

caused a shift in fluorescence intensity in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the hypothalamus from the nighttime to the daytime period.

The highest values of the density of c-Fos-positive neurons in the studied hypothalamic subnuclei were observed in rats maintained under lighting regimes 12.00L:12.00D and 00L:24.00D at 02:00 of observation.

Thus, the expression of the product of the activity of the immediate-early response gene c-fos – the c-Fos protein – is characterized by rhythmicity in the medial parvocellular subnuclei of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in rats. The production of the c-Fos protein undergoes significant changes under conditions of light deprivation. In particular, the concentration index of this protein during the daytime period of the experiment was 0.543 ± 0.0128 a.u. and was significantly higher than the control values.

Key words: paraventricular nucleus, hypothalamus, c-fos gene, c-Fos protein, light deprivation.

ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:

Fedoriak I. V.: <https://orcid.org/0009-0007-2462-8264>^{BD}

Bulyk R. Ye.: <https://orcid.org/0000-0003-0651-534X>^{EF}

Smetaniuk O. V.: <https://orcid.org/0000-0002-8985-2650>^A

Agranov O. S.: <https://orcid.org/0009-0008-7627-2359>^C

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest / Автори декларують відсутність конфлікту інтересів

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Bulyk Roman Yevgenovych / Булик Роман Євгенович

Bukovinian State Medical University / Буковинський державний медичний університет

Ukraine, 58002, Chernivtsi, 2 Teatralna Square / Україна, 58002, м. Чернівці, пл. Театральна 2

Tel.: +380950410043 / Тел.: +380950410043

E-mail: bulyk@bsmu.edu.ua

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

This article is distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution (CC-BY) License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited © All authors, 2026 / Ця стаття розповсюджується на умовах ліцензії **Creative Commons Attribution (CC-BY)**, яка дозволяє необмежене використання, поширення та відтворення в будь-якому форматі за умови належного цитування оригінальної роботи © Всі автори, 2026

Received 18.10.2025 / Стаття надійшла 18.10.2025 року
Accepted 03.03.2026 / Стаття прийнята до друку 03.03.2026 року
Published 27.03.2026 / Опубліковано 27.03.2026 року

DOI 10.29254/2077-4214-2026-1-180-380-388

UDC 573.6:577.21-076

Feskov O. M., Zhylkova Ye. S., Chumakova N. O., Feskova A. O., Yehunkova O. V.

REACTIVE OXYGEN SPECIES IN EJACULATE AFFECT EMBRYO DEVELOPMENT *IN VITRO* WHEN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES ARE USED

Centre of Human Reproduction “Clinic of Professor Feskov O.” (Kharkiv, Ukraine)

zhilkova@feskov.ua

Reactive oxygen species are a necessary condition for the maturation, existence and ability of spermatozoa to fertilize the oocyte. The excess of reactive oxygen species in semen can initiate pathological changes in sperm, causing oxidative damage to cell membranes, proteins and DNA. Currently, several scientific studies indicate that high levels of reactive oxygen species in the ejaculate are one of the causes of low male reproductive function. On the other hand, the measurement of reactive oxygen species is hampered by the lack of standardization, including the choice of controls and sample selection. The published data about the effects of oxidative stress on standard fertility sperm parameters (sperm motility, concentration and morphology) and on the integrity of sperm DNA in the ejaculate are controversial.

The aim of the present work was to investigate the effect of reactive oxygen species in ejaculate on standard microscopic sperm parameters and on the early embryo development in vitro in couples with male factor of infertility.

The development of the embryos from 26 married couples with combined factors of infertility was analyzed. Microscopic analysis of ejaculate was performed according to WHO recommendations from 2021. The level of reactive oxygen species (ROS) in ejaculate was analyzed using Oxisperm kits (Halotech DNA, Spain). Donor oocytes were fertilized by the method of intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Embryos that reached the blastocyst stage were evaluated by morphological characteristics according to the criteria of D. Gardner. Preimplantation genetic testing

of blastocysts for aneuploidy was performed using the next-generation sequencing method. Statistical hypotheses were tested using the *t*, chi-square and *rs* criteria at significance levels of 0.05 and 0.01.

The negative influence of the excess of reactive oxygen species in semen on the early embryo development *in vitro* is proved. The ROS-level in ejaculate in infertile patients are significantly higher comparing with the ROS-value for men with normal microscopic sperm parameters (2.4 ± 0.8 vs. 1.6 ± 0.6 $p < 0.05$). A significant negative correlation was found between sperm motility and paternal age ($rs = -0.54$, $p = 0.01795$). Total blastocyst formation rate for embryos *in vitro* was significantly lower in infertile patients, comparing with the mentioned index for embryos obtained from donor gametes (50.2% vs. 76.0%, $df = 1$, $\chi^2_{fact.} = 15.3173$, $p = 0.000157$). The strong negative correlation between the ROS-level and both total blastocysts formation rate and euploid blastocyst formation rate was demonstrated in infertile patients ($rs = -0.66$, $p = 0.00247$ and $rs = -0.65$, $p = 0.04034$, respectively).

Key words: reactive oxygen species, male infertility, blastocyst formation, aneuploidy, *in vitro* embryo development.

Connection of the publication with planned research work.

The present study is a part of research work "Determination of pre-treatment role for increasing the efficiency of cryopreservation and hypothermic storage of cellular structures with different levels of organization" (state registration number 0121U113329).

Introduction.

According to the literature, in European countries and in Ukraine, male factor is the cause of infertility in couples in more than 50% of cases [1]. Currently, several scientific studies indicate that high levels of reactive oxygen species (ROS) in the ejaculate are one of the causes of low male reproductive function. Reactive oxygen species are a necessary condition for the maturation, existence and ability of spermatozoa to fertilize the oocyte [2, 3]. The content of ROS at an optimal level is maintained by the antioxidant system. Oxidative stress arises from an imbalance between ROS production and antioxidant defense mechanisms. On the other hand, the measurement of reactive oxygen species is hampered by the lack of standardization, including the choice of controls and sample selection [4]. The published data about the effects of oxidative stress on standard fertility sperm parameters (sperm motility, concentration and morphology) and on the integrity of sperm DNA in the ejaculate are controversial. Indeed, most of the studies suggests that excess reactive oxygen species in semen can initiate pathological changes in sperm, causing oxidative damage to cell membranes, proteins and DNA [5]. The other ones showed no effect of ROS on sperm quality [6]. The question of whether the level of ROS in sperm affects human embryo development *in vitro* is still open. Some authors showed that high percentage of hydrogen peroxide in ejaculate reduced the good-quality day 3 embryo rate and the good-quality blastocyst rate [7]. On the other hand, Kuroda S. (2020) demonstrated that the reactive oxygen species level in semen did not reduce the fertilization rate in IVF cycles when the method of ICSI was used to fertilize the oocytes [8]. It remains relevant to study the question of whether the oxidative stress in sperm leads to the formation of aneuploid embryos when assisted reproductive technologies are used. For example, Burrue V. (2014) showed that high ROS-level in sperm can result in aneuploidy and failure to develop normally to the blastocyst stage [9]. From the other hand Yunghua Fu (2025) found that there was no significant difference in blastocysts' aneuploidy rates in groups of patients with different levels of ROS in sperm [10].

