



Долгих О.В., Дианова Д.Г., Аликина И.Н., Кривцов А.В.

Влияние бензола на запрограммированную клеточную гибель сперматозоидов

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 614045, Пермь, Россия

Введение. Бензол и его производные, поступающие в организм из среды обитания, являются источниками постоянной опасности нарушения здоровья, в том числе и репродуктивного.

Цель работы — изучить *in vitro* модифицирующее влияние бензола на показатели, контролируемые апоптоз сперматозоидов.

Материалы и методы. В исследование включены данные 27 практически здоровых мужчин в возрасте от 41 до 51 года, не имеющих производственного контакта с вредными факторами и проживающих в относительно благоприятных условиях. Методом проточной цитометрии в эякулированном семени определяли CD25⁺-маркер и CD95⁺-маркер, содержание p53, bax и активность каспазы-3, процентное содержание AnnexinV-FITC⁺PI⁻-сперматозоидов и AnnexinV-FITC⁺PI⁺-сперматозоидов. Для оценки влияния ароматических углеводородов на показатели, контролируемые апоптоз, пробы семенной жидкости инкубировали с бензолом в концентрации 0,001 мкг/мл (опытные пробы) в течение 72 ч при температуре 37 °С. В качестве контроля использованы образцы спермы, которые инкубировали в идентичных условиях, без добавления бензола.

Результаты. Установлено, что в опытных образцах спермы после внесения бензола статистически значимо ($p = 0,023-0,026$) снижается (в среднем на 50% от исходного уровня) содержание p53, активность каспазы-3 и количество погибших мужских половых клеток (AnnexinV-FITC⁺PI⁺-сперматозоиды). При этом добавление в образцы эякулированного семени бензола не изменяло ранний активационный профиль гамет (по критерию CD25⁺), готовности клеток к запуску FAS-зависимого апоптоза (CD95⁺) и количество сперматозоидов, маркированных для гибели путём апоптоза (AnnexinV-FITC⁺PI⁻-сперматозоиды).

Заключение. Результаты иммунологического тестирования продемонстрировали, что бензол в системе *in vitro* приводит к снижению значений показателей клеточной гибели, нарушая жизненный цикл сперматозоида. На примере бензола показано, что гаптенная контаминация способна изменять фертильность спермы, ассоциированную с дисбалансом проапоптотических факторов и нарушением функции мужской репродуктивной системы. Показатели запрограммированной клеточной гибели bax, p53, каспаза-3, CD25-позитивные, FAS-позитивные, AnnexinV-FITC⁺PI⁻-сперматозоиды и AnnexinV-FITC⁺PI⁺-сперматозоиды в эякуляте рекомендуются для диагностики и контроля нарушения фертильности сперматозоидов.

Ключевые слова: бензол; контаминация; сперматозоид; клеточная гибель

Для цитирования: Долгих О.В., Дианова Д.Г., Аликина И.Н., Кривцов А.В. Влияние бензола на запрограммированную клеточную гибель сперматозоидов. *Гигиена и санитария*. 2021; 100(10): 1060-1063. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-10-1060-1063>

Для корреспонденции: Долгих Олег Владимирович, доктор мед. наук, зав. отд. иммунобиологических методов диагностики, ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», 614045, Пермь. E-mail: oleg@fcrisk.ru

Участие авторов: Долгих О.В. — концепция и дизайн исследования, редактирование; Дианова Д.Г. — концепция и дизайн исследования, написание текста; Аликина И.Н. — сбор и обработка материала; Кривцов А.В. — статистическая обработка. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки. Работа выполнена по теме из Плана НИР ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» «Исследование репродуктивных нарушений у мужчин, связанных с воздействием вредных и опасных производственных факторов, и обоснование молекулярно-генетических маркеров их диагностики», № НОКР АААА-А20-120080790015-5.

