

EDN: <https://elibrary.ru/fknddv>DOI: <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2022-62-12-797-801>

УДК 615: 616.6.02

© Аликина И.Н., Долгих О.В., 2021

Аликина И.Н., Долгих О.В.

Параметры спонтанной и индуцированной бензолом клеточной гибели сперматозоидов в условиях *in vitro* у мужчин — работников предприятия нефтедобычи с нарушением фертильности

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», ул. Монастырская, 82, Пермь, 614045

Введение. С каждым годом прослеживается неуклонный рост частоты мужского бесплодия как в России, так и в других странах мира при сопутствующей низкой эффективности распознавания причин его идиопатических форм. Объяснением роста бесплодия служат: вредные производственные факторы, в том числе, химические, прогрессивное ухудшение качества городской среды, оказывающей существенное влияние на репродуктивное здоровье урбанизированного населения, повторяющиеся экономические кризисы, негативно влияющие на психику человека, массовое употребление некачественных продуктов и лекарств. Перечисленные факторы, прежде всего, химические производственные, негативно влияют на репродуктивную систему, в том числе, на дифференцировку мужских половых клеток, как причину нарушения фертильности.

Цель исследования — изучение в условиях *in vitro* спонтанной и индуцированной бензолом особенности апоптоза сперматозоидов мужчин — работников предприятия нефтедобычи с нарушением фертильности.

Материалы и методы. Проведено экспериментальное исследование биологического материала (эякулят) у 50 мужчин с нарушениями репродуктивной функции (26–49 лет), работников предприятия нефтедобычи. Для проведения эксперимента *in vitro* использовали пробы семенной жидкости. В качестве фактора индукции *in vitro* использовали раствор бензола в концентрации 0,001 мкг/мл (подобрана экспериментально). Анализируемые пробы были разделены на 2 равные части для исследования спонтанной и индуцированной бензолом экспрессии маркеров апоптоза (CD25⁺, CD95⁺, bax, p53, Аннексин V-FITC и пропидиум йодид (*Propidium Iodide*), *Caspasa-3*), которые определялись методом проточной цитометрии.

Результаты. Достоверных отклонений внутриклеточных маркеров апоптоза сперматозоидов (bax, p53, Annexin V-FITC⁺7AAD⁺, Annexin V-FITC⁺7AAD⁻, *Caspasa-3*) обнаружено не было, однако наблюдались различия в экспрессии мембранных протеинов CD95⁺ и CD25⁺ на 20% и 10% по сравнению со спонтанным уровнем, что связано с ускорением событий программированной гибели сперматозоидов ($p < 0,05$).

Заключение. Результаты, полученные в эксперименте *in vitro* по моделированию программы апоптоза путём индукции гаптенем (бензолом), показали, что нарушения клеточной гибели сперматозоидов связаны со сверхэкспрессией ключевого рецептора запуска апоптоза CD95, а также маркера ранней активации клеток CD25, что отражает модификацию бензолом сценария клеточной гибели по пути её избыточной стимуляции.

Ключевые слова: бензол; репротоксиканты; иммунологические маркеры; апоптоз; сперматозоиды

Для цитирования: Аликина И.Н., Долгих О.В. Параметры спонтанной и индуцированной бензолом клеточной гибели сперматозоидов в условиях *in vitro* у мужчин — работников предприятия нефтедобычи с нарушением фертильности. *Мед. труда и пром. экол.* 2022; 62(12): 797–801. <https://elibrary.ru/fknddv> <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2022-62-12-797-801>

Для корреспонденции: Аликина Инга Николаевна, младший научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения». E-mail: 27konti72@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дата поступления: 23.03.2022 / Дата принятия к печати: 21.11.2022 / Дата публикации: 23.12.2022

Inga N. Alikina, Oleg V. Dolgikh

Parameters of spontaneous and benzene-induced cell death of spermatozoa under *in vitro* conditions in male employees of an oil production enterprise with impaired fertility

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, 82, Monastyrskaya St., Perm, 614045

Introduction. Every year there is a steady increase in the frequency of male infertility both in Russia and in other countries of the world with the concomitant low efficiency of recognizing the causes of its idiopathic forms. The explanation for the increase in infertility are: harmful production factors, including chemical ones, progressive deterioration of the quality of the urban environment, which has a significant impact on the reproductive health of the urbanized population, recurring economic crises that negatively affect the human psyche, mass consumption of substandard products and medicines. These factors, primarily chemical production, negatively affect the reproductive system, including the differentiation of male germ cells, as a cause of fertility disorders.

