaki G, Murthy A, Malini S. Assessment and Establishment of Correlation between Reactive Oxidation Species, Citric Acid, and Fructose Level in Infertile Male Individuals: A Machine-Learning Approach. *J Hum Reprod Sci.* 2021;14(2):129.
184. Fallah A, Mohammad-Hasani A, Colagar AH. Zinc is an Essential Element for Male Fertility: A Review of Zn Roles in Men’s Health, Germination, Sperm Quality, and Fertilization. *J Reprod Infertil.* 2018;19(2):69–81.
185. Zhao J, Dong X, Hu X, Long Z, Wang L, Liu Q, et al. Zinc levels in seminal plasma and their correlation with male infertility: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2016;6(1):1–10.
186. Colagar AH, Marzony ET, Chaichi MJ. Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutr Res.* 2009;29(2):82–8.
187. Kothari RP, Chaudhari AR. Zinc Levels in Seminal Fluid in Infertile Males and its Relation with Serum Free Testosterone. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(5):CC05.
188. Milostić-Srb A, Včev A, Tandara M, Marić S, Kuić-Vadlja V, Srb N, et al. Importance of zinc concentration in seminal fluid of men diagnosed with infertility. *Acta Clin Croat.* 2020;59(1):154–160.
189. Türk S, Mändar R, Mahlapuu R, Viitak A, Punab M, Kullisaar T. Male infertility: Decreased levels of selenium, zinc and antioxidants. *J Trace Elem Med Biol.* 2014;28(2):179–185.
190. Lin YC, Chang TC, Tseng YJ, Lin YL, Huang FJ, Kung FT, et al. Seminal plasma zinc levels and sperm motion characteristics in infertile samples. *Chang Gung Med J.* 2000;23(5):260–266.
191. Akinloye O, Abbiyesuku FM, Oguntibeju OO, Arowojolu AO, Truter EJ. The impact of blood and seminal plasma zinc and copper concentrations on spermogram and hormonal changes in infertile Nigerian men. *Reprod Biol.*

- 2011;11(2):83–97.
192. Syriou V, Papanikolaou D, Kozyraki A, Goulis DG. Cytokines and male infertility. *Eur Cytokine Netw.* 2018;29(3):73–82.
 193. Г. В. Максимюк, З. Д. Воробець, В. М. Максимюк. Рівень IL-6, IL-8 і IL-10 у спермі чоловіків. *Світ медицини та біології.* 2015;3(51):59–63.
 194. Sutherland JP, McKinley B, Eckel RH. The Metabolic Syndrome and Inflammation. *Metab Syndr Relat Disord.* 2004;2(2):82–104.
 195. Lotti F, Corona G, Degli Innocenti S, Filimberti E, Scognamiglio V, Vignozzi L, et al. Seminal, ultrasound and psychobiological parameters correlate with metabolic syndrome in male members of infertile couples. *Andrology.* 2013;1(2):229–239.
 196. Huleihel M, Lunenfeld E, Horowitz S, Levy A, Potashnik G, Glezerman M. Production of interleukin-1-like molecules by human sperm cells. *Fertil Steril.* 2000;73(6):1132–1137.
 197. Bremer AA, Devaraj S, Afify A, Jialal I. Adipose Tissue Dysregulation in Patients with Metabolic Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(11):E1782–8.
 198. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(4):189–195.
 199. Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Mühl H, et al. Overview of interleukin-18: More than an interferon- γ inducing factor. *J Leukoc Biol.* 1998;63(6):658–64.
 200. Novick D, Kim S, Kaplanski G, Dinarello CA. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin Immunol.* 2013;25(6):439–448.
 201. Bruun JM, Stallknecht B, Helge JW, Richelsen B. Interleukin-18 in plasma and adipose tissue: effects of obesity, insulin resistance, and weight loss. *Eur J Endocrinol.* 2007;157(4):465–71.
 202. Zilverschoon GRC, Tack CJ, Joosten LAB, Kullberg BJ, Van Der Meer JWM, Netea MG. Interleukin-18 resistance in patients with obesity and type 2 diabetes mellitus. *Int J Obes.* 2008;32(9):1407–1414.