Поступила 27.07.2021 / Принята к печати 28.09.2021 / Опубликована 31.10.2021

Oleg V. Dolgikh, Dina G. Dianova, Inga N. Alikina, Alexander V. Krivtsov

The benzene impact on programmed death of sperm cell

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare, 614045, Perm, Russian Federation

Introduction. Benzene and its derivatives enter organism from the natural environment are the sources of constant health danger, including reproductive system disorders.

Purpose of the study. *In vitro* study of the modifying effect of benzene on the indices controlling the apoptosis of sperm cells.

Materials and methods. The study includes data on 27 men from 41 to 51 years of age, apparently healthy, not in contact with harmful factors, and living in relatively favourable conditions. Using flow cytometry in the ejaculated semen, we determined CD25⁺ and CD95⁺ markers, p53, bax, caspase-3 activity, percentage of AnnexinV-FITC⁺PI⁻, and AnnexinV-FITC⁺PI⁺-spermatozoa. The seminal fluid samples were incubated with benzene at a concentration of 0.001 µg/ml (experimental samples) for 72 hours at 37°C to evaluate the effect of aromatic hydrocarbons on the indices controlling the apoptosis. Sperm samples incubated under identical conditions without benzene addition were used as control samples.

Results. p53 content, caspase-3 activity, and the number of dead male germ cells (AnnexinV-FITC⁺PI⁺-spermatozoa) were found to decrease statistically significantly ($p=0,023-0,026$) in experimental semen samples after the addition of benzene (by 50% of the initial level on average). At the same time, the addition of benzene to the ejaculated semen samples did not change the early activation profile of gametes (according to CD25⁺ criteria), cells readiness to start FAS-dependent apoptosis (CD95⁺), and the number of spermatozoa marked for death by apoptosis (AnnexinV-FITC⁺PI⁻-spermatozoa).

Conclusion. The results of immunological testing demonstrated that *in vitro* system benzene inhibits apoptosis and interferes with gamete life cycle. On the example of benzene, it was been demonstrated that haptenic contamination could alter sperm fertility associated with an imbalance of proapoptotic factors and impair ed male reproductive system function. The indices of programmed cell death bax, p53, caspase-3, CD25-positive, FAS-positive, AnnexinV-FITC⁺PI⁻-sperm, and AnnexinV-FITC⁺PI⁺-sperm in the ejaculate are recommended for diagnosis and monitoring of sperm fertility disorders.

Keywords: benzene; contamination; sperm; cell death

For citation: Dolgikh O.V., Dianova D.G., Alikina I.N., Krivtsov A.V. The benzene impact on programmed death of sperm cell. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100(10): 1060-1063. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-10-1060-1063> (In Russ.)

For correspondence: Oleg V. Dolgikh, MD, PhD, DSci., Head of Immunobiological Diagnostics Methods Department, Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare, Perm, 614045, Russian Federation. E-mail: oleg@fcrisk.ru

Information about the authors:

Dolgikh O.V., <https://orcid.org/0000-0003-4860-3145>

Dianova D.G., <https://orcid.org/0000-0002-0170-1824>

Alikina I.N., <https://orcid.org/0000-0002-2057-9828>

Krivtsov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-7986-0326>

Contribution: Dolgikh O.V. – research concept and design, editing; Dianova D.G. – research concept and design, text writing; Alikina I.N. – collection and processing of the material; Krivtsov A.V. – statistical processing. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

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

Acknowledgement. The study had no sponsorship. The work was carried out on the topic from the Research Plan of the Federal State Budgetary Institution "Federal Research Center for Medical and Preventive Technologies of Public Health Risk Management" "Study of reproductive disorders in men associated with exposure to harmful and hazardous production factors and substantiation of molecular genetic markers for their diagnosis", No. НОКР ААААА-А20-120080790015-5.