The aim of the study to consider *in vitro* spontaneous and benzene-induced features of sperm apoptosis in male oil industry workers with impaired fertility.

Materials and methods. We have conducted an experimental study of biological material (ejaculate) in 50 men with reproductive disorders (26–49 years old), employees of an oil production enterprise. To conduct the experiment *in vitro*, the researchers used seminal fluid samples. A benzene solution at a concentration of 0.001 micrograms/ml was used as an *in vitro* induction factor (selected experimentally). We divided the analyzed samples into 2 equal parts to study the spontaneous and benzene-induced expression of apoptosis markers (CD25⁺, CD95⁺, bax, p53, Annexin V-FITC and Propidium Iodide, *Caspasa-3*), which the researchers determined by flow cytometry.

Results. There were no significant deviations of intracellular markers of sperm apoptosis (bax, p53, Annexin V-FITC⁺7AAD⁺, Annexin V-FITC⁺7AAD⁻, *Caspasa-3*), however, experts observed differences in the expression of CD95⁺ and CD25⁺

membrane proteins by 20% and 10% compared to the spontaneous level, which is associated with the acceleration of the events of programmed sperm death ($p < 0.05$).

Conclusion. The results obtained in an *in vitro* experiment on modeling the apoptosis program by induction with hapten (benzene) showed that violations of sperm cell death are associated with overexpression of the key receptor for triggering apoptosis CD95, as well as a marker of early activation of CD25 cells, which reflects benzene modification of the cell death scenario along the path of its excessive stimulation.

Keywords: benzene; reprotoxicants; immunological markers; apoptosis; sperm

For citation: Alikina I.N., Dolgikh O.V. Parameters of spontaneous and benzene-induced cell death of spermatozoa under *in vitro* conditions in male employees of an oil production enterprise with impaired fertility. *Med. truda i prom. ekol.* 2022; 62(12): 797–801. <https://elibrary.ru/fknndv> <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2022-62-12-797-801> (in Russian)

For correspondence: Inga N. Alikina, the Junior Researcher of the Department of Immunobiological Diagnostic Methods, Federal Research Center for Medical and Preventive Technologies of Public Health Risk Management. E-mail: 27konti72@mail.ru

Information about the authors: Dolgikh O.V. <https://orcid.org/0000-0003-4860-3145>

Funding. The study had no funding.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Received: 23.03.2022 / Accepted: 21.11.2022 / Published: 23.12.2022

Введение. Этиопатогенез нарушений мужской фертильности, особенно в условиях производственной среды, сложный и многообразный. За последние 40 лет, по новым данным экспертов ВОЗ, среднестатистическая концентрация сперматозоидов в 1 мл спермы у мужчин во всем мире сократилась на 50%. В семенной жидкости обнаружены различные ядовитые продукты промышленного производства: пентахлорфенол, гексахлорбензол и другие [1, 2].

В настоящее время обстановка с экспозицией репродуктивных факторов ещё больше ухудшилась. Кроме ядовитых веществ производственного характера, в воде, пище, воздухе увеличилось содержание радионуклидов, тяжёлых металлов, ароматических углеводородов [2, 3].

Важную функцию защиты и детоксикации играют белки клеточных мембран, которые обеспечивают события иммунной регуляции. Поэтому очень важно сохранить или предупредить разрушение клеточных мембран, а в дальнейшем и генетического материала [3, 4].

Нефтедобывающая промышленность является одной из наиболее развитых отраслей производства в России. Несмотря на непрерывную модернизацию и усовершенствование производственного процесса, работники данной отрасли промышленности подвергаются воздействию вредных производственных факторов, наиболее значимыми из которых являются ароматические углеводороды [5–7].