203. Netea MG, Joosten LAB, Lewis E, Jensen DR, Voshol PJ, Kullberg BJ, et al. Deficiency of interleukin-18 in mice leads to hyperphagia, obesity and insulin resistance. *Nat Med.* 2006;12(6):650–656.
204. Максимюк ГВ. Іони лужних металів та показники якості нативної і деконсервованої сперми. *Біологія тварин.* 2015;17(3):72–78.
205. Vílchez MC, Morini M, Peñaranda DS, Gallego V, Asturiano JF, Pérez L. Role of potassium and pH on the initiation of sperm motility in the European eel. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol.* 2017;203:210–219.
206. Kumar S, Ying YK, Hong P, Maddaiah VT. Potassium increases intracellular calcium simulating progesterone action in human sperm. *Arch Androl.* 2009;44(2):93–101.
207. Bolanca I, Obhodas J, Ljiljak D, Matjacic L, Kuna K. Synergetic Effects of K, Ca, Cu and Zn in Human Semen in Relation to Parameters Indicative of Spontaneous Hyperactivation of Spermatozoa. *PLoS One.* 2016;11(3):e0152445.
208. Teerds KJ, de Rooij DG, Keijer J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Hum Reprod Update.* 2011;17(5):667–683.
209. Hausman GJ, Barb CR, Lents CA. Leptin and reproductive function. *Biochimie.* 2012;94(10):2075–2081.
210. Scarpace PJ, Matheny M, Tümer N, Cheng KY, Zhang Y. Leptin resistance exacerbates diet-induced obesity and is associated with diminished maximal leptin signalling capacity in rats. *Diabetol.* 2005;48(6):1075–1083.
211. Childs G V., Odle AK, MacNicol MC, MacNicol AM. The Importance of Leptin to Reproduction. *Endocrinology.* 2021;162(2):1–18.
212. Jope T, Lammert A, Kratzsch J, Paasch U, Glander HJ. Leptin and leptin receptor in human seminal plasma and in human spermatozoa. *Int J Androl.* 2003;26(6):335–341.
213. Almabhouh F, Abdul Aziz NAA, Durairajanayagam D, Singh HJ. Could leptin be responsible for the reproductive dysfunction in obese men? *Reprod Biol.*

- 2020;20(1):106–110.
214. Almabhouh FA, Mokhtar AH, Malik IA, Aziz NA, Durairajanayagam D, Singh HJ. Leptin and reproductive dysfunction in obese men. *Andrologia*. 2020;52(1):e13433.
 215. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007;41:111–119.
 216. Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Luvizotto RAM, Sugizaki MM, Campos DHS, et al. Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. *Brazilian J Med Biol Res*. 2016;49(4):e5028.
 217. Fernandez CDB, Bellentani FF, Fernandes GSA, Perobelli JE, Favareto APA, Nascimento AF, et al. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9:32.
 218. Palmer NO, Bakos HW, Owens JA, Setchell BP, Lane M. Diet and exercise in an obese mouse fed a high-fat diet improve metabolic health and reverse perturbed sperm function. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012;302(7):E768-80.
 219. Chambers TJG, Morgan MD, Heger AH, Sharpe RM, Drake AJ. High-fat diet disrupts metabolism in two generations of rats in a parent-of-origin specific manner. *Sci Reports*. 2016;6(1):1–11.
 220. Miranda J, Eseberri I, Lasa A, Portillo MP. Lipid metabolism in adipose tissue and liver from diet-induced obese rats: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley strains. *J Physiol Biochem*. 2018;74(4):655–666.
 221. Yang GT, Zhao HY, Kong Y, Sun NN, Dong AQ. Study of the effects of nesfatin-1 on gastric function in obese rats. *World J Gastroenterol*. 2017;23(16):2940–2947.
 222. Hira T, Suto R, Kishimoto Y, Kanahori S, Hara H. Resistant maltodextrin or fructooligosaccharides promotes GLP-1 production in male rats fed a high-fat and high-sucrose diet, and partially reduces energy intake and adiposity. *Eur J Nutr* 2017 573. 2017;57(3):965–979.