Received: July 27, 2021 / Accepted: September 28, 2021 / Published: October 31, 2021

Введение

Нарушения, возникающие в процессе основных этапов сложного жизненного цикла сперматозоида, достаточно часто являются причиной изменения состояния репродуктивной функции [1]. После эякуляции сперматозоид претерпевает ряд изменений, приобретает значительную подвижность и, соответственно, способность к оплодотворению яйцеклетки. Количество и качество производимой спермы являются зависимыми от конкретных клеточных и молекулярных механизмов контроля, на регуляцию которых оказывают влияние различные экзогенные факторы, в том числе и химические факторы (гаптены) среды обитания.

Зарегистрировано значительное число химических веществ, поступающих в организм из внешней среды, оказывающих негативное воздействие на организм. Предполагают, что загрязнения среды обитания могут оказывать негативное влияние на гормональный фон, генетический аппарат (материал) клетки, нормальный сперматогенез, снижая качество эякулированного семени и мужскую фертильность. К потенциально опасным для репродуктивного здоровья химическим веществам, поступающим в атмосферный воздух и воздух рабочей зоны, а также в водную среду, относятся фталаты, полициклические ароматические углеводороды, ароматические амины, фосфорорганические эфиры, ряд металлов [2, 3]. Отмечено, что в условиях воздействия отдельных химических веществ (органического и неорганического происхождения) снижается способность к оплодотворению яйцеклетки у сперматозоидов; уменьшается количество, концентрация и подвижность сперматозоидов, нарушается функция клеток Лейдига, инициируется апоптоз клеток Сертоли; понижается качество спермы и повышается уровень повреждений ДНК сперматозоидов; активируется некроз сперматозоидов, обусловленный дисбалансом в системе bax/bcl-2 [2, 3]. Анеуплоидия по 21-й, X-, Y-хромосомам в сперме наблюдалась у китайских мужчин, работающих на обувной, бумажной фабриках в условиях экспозиции бензолом [4]. Хромосомные аномалии сперматозоидов обнаружены у рабочих США в условиях воздействия ароматических углеводородов (бензол, ксилолы) [5]. Установлено негативное влияние отдельных органических репротоксикантов на сперматогенез, характеризующееся снижением выработки тестостерона, ингибированием пролиферации клеток Сертоли, активацией апоптоза гоноцитов за счёт повышения экспрессии FAS [6]. Необходимо отметить, что сохранение баланса между активностью процессов пролиферации и апоптозом обеспечивает механизм физиологической регуляции жизненного цикла сперматозоида. В семенных каналах происходит селективный апоптоз сперматогониев, что обуславливает необходимую плотность гамет. Следует подчеркнуть, что капацитация и апоптоз – это два достаточно прочно взаимосвязанных процесса [7]. Преобладание проапоптотических белков-регуляторов вызывает существенное снижение количества сперматозоидов в сперме. Между тем ингибирование апоптотических сигналов способствует выживанию аномальных клеток [3, 6, 7].

Показано, что в условиях негативного влияния различных химических загрязнений антропогенного и природного

происхождения изменение фертильности эякулята, ассоциированное с нарушением баланса в системе основных участников сигналинга апоптоза, способствует дисфункции репродуктивной системы. Очевидно, что изучение особенностей индикаторов апоптоза в эякулированном семени при воздействии токсикантов различной природы (на примере бензола) будет способствовать пониманию развития процессов, вызывающих нарушения фертильности сперматозоидов. Это обуславливает актуальность настоящего исследования.

Цель работы – изучить *in vitro* модифицирующее влияние бензола на показатели, контролируемые апоптоз сперматозоидов.

Материалы и методы

При проведении научного исследования учтены требования, изложенные в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве испытуемого» 1964 года (с изменениями и дополнениями 2013 года). Проведённые исследования одобрены этическим комитетом ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН» Роспотребнадзора. Информированное согласие на участие в исследовании и использование персональных данных подписано всеми участниками исследования.