The aim of the study.

To investigate the effect of the level of reactive oxygen species in ejaculate on the standard microscopic parameters of the spermogram in men with decreased reproductive function indicators. To determine the effect of the level of reactive oxygen species in semen on early embryo development *in vitro* and on blastocyst ploidy, as well as to analyze the influence of paternal age on male reproductive function and embryo development *in vitro* fertilization cycles.

Object and research methods.

The collection of primary information and laboratory studies were conducted at the "Clinic of Professor Feskov O.M." (Kharkiv). The study was approved by the Ethics Committee of "Sana-Med" Ltd. (Center for Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O.M.") in accordance with Protocol No. 3 dated December 20, 2024. Each patient has signed an informed consent form regarding the use and processing of data.

During the period of January-August 2025, the development of the embryos from 26 married couples with combined factors of infertility was analyzed. Egg donation was used for all mentioned patients. The average paternal age in infertile group was 39.1 ± 4.1 years old. Donor oocytes were fertilized by the method of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) because of poor sperm parameters in men in mentioned group. The control group was considered separately: embryos were received using donor gametes.

A microscopic analysis of the ejaculate and the level of ROS in sperm were studied both for patients with spermatogenesis failures and for 25 sperm donors with average age 32.2 ± 3.5 years old. The effect of the reactive oxygen species level in semen on fertilization rates and blastocyst formation rates and blastocyst aneuploidy rates was studied in infertile group.

Microscopic analysis of ejaculate was performed according to WHO recommendations from 2021 [11]. The level of ROS in ejaculate was analyzed using Oxisperm kits (Halotech DNA, Spain). The assay is based on the ability of nitro blue tetrazolium and other molecules associated with oxidative stress to be converted by superoxide anions into a water-insoluble blue formazan crystal, which changes the color intensity in the reactive gel (from yellow to various levels of violet-blue). The result of the assay was determined by the color scale according to the color intensity. According to the manufacturer's grading, 4 levels of ROS were distinguished (levels 1 and 2 are low ROS exposure; level 3 is medium ROS exposure; level 4 is high ROS exposure) [12]. The principle of

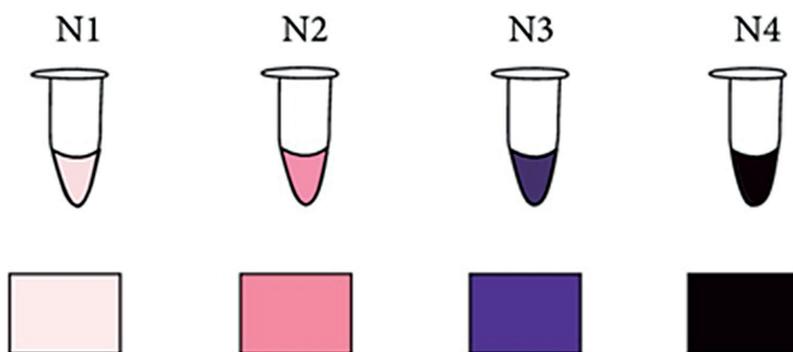


Figure 1 – Scheme for determining the level of ROS in the ejaculate using Oxisperm kits (Halotech DNA, Spain): N1, N2 – low exposure to ROS; N3 – average exposure to ROS; N4 – high exposure to ROS.

determining the level of ROS in ejaculate is schematically shown in figure 1.

Controlled ovulation stimulation (COS) of egg donors was performed using the ant-GnRH protocol. Fertilization of the obtained oocytes was done by ICSI technique. Embryo culture to the blastocyst stage was performed in GAIN medium Single-step (Austria) at a temperature of 36.9°C-37.1°C and a CO₂ content of 5.5%-5.7% [13]. Embryos that reached the blastocyst stage were evaluated by morphological characteristics of the intracellular mass (ICM) and trophectoderm (TE), according to the criteria of D. Gardner [14]. Preimplantation genetic testing of blastocysts for aneuploidy was performed using the next-generation sequencing method [15].

Comparison of average arithmetic means was carried out using the Student's t-test. To study the relationships between the features, the method of Spearman correlation analysis was used. Statistical hypotheses were tested using the t, chi-square and r_s criteria at significance levels of 0.05 and 0.01 [16]. The Apache Open Office 4.0.0 software package (Sana-Light Ltd., Sana-Med Ltd.) was used for calculation.

Research results and their discussion.

When studying the effect of paternal age on microscopic sperm parameters, a statistically significant negative correlation was found between sperm motility and the age of the patients ($r_s = -0.54$, $p=0.01795$). There was no correlation between paternal age and sperm concentration and a part of spermatozoa with normal morphology in ejaculate in studied group of infertile men (table 1). Their effect of paternal age on the ROS-level in ejaculate was not proved in examined group of infertile men. The study did not prove the effect of the level of reactive oxygen species in the ejaculate on sperm motility, concentration, and morphology in infertile patients ($p>0.05$). Nevertheless, it was found out that the ROS-level in ejaculate in infertile patients is significantly higher comparing with the ROS-value for sperm donors (2.4 ± 0.8 vs. 1.6 ± 0.6 ; $t_{empiric.}=3.3$, $t_{critic.}=2.797$ $p<0.05$, respectively).

Totally 317 mature MII donor oocytes were fertilized by the method of ICSI in infertile group of patients. In average there were 10.1 ± 2.1 MII donor eggs per patient. The fertilization rate in these patients was 72.9% (231 zygotes with two pronuclei). The total blastocysts formation rate (BFR) was 50.2% (116 blastocysts) in examined infertile group.

