



## Как сохранить качество сперматозоидов при обработке в циклах вспомогательных репродуктивных технологий? Температурный фактор

А.В. Зобова, Н.П. Макарова

Отделение вспомогательных технологий в лечении бесплодия ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва

Контакты: Анастасия Валерьевна Зобова [zoana2011@gmail.com](mailto:zoana2011@gmail.com)

В связи с широким распространением вспомогательных репродуктивных технологий важно обеспечение оптимальных условий для поддержания термотолерантности сперматозоидов. Между качеством сперматозоидов и температурой хранения образцов спермы существует прямая корреляция, поэтому для сохранения оплодотворяющей способности сперматозоидов *in vitro* требуется поддержание адекватной температуры. Однако температура, при которой функциональные характеристики сперматозоидов после эякуляции сохраняются наилучшим образом, до сих пор остается предметом множества дискуссий, а сведения об оптимальных для инкубации спермы температурных условиях достаточно противоречивы. В подавляющем большинстве публикаций сообщается о повреждающем влиянии чрезмерного нагрева на качество спермы. Однако инкубация образцов обработанной спермы в таких температурных условиях по-прежнему применяется на практике во многих эмбриологических лабораториях. Грамотный подход к подбору условий обработки и хранения спермы перед ее использованием для искусственного оплодотворения, учитывающий температурный фактор, позволит улучшить такие функциональные характеристики сперматозоидов, как их подвижность, морфология и оплодотворяющая способность.

В представленном обзоре проанализированы современные данные о зависимости качества спермы от температуры инкубирования перед проведением процедуры искусственного оплодотворения.

**Ключевые слова:** сперматозоид, термотолерантность, обработка эякулята, экстракорпоральное оплодотворение, мужское бесплодие

### How to maintain the sperm quality during the semen processing in assisted reproductive technology? The temperature factor

A.V. Zobova, N.P. Makarova

Department of Assisted Technologies in Treatment of Infertility, V.I. Kulakov Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia, Moscow

In connection with broad distribution of auxiliary reproductive technologies, it is important to secure optimal conditions for keeping thermal tolerance of sperm cells. There is direct correlation between the quality of sperm cells and sperm samples storage temperature, that is why support of adequate temperature is required to keep the fertilizing capacity of sperm *in vitro*. However, the temperature at which sperm cells keep their functional characteristics after ejaculation in the best way is still the subject of many discussions, and information on the temperature conditions that are the best to incubate sperm is rather contradictory. Vast majority of publications report the damaging effect of excessive heating on the sperm quality. However, incubation of samples of treated sperm in such temperature conditions is still practiced in many embryology laboratories. A literate approach to the selection of conditions of treatment and storage of sperm prior to its usage for which takes into account the temperature factor will improve functional characteristics of sperm cells such as their agility, morphology, and fertilizing capacity.

The review presented provides analysis of modern data of dependency of the quality of sperm on the incubation temperature prior to performance of the artificial insemination procedure.

**Key words:** sperm cell, thermal tolerance, processing of the ejaculate, *in vitro* insemination, male infertility

#### Введение

Одним из важнейших параметров при проведении процедур искусственного оплодотворения является качество спермы. Качество подготавливаемых образцов спермы зависит от различных лабораторных факторов, таких как:

- методика обработки спермы [1–3];
- температура, поддерживаемая во время обработки [4, 5];
- промежуток времени от момента подготовки спермы до проведения процедуры искусственного оплодотворения [6];

- температура, поддерживаемая при инкубации готовых образцов спермы *in vitro* [7–9].

С момента разработки методик подготовки спермы к проведению процедур, связанных с искусственным оплодотворением, не прекращаются дискуссии, касающиеся соблюдения температурного режима при обработке и хранении образцов спермы. Обработка спермы в лабораториях экстракорпорального оплодотворения (ЭКО), как правило, сопряжена с экспозицией клеток при комнатной температуре либо при 37 °С в течение различных периодов времени. В настоящей работе сделана попытка обобщить имеющиеся данные о термотолерантности мужских половых клеток.