223. Gómez-Crisóstomo NP, De la Cruz-Hernández EN, Méndez Méndez ER, Hernández-Landero MF, Camacho Liévano JU, Martínez-Abundis E. Differential effect of high-fat, high-sucrose and combined high-fat/high-sucrose diets consumption on fat accumulation, serum leptin and cardiac hypertrophy in rats. *Arch Physiol Biochem.* 2020;126(3):258–263.
224. Arbo BD, Niches G, Zanini P, Bassuino DM, Driemeier D, Ribeiro MF, et al. Aging affects the response of female rats to a hypercaloric diet. *Exp Gerontol.* 2018;101:7–12.
225. Ferramosca A, Di Giacomo M, Moscatelli N, Zara V. Obesity and Male Infertility: Role of Fatty Acids in the Modulation of Sperm Energetic Metabolism. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2018;120(4):1700451.
226. Alsuhaymi N. Effect of obesity on fertility parameters in WIO mice model. *Adv Clin Exp Med.* 2022;31(5):539–546.
227. Heydari H, Ghiasi R, Hamidian G, Ghaderpour S, Keyhanmanesh R. Voluntary exercise improves sperm parameters in high fat diet receiving rats through alteration in testicular oxidative stress, mir-34a/SIRT1/p53 and apoptosis. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2021;42(3):253–263.
228. Sousa AP, Amaral A, Baptista M, Tavares R, Caballero Campo P, Caballero Peregrín P, et al. Not All Sperm Are Equal: Functional Mitochondria Characterize a Subpopulation of Human Sperm with Better Fertilization Potential. Clarke H, editor. *PLoS One.* 2011;6(3):e18112.
229. Barbagallo F, La Vignera S, Cannarella R, Aversa A, Calogero AE, Condorelli RA. Evaluation of Sperm Mitochondrial Function: A Key Organelle for Sperm Motility. *J Clin Med.* 2020;9(2):363.
230. Stendardi A, Focarelli R, Piomboni P, Palumberi D, Serafini F, Ferramosca A, et al. Evaluation of mitochondrial respiratory efficiency during in vitro capacitation of human spermatozoa. *Int J Androl.* 2011;34(3):247–255.
231. Davila MP, Muñoz PM, Tapia JA, Ferrusola CO, Da Silva C CB, Peña FJ. Inhibition of Mitochondrial Complex I Leads to Decreased Motility and Membrane Integrity Related to Increased Hydrogen Peroxide and Reduced

ATP Production, while the Inhibition of Glycolysis Has Less Impact on Sperm Motility. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138777.

232. Darr CR, Varner DD, Teague S, Cortopassi GA, Datta S, Meyers SA. Lactate and pyruvate are major sources of energy for stallion sperm with dose effects on mitochondrial function, motility, and ROS production. *Biol Reprod*. 2016;95(2):34–35.
233. Desler C, Hansen TL, Frederiksen JB, Marcker ML, Singh KK, Juel Rasmussen L. Is there a link between mitochondrial reserve respiratory capacity and aging? *J Aging Res*. 2012;2012:1–9.
234. Marchetti P, Fovez Q, Germain N, Khamari R, Kluza J. Mitochondrial spare respiratory capacity: Mechanisms, regulation, and significance in non-transformed and cancer cells. *FASEB J*. 2020;34(10):13106–13124.

ДОДАТКИ

Додаток А

Пам'ятка пацієнта

Підготовка до здачі спермограми

Аналіз спермограми проводять після статевого утримання пацієнта не менше 2-ох та не більше 7-ми діб. Якщо треба повторити аналіз, то необхідно дотримуватись сталої кількості днів абстиненції (утримання) при кожному візиті.

- Заборонено вживати алкоголь у будь-яких кількостях протягом 6-7 днів перед здачею еякуляту.

- З огляду на те, що хронічні інтоксикації негативно впливають на показники спермограми, необхідно намагатися протягом 2.5 місяців перед дослідженням виключити токсичні фактори (алкоголь, тютюн, наркотики, медикаменти тощо).

- При запальних захворюваннях сечостатевої системи рекомендується досліджувати еякулят через 2 тижні після проведеної терапії основного захворювання.

- При наявності гострих респіраторних вірусних захворювань, що перебігають із підвищенням температури тіла, дослідження еякуляту відкладають та проводять через 7–10 днів після одужання.

- Загальне перегрівання організму негативно впливає на сперматозоїди. Тому, перед здачею спермограми важливо не відвідувати сауни та лазні.

- Після масажу простати дослідження еякуляту слід відкласти мінімум на 7 днів.