In the Control Group with using of donor male and female gametes, 93 mature MII oocytes were fertilized by ICSI. The fertilization rate in this group was 80.6% (75 zygotes with two pronuclei). The total BFR was 76.0% (57 blastocysts) respectively. There was no statistically significant difference between the fertilization rates in the infertile group and in a Control Group. On the other hand, the total blastocyst formation rate was significantly higher in the Control Group, comparing with the mentioned index for infertile patients (76.0% vs. 50.2%, $df=1$, $\chi^2_{fact.}=15.3173$, $p=0.000157$, respectively).

Such result confirmed the fact that the process of blastocyst formation depends on general quality of sperm [17]. Nevertheless, no correlation was found between microscopic sperm parameters and blastocyst formation rate in infertile group ($p>0.05$).

The relationship between reactive oxygen species in semen and the oocyte fertilization rate, total blastocysts formation rate (BFR) and euploid blastocyst formation rate (eBFR) was investigated in couples with male factor of infertility when the donor eggs were used. In total, preimplantation genetic testing was performed for 105 blastocysts. Biopsy was performed on the fifth day of culture for 63 embryos, and on the sixth day for 42 blas-

Table 1 – The correlation between paternal age and classical parameters of the spermogram in men with low reproductive function

Sperm parameter		Number of patients, N	Paternal age, years	r_s	p
Name of parameter	Average mean, $\bar{x} \pm m_x$				
Motility, %	46.5±11.2	26	39.1±4.1	-0.54	0.01795
Concentration, mln./mL	49.9±24.2	26	39.1±4.1	0.06	$p>0.05$
Normal sperm morphology, %	7.3±5.0	26	39.1±4.1	-0.16	$p>0.05$

Notes: p – significance level, r_s – Spearman coefficient.



Figure 2 – Blastocyst 5AA according to the D. K. Gardner classification in vitro, before the procedure of biopsy. Magnification: x250.

tocysts. A photo of a blastocyst before the biopsy procedure is shown in **figure 2**. The strong negative correlation between the ROS-level in sperm and both total blastocysts formation rate and euploid blastocyst formation rate was found out ($r_s = -0.66$, $p = 0.00247$ and $r_s = -0.65$, $p = 0.04034$, respectively). In examined group a high ROS-level did not lead to fertilization failure in ICSI. The results obtained are mentioned in **table 2**.

In this study, we analyzed the fertilization rate, total blastocysts formation rate, and euploid blastulation rate to assess the effects of ROS on embryo development. As there was not any correlation between high levels of reactive oxygen species in the ejaculate on sperm motility, concentration, and morphology in infertile patients, there could be suggested that there are some more deep mechanisms of the ROS-effects on male reproductive function resulted in early embryo development failures (total blastulation rate and euploid blastocyst formation rate). For example, some authors suggested that high amounts of ROS may impair mitochondrial function potentially causing sperm dysfunction and, consequently, infertility [18]. The next possible explanation for such a decreased developmental potential could involve sperm DNA integrity [19]. So further investigation to understand the influence of the mechanisms of reactive oxygen species in semen on male reproductive function are perspective.

Conclusions.

The influence of the reactive oxygen species level in semen on the early embryo development *in vitro* is proved. It was demonstrated a strong negative effect of high level of reactive oxygen species in ejaculate on total blastocysts formation rate ($r_s = -0.66$, $p = 0.00247$) and euploid blastocyst formation rate ($r_s = -0.65$, $p = 0.04034$) in couples with male factor of infertility. An excess of ROS-level in semen does not lead to fertilization failure in ICSI. No correlation was found between microscopic sperm parameters and early embryo development *in vitro* ($p > 0.05$). The ROS-level in ejacu-

Table 2 – Correlation between the level of reactive oxygen species in semen and standard *in vitro* fertilization parameters

In vitro fertilization parameters		Number of patients, N	ROS-level, $\bar{X} \pm m_x$	r_s	p
Name of parameter	Average mean, $\bar{X} \pm m_x$				
Total number of donor MII-oocytes, N	10.1±2.1	26	2.4±0.8	-	-
Fertilization rate,%	72.9±7.1	26	2.4±0.8	0.05	$p > 0.05$
Total blastocyst formation rate, %	50.2±14.9	26	2.4±0.8	-0.66	0.00247
Euploid blastocyst formation rate, %	11.6±7.7	26	2.4±0.8	-0.65	0.04034

Notes: p – significance level, r_s – Spearman coefficient.

late in infertile patients is significantly higher comparing with the ROS-value for men with normal microscopic sperm parameters (2.4±0.8 vs. 1.6±0.6; $t_{empiric} = 3.3$, $t_{critic} = 2.797$, $p < 0.05$). Paternal age negatively affects sperm motility ($r_s = -0.54$, $p = 0.01795$). The study did not prove the effect of high levels of reactive oxygen species in the ejaculate on sperm motility, concentration, and morphology in infertile patients ($p > 0.05$). In perspective ROS concentrations might become a preconception diagnostic test in infertile men.

Prospects for further research.

Currently, research data about the role of male reproductive function parameters in embryo development and the formation of aneuploid embryos are ambiguous. Among the various etiological factors contributing to male infertility, oxidative stress is perspective to study as a major player, profoundly impacting sperm function and overall reproductive outcomes. Among the physiological factors, oxidative stress could be considered as a key determinant of sperm dysfunction. Excessive ROS production damages the sperm membrane, proteins, and DNA, impairing sperm motility, viability, and the ability to fertilize an oocyte. Furthermore, oxidative stress could be linked to DNA fragmentation, which has been associated with a higher incidence of infertility and poor pregnancy outcomes.

DOI 10.29254/2077-4214-2026-1-180-380-388

УДК 573.6:577.21-076

Феськов О. М., Жилкова Є. С., Чумакова Н. О., Феськова А. О., Єгунькова О. В.

РЕАКТИВНІ ФОРМИ КИСНЮ В ЕЯКУЛЯТІ ВПЛИВАЮТЬ НА РОЗВИТОК ЕМБРІОНА *IN VITRO* ПРИ ВИКОРИСТАННІ ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Центр Репродукції Людини «Клініка професора Феськова О.М.» (м. Харків, Україна)

zhilkova@feskov.ua

Активні форми кисню є необхідною умовою для дозрівання, існування та здатності сперматозоїдів запліднювати ооцит. Надлишок активних форм кисню в спермі може ініціювати патологічні зміни в сперматозоїдах, спричиняючи оксидативне пошкодження клітинних мембран, білків та ДНК. Наразі ряд наукових досліджень показують, що збільшення рівня активних форм кисню в еякуляті є однією з причин зниження показників чоловічої репродуктивної функції. З іншого боку, вимірювання активних форм кисню ускладнюється через відсутність стандартизації проведення даного аналізу, включаючи вибір контролів та відбір зразків. Опубліковані дані про вплив оксидативного стресу на стандартні параметри спермограми (рухливість, концентрація та морфологія сперматозоїдів) та на цілісність ДНК сперматозоїдів в еякуляті є суперечливими.