#### **Температура, оптимальная для обработки и хранения сперматозоидов человека перед проведением искусственного оплодотворения**

Известно, что процессы сперматогенеза и спермиогенеза у человека являются термозависимыми и требуют температуры на 2–4 °С ниже температуры тела [10]. Тем не менее данные об оптимальной температуре, необходимой для поддержания максимальной подвижности и жизнеспособности сперматозоидов после эякуляции, достаточно противоречивы. Так, ряд исследователей утверждают, что оптимальной для инкубации образцов спермы является комнатная температура [11–15]. Другая группа авторов настаивает на том, что наилучшего качества спермы можно добиться лишь в случае, если сперматозоиды инкубировались при 37 °С [16, 17]. Третьи же делают вывод об отсутствии значимых изменений параметров образцов спермы после инкубации как при комнатной температуре, так и при температуре тела [18–20].

Результаты исследований, в которых рекомендуется хранить образцы спермы при комнатной температуре, вполне обоснованны. Так, после длительной (в течение 24 ч) инкубации было выявлено значительно лучшее и более долгое сохранение качества спермы при комнатной температуре (23 °С), чем при температуре яичка (35 °С) [21]. Было показано, что инкубация при 37 °С приводит к существенному уменьшению количества сперматозоидов с прогрессивной подвижностью и снижению концентрации морфологически нормальных сперматозоидов. В образцах спермы, обработанных с использованием градиента плотности, наблюдалось снижение количества сперматозоидов, способных вступить в акросомную реакцию при комнатной температуре. Однако в образцах спермы, обработанных методом флотации, происходило существенное уменьшение количества апоптотических сперматозоидов после инкубации при комнатной температуре по сравнению с аналогичными образцами, инкубированными при 35 °С. Кроме того, во всех образцах, инкубированных при 35 °С, значительно уменьшалось количество жизнеспособных сперматозоидов [21]. Эти данные хо-

рошо согласуются с результатами, опубликованными A. Schuffner et al. [22], которые продемонстрировали значительное снижение подвижности и возрастание уровня апоптоза после инкубации при 37 °С. При этом комнатная температура не оказывает влияния на жизнеспособность сперматозоидов и их способность к акросомной реакции [7]. Предполагается, что при значениях ниже температуры тела сперматозоиды переходят в состояние покоя, что позволяет им сохранять энергию. В 2009 г. G.G. Gallup предложил «гипотезу активации» в качестве механизма капацитации сперматозоидов *in vivo*. Он постулировал, что повышение температуры после поступления сперматозоидов в женские половые пути может выступать в качестве триггера для гиперактивации сперматозоидов [23]. Данная гипотеза, возможно, объясняет снижение выживаемости сперматозоидов при 37 °С по сравнению с более низкими температурами.

Кроме того, при 37 °С наблюдается заметное возрастание численности бактериальной флоры, а также снижение pH, что также может служить объяснением снижения подвижности и жизнеспособности сперматозоидов [24].

Температурный фактор, возможно, способен отражаться и на морфологической целостности ядра сперматозоида. Было установлено, что инкубация образцов спермы в течение 2 ч при 37 °С приводит к появлению крупных ядерных вакуолей, при этом инкубация при 21 °С не вызывает такого эффекта [14, 15]. Авторы предполагают, что в основе вакуолизации спермального ядра могут лежать некоторые хромосомные дефекты [25]. По мнению данной исследовательской группы, это предположение согласуется с материалами исследований других авторов. Так, было показано, что уровень фрагментации ДНК в сперматозоидах возрастает после инкубации *in vitro* в течение 4 ч при 37 °С [13]. Кроме того, было продемонстрировано существенное увеличение (с 25 до 91 %) количества сперматозоидов с неконденсированным хроматином после инкубации *in vitro* при 37 °С в течение 24 ч [12]. Опираясь на эти данные, S. Peer et al. высказали предположение о том, что в возникновение крупных ядерных вакуолей и в процессы фрагментации ДНК и деконденсации хроматина вовлечены одни и те же ферментативные механизмы, запускающиеся при температуре 37 °С [14]. При этом в публикации другой группы исследователей сообщается, что инкубация образцов спермы при 37 °С во время выполнения таких рутинных манипуляций, как обработка спермы методом флотации, селекция сперматозоида перед процедурой его интрацитоплазматической инъекции, а также инсеминация ооцитов (оплодотворение ооцитов методом ЭКО), не приводит к образованию вакуолей в ядре сперматозоида [26]. Исследователи предполагают, что одной из причин, объясняющих разницу в полученных ре-