- Напередодні здачі аналізів, по можливості, уникати конфліктних ситуацій та виключити інтенсивні тренування та важкі фізичні навантаження. Вночі, перед дослідженням, рекомендується забезпечити повноцінний відпочинок.

Забір матеріалу (у клініці):

- Матеріал отримують шляхом мастурбації в спеціальній кімнаті клініки. За виняткових обставин, можна зібрати еякулят за межами лікувальної установи.

- Еякулят збирають у спеціальний контейнер із кришкою. На емності має бути зазначена наступна інформація: прізвище, ім'я, по батькові пацієнта та його ідентифікаційний номер, дата та час забору матеріалу.

Продовження додатка А

- Заборонено використовувати креми, гелі, будь-які інші матеріали, а також слину в момент збору еякуляту. Ці чинники можуть вплинути на життєздатність сперматозоїдів.

- Еякулят необхідно зібрати в повному обсязі. Зверніть увагу на те, що перша порція секрету містить найбільшу кількість сперматозоїдів та простатичну рідину, тоді як в останніх порціях – переважає рідина із сім'яних міхурців. Тому особливо важливо не втратити першу порцію еякуляту. Якщо частина еякуляту не потрапила у контейнер, обов'язково повідомите про це лікаря (лаборанта). За цієї умови, наступний зразок слід збирати після статевого утримання 2–7 діб.

- Якщо під час збору матеріалу виникли будь-які труднощі (наприклад, виникла неповна еякуляція / еякуляція була отримана після довготривалої мастурбації (понад 10 хв) тощо), обов'язково слід повідомити про це лікаря (лаборанта).

Забір матеріалу (вдома):

- Зразок може бути зібраний у домашніх умовах у виняткових випадках. Зокрема, таких як нездатність отримати еякулят шляхом мастурбації в клініці чи невідповідні умови лабораторії. Якщо матеріал був зібраний поза межами лікувальної установи, то пацієнт повинен повідомити лаборанта про цю обставину.

- Пацієнт повинен записати час, коли відбулась еякуляція та доставити контейнер до лабораторії не пізніше, ніж через 1 год після еякуляції.

- Під час транспортування зразок повинен зберігатись при температурі від 20 до 37°C.

Забір матеріалу (у презерватив):

- Недопустимо збирати еякулят за допомогою звичайних презервативів, оскільки в них містяться речовини, які впливають на рухливість сперматозоїдів. У виняткових випадках, при неможливості збору еякуляту методом мастурбації (етичні, релігійні причини), допустимо його отримання у процесі статевого акту за допомогою спеціальних нетоксичних кондомів, розроблених спеціально для збору еякуляту.

Увага!

Не можна, отримувати еякулят шляхом перерваного статевого акту, позаяк можна втрати першу порцію секрету, що містить найбільшу кількість статевих клітин. Окрім того, ймовірна контамінація бактеріями, а вагінальна рідина, що має низьке значення рН, може негативно впливати на рухливість сперматозоїдів.

Додаток Б

**Референтні значення показників спермограми, які досліджувалися
(згідно з Керівництвом ВООЗ, 2010)**

Показники	Значення
Об'єм еякуляту (мл)	1.5 мл і більше
Розрідження (хв)	до 60 хв
В'язкість (см)	до 2 см
Колір	молочно-білий / сіруватий мутний
pH	<7.2
Аглотинація/ агрегація сперматозоїдів	відсутня
Слиз	відсутній
Концентрація сперматозоїдів (в 1 мл)	15 млн/мл і більше
Загальна кількість сперматозоїдів (млн.)	39 млн і більше
Рухливість сперматозоїдів	
Прогресивно рухливі PR(%)	32 % і більше
Загальна рухливість PR + NP (%)	40 % і більше
Життєздатність (% живих сперматозоїдів)	58 % і більше
Морфологія (% нормальних форм)	4 % і більше
Концентрація лейкоцитів (млн/мл)	менше ніж 1 млн/мл

*Примітки:** PR (progressive motility), прогресивно рухливі; ** NP (non-progressive motility), непрогресивно рухливі сперматозоїди.