Метою даної роботи було дослідити вплив активних форм кисню в еякуляті на стандартні мікроскопічні параметри спермограми та на ранній розвиток ембріона *in vitro* для подружніх пар з чоловічим фактором безпліддя.

Було проаналізовано розвиток ембріонів *in vitro* для 26 подружніх пар з комбінованими факторами безпліддя. Мікроскопічний аналіз еякуляту проведено відповідно до рекомендацій ВООЗ від 2021 року. Рівень активних форм кисню (АФК) в еякуляті визначено за допомогою наборів Oxisperm (Halotech DNA, Іспанія). Запліднення донорських ооцитів виконано методом інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів (ІКСІ). Ембріони, що досягли стадії бластоцисти, оцінювали за морфологічними характеристиками згідно з критеріями Д. Гарднера. Преімплантаційне генетичне тестування бластоцист на анеуплоїдії проведено методом секвенування наступного покоління. Статистичні гіпотези перевірені за рівнів значущості 0,05 та 0,01.

Доведено негативний вплив надлишку активних форм кисню в спермі на ранній розвиток ембріонів *in vitro*. Вміст активних форм кисню в еякуляті у безплідних пацієнтів значно вищий порівняно зі значенням АФК у чоловіків з нормальними мікроскопічними параметрами сперми ($2,4 \pm 0,8$ проти $1,6 \pm 0,6$, $p < 0,05$). Показано негативний вплив вікового фактору на рухливість сперматозоїдів ($rs = -0,54$, $p = 0,01795$). Загальна частота формування бластоцист *in vitro* значно нижча серед безплідних пацієнтів у порівнянні із зазначеним показником для ембріонів, отриманих від донорських гамет (50,2% проти 76,0%, $df = 1$, $\chi^2_{\text{факт.}} = 15,3173$, $p = 0,000157$). Продемонстровано негативну кореляцію між рівнем активних форм кисню в еякуляті та як і загальною частотою формування бластоцист, так і з частотою формування еуплоїдних бластоцист у чоловіків зі зниженням показників фертильності ($rs = -0,66$, $p = 0,00247$ та $rs = -0,65$, $p = 0,04034$ відповідно).

Ключові слова: активні форми кисню, чоловіче безпліддя, формування бластоцист, анеуплоїдія, розвиток ембріонів *in vitro*.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дана робота є частиною НДР «Визначення ролі попередньої обробки для підвищення ефективності кріоконсервування і гіпотермічного зберігання клітинних структур різного рівня організації» (номер державної реєстрації 0121U113329).

Вступ.

Згідно з літературними даними, у європейських країнах та в Україні чоловічий фактор є причиною ненастання вагітності практично у 50% подружніх пар, що стикаються з проблемою безпліддя [1]. Наразі ряд наукових досліджень вказує на те, що високий рівень активних форм кисню (АФК) в еякуляті є однією з причин зниження показників чоловічої репродуктивної функції. Активні форми кисню є необхідною умовою для дозрівання, існування та здатності сперматозоїдів запліднювати ооцит [2, 3]. Вміст АФК на оптимальному рівні підтримується антиоксидантною системою. Окислювальний стрес виникає через дисбаланс між продукцією АФК та механізмами антиоксидантного захисту. З іншого боку, вимірювання рівня активних форм кисню в еякуляті ускладнюється через відсутність стандартизації, включаючи вибір контролів та відбір зразків [4]. Опубліковані дані про вплив окисдативного стресу на стандартні параметри спермограми (рухливість, концентрація та морфологія сперматозоїдів) та на цілісність ДНК сперматозоїдів в еякуляті є суперечливими. Дійсно, більшість досліджень свідчать про те, що надлишок активних форм кисню в спермі може ініціювати патологічні зміни в сперматозоїдах, спричиняючи окисне пошкодження клітинних мембран, білків та ДНК [5]. Інші дослідження не показали впливу активних форм кисню на якість сперми [6]. Питання про те, чи впливає рівень АФК у спермі на розвиток ембріона людини *in vitro*, залишається відкритим. У результатах, наведених у своїх роботах разом авторів, було показано, що збільшення активних форм кисню в еякуляті веде до зниження частки ембріонів високої морфологічної якості на стадії дроблення на 3-й день культивування та негативно впливає на частоту формування бластоцист з нормальною морфологією [7]. З іншого боку, Kuroda S. (2020) продемонстрував,

що рівень активних форм кисню в спермі не знижує рівень запліднення в циклах екстракорпорального запліднення (ЕКЗ), за умови використання метода ІКСІ для запліднення ооцитів [8]. Залишається актуальним вивчення питання про те, чи призводить окисдативний стрес сперматозоїдів до утворення анеуплоїдних ембріонів при використанні допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). Наприклад, Burrell V. (2014) показав, що високий рівень АФК у спермі може призвести до формування анеуплоїдного ембріона та до нездатності ембріонів нормально розвиватися до стадії бластоцисти [9]. З іншого боку, Yunghua Fu (2025) виявив, що не було суттєвої різниці у частоті формування анеуплоїдних бластоцист у групах пацієнтів з різним рівнем АФК в еякуляті [10].

Мета дослідження.

Дослідити вплив рівня активних форм кисню в еякуляті на стандартні мікроскопічні параметри спермограми у чоловіків зі зниженням показників репродуктивної функції. Визначити вплив рівня активних форм кисню в спермі на ранній розвиток ембріона *in vitro* та на плоїдність бластоцист, а також проаналізувати вплив віку батька на чоловічу репродуктивну функцію та розвиток ембріона в циклах екстракорпорального запліднення.

Об'єкт і методи дослідження.

Збір первинної інформації та лабораторні дослідження проводилися в «Клініці професора Феськова О.М.» (м. Харків). Дослідження було схвалено Етичним комітетом ТОВ «Сана-Мед» (Центр репродукції людини «Клініка професора Феськова О.М.») відповідно до Протоколу № 3 від 20 грудня 2024 року. Кожним пацієнтом підписана Інформована згода щодо використання та обробки даних.