зультатах, может являться неверный выбор способа оценки сперматозоидов, поскольку образование вакуолей оценивалось с использованием аликвот не из одинаковых групп сперматозоидов.

Инкубация спермы при комнатной температуре оказывает влияние на клеточные механизмы, участвующие в капацитации спермы, и приводит к временной блокировке связанных с ней событий [16]. После инкубации в течение 18 ч при 20 °С в сперматозоидах было выявлено множество тирозин-фосфорилированных белков, что может свидетельствовать об отсутствии капацитации. Добиться капацитации и наступления акросомной реакции можно, поместив сперматозоиды в определенные условия, включающие, в том числе, инкубацию при температуре тела. При этом снижение температуры с 37 до 20 °С приводит к значительному уменьшению индукции акросомной реакции, что подразумевает декапацитацию сперматозоидов [16]. Результаты данного исследования четко демонстрируют, что процесс капацитации сперматозоидов является термозависимым и невозможен при комнатной температуре. Блокирующий эффект преодолевается путем возвращения сперматозоидов к температуре 37 °С.

В ряде публикаций говорится об отсутствии значимых изменений параметров образцов спермы через 4–6 ч инкубации как при комнатной температуре, так и при температуре тела [18–20]. Однако во всех этих исследованиях сообщается о существенных изменениях параметров, наблюдавшихся после инкубации спермы в течение 24 ч.

В таблице представлены результаты некоторых исследований, описывающих зависимость кинетических, морфологических, мембранных и ядерных характеристик сперматозоидов от температуры инкубации образцов спермы.

Неотъемлемой частью вспомогательных репродуктивных технологий является обработка спермы методом центрифугирования в градиенте плотности [27]. В ряде публикаций сообщается о том, что клиническое значение для пациентов со сниженной подвижностью сперматозоидов имеет не только температура инкубирования обработанной спермы, но и температура, при которой осуществляется центрифугирование образцов. В образцах спермы, обрабатывавшихся путем центрифугирования при 34 °С и при комнатной температуре, были отмечены существенные различия в концентрации и подвижности сперматозоидов (данные параметры достоверно возрастали после обработки спермы при 34 °С). Авторы данного исследования рекомендуют осуществлять центрифугирование спермы при 34 °С для пациентов с установленным мужским фактором бесплодия при проведении процедуры внутриматочной инсеминации [4]. При этом другая группа исследователей, сравнивая результаты подготовки спермы при комнатной температуре и при 37 °С, на-

против, пришла к выводу, что температура обработки не влияет ни на параметры спермы, ни на частоту наступления беременностей после процедуры внутриматочной инсеминации [28].

В необработанных образцах спермы подвижность и жизнеспособность сперматозоидов резко сокращаются в течение 24–48 ч. Установлено, что подвижность сперматозоидов человека снижается при контакте с семенной плазмой при 37 °С, однако после удаления плазмы они могут сохранять жизнеспособность в течение 72 ч [29]. Предполагается, что в семенной плазме могут содержаться факторы, пагубно влияющие на подвижность и жизнеспособность сперматозоидов [9]. Логично было бы предположить, что в условиях, близких к физиологическим, сперматозоиды способны выживать гораздо лучше. Исследования по сокультивированию человеческих сперматозоидов с клетками репродуктивного тракта показали, что подвижность сперматозоидов и степень выраженности акросомной реакции возрастают при сокультивировании с клетками маточной трубы или эндометриальными клетками по сравнению с контрольной группой, культивировавшейся в человеческой трубной жидкости (HTF, Irvine Scientific) без клеток [30]. Параметры подвижности спермы, гиперактивация и акросомная реакция также возрастают после инкубации с фолликулярной жидкостью и клетками гранулезы [31]. Кроме того, клетки человеческой маточной трубы вырабатывают пептиды, которые поддерживают подвижность сперматозоидов [32]. Было показано, что длительная инкубация подвижных человеческих сперматозоидов только в HTF при 37 °С сопряжена с существенным снижением подвижности и мембранными изменениями, при этом защитного эффекта можно добиться путем добавления человеческого сывороточного альбумина [22].