Додаток В

Класифікація показників еякуляту (ВООЗ, 2010)

Аспермія	Відсутність еякуляту (або ретроградна еякуляція)
Астенозооспермія	Відсоток прогресивно-рухомих сперматозоїдів (PR) нижче нормативних значень
Астенотератозооспермія	Відсоток PR сперматозоїдів та морфологічно нормальних сперматозоїдів нижче нормативних значень
Азооспермія	Сперматозоїди в еякуляті відсутні
Гемоспермія (гематоспермія)	Наявність еритроцитів в еякуляті
Криптозооспермія	В нативному препараті сперматозоїди відсутні, але наявні в осаді еякуляту
Лейкоспермія (лейкоцитоспермія, піоспермія)	Наявність лейкоцитів в еякуляті вище нормативних значень
Некрозооспермія	Низький відсоток живих та високий відсоток нерухомих сперматозоїдів у еякуляті
Нормозооспермія	Загальна кількість (або концентрація) сперматозоїдів та відсоток PR і морфологічно нормальних сперматозоїдів відповідає нормативним значенням
Олігоастенозооспермія	Загальна кількість (або концентрація) сперматозоїдів та відсоток PR сперматозоїдів нижче нормативних значень
Олігоастенотератозооспермія	Загальна кількість (або концентрація) сперматозоїдів, відсоток PR і морфологічно нормальних сперматозоїдів нижче нормативних значень
Олігозооспермія	Загальна кількість (або концентрація) сперматозоїдів нижче нормативних значень
Тератозооспермія	Відсоток морфологічно нормальних сперматозоїдів нижче нормативних значень

Примітка: суфікс «-спермія» завжди стосується еякуляту, а «-зооспермія» - сперматозоїдів.

Додаток Г

**Нутритивний склад та калораж дієт, що використовувалися у
дослідженні**

Компоненти кормів (на 100г)	Дієти		
	КГ	ВЖД 45% ккал жиру	ВЖЦД
Енергетична цінність, ккал/г	3.03	4.92	5.08
Білки, % ккал	21.5	20.0	16.0
Жири, % ккал	6.5	45.0	40.0
Вуглеводи, % ккал	72.0	35.0	46.0

Примітки: КГ – контрольна група; ВЖД – високожирова дієта;
ВЖЦД – дієта з високим вмістом жиру та цукру.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

- **Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**
1. Kozopas N.M., Chornenka O.I., Vorobets M.Z., Lapovets L.Y., Maksymyuk H.V. Body Mass Index and Sperm Quality: Is there a Relationship? J Hum Reprod Sci 2020;13(2):110–113. DOI:10.4103/jhrs.JHRS_15_20. *(Дисертантка особисто провела забір матеріалу, здійснила аналіз, опрацювала отримані результати, оформила статтю до друку. Співавтори надавали консультативну допомогу).*
 2. Kozopas N.M., Boykiv N.D., Dorofeyeva U.S., Fafula R.V., Maksymyuk H.V. Seminal plasma pro-inflammatory cytokines and semen quality in overweight and obese men. Riv Ital Med Lab 2021;17(1):24–30. DOI: 10.23736/S1825-859X.21.00086-4. *(Дисертантка здійснила забір матеріалу, його аналіз, опрацювала та узагальнила отримані результати, провела аналіз науково-фахових джерел літератури, підготувала статтю до друку. Співавтори здійснювали консультативну допомогу).*
 3. Козопас Н.М., Максимюк Г.В. Показники фертильності щурів та рівень лептину в плазмі крові за умов впливу висококалорійних дієт. Медична та клінічна хімія. 2022;23(4):59–63. DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2021.i4.12734. *(Дисертантка особисто провела постановку експериментального дослідження, аналіз та узагальнення отриманих результатів, написала та оформила статтю до друку. Співавторка надавала консультативну допомогу).*