Протягом періоду січень-серпень 2025 року було проаналізовано розвиток ембріонів 26 подружніх пар з комбінованими факторами безпліддя. Донорські ооцити були використані у зазначеній групі пацієнтів. Середній вік чоловіків у даній групі становив $39,1 \pm 4,1$ років. Донорські ооцити запліднювали методом інтрацитоплазматичної ін'єкції сперматозоїдів (ІКСІ), беручи до уваги значне зниження параметрів спермограми у пацієнтів. Контрольну групу розгля-

дали окремо: ембріони були отримані виключно із використанням донорських гамет.

Мікроскопічний аналіз еякуляту та рівень активних форм кисню у спермі досліджували як для пацієнтів з порушеннями сперматогенезу, так і у 25 донорів сперми середнім віком $32,2 \pm 3,5$ років. Для групи з безпліддям було проаналізовано вплив рівня АФК в еякуляті на частоту запліднення, загальну частоту формування бластоцист та частоту формування еуплоїдних бластоцист.

Мікроскопічний аналіз еякуляту проведено відповідно до рекомендацій ВООЗ від 2021 року [11]. Рівень активних форм кисню в еякуляті визначено за допомогою наборів Oxisperm (Halotech DNA, Іспанія). Аналіз базується на здатності нітро-синього тетразолію та інших молекул, пов'язаних з оксидативним стресом, перетворюватися супероксидними аніонами на нерозчинний у воді кристал синього формаза-ну, що змінює інтенсивність кольору в реактивному гелі (від жовтого до різних рівнів фіолетово-синього). Результат аналізу визначали за кольоровою шкалою відповідно до інтенсивності кольору. Згідно з класифікацією виробника, було виділено 4 рівні АФК (рівні 1 та 2 – низький рівень впливу АФК; рівень 3 – середній рівень впливу АФК; рівень 4 – високий рівень впливу АФК) [12]. Принцип визначення рівня АФК в еякуляті схематично показано на **рисунку 1**.

У рамках програм екстракорпорального запліднення для контрольованої стимуляції овуляції (КСО) донорів ооцитів застосовували протокол з ант-ГнРГ. Запліднення отриманих ооцитів проводили методом ІКСІ. Культивування ембріонів до стадії бластоцисти проводили у середовищі GAIN Single-step (Австрія) за температури $36,9^{\circ}\text{C}$ - $37,1^{\circ}\text{C}$ та вмісту CO_2 $5,5\%$ - $5,7\%$ [13]. Ембріони, що досягли стадії бластоцисти, оцінювали за морфологічними характеристиками внутрішньоклітинної маси (ВКМ) та трофктодерми (ТЕ) згідно з критеріями Д. Гарднера [14]. Преімплантаційне генетичне тестування бластоцист на анеуплоїдію проводили за методом секвенування наступного покоління [15].

Порівняння середніх арифметичних значень проводилося за допомогою t-критерію Стьюдента. Для вивчення зв'язків між ознаками використовувалася метод кореляційного аналізу Спірмена. Статистичні гіпотези перевірялися за допомогою t-критерію, критерію χ^2 та r_s за рівнів значущості 0,05 та 0,01 [16]. Для розрахунку використовувалася програмний пакет Apache Open Office 4.0.0 (ТОВ «Сана-Лайт», ТОВ «Сана-Мед»).

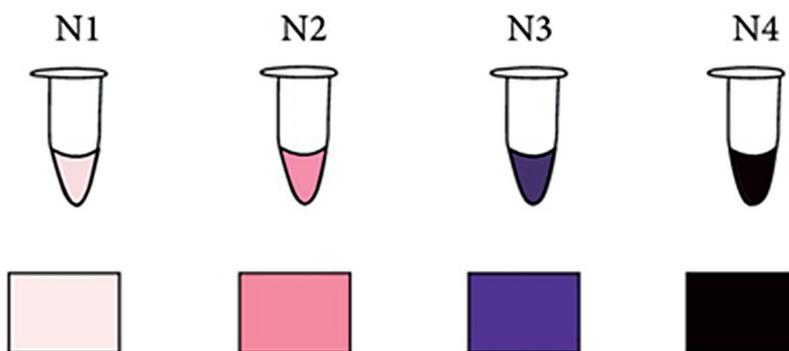
Результати дослідження та їх обговорення.

При вивченні впливу чоловічого віку на мікроскопічні параметри сперми було встановлено статистично значущу негативну кореляцію між рухливістю сперматозоїдів та віком пацієнтів ($r_s = -0.54$, $p=0.01795$). Не було виявлено кореляції між віком та концентрацією сперматозоїдів та часткою сперматозоїдів з нормальною морфологією в еякуляті у до-

сліджуваній групі безплідних чоловіків (**таблиця 1**). Зв'язок віку чоловіка з рівнем АФК в еякуляті у даному дослідженні не встановлений. У розглянутій групі пацієнтів не було доведено впливу рівня активних форм кисню в еякуляті на рухливість, концентрацію та морфологію сперматозоїдів ($p>0,05$). Тим не менш, було виявлено, що рівень АФК в еякуляті у чоловіків з безпліддям значно вищий порівняно зі значенням АФК у донорів сперми ($2,4 \pm 0,8$ проти $1,6 \pm 0,6$; $t_{\text{темп}}=3,3$, $t_{\text{критич}}=2,797$, $p<0,05$ відповідно).

У результаті проведення КСО, серед пацієнтів з безпліддям загалом метод запліднення ІКСІ було застосовано для 317 зрілих донорських ооцитів на стадії МІІ.В середньому на одну пацієнтку з досліджуваної групи було використано $10,1 \pm 2,1$ донорських ооцита на стадії МІІ. Частота запліднення у групі з безпліддям становла $72,9\%$ (231 зигота з двома пронуклеусами). Загальна частота формування бластоцист (ЧФБ) у зазначеній групі становила $50,2\%$ (116 бластоцист).

У контрольній групі з використанням донорських чоловічих та жіночих гамет метод ІКСІ було застосовано з метою запліднення 93 зрілих ооцитів на ста-



Рисунку 1 – Схема визначення рівня активних форм кисню (АФК) в еякуляті за допомогою наборів Oxisperm (Halotech DNA, Іспанія): N1, N2 – низький рівень впливу АФК; N3 – середній рівень впливу АФК; N4 – високий рівень впливу АФК.