#### **Внутриклеточные поражения сперматозоидов под воздействием температурного фактора**

Одной из причин ухудшения качества спермы при изменении условий инкубирования, в частности температуры, является образование активных форм кислорода (АФК), таких как перекись водорода, супероксид-анион и гидроксильные радикалы [33]. В норме присутствие некоторого количества АФК в семенной жидкости является необходимым для регуляции циклоденозинмонофосфат-зависимого пути, который контролирует индукцию капацитации и начало акросомной реакции [34]. Однако уровень АФК может меняться в зависимости от температуры инкубирования спермы [35]. Было установлено, что уровень АФК в образцах спермы, обработанной методом флотации, возрастает при 37 °С и напрямую зависит от продолжительности такой инкубации [11].

Между количеством АФК и количеством подвижных сперматозоидов существует обратная кор-

*Зависимость функциональных параметров спермы от температуры инкубирования*

Авторы	Метод исследования	Характеристики спермы
R. J. Aitken et al., 1996 [7]	Окрашивание флуоресцеин-меченным лектином совместно с гипосмотическим тестом	Инкубация образцов обработанной спермы при комнатной температуре не влияет на жизнеспособность сперматозоидов и их способность к акросомной реакции
M. E. Hammadeh et al., 2001 [12]	Окрашивание акридиновым оранжевым	Существенное увеличение (с 25 до 91 %) количества сперматозоидов с неконденсированным хроматином после инкубации при 37 °С в течение 24 ч
C. I. Marin-Briggiler et al., 2002 [16]	Гель-электрофорез в полиакриламидном геле + вестерн-блоттинг с использованием моноклональных антифосфотриозин-антител	Блокировка процесса капацитации при 20 °С и его возобновление при 37 °С; индукция акросомной реакции при 37 °С
A. Schuffner et al., 2002 [22]	Окрашивание аннексином V	Снижение концентрации подвижных сперматозоидов и рост уровня апоптоза после инкубации при 37 °С
L. H. Dalzell et al., 2004 [13]	Метод ДНК-комет	Возрастание уровня фрагментации ДНК в замороженных/размороженных сперматозоидах после инкубации в течение 4 ч при 37 °С
C. Lachaud et al., 2004 [19]	Окрашивание аннексином V; TUNEL	Отсутствие изменений параметров спермы после 4 ч инкубации при 37 °С, существенное снижение подвижности и жизнеспособности сперматозоидов после 24 ч инкубации; отсутствие роста апоптотических маркеров как после 4 ч, так и после 24 ч инкубации
S. Peer et al., 2007 [14]; C. Schwarz et al., 2012 [15]	Оценка морфологии сперматозоидов по критериям MSOME	Образование больших ядерных вакуолей после инкубации при 37 °С
R. E. Jackson et al., 2010 [18]	SCD	Краткосрочное хранение при комнатной температуре (4 ч) не приводит к фрагментации ДНК сперматозоидов, тогда как после 24 ч хранения фрагментация значительно возрастает
A. Neyer et al., 2013 [26]	Оценка морфологии сперматозоидов по критериям MSOME	Отсутствие изменений в количестве сперматозоидов с крупными ядерными вакуолями после инкубации как при комнатной температуре, так и при 37 °С
A. Thijssen et al., 2014 [21]	Окрашивание аннексином V; мечение антителами CD46; окрашивание 7-аминоактиномицином D (7-AAD)	Снижение подвижности и концентрации морфологически нормальных сперматозоидов при 35 °С; повышение концентрации апоптотических сперматозоидов при 35 °С; снижение количества жизнеспособных сперматозоидов при 35 °С; снижение количества сперматозоидов, способных вступить в акросомную реакцию при комнатной температуре

**Примечание.** SCD (*sperm chromatin dispersion*) – тест на дисперсию хроматина сперматозоидов; MSOME (*motile sperm organelle morphology examination*) – морфологический анализ органелл подвижного сперматозоида; TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) – терминальное дезоксиуридиновое мечение концов.