В исследование включены данные 27 практически здоровых мужчин в возрасте от 41 до 51 года, не имеющих производственного контакта с вредными факторами и проживающих в относительно благоприятных условиях. В образцах свежей спермы оценивали уровень экспрессии на сперматозоидах CD25⁺-антигена и CD95⁺-антигена (FAS), определяли содержание p53, bax и активность каспазы-3, идентифицировали количество AnnexinV-FITC⁺PI⁻-сперматозоидов и AnnexinV-FITC⁺PI⁺-сперматозоидов. Детекцию показателей, контролируемых апоптоз, выполняли на проточном цитометре FACSCalibur фирмы Becton Dickinson (BD, США) методом иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител (BD, США). Для оценки влияния бензола на клеточную гибель пробы эякулята инкубировали с бензолом в концентрации 0,001 мкг/мл в течение 72 ч при температуре 37 °C (опытные пробы) [8]. Контролем служили образцы спермы без добавления бензола, которые инкубировали при таких же условиях.

Статистическая обработка и анализ полученных результатов выполнены с использованием пакета статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, США). Представленные данные описаны с помощью среднего арифметического значения (M) и ошибки среднего арифметического (m). Для проверки нулевых гипотез о равенстве средних значений между двумя зависимыми группами применяли T -критерий Уилкоксона. Для всех выполненных анализов различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

После внесения в опытные образцы эякулята бензола в концентрации 0,001 мкг/мл отмечалось статистически значимое ($p = 0,023–0,026$) в 1,7 раза снижение уровня проапоптотического белка p53 и в 1,4 раза активности

Показатели апоптоза сперматозоидов в условиях контаминации бензола, $M(m)$ Indices of spermatozoa apoptosis under conditions of benzene contamination, $M(m)$

Показатель Index	Проба без добавления бензола Sample without added benzene $n = 27$	Проба с добавлением бензола Sample with added benzene $n = 27$	T	Z	p
CD25 ⁺ -сперматозоиды, % CD25 ⁺ -spermatozoa, %	27.07 (3.97)	21.76 (3.19)	30.0	1.70	0.088
CD95 ⁺ -сперматозоиды, % CD95 ⁺ -spermatozoa, %	14.33 (3.37)	15.60 (4.02)	49.5	0.62	0.532
bax, %	33.26 (3.71)	34.78 (5.24)	55.0	0.28	0.776
p53, %	17.54 (2.81)	10.57 (1.90)	21.0	2.21	0.026
Каспаза-3, нг/мл Caspase-3, ng/ml	5.51 (0.87)	4.03 (0.80)	20.0	2.27	0.023
AnnexinV-FITC ⁺ PI ⁻ -сперматозоиды, % AnnexinV-FITC ⁺ PI ⁻ -spermatozoa, %	1.66 (0.66)	1.92 (0.89)	50.0	0.56	0.570
AnnexinV-FITC ⁺ PI ⁺ -сперматозоиды, % AnnexinV-FITC ⁺ PI ⁺ -spermatozoa	55.64 (6.28)	39.00 (6.19)	21.0	2.21	0.026

каспазы-3 (таблица). Обнаружено статистически значимое ($p = 0,026$) уменьшение в 1,4 раза процентного содержания AnnexinV-FITC⁺PI⁺-сперматозоидов в опытных пробах (после добавления бензола). Уровень экспрессии CD25⁺-рецептора и CD95⁺-рецептора на сперматозоидах, а также количество AnnexinV-FITC⁺PI⁻-сперматозоидов не имели статистически значимых ($p = 0,088-0,776$) различий в контрольных и опытных пробах.

Доля проб со значительным ингибированием активности каспазы-3 и сниженным содержанием p53 по сравнению с исходным уровнем после внесения бензола составила 80%. После добавления бензола в 66,7% проб эякулята (опытные образцы) отмечено снижение количества AnnexinV-FITC⁺PI⁺-сперматозоидов относительно контрольных образцов.