дії МІІ. Частота запліднення в цій групі склала $80,6\%$ (75 зигот з двома пронуклеусами). Загальна частота формування бластоцист становила $76,0\%$ (57 бластоцист), відповідно. Не було виявлено статистично значущої різниці між частотою запліднення серед пацієнтів з безпліддям та в контрольній групі. З іншого боку, загальна частота формування бластоцист була значно вища у контрольній групі у порівнянні із зазначеним показником для безплідних пацієнтів ($76,0\%$ проти $50,2\%$, $df=1$, $\chi^2_{\text{факт}}=15,3173$, $p=0,000157$, відповідно). Такий результат підтверджує той факт, що процес утворення бластоцист залежить від загальної якості сперми [17]. Проте, кореляції між мі-

Таблиця 1 – Кореляція між віком та класичними параметрами спермограми серед чоловіків зі зниженням показників репродуктивної функцією

Sperm parameter		Кількість пацієнтів N	Вік, роки	r_s	p
Назва параметру	Середнє значення, $\bar{x} \pm m_x$				
Рухливість, %	46.5 ± 11.2	26	39.1 ± 4.1	-0.54	0.01795
Концентрація, млн./мл	49.9 ± 24.2	26	39.1 ± 4.1	0.06	$p>0.05$
Нормальна морфологія сперматозоїдів, %	7.3 ± 5.0	26	39.1 ± 4.1	-0.16	$p>0.05$

Примітки: p – рівень значущості, r_s – коефіцієнт Спірмена.



Рисунок 2 – Бластициста 5AA за класифікацією Д. К. Гарднера *in vitro*, перед процедурою біопсії. Збільшення: x250.

Таблиця 2 – Кореляція між рівнем активних форм кисню в еякуляті та стандартними параметрами циклу екстракорпорального запліднення

In vitro параметри		Кількість пацієнтів, N	Рівень АФК, $\bar{X} \pm m_x$	r_s	p
Назва параметру	Середнє значення, $\bar{X} \pm m_x$				
Загальна кількість донорських МІІ-ооцитів, N	10.1±2.1	26	2.4±0.8	-	-
Частота запліднення, %	72.9±7.1	26	2.4±0.8	0.05	$p>0.05$
Загальна частота формування бластоцист, %	50.2±14.9	26	2.4±0.8	-0.66	0.00247
Частота формування еуплоїдних бластоцист, %	11.6±7.7	26	2.4±0.8	-0.65	0.04034

Примітки: p – рівень значущості, r_s – коефіцієнт Спірмена.

кроскопічними параметрами сперми та частотою формування бластоцист у даному дослідженні не виявлено ($p>0,05$).

Досліджено зв'язок між рівнем АФК в еякуляті та частотою запліднення ооцитів, загальною частотою формування бластоцист та частотою формування еуплоїдних бластоцист у пар з чоловічим фактором безпліддя при використанні донорських яйцеклітин. Загалом, преімплантаційне генетичне тестування було проведено для 105 бластоцист. Біопсію проводили на п'ятий день культивування для 63 ембріонів та на шостий день для 42 бластоцист. Фото бластоцисти перед процедурою біопсії наведено на **рисунку 2**. Було виявлено значущу негативну кореляцію між рівнем АФК у спермі та як загальною ЧФБ, так і частотою формування еуплоїдних бластоцист ($r_s=-0,66$, $p=0,00247$ та $r_s=-0,65$, $p=0,04034$, відповідно). У досліджуваній групі не було виявлено впливу підвищення рівня АФК в еякуляті на частоту запліднення при проведенні ІКСІ. Отримані результати наведено в **таблиці 2**.

У даному дослідженні було оцінено вплив рівня активних форм кисню в еякуляті на ранній розвиток ембріона *in vitro*. Оскільки не було виявлено жодної кореляції між високим рівнем АФК в еякуляті та

рухливістю, концентрацією та морфологією сперматозоїдів у пацієнтів з безпліддям, можна припустити, що існують деякі глибші механізми впливу АФК на чоловічу репродуктивну функцію, що призводять до ранніх порушень розвитку ембріона (загальний рівень бластуляції та рівень утворення еуплоїдних бластоцист). Наприклад, деякі автори припустили, що висока кількість АФК може негативно впливати на функцію мітохондрій, потенційно спричиняючи дисфункцію сперматозоїдів і, як наслідок, безпліддя [18]. Наступним можливим поясненням такого зниженого потенціалу розвитку може бути порушення цілісності ДНК сперматозоїдів [19]. Тому подальші дослідження для розуміння впливу механізмів активних форм кисню в спермі на чоловічу репродуктивну функцію є перспективними.

Висновки.

Доведено вплив рівня активних форм кисню в еякуляті на ранній розвиток ембріонів *in vitro*. Продемонстровано, що підвищення рівня активних форм кисню в еякуляті веде до зниження загальної частоти формування бластоцист ($r_s=-0,66$, $p=0,00247$) та зменшує частоту формування еуплоїдних бластоцист ($r_s=-0,65$, $p=0,04034$) у циклах екстракорпорального запліднення у пар з чоловічим фактором безпліддя. Надлишок рівня активних форм кисню в спермі не впливає на частоту запліднення при проведенні ІКСІ ($p>0,05$). Не виявлено кореляції між мікроскопічними параметрами спермограми та раннім розвитком ембріонів *in vitro* ($p>0,05$). Рівень активних форм кисню в еякуляті у пацієнтів з безпліддям значно вищий порівняно зі значенням АФК у чоловіків з нормальними мікроскопічними параметрами спермограми ($2,4\pm0,8$ проти $1,6\pm0,6$; $t_{\text{темп}}=3,3$, $t_{\text{критич}}=2,797$, $p<0,05$). Показано, що збільшення чоловічого віку негативно впливає на рухливість сперматозоїдів ($r_s=-0,54$, $p=0,01795$). У даному дослідженні не було доведено впливу високого рівня активних форм кисню в еякуляті на рухливість, концентрацію та морфологію сперматозоїдів у пацієнтів з безпліддям ($p>0,05$). У перспективі визначення концентрації активних форм кисню в еякуляті може стати діагностичним тестом перед зачаттям у чоловіків з безпліддям.

Перспективи подальших досліджень.