реляция [36]. Усиление выработки АФК выше нормального уровня приводит к снижению подвижности сперматозоидов и их способности к слиянию с яйцеклеткой [33]. При этом, как было показано, наиболее токсичной из АФК, участвующих в этих изменениях, является перекись водорода.

Токсический эффект АФК, таких как перекись водорода, а также пероксиды жирных кислот, вызванный их атакой на фосфолипиды клеточных мембран, известен довольно давно [37]. Однако, несмотря на все эти данные, механизмы, с помощью которых АФК оказывают вредное воздействие на сперматозоиды, до сих пор не изучены полностью.

Сперматозоиды человека чувствительны к АФК-индуцированному перекисному окислению липидов вследствие высокого содержания полиненасыщенных жирных кислот в цитоплазматической мембране и низкого содержания антиоксидантных ферментов в цитоплазме [38]. Эти ферменты не способны защищать от воздействия АФК цитоплазматическую мембрану, окружающую акросому и хвост сперматозоида, поэтому защита сперматозоидов от окислительного стресса обусловлена также ферментами, которые содержатся в семенной плазме [39, 40]. Было показано, что после обработки спермы в градиенте плотности защитные функции антиоксидантных ферментов, содержащихся в семенной плазме, исчезают [34, 40]. В одном из исследований сообщается о том, что температура 37 °С является оптимальной для транспортировки и обработки спермы, а манипуляции с образцами спермы при 37 °С позволяют избежать вредоносного воздействия АФК [17]. Для эксперимента авторы использовали образцы нативного эякулята (очистка спермы от семенной плазмы не производилась), что, по всей вероятности, оказало влияние на результаты данного исследования [39, 40].

Последствия окислительного стресса сказываются как на мембране сперматозоидов, так и на целостности ДНК в ядре сперматозоида [34, 41].

Изменение характеристик спермы, вызванное АФК, выражается не только в снижении подвижности и способности сперматозоидов связываться с блестящей оболочкой и оплодотворять ооциты, но также в снижении способности к регуляции уровня внутриклеточного кальция [42, 43]. В свою очередь, снижение подвижности сперматозоидов вследствие накопления АФК может быть обусловлено несколькими причинами, в частности истощением аденозинтрифосфата, что негативно отражается на аксонеме сперматозоида [44, 45]. Другой причиной может являться воздействие АФК на митохондриальный аппарат мужских половых клеток: подвижность сперматозоидов напрямую зависит от целостности митохондриальной оболочки, основным компонентом которой являются фосфолипиды [46]. Окисление этих фосфолипидов

АФК может приводить к уменьшению подвижности сперматозоидов. Возможно также, что невысокие концентрации перекиси водорода ингибируют подвижность сперматозоидов и способствуют снижению уровня аденозинтрифосфата, не вызывая при этом перекисного окисления липидов или существенного воздействия на мембранный потенциал митохондрий [47]. То есть снижение подвижности сперматозоидов может быть АФК-опосредованным независимо от перекисного окисления липидов или мембранного потенциала митохондрий.

Таким образом, температура инкубирования спермы способна оказывать влияние на изменение уровня АФК в образцах, а следовательно, и на функциональную компетентность сперматозоидов.