- **Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:**

1. Козопас Н.М. Зв'язок компонентів метаболічного синдрому та чоловічого безпліддя (огляд літератури). Міжнародна науково-практична конференція на тему: «Досягнення медичної науки як чинник стабільності розвитку медичної практики» 9-10 березня 2018; Дніпро: Організація наукових медичних досліджень «Salutem». *(Публікація тез)*.
2. Козопас Н.М., Лаповець Л.Є., Максимюк Г.В. Вміст цинку в спермальній плазмі чоловіків із надмірною масою тіла. Матеріали XXIII Міжнародного медичного конгресу молодих вчених, 15-17 квітня 2019 року; Тернопіль: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України. *(Публікація тез)*.
3. Kozopas N.M., Maksymyuk H.V., Lapovets L.E., Chornenka O.I., Dorofeeva U.S. The effect of increasing body mass index on sperm quality of subfertile men. J Clin Chim Acta. 2019. 23rd IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Barcelona). *(Стенодова доповідь та публікація тез)*.
4. Kozopas N.M., Kost A.S., Lapovets L.E., Maksymyuk H.V. Impact of obesity and metabolic syndrome on semen quality. Proceedings of the 14th Bialystok International Medical Congress for Young Scientists. 2019 May 17-18; Bialystok, Poland: Educational-Scientific Center, the Faculty of Health Sciences, Medical University of Bialystok. *(Усна доповідь та публікація тез)*.
5. Козопас Н.М., Бойків Н.Д., Максимюк Г.В. Прозапальні цитокіни та якість еякуляту чоловіків із надмірною масою тіла та ожирінням. Матеріали LXIII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини», 12 червня 2020 року; Тернопіль: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України. *(Публікація тез)*.

6. Козопас Н.М. , Максимюк Г.В. Інфламасома та розвиток прозапального стану в організмі. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «YOUNG SCIENCE 2.0» Національна медична академія післядипломної освіти імені П. П. Шупика, м. Київ, 20 листопада 2020 року. (*Стенова доповідь та публікація тез*).
7. Kozopas N.M., Dorofeyeva U.S., Maksymyuk H.V. Is there a relationship between seminal zinc concentration and sperm quality in overweight men? 7th Lublin International Medical Congress 26-28 November 2020, Lublin, Poland. (*Стенова доповідь та публікація тез*).
8. Козопас Н.М., Максимюк Г.В. Оцінка показників морфології сперматозоїдів у чоловіків з надмірною масою тіла та ожирінням. Всеукраїнська міждисциплінарна науково-практична конференція з міжнародною участю «УМСА – століття інноваційних напрямків та наукових досягнень (до 100-річчя від заснування УМСА)» Полтавський державний медичний університет. Полтава 8 жовтня 2021 року. (*Публікація тез*).
9. Козопас Н.М. Вплив різнокомпонентних дієт на розвиток аліментарного ожиріння та показники фертильності щурів. 82-а студентська наукова конференція для студентів-медиків та молодих вчених - LYSICon 82, 27-29 жовтня 2021 р. (*Усна доповідь та публікація тез*).
10. Козопас Н.М., Бойків Н.Д., Максимюк Г.В. Вміст лептину спермоплазми у пацієнтів з різним індексом маси тіла. XV всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених з міжнародною участю „Актуальні питання клінічної медицини”, (19 листопада 2021 р., м. Запоріжжя). (*Публікація тез*).
11. Kozopas N.M., Manko B.O., Mazur H.M., Maksymyuk H.V. The effects of high-fat or high-fat/high-sugar diets on rat sperm parameters and mitochondrial respiration. J Clin Chim Acta. Nov 28-Dec 02, 2021. EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Munich. (*Публікація тез*).

12. Козопас Н.М., Максимюк Г.В. Зміни вмісту фруктози в еякуляті чоловіків на тлі надмірної маси тіла та ожиріння. ІХ науково-практична конференція з міжнародною участю «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів». 22 – 23 вересня 2022 року; Тернопіль: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України. *(Публікація тез)*.

• **Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:**

Козопас Н.М., Максимюк Г.В., Лаповець Л.Є., Одноріг Л.О. Метаболічний синдром та чоловіче безпліддя: сучасний погляд на проблему. Bull Probl Biol Med. 2018;1(2):26. *(Дисертантці належить ідея роботи, а також самостійно виконала аналіз наукової літератури, опрацювала та сформулювала основні висновки роботи, оформила статтю. Співавтори надали консультативну допомогу)*.