Обсуждение

Значительный рост индустриализации и урбанизации в целом сказывается на загрязнении среды обитания различными химическими веществами, образующимися в результате промышленной или сельскохозяйственной деятельности человека. Полагают, что значительное количество загрязнений среды обитания влияет на нормальный жизненный цикл сперматозоидов, снижая качество спермы и мужскую фертильность. Бензол в незначительных количествах находится практически повсеместно, основной путь его поступления в организм — через дыхательные пути. Показано, что бензол может вызывать гематотоксические, иммунотоксические эффекты, а также хромосомные aberrации [2–5]. Аналитический обзор литературы показал, что до 1980 года эффекты бензола на организм изучались в основном при его значительной концентрации в воздухе — выше 50%. Однако в поздних исследованиях установлено негативное воздействие бензола на человека в более низких концентрациях, например, обнаружен гематологический эффект для всех типов клеток на уровне 2,2% [4]. Следует отметить, что влияние бензола на фертильность спермы остаётся малоизученным, обнаружен ряд противоречий, касающихся модифицирующего эффекта химического загрязнения на гибель сперматозоидов. В современных научных источниках представлена информация о различных эффектах бензола при инициации и реализации апоптоза в опухолевых и нормальных (здоровых) клетках [9].

Результаты гигиенических исследований показали, что в крови и сперме мужчин при хронической ингаляционной экспозиции бензолом обнаруживается данный ароматический углеводород [9, 10]. Так, при содержании бензола в воздухе рабочей зоны от 0 до 7070,3 мг/м³ он идентифицирован

в крови обследуемых экспонированных мужчин в диапазоне 0,40–51,32 мкмоль/л, а в сперме — 0,17–8,54 мкмоль/л [9]. Бензол является сперматокином [11]. Длительное низкоуровневое воздействие бензола снижает уровень тестостерона, вызывает нарушение гаметогенеза и дисфункцию иммунной системы [11]. Установлено, что в условиях экспозиции бензолом изменяется качество спермы, характеризующиеся снижением подвижности и жизнеспособности сперматозоидов [10]. Ряд авторов продемонстрировали, что апоптоз сперматозоидов опосредуется белками FAS, при этом количество FAS⁺-гамет повышалось у мужчин, качество эякулята которых не соответствовало показателям, установленным ВОЗ для нормальной спермы. Также показано, что существуют особенности показателей спермограммы и наличие маркеров апоптоза у эякуляторных сперматозоидов, ассоциированные с возрастом [7, 12]. Половые клетки, маркированные FAS, фагоцитируются и элиминируются клетками Сертоли [13]. Для адекватного ответа на повреждающий агент клетке необходимо запустить пролиферативные и дифференцировочные процессы, характеризующиеся позитивной ранней активацией по критерию CD25⁺. Инкубация спермы человека с бензолом (в концентрациях 0,3; 0,2; 0,1 и 0,05%) в течение 1 ч при температуре 37 °C вызвала уменьшение подвижности и жизнеспособности сперматозоидов. Максимальное снижение жизнеспособности отмечалось при наиболее высоких концентрациях бензола (0,3 и 0,2%). Ингибирование активности ферментов, катализирующих реакцию образования АТФ, а также значительная генерация активных форм кислорода наблюдаются при внесении в опытные пробы эякулята бензола, что свидетельствует о нарушении функции митохондрий гамет [14]. Обнаружено снижение уровня апоптотических клеток на фоне изменения уровня экспрессии белков семейства BCL-2 в условиях экспозиции бензолом [15]. В системе *in vitro* метаболиты бензола дозозависимо индуцировали аутофагию и апоптоз за счёт усиления фосфорилирования bcl-2 [9]. На модели раковых клеток доказана способность бензола и его метаболитов дозозависимо индуцировать продукцию активных форм кислорода и повреждение митохондрий, характеризующиеся падением мембранного потенциала, изменением ультраструктуры митохондрий, активацией каспазы-3, каспазы-9 и усилением апоптоза [16]. Эффекторная каспаза-3 отвечает за реализацию как рецепторопосредованного, так и митохондриального апоптоза. Установлено, что каспаза-3 и p53 в незначительных количествах идентифицируются в митохондриях. Белок p53 может быть участником активации FAS-зависимого апоптоза, а также регулятором

открытия митохондриальной поры. Более того, в митохондри протеин p53 способен запускать олигомеризацию bax и/или каспазы-3 и, соответственно, апоптоз [17]. Следует отметить, что изменения мембранного потенциала митохондрий, активность каспазы-3 и уровень p53 предшествуют экстернализации фосфатидилсерина.