Наразі дані досліджень щодо ролі параметрів чоловічої репродуктивної функції у ранньому ембріогенезі та формуванні анеуплоїдних ембріонів є неоднозначними. Серед різних етіологічних факторів, що сприяють чоловічому безпліддю, оксидативний стрес є перспективним для вивчення як основний фактор, який суттєво впливає на функцію сперматозоїдів та загальні репродуктивні результати. Серед фізіологічних факторів оксидативний стрес можна розглядати як ключовий фактор дисфункції сперматозоїдів. Надмірне вироблення активних форм кисню пошкоджує мембрану сперматозоїдів, білки та ДНК, порушуючи рухливість, життєздатність сперматозоїдів та здатність запліднювати ооцит. Крім того, високий рівень АФК в еякуляті може бути однією з причин фрагментацією ДНК сперматозоїдів, що можна розглядати, як одну з причин чоловічого безпліддя.

References / Література

- Mazzilli R, Rucci C, Vaiarelli A, Cimadomo D, Ubaldi FM, Foresta C, et al. Male factor infertility and assisted reproductive technologies: indications, minimum access criteria and outcomes. *J Endocrinol Invest*. 2023;46(6):1079-1085. DOI: [10.1007/s40618-022-02000-4](https://doi.org/10.1007/s40618-022-02000-4).
- Mannucci A, Argento FR, Fini E, Coccia ME, Taddei N, Becatti M, et al. The Impact of Oxidative Stress in Male Infertility. *Front Mol Biosci*. 2022;8:799294. DOI: [10.3389/fmolb.2021.799294](https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.799294).
- Wagner H, Cheng J, Ko Edmund Y. Role of reactive oxygen species in male infertility: An updated review of literature. *Arab J Urol*. 2018;16(1):35-43. DOI: [10.1016/j.aju.2017.11.001](https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.11.001).
- Parekatil SJ, Esteves SC, Agarwal A, editors. Male infertility. Switzerland: Springer; 2020. Chapter, Apoptosis and male infertility; p. 479-486.
- Bisht S, Dada R. Oxidative stress: Major executioner in disease pathology, role in sperm DNA damage and preventative strategies. *Frontiers in Bioscience (Schol Ed)*. 2017;9:420-447.
- O'Flaherty C. Reactive Oxygen Species and Male Fertility. *Antioxidants*. 2020;9(4):287. DOI: [10.3390/antiox9040287](https://doi.org/10.3390/antiox9040287).
- Liu J, Zhu K, Xu S, Tu W, Lin X, Su Y, et al. Double-edged sword: effects of human sperm reactive oxygen species on embryo development in IVF cycles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2023 4;21(1):1. DOI: [10.1186/s12958-022-01053-7](https://doi.org/10.1186/s12958-022-01053-7).
- Kuroda S, Takeshima T, Takeshima K, Usui K, Yasuda K, Sanjo H, et al. Early and late paternal effects of reactive oxygen species in semen on embryo development after intracytoplasmic sperm injection. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2020;66(2):122-128. DOI: [10.1080/19396368.2020.1720865](https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1720865).
- Burrue V, Klooster K, Barker C. Abnormal Early Cleavage Events Predict Early Embryo Demise: Sperm Oxidative Stress and Early Abnormal Cleavage. *Sci Rep*. 2014;4:6598. DOI: [10.1038/srep06598](https://doi.org/10.1038/srep06598).
- Yunghua F, Jianying H, Jie W, Lin Q, Wen O, Ximeng A, et al. Effect of sperm swim – up vs density gradient centrifugation on embryo aneuploidy detected by non-invasive chromosomal screening in conventional IVF. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2025;312:114545. DOI: [10.1016/j.ejogrb.2025.114545](https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2025.114545).
- Chung E, Atmoko W, Saleh R, Shah R, Agarwal A. Sixth edition of the World Health Organization laboratory manual of semen analysis: Updates and essential take away for busy clinicians. *Arab Journal of Urology*. 2024;22(2):71-74. DOI: [10.1080/20905998.2023.2298048](https://doi.org/10.1080/20905998.2023.2298048).
- Castleton PE, Deluao JC, Sharkey DJ, McPherson NO. Measuring Reactive Oxygen Species in Semen for Male Preconception Care: A Scientist Perspective. *Antioxidants (Basel)*. 2022;11(2):264. DOI: [10.3390/antiox11020264](https://doi.org/10.3390/antiox11020264).
- Gruber I, Klein M. Embryo culture media for human IVF: which possibilities exist? *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2011;12(2):110-117. DOI: [10.5152/jtgg.2011.25](https://doi.org/10.5152/jtgg.2011.25).
- Gardner DK, Lane M, Stevens J. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2000;73:1155-1158. DOI: [10.1016/S0015-0282\(00\)00518-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(00)00518-5).
- Doroftei B, Ilie O, Anton N, Armeanu T, Ilea C. A Mini-Review Regarding the Clinical Outcomes of In Vitro Fertilization (IVF) Following Pre-Implantation Genetic Testing (PGT)-Next Generation Sequencing (NGS) Approach. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(8):1911. DOI: [10.3390/diagnostics.12081911](https://doi.org/10.3390/diagnostics.12081911).
- Petrie A, Sabin C. *Medical Statistics at a Glance*. Winnipeg: Blackwell Science; 2000. 157 p.
- Piccolomini MM, Bonetti TC, Motta E, Serafini PC, Alegretti JR. How general semen quality influences the blastocyst formation rate: Analysis of 4205 IVF cycles. *JBRA Assist Reprod*. 2018;22(2):89-94. DOI: [10.5935/1518-0557.20180022](https://doi.org/10.5935/1518-0557.20180022).
- Durairajanayagam D, Singh D, Agarwal A, Henkel R. Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction. *Andrologia*. 2021;53:e13666.
- Kumaresan A, Das Gupta M, Datta TK, Morrell JM. Sperm DNA Integrity and Male Fertility in Farm animals: a review. *Front Vet Sci*. 2020;7:321.

РЕАКТИВНІ ФОРМИ КИСНЮ В ЕЯКУЛЯТІ ВПЛИВАЮТЬ НА РОЗВИТОК ЕМБРІОНА *IN VITRO* ПРИ ВИКОРИСТАННІ ДОПОМІЖНИХ РЕПРОДУКТИВНИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Феськов О. М., Жилкова Є. С., Чумакова Н. О., Феськова А. О., Єгунькова О. В.