Додаток Д1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Виконавчий директор
 ТОВ «Медичний центр
 Святої Параскеви»
 Д. О. Левченко
 (підпис керівника установи) 20 21 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Зміни показників спермограми та деяких біохімічних параметрів спермальної плазми у неплідних чоловіків із надмірною масою тіла та ожирінням.
2. **Установа розробник:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра клінічної лабораторної діагностики факультету післядипломної освіти; вул. Пекарська, 69а, Львів.
3. **Автори:** Козопас Наталія Михайлівна, Максимюк Ганна Василівна.
4. **Джерело інформації:** Kozopas NM, Chornenka OI, Vorobets MZ, Lapovets LY, Maksymyuk HV. Body mass index and sperm quality: Is there a relationship? J Hum Reprod Sci 2020; 13:110-3 DOI:10.4103/jhrs.JHRS_15_20. (Scopus).
5. **Де впроваджено:** ТОВ «Медичний центр Святої Параскеви».
6. **Ефективність впровадження:** результати наукової пропозиції впровадженні у медичний діагностичний процес лабораторного відділення.
7. **Строки впровадження:** 2021 – 2022 н.р.
8. **Зауваження та пропозиції:** немає, рекомендовано до впровадження у медичній практиці.

Відповідальний за впровадження

Заступник виконавчого директора,
 керівник лабораторії
 ТОВ «Медичний центр
 Святої Параскеви»
 к.мед.н.

«05» 01 2021 р.

А. С. Кость

Додаток Д2

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Перший проректор
 з науково-педагогічної роботи
 Львівського національного медичного
 університету імені Данила Галицького
 доц. К.Б.Н.

I. I. Солонинко
 09 2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Зміни показників спермограми та деяких біохімічних параметрів спермальної плазми у неплодних чоловіків із надмірною масою тіла та ожирінням.
2. **Установа, автор:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра клінічної лабораторної діагностики факультету післядипломної освіти, Козопас Наталія Михайлівна, Максимюк Ганна Василівна.
3. **Джерело інформації:** Kozopas NM, Chornenka OI, Vorobets MZ, Lapovets LY, Maksymyuk HV. Body mass index and sperm quality: Is there a relationship? J Hum Reprod Sci 2020; 13:110-3 DOI:10.4103/jhrs.JHRS_15_20. (Scopus).
4. **Де впроваджено:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького; кафедра медичної біології, паразитології та генетики.
5. **Форма впровадження:** науково-навчальний процес кафедри (матеріали семінарів студентів).
6. **Ефективність впровадження:** ознайомлення студентів з особливостями спермограми та біохімічних параметрів спермальної плазми у неплодних чоловіків впливу на тлі надмірної маси тіла та ожиріння.
7. **Строки впровадження:** 2021 – 2022 н.р.

Відповідальний за впровадження
 Завідувач кафедри медичної біології,
 паразитології та генетики
 Львівського національного медичного
 університету імені Данила Галицького
 Професор, д.б.н.

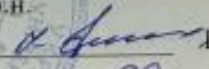
3. Д. Воробець

« 12 » 09 2022 р.

Додаток ДЗ

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
з науково-педагогічної роботи
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
доц. к.б.н.


 І. І. Солонинко

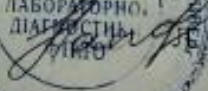
« 22 » 09 2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Вміст прозапальних цитокінів у спермоплазмі та якість еякуляту на тлі надмірної маси тіла та ожиріння.
2. **Установа, автор:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра клінічної лабораторної діагностики факультету післядипломної освіти, Козопас Наталія Михайлівна, Максимюк Ганна Василівна.
3. **Джерело інформації:** Kozopas NM, Boykiv ND, Dorofeyeva US, Fafula RV, Maksymyuk HV. Seminal plasma pro-inflammatory cytokines and semen quality in overweight and obese men. Riv Ital Med Lab 2021 Feb 03. DOI: 10.23736/S1825-859X.21.00086-4. (Scopus).
4. **Де впроваджено:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра клінічної лабораторної діагностики ФПДО.
5. **Форма впровадження:** матеріалілекцій, семінарів, практичних занять інтернів та курсантів.
6. **Ефективність впровадження:** поглиблення знань слухачів стосовно прозапального стану, як потенційної ланки, що пояснює вплив ожиріння на якість еякуляту у неплідних чоловіків.
7. **Строки впровадження:** 2021 н.р. – по теперішній час.

Відповідальний за впровадження
завідувач кафедри клінічної лабораторної
діагностики ФПДО
Львівського національного медичного
університету імені Данила Галицького
професор, д.м.н.

« 22 » 09 2022 р.



 С. Лаповець