Несмотря на улучшение условий труда для людей, занятых в сфере нефтедобычи, за последние 20–30 лет наличие сочетанного действия производственных факторов (тяжёлый физический труд, воздействие химических веществ, повышенное нервно-эмоциональное напряжение) является главной причиной коморбидных состояний, к которым можно отнести и мужское бесплодие [7–9].

Длительная и интенсивная экспозиция профессиональных групп вредными производственными факторами может повлечь снижение адаптационного потенциала, нарушения иммунной регуляции и, как следствие, развитие профессионально обусловленных заболеваний, в том числе заболеваний репродуктивной системы [10, 11].

Сохранение профессионального здоровья, профессионального долголетия при помощи современных технологий, снижения уровня заболеваемости и травматизма — одна из основных задач общества, важнейшая функция государства и основа его социальной политики, поскольку экономический подъем государства связан с трудоспособным населением [11]. Поэтому, актуальной задачей является разработка комплекса научно-обоснованных программ профилактики, направленных на предупреждение возникновения и дальнейшего развития производственно обусловленных

заболеваний, инициированных воздействием факторов трудового процесса, снижением индекса коморбидности патологии и предупреждения развития осложнений.

Цель исследования — изучение в условиях *in vitro* спонтанной и индуцированной бензолом особенности апоптоза сперматозоидов мужчин — работников предприятия нефтедобычи с нарушением фертильности.

Материалы и методы. Для изучения влияния бензола на репродуктивную дисфункцию у мужчин, проведено экспериментальное исследование биологического материала (эякулят) у 50 мужчин с нарушениями репродуктивной функции (26–49 лет), работников предприятия нефтедобычи. Изучены спонтанные и индуцированные изменения клеточной экспрессии маркеров апоптоза. Полученные результаты систематизированы и статистически обработаны по иммунологическим показателям, ассоциативно связанным с направленностью токсического воздействия ароматических углеводородов на репродуктивную систему обследуемых.

Для проведения эксперимента *in vitro* использовали биологическую среду (семенная жидкость). В качестве фактора индукции *in vitro* использовали раствор бензола (ГСО 7141-95 МСО 0038:1998 (1,5 см³)) в концентрации 0,001 мкг/мл. Нами данная концентрация подобрана экспериментально. По литературным данным известно, что при содержании бензола в воздухе рабочей зоны от 0 до 7070,3 мг/м³, данное химическое соединение идентифицировано в крови обследуемых экспонированных мужчин в диапазоне 0,40–51,32 мкмоль/л, а в сперме — 0,17–8,54 мкмоль/л [12]. Оценив состояние сперматогенеза в концентрации 0,17 мкмоль/л и на порядок ниже, мы остановились на последней (0,017 мкмоль/л), как не вызвавшей его нарушений. Эксперимент был построен таким образом, что исследуемые пробы были разделены на 2 равные части для исследования спонтанной и индуцированной бензолом экспрессии маркеров апоптоза. Для исследования спонтанной экспрессии в каждую пробирку с суспензией клеток добавляли физиологический раствор в количестве 100 мкл на 100 мкл спермы, соотношение 1:1. Все культуры клеток спермы инкубировали 72 часа в термостате при температуре 37°C.

После инкубации экспериментальных проб, анализ результатов проводили на проточном цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» с использованием универсальной программы CellQuest.PrO, при этом регистрировали не менее 10 тыс. событий.

Определение меченых моноклональных антител (МКАТ) к мембранным CD-рецепторам CD25⁺, CD95⁺,

определение уровня экспрессии белка *bax*, определение внутриклеточного маркера апоптоза — *p53*-протеина, уровень апоптотических клеток с помощью окрашивания Аннексин V-FITC (*Annexin V-FITC*, FITC (*Fluorescein Isothiocyanate*)) и пропидиум йодид (*PI (Propidium Iodide)*), протеолитического фермента *Caspasa-3* проводили методом мембранной иммунофлуоресценции с использованием соответствующих МКАТ, согласно инструкциям производителя («*Becton Dickinson*», США).

Исследование выполнено согласно требованиям, изложенным в Хельсинкской декларации ВМА «Этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве испытуемого» (1964 г., 2013 г.).