### Заключение

Несмотря на противоречивость данных об оптимальной для инкубации образцов спермы температуре, зависимость оплодотворяющей способности сперматозоидов от температуры хранения является очевидной. В подавляющем большинстве публикаций сообщается о повреждающем влиянии чрезмерного нагрева на качество спермы. Однако инкубация образцов обработанной спермы в таких температурных условиях по-прежнему применяется на практике во многих эмбриологических лабораториях. Важно подчеркнуть целесообразность оптимизации условий обработки и хранения спермы в рутинной практике многих лабораторий ЭКО с целью максимального улучшения качества подготавливаемых образцов. Грамотный подход к подбору условий обработки и хранения спермы перед ее использованием для искусственного оплодотворения, с учетом температурного фактора, позволит улучшить такие функциональные характеристики сперматозоидов, как их подвижность, морфология и оплодотворяющая способность. В связи с этим необходимо дальнейшее изучение влияния различных способов инкубации на термотолерантность сперматозоидов, поскольку способ инкубации образцов спермы в конечном счете отражается на характеристиках преимплантационного эмбриогенеза, а следовательно, и на количестве благоприятных клинических исходов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Boomsma C.M., Heineman M.J., Cohlen B.J., Farquhar C. Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(4): CD004507.
2. Chen M.J., Bongso A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Hum Reprod* 1999;14(3): 759–64.
3. Marchesi D.E., Biederman H., Ferrara S. et al. The effect of semen processing on sperm DNA integrity: comparison of two techniques using the novel Toluidine Blue Assay. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010;151(2):176–80.
4. Franken D.R., van Wyk R., Stoumann C., Avari K. Temperature controlled centrifugation improves sperm retrieval. *Andrologia* 2011;43(3):217–21.
5. Otsuki J., Chuko M., Momma Y. et al. A comparison of the swim-up procedure at body and testis temperatures. *J Assist Reprod Genet* 2008;25(8):413–5.
6. Yavas Y., Selub M.R. Intrauterine insemination (IUI) pregnancy outcome is enhanced by shorter intervals from semen collection to sperm wash, from sperm wash to IUI time, and from semen collection to IUI time. *Fertil Steril* 2004;82(6):1638–47.
7. Aitken R.J., Allan I.W., Irvine D.S., Macnamee M. Studies on the development