Бензол и его производные, являющиеся достаточно широко распространёнными загрязнителями окружающей среды, при любом пути воздействия непосредственно контактируют с клетками репродуктивной системы и формируют соответствующую адаптивную реакцию, которая может проявляться в модификации реализации гибели половых клеток. В системе *in vitro* внесение бензола в концентрации 0,001 мкг/мл в образцы спермы не изменяло уровень bax, количество CD25-положительных, FAS-положительных и аннексин-положительных сперматозоидов. В то же время инкубация опытных образцов эякулированного семени с бензолом вызвала статистически значимое ($p = 0,023–0,026$) снижение в среднем в 1,5 раза проапоптотического белка p53 и ингибирование активности каспазы-3, характеризуя угнетение p53-опосредованного пути передачи апоптотического стимула и подтверждая митохондриальную дисфункцию. Установлено, что внесение бензола в эякулированное семя вызывает статистически значимое ($p = 0,026$) уменьшение в 1,4 раза сперматозоидов, положительно маркированных по

аннексину и пропидиум иодиду, что не исключает ингибирования элиминации стареющих или дефектных форм сперматозоидов.

Заключение

Результаты исследования продемонстрировали, что ароматические углеводороды (на примере бензола) способны изменять фертильность сперматозоидов. Установлено ингибирование нерцепторного механизма апоптоза, ассоциированного с дефектом работы митохондрий и угнетением передачи апоптотического сигнала через p53-регулируемый путь. В условиях экспозиции *in vitro* бензола в эякуляте нарушалась степень окрашивания пропидиум иодидом ДНК сперматозоидов, а также снижалось внутриклеточное содержание p53 и активность каспазы-3. Таким образом, при оценке влияния агентов химической природы (на примере бензола) на фертильность эякулята кластеры дифференцировки сперматозоидов CD25⁺-сперматозоиды, CD95⁺-сперматозоиды, а также мембранные и внутриклеточные протеины bax, p53, каспаза-3, AnnexinV-FITC+PI⁻-сперматозоиды, AnnexinV-FITC⁺PI⁺-сперматозоиды могут быть использованы в качестве индикаторных показателей нарушения программированной клеточной гибели и снижения качества мужских половых клеток.

Литература

(п.п. 2–11, 13–17 см. References)

1. Сатаева Т.П., Ковальчук А.В., Кутя С.А. Жизненный цикл сперматозоида. Норма и нарушения. *Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины*. 2018; 8(1): 113–22.
12. Дианова Д.Г., Долгих О.В., Кривцов А.В., Левина А.В., Теплых С.В. Особенности показателей спермограммы у мужчин с различной степенью отягощенности репродуктивного анамнеза, проживающих

на территории крупного промышленного города. В кн.: *Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Анализ риска здоровью – 2021. Внешнесредовые, социальные, медицинские и поведенческие аспекты совместно с международной встречей по окружающей среде и здоровью RISE-2021»*. Том 2. Пермь; 2021: 219–24.

References

1. Sataeva T.P., Koval'chuk A.V., Kutya S.A. Sperm life cycle. Norm and violations. *Krymskiy zhurnal eksperimental'noy i klinicheskoy meditsiny*. 2018; 8(1): 113–22. (in Russian)
2. Krzastek S.C., Farhi J., Gray M., Smith R.P. Impact of environmental toxin exposure on male fertility potential. *Transl. Androl. Urol.* 2020; 9(6): 2797–813. <https://doi.org/10.21037/tau-20-685>
3. Kushawah B., Yadav R.S., Swain D.K., Kumari P., Kumar A., Yadav B., et al. Collapsed mitochondrial cristae in goat spermatozoa due to mercury result in lethality and compromised motility along with altered kinematic patterns. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 646. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80235-y>
4. Schnatter A.R., Rooseboom M., Kocabas N.A., North C.M., Dalzell A., Twisk J., et al. Derivation of an occupational exposure limit for benzene using epidemiological study quality assessment tools. *Toxicol. Lett.* 2020; 334: 117–44. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.05.036>
5. Tualeka A.R., Guan N.Y., Russeng S.S., Ahsan A., Susilowati I.H., Rahmawati P., et al. Relationship of benzene concentration, ECR benzene, malondialdehyde, glutathione, and DNA degeneration in shoe industrial workers in Osowilangun, Indonesia. *Dose Response*. 2020; 18(2): 1559325820921023. <https://doi.org/10.1177/1559325820921023>
6. Rehman S., Usman Z., Rehman S., Aldrahem M., Rehman N., Rehman I., et al. Endocrine disrupting chemicals and impact on male reproductive health. *Transl. Androl. Urol.* 2018; 7(3): 490–503. <https://doi.org/10.21037/tau.2018.05.17>
7. Nakidkina A.N., Kuzmina T.I. Apoptosis in spermatozoa and its role in deteriorating semen quality. *Russ. J. Dev. Biol.* 2019; 50: 165–72. <https://doi.org/10.1134/S1062360419040064>
8. Selvaraj P., Selvaraj K., Kalachelvi 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; 36(4): 241–4. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.126289>
9. Chen Y., Zhang W., Guo X., Ren J., Gao A. The crosstalk between autophagy and apoptosis was mediated by phosphorylation of Bcl-2 and beclin1 in benzene-induced hematotoxicity. *Cell Death Dis.* 2019; 10(10): 772. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2004-4>
10. Xiao G.B., Pan C.B., Cai Y.Z., Lin H., Fu Z.M. Effect of benzene, toluene, xylene on the semen quality and the function of accessory gonad of exposed workers. *Ind. Health.* 2001; 39: 206–10. <https://doi.org/10.2486/indhealth.39.206>
11. Kuranchie F.A., Angnunavuri P.N., Attigbhe F., Nerquaye-Tetteh E.N. Occupational exposure of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) to pump attendants in Ghana: Implications for policy guidance. *Cogent Environ. Sci.* 2019; 5(1). <https://doi.org/10.1080/23311843.2019.1603418>
12. Dianova D.G., Dolgikh O.V., Krivtsov A.V., Levina A.V., Teplykh S.V. Features of spermogram indices in men with varying degrees of burden of reproductive history, living on the territory of a large industrial city. In: *Materials of the XI All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation «Health Risk Analysis - 2021. Environmental, Social, Medical and Behavioral Aspects in Conjunction with the International Meeting on Environment and Health RISE-2021»*. Volume 2 [Materials XI Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem «Analiz riska zdorov'yu – 2021. Vneshnesredovye, sotsial'nye, meditsinskie i povedencheskie aspekty sovmestno s mezhdunarodnoy vstrechey po okruzhayushchey srede i zdorov'yu RISE-2021». Tom 2]. Perm'; 2021: 219–24. (in Russian)
13. Chen Y., Yang J., Wang Y., Yang M., Guo M. Zinc deficiency promotes testicular cell apoptosis in mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 2020; 195(1): 142–9. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01821-4>
14. Mandani P., Desai K., Highland H. Cytotoxic effects of benzene metabolites on human sperm function. *ISRN Toxicol.* 2013; 2013: 397524. <https://doi.org/10.1155/2013/397524>
15. The role of apoptosis-associated pathways as responders to contaminants and in disease progression. Chapter 8. In: Rager J.E., ed. *Systems Biology in Toxicology and Environmental Health*. Chapel