Результаты и обсуждение. По результатам сравнительного анализа не выявлено достоверных отклонений патогенетических тестов иммунологических маркеров по сравнению с средними значениями референтного уровня в пробах спонтанной экспрессии, однако наблюдается избыточность экспрессии рецептора клеточной смерти *CD95*⁺ ($p<0,05$) у 30% проб обследуемых, и снижение количества *Annexin V-FITC*+7AAD негативных клеток (без достижения уровня значимости) в пробах с нагрузкой (15%) (таблица).

Не выявлено достоверных отклонений внутриклеточных маркеров апоптоза, однако наблюдалось снижение экспрессии онкосупрессора *p53* на 13%, не достигшее уровня достоверности.

Наблюдалась достоверная разница индуцированных уровней экспрессии показателей *CD*-рецепции *CD95*⁺ и *CD25*⁺ на 20% и 10% по отношению к спонтанному уровню, свидетельствующая об угнетении запуска событий апоптоза ($p<0,05$).

Пробы мужчин, подвергшиеся гаптенной модификации, отличались избыточным уровнем экспрессии мембранного маркера апоптоза *CD95*⁺ на сперматозоидах, который позиционируется как фактор, снижающий фертильность спермы. Причиной запуска механизма избыточной запрограммированной гибели клеток являются изменения, вызванные воздействием экзогенного химического соединения — симулятора эстрогенов, которым для исследуемого мужского контингента является бензол. Нами продемонстрировано, что представитель химической группы ароматических углеводородов (бензол) реализует репротоксичность, используя механизм избыточной индукции мембранной сигнализации рецептора клеточной гибели, ускоряет естественную программу клеточной гибели ориентировочно на 20% по сравнению с состоянием репродуктивных клеток, не подвергшихся стимуляции.

Цикл жизни многих типов клеток, в том числе и сперматозоидов, может зависеть от присутствия факторов смерти. Ключевой молекулой запуска процесса апоптоза является клеточный рецептор *CD95 (Fas)* — поверхностный белок мембраны клеток, который используется при управлении апоптозом в течение сперматогенеза у множества разновидностей млекопитающих и у человека [13]. При различных нарушениях сперматогенеза наблюдается изменение экспрессии *CD95* на сперматозоидах, отражая активность патологических процессов, протекающих в мужской репродуктивной системе. Положительная корреляция *CD95*⁺ клеток с наличием в эякуляте атипичных форм сперматозоидов свидетельствует о том, что эти клетки потенциально уготовлены к гибели по рецепторному пути апоптоза, когда сигналы к его запуску поступают извне и опосредованы через *CD95*-рецепторы [13, 14]. Таким образом, можно предположить связь между экспрессией рецептора апоптогенного сигнала *CD95* и морфофункциональными характеристиками сперматозоидов, которые показывают, что экспрессия *CD95* на сперматозоидах, является фактором, снижающим фертильность спермы [15].

По литературным данным, есть предположение, что *p53* играет роль в патогенезе бесплодия, в связи с его экспрессией в первичных сперматоцитах [16–18]. Ряд исследований показал, что родственный ген *TP53 Arg72Pro* может быть связан с нарушением сперматогенеза при идиопатическом бесплодии у мужчин на юго-востоке Китая [16]. Транскрипционный фактор *p53* играет важную роль в контроле размножения половых клеток при нормальном сперматогенезе, скорее всего, за счёт регулирования процесса апоптоза в сперматогониях. В экспериментах на крысах была обнаружена экспрессия *p53* в сперматоцитах, вступивших в мейоз (прелептотенные, зиготенные, пахитенные). Этот белок также был обнаружен в работах по его изучению в половых клетках яичек [16–18].

Воздействие бензола и смеси данного вещества влияют на фертильную способность сперматозоидов, необратимо подавляя сперматогенез. Прекращение интоксикации бензолом и его смесью не играет роли для репарации сперматогенеза, так как приспособительные свойства тканевых элементов семенников недостаточны для регенерации сперматогенеза и восстановления фертильности после прекращения действия данных химических факторов [19].