- of diluents for the transportation and storage of human semen at ambient temperature. *Hum Reprod* 1996;11(10):2186–96.
8. Makler A., Deutch M., Vilensky A., Palti Y. Factors affecting sperm motility. VIII. Velocity and survival of human spermatozoa as related to temperatures above zero. *Int J Androl* 1981;4(5):559–69.
9. Petrella C., Hsieh J., Thrift K. et al. Optimizing incubation conditions for the preservation of sperm motility in processed semen samples. *Fertil Steril* 2005;84(2):513–5.
10. Thonneau P., Bujan L., Multigner L., Mieuisset R. Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Hum Reprod* 1998;13(8):2122–5.
11. Calamera J.C., Fernandez P.J., Buffone M.G. et al. Effects of long-term *in vitro* incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. *Andrologia* 2001;33(2):79–86.
12. Hammadeh M.E., Strehler E., Zeginiadou T. et al. Chromatin decondensation of human sperm *in vitro* and its relation to fertilization rate after ICSI. *Arch Androl* 2001;47(2):83–7.
13. Dalzell L.H., McVicar C.M., McClure N. et al. Effects of short and long incubations on DNA fragmentation of testicular sperm. *Fertil Steril* 2004;82(5):1443–5.
14. Peer S., Eltes F., Berkovitz A. et al. Is fine morphology of the human sperm nuclei affected by *in vitro* incubation at 37 degrees C? *Fertil Steril* 2007;88(6):1589–94.
15. Schwarz C., Köster M., van der Ven K., Montag M. Temperature-induced sperm nuclear vacuolisation is dependent on sperm preparation. *Andrologia* 2012;44 Suppl 1:126–9.
16. Marin-Briggiler C.I., Tezon J.G., Miranda P.V., Vazquez-Levin M.H. Effect of incubating human sperm at room temperature on capacitation-related events. *Fertil Steril* 2002;77(2):252–9.
17. Esfandiari N., Saleh R.A., Blaut A.P. et al. Effects of temperature on sperm motion characteristics and reactive oxygen species. *Int J Fertil Womens Med* 2002;47(5):227–33.
18. Jackson R.E., Bormann C.L., Hassun P.A. et al. Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertil Steril* 2010;94(7):2626–30.
19. Lachaud C., Tesarik J., Cacadas M.L., Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2004;19(3):607–10.
20. Petrella C., Hsieh J., Blake E. et al. Human sperm can survive at room temperature for weeks: Measured by motility and viability of sperm maintained under various conditions. *Fertil Steril* 2003;80:210.
21. Thijssen A., Klerkx E., Huyser C. et al. Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2014;28(4):436–42.
22. Schuffner A., Morshedi M., Vaamonde D. et al. Effect of different incubation conditions on phosphatidylserine externalization and motion parameters of purified fractions of highly motile human spermatozoa. *J Androl* 2002;23(2):194–201.
23. Gallup G.G. On the origin of descended scrotal testicles: the activation hypothesis. *Evol Psychol* 2009;7(4):517–26.
24. Appell R.A., Evans P.R. The effect of temperature on sperm motility and viability. *Fertil Steril* 1977;28(12):1329–32.
25. Berkovitz A., Eltes F., Ellenbogen A. et al. Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 2006;21(7):1787–90.
26. Neyer A., Vanderzwalmen P., Bach M. et al. Sperm head vacuoles are not affected by *in-vitro* conditions, as analysed by a system of sperm-microcapture channels. *Reprod Biomed Online* 2013;26(4):368–77.
28. Henkel R. Sperm processing for IVF. In: Nagy Z.P., Varghese A., Agarwal A. Practical manual of *in vitro* fertilization: Advanced methods and novel devices. Springer, 2012.
29. Selvaraj P., Selvaraj K., Kalaichelvi S., Mahalakshmi R. Semen preparation techniques in intrauterine insemination: A comparison of non-temperature and temperature controlled centrifugation in cases of unexplained infertility. *J Hum Reprod Sci* 2013;6(4):241–4.
30. Cohen J., Fehilly C.B., Walters D.E. Prolonged storage of human spermatozoa at room temperature or in a refrigerator. *Fertil Steril* 1985;44(2):254–62.
31. Lai Y.M., Chang F.H., Lee C.L. et al. Coculture of human spermatozoa with reproductive tract cell monolayers can enhance sperm functions better than coculture with Vero cell monolayers. *J Assist Reprod Genet* 1996;13(5):417–22.
32. Fabbri R., Porcu E., Lenzi A. et al. Follicular fluid and human granulosa cell cultures: influence on sperm kinetic parameters, hyperactivation, and acrosome reaction. *Fertil Steril* 1998;69(1):112–7.
33. Yao Y., Ho P., Yeung W.S. Human oviductal cells produce a factor(s) that maintains the motility of human spermatozoa *in vitro*. *Fertil Steril* 2000;73(3):479–86.
34. Aitken R.J., Clarkson J.S., Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod* 1989;41(1):183–97.
35. Aitken R.J. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon – a cell in crisis? *J Reprod Fertil* 1999;115(1):1–7.
36. Saleh R.A., Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J Androl* 2002;23(6):737–52.
37. Iwasaki A., Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992;57(2):409–16.
38. Jones R., Mann T., Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979;31(5):531–7.
39. Alvarez J.G., Storey B.T. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1995;42(3):334–46.
40. Zini A., de Lamirande E., Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl* 1993;16(3):183–8.
41. Twigg J., Irvine D.S., Houston P. et al. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod* 1998;4(5):439–45.
42. Aitken R.J., Gordon E., Harkiss D. et al. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998;59(5):1037–46.
43. Aitken R.J., Irvine D.S., Wu F.C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164(2):542–51.
44. Oehninger S., Blackmore P., Mahony M., Hodgen G. Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 1995;12(1):41–7.
45. de Lamirande E., Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 1992;13(5):368–78.
46. de Lamirande E., Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl* 1992;13(5):379–86.
47. Alvarez J.G., Storey B.T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol Reprod* 1982;27(5):1102–8.
48. Armstrong J.S., Rajasekaran M., Chamulitrat W. et al. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med* 1999;26(7–8):869–80.