Резюме. Активні форми кисню є необхідною умовою для дозрівання, існування та здатності сперматозоїдів запліднювати ооцит. Надлишок активних форм кисню в спермі може ініціювати патологічні зміни в сперматозоїдах, спричиняючи оксидативне пошкодження клітинних мембран, білків та ДНК. Опубліковані дані про вплив оксидативного стресу на стандартні параметри фертильності сперматозоїдів (рухливість, концентрацію та морфологію сперматозоїдів) та на цілісність ДНК сперматозоїдів в еякуляті є суперечливими. Наразі результати більшості проведених раніше наукових досліджень вказують на те, що високий рівень активних форм кисню (АФК) в еякуляті є однією з причин зниження параметрів чоловічої репродуктивної функції. У даній роботі було досліджено ефект рівня АФК в еякуляті на стандартні мікроскопічні параметри спермограми у чоловіків зі зниженням репродуктивної функції. Було перевірено вплив рівня активних форм кисню в спермі на ранній розвиток ембріонів *in vitro* у подружнім пар з чоловічим фактором безпліддя. Проаналізовано вплив вікового фактора на чоловічу репродуктивну функцію та розвиток ембріонів у циклах екстракорпорального запліднення. Було продемонстровано значний негативний вплив високого рівня активних форм кисню в еякуляті на загальну частоту формування бластоцист ($r_s = -0,66$, $p = 0,00247$) та на частоту формування еуплоїдних бластоцист ($r_s = -0,65$, $p = 0,04034$) у пар з чоловічим фактором безпліддя. Високий рівень активних форм кисню не веде до зниження частоти запліднення при використанні метода ІКСІ. Рівень активних форм кисню у безплідних пацієнтів значно вищий порівняно зі значенням АФК у чоловіків з нормальними мікроскопічними параметрами спермограми ($2,4 \pm 0,8$ проти $1,6 \pm 0,6$; $t_{\text{емп.}} = 3,3$, $t_{\text{критич.}} = 2,797$, $p < 0,05$). Чоловічий вік негативно впливає на рухливість сперматозоїдів ($r_s = -0,54$, $p = 0,01795$). У даному дослідженні не було доведено впливу високого рівня активних форм кисню в еякуляті на рухливість, концентрацію та морфологію сперматозоїдів у безплідних пацієнтів ($p > 0,05$). У перспективі визначення концентрації АФК може стати діагностичним тестом для чоловіків перед проведенням циклу екстракорпорального запліднення. Вимірювання активних форм кисню ускладнюється за відсутності стандартизації, включаючи вибір контрольних груп та відбір зразків.

Ключові слова: активні форми кисню, чоловіче безпліддя, формування бластоцист, анеуплоїдія, розвиток ембріонів *in vitro*.

REACTIVE OXYGEN SPECIES IN EJACULATE AFFECT EMBRYO DEVELOPMENT *IN VITRO* WHEN ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES ARE USED

Feskov O. M., Zhylkova Ye. S., Chumakova N. O., Feskova A. O., Yehunkova O. V.

Abstract. Reactive oxygen species are a necessary condition for the maturation, existence and ability of spermatozoa to fertilize the oocyte. The excess of reactive oxygen species in semen can initiate pathological changes in sperm, causing oxidative damage to cell membranes, proteins and DNA. The published data about the effects of oxidative stress on standard fertility sperm parameters (sperm motility, concentration and morphology) and on the integrity of sperm DNA in the ejaculate are controversial. Currently, several scientific studies indicate that high levels of reactive oxygen species (ROS) in the ejaculate are one of the causes of low male reproductive function. In present study the effect of ROS-level in ejaculate on standard microscopic parameters of the spermogram in men with low reproductive function was investigated. The influence of the reactive oxygen species level in semen on the early embryo development *in vitro* was studied in couples with male factor of infertility. The influence of paternal age on male reproductive function and embryo development in *in vitro* fertilization cycles was analyzed. It was demonstrated a strong negative effect of high level of reactive oxygen species in ejaculate on total blastocysts formation rate ($r_s = -0.66$, $p = 0.00247$) and euploid blastocyst formation rate ($r_s = -0.65$, $p = 0.04034$) in couples with male factor of infertility. A high ROS-level does not lead to fertilization failure in ICSI. The ROS-level in infertile patients is significantly higher comparing with the ROS-value for men with normal microscopic sperm parameters (2.4 ± 0.8 vs. 1.6 ± 0.6 ; $t_{\text{empiric}} = 3.3$, $t_{\text{critic}} = 2.797$, $p < 0.05$). Paternal age negatively affects sperm motility ($r_s = -0.54$, $p = 0.01795$). The study did not prove the effect of high levels of reactive oxygen species in the ejaculate on sperm motility, concentration, and morphology in infertile patients ($p > 0.05$). In perspective ROS concentrations might become a preconception diagnostic test in men. The measurement of reactive oxygen species is hampered by the lack of standardization, including the choice of controls and sample selection.

Key words: reactive oxygen species, male infertility, blastocyst formation, aneuploidy, *in vitro* embryo development.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Feskov O. M.: <https://orcid.org/0000-0003-3626-0229>^{EF}Zhylkova Ye. S.: <https://orcid.org/0000-0002-5706-3577>^{ABCD}Chumakova N. O.: <https://orcid.org/0009-0000-1070-7702>^BFeskova A. O.: <https://orcid.org/0009-0005-6457-0787>^BYehunkova O. V.: <https://orcid.org/0000-0003-4996-644X>^B

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest. / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Zhylkova Yevheniia Stanislavivna / Жилкова Євгенія Станіславівна

Centre of Human Reproduction "Clinic of Professor Feskov O." / Центр Репродукції Людини «Клініка професора Феськова О.М.»

Ukraine. 61098, Kharkiv, 15 Kholodnohirskaya str. / Адреса: Україна, 61098, м. Харків, вул. Холодногірська 15

Tel.: 0667651055 / Тел.: 0667651055

E-mail: zhilkova@feskov.ua

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

This article is distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution (CC-BY) License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited © All authors, 2026 / Ця стаття розповсюджується на умовах ліцензії **Creative Commons Attribution (CC-BY)**, яка дозволяє необмежене використання, поширення та відтворення в будь-якому форматі за умови належного цитування оригінальної роботи © Всі автори, 2026

Received 19.10.2025 / Стаття надійшла 19.10.2025 року
Accepted 04.03.2026 / Стаття прийнята до друку 04.03.2026 року
Published 27.03.2026 / Опубліковано 27.03.2026 року