Сведения о значении бензола как гонадотропного фактора в аспекте актуальности изучения приспособительных свойств семенников нуждаются на сегодняшний день в конкретизации и дополнении [20].

Таблица / Table

Средние показатели маркеров апоптоза в сравниваемых пробах работников мужчин ($M\pm m$), $n=50$
Average indices of markers of apoptosis in the compared samples of male workers ($M\pm m$), $n=50$

Показатели	Пробы индуцированные (нагрузка бензолом)	Пробы спонтанные (без нагрузки)	Средние значения референтного уровня
<i>AnnexinV-FITC</i> +7AAD ⁺ , %	1,836±0,260	2,357±0,333	3,05±0,18
<i>AnnexinV-FITC</i> +7AAD ⁻ , %	45,576±6,445	54,839±7,755	56,13±2,96
<i>Bax</i> , %	30,135±4,262	30,487±4,311	31,6±0,36
<i>p53</i> , %	12,697±1,796	14,297±2,022	14,47±0,39
<i>CD3</i> + <i>CD95</i> ⁺ , %	24,421±3,454***	20,250±2,864	19,28±0,59*
<i>CD3</i> + <i>CD25</i> ⁺ , %	28,513±4,032**	26,993±3,817	28,76±0,85
<i>Caspasa-3</i>	6,083±0,860	6,226±0,880	6,4±0,31

Примечание: * — различия с референтным уровнем достоверны, $p<0,05$, ** — достоверность различий между пробами.
Note: * — differences with the reference are significant, $p<0.05$; ** — reliability of differences between samples.

В данном исследовании, бензол, при концентрации 0,001 мг/м³ выступает и как стимулятор эстрогенов (экзогенный тирозин, как дегидроксилированный фенол), стимулирует эстрогеновый рецептор, а также рецептор фактора некроза опухоли, в том числе его часть, представленную CD95⁺. Сигнал минует классический вариант стимуляции апоптоза — каспазный цикл и *bax* и угнетает транскрипт *p53*. Срабатывают два механизма антиапоптоза — холостая сигнализация не запускает фосфатидилсеринный апоптоз (аннексин окрашенных клеток меньше), а антиопухолевый контроллер (*p53*) угнетён. В связи с этим, сперматозоиды избыточно стареют и видоизменяются (патологические формы), следовательно, оплодотворение яйцеклетки в результате может не произойти из-за недостаточной подвижности или иммунного конфликта (образования антител к сперматозоидам). Таким образом, нагрузка гормональным стимулятором отменяет физиологическую компенсацию на уровне макроорганизма и позволяет выявить замедление гибели сперматозоидов и их функционального старения.

Заключение. Проведённые исследования по изучению особенностей состояния мембранных и внутриклеточных маркеров клеточной гибели у мужчин — работников предприятия нефтедобычи позволили выявить ассоциированную с репродуктивными нарушениями достоверную модификацию событий апоптоза сперматозоидов. Полученные в эксперименте результаты по моделированию программы апоп-

тозогативной стимуляции показывают, что из спектра проанализированных показателей апоптоза сперматозоидов, нарушения сперматогенеза ассоциированы с избыточной экспрессией ключевого рецептора процесса апоптоза — CD95, а также маркера ранней активации клеток — CD25, отражая запуск активности апоптотических сценариев в мужской репродуктивной системе. Установлено, что представители химической группы ароматических углеводородов реализуют репротоксичность, используя механизм избыточной индукции мембранной сигнализации рецептора клеточной гибели, ускоряют естественную программу клеточной гибели ориентировочно на 20% по сравнению с состоянием репродуктивных клеток, не подвергшихся стимуляции.

Проведённые исследования *in vitro* по обоснованию иммунологических маркеров у мужчин — работников предприятия нефтедобычи, позволили установить, что возрастание экспрессии маркера апоптоза CD95⁺ на сперматозоидах является фактором, ассоциированным с угнетением фертильности спермы в условиях экспозиции бензолом.

Таким образом, к экзогенным факторам, модифицирующим механизм клеточной гибели, можно отнести гапте-ны-репротоксиканты, относящиеся к гомологическому ряду ароматических углеводородов (бензол), ускоряющие события программированной гибели сперматозоидов у мужчин — работников предприятия нефтедобычи с нарушением фертильности.

Список литературы

1. Руководство ВОЗ по стандартизованному обследованию и диагностике бесплодных супружеских пар. Пер. с англ. Р.А. Нерсеяна; 1997.
2. Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А. Руководство по сперматологии. М; 2002.
3. Руководство ВОЗ по лабораторному исследованию эякулята человека и взаимодействию сперматозоидов с цервикальной слизью. 4-е издание. МедПресс; 2001.
4. Долгов В.В., Луговская С.А., Фанченко Н.Д., Миронова И.И., Назарова Е.К., Ракова Н.Г., Раков С.С., Селиванов Т.О., Щелков А.М. Лабораторная диагностика мужского бесплодия. Кафедра КДЛ. М; 2006.
5. Гимранова Г.Г., Бакиров А.Б., Каримов А.К. и др. Факторы и показатели профессионального риска при добыче нефти. Вестник РГМУ. 2014; 1: 72–5.
6. Оруджев Р.А., Джафарова Р.Э. Особенности токсического действия углеводородов нефти на организм человека. Вестник ВГМУ. 2017; 4: 8–15.
7. Гимранова Г.Г., Бакиров А.Б., Шайхлисламова Э.Р., Каримова А.К., Волгарева А.Д., Обухова М.П., Бейгул Н.А. Распространённость основных неинфекционных, производственно-обусловленных заболеваний у работников нефтедобывающей отрасли. Медицина труда и экология человека. 2016; 1 (5): 5–15.
8. Алексеев В.Д., Симонова Н.Н., Зуева Т.Н. Влияние производственных факторов на состояние здоровья работников нефтедобычи при вахтовой организации труда в Заполярье. Экология человека. 2009; 6: 47–50.
9. Алиев Ф.Г., Мамедов Г.М., Гулиева А.А. Показатели неспецифической иммунологически обусловленной резистентности у лиц, работающих в нефтяной промышленности. Дальневосточный журнал инфекционной патологии. 2009; 14: 107–11.
10. Долгих О.В., Кривцов А.В., Бубнова О.А. Иммуногенетические показатели у работающих в условиях сочетанного воздействия пыли и производственного шума. Российский иммунологический журнал. 2015; 9(2): 551–3.
11. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2018 году: Государственный доклад. — М; Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. 2019; 254.
12. Chen Y., Zhang W., Guo X., Ren J., Gao A. et al. The crosstalk between autophagy and apoptosis was mediated by phosphorylation of Bcl-2 and beclin1 in benzene-induced hematotoxicity. Cell Death. Dis. 2019; 10: 772. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2004-4>
13. Мойбенко А.А., Досенко В.Е., Нагибин В.С. Ферментативные механизмы апоптоза. Пат. физиол. и Экспер. терапия. 2005; 3: 17–26.
14. Плосконос М.В. CD95 как фактор, нарушающий фертильность спермы. Успехи современного естествознания. 2015; 4: 141–3.
15. Bostwick D.G. Urologic Surgical Pathology. 3rd Edition; 2014: 976.
16. Gupta G.S. Proteomics of Spermatogenesis. Springer Science & Business Media. 2006; 855.
17. Lu N.X., Xia Y.K. Lack of association between polymorphisms in p53 gene and spermatogenetic failure in a Chinese population. Andrologia. 2007; 39(6): 223–28. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2007.00790.x>
18. Sjöblom T., Lähde J. Expression of p53 in normal and gamma-irradiated rat testis suggests a role for p53 in meiotic recombination and repair. J. Oncogene. 1996; 12(12): 2499–505.
19. Wang G.G., Guo Y.S., Zhou T., Shi X.D., Yu J., Yang Y., Wu Y.B., Wang J., Liu M.X., Chen X. et al. In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. Journal of Proteomics. 2013; 79: 114–22. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.008>
20. Martin R.H., Rademaker A.W., Greene C., et al. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate and severe oligospermia. Biol. Reprod. 2003; 69: 535–9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.015149>

References

1. WHO guidelines for standardized examination and diagnosis of infertile couples. Transl. by R.A. Nersejan; 1997 (in Russian).
2. Bragina E.E., Abdumalikov R.A. *Spermatology Guide*. M; 2002 (in Russian).
3. WHO guidelines for laboratory testing of human ejaculate and the interaction of sperm with cervical mucus. 4th ed. MedPress; 2001 (in Russian).
4. Dolgov V.V., Lugovskaja S.A., Fanchenko N.D., Mironova I.I., Nazarova E.K., Rakova N.G., Rakov S.S., Selivanov T.O., Shhelkov A.M. *Laboratory diagnosis of male infertility*. Kafedra KDL. M; 2006 (in Russian).
5. Gimranova G.G., Bakirov A.B., Karimova L.K. et al. Factors and indicators of professional risk in oil production. *Vestnik RGMU*. 2014; 1: 72–5 (in Russian).
6. Orudzhev R.A., Dzhafarova R.Je. Features of the toxic effect of oil hydrocarbons on the human body. *Vestnik VGMU*. 2017; 4: 8–15 (in Russian).
7. Gimranova G.G., Bakirov A.B., Shajhlislamova Je.R., Karimova L.K., Volgareva A.D., Obuhova M.P., Bejgul N.A. Prevalence of major non-infectious, work-related diseases among oil workers. *Medicina truda i jekologija cheloveka*. 2016; 1(5): 5–15 (in Russian).
8. Alekseenko V.D., Simonova N.N., Zueva T.N. Influence of production factors on the health status of oil production workers in the shift work organization in the Arctic. *Jekologija cheloveka*. 2009; 6: 47–50 (in Russian).
9. Aliev F.G., Mamedov G.M., Gulieva A.A. Indicators of nonspecific immunologically determined resistance in persons working in the oil industry. *Dal'nevostochnyj zhurnal infekcionnoj patologii*. 2009; 14: 107–11 (in Russian).
10. Dolgih O.V., Krivcov A.V., Bubnova O.A. Immunogenetic parameters in workers under conditions of combined exposure to dust and industrial noise. *Rossijskij immunologicheskij zhurnal*. 2015; 9 (2): 551–53 (in Russian).
11. On the sanitary and epidemiological situation in the Russian Federation in 2018: Statereport. M; *Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare*. 2019; 254 (in Russian).
12. Chen Y., Zhang W., Guo X., Ren J., Gao A. et al. The crosstalk between autophagy and apoptosis was mediated by phosphorylation of Bcl-2 and beclin1 in benzene-induced hematotoxicity. *Cell Death. Dis.* 2019; 10: 772. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2004-4>
13. Mojbenko A.A., Dosenko V.E., Nagibin V.S. Enzymatic mechanisms of apoptosis. *Pat. fiziol. i jeksper. terapija*. 2005; 3: 17–26 (in Russian).
14. Ploskonos M.V. CD95 as a factor impairing sperm fertility. *Uspehi sovremennogo estestvoznaniya*. 2015; 4: 141–3 (in Russian).
15. Bostwick D.G. *Urologic Surgical Pathology*. 3rd ed. 2014; 976.
16. Gupta G.S. Proteomics of Spermatogenesis. *Springer Science & Business Media*. 2006; 855.
17. Lu N.X., Xia Y.K. Lack of association between polymorphisms in p53 gene and spermatogenetic failure in a Chinese population. *Andrologia*. 2007; 39(6): 223–8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2007.00790.x>
18. Sjöblom T., Lähdetie J. Expression of p53 in normal and gamma-irradiated rat testis suggests a role for p53 in meiotic recombination and repair. *J. Oncogene*. 1996; 12(12): 2499–505.
19. Wang G.G., Guo Y.S., Zhou T., Shi X.D., Yu J., Yang Y., Wu Y.B., Wang J., Liu M.X., Chen X. Et al. In-depth proteomic analysis of the human sperm reveals complex protein compositions. *Journal of Proteomics*. 2013; 79: 114– 22. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.008>
20. Martin R.H., Rademaker A.W., Greene C., et al. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate and severe oligospermia. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 535–9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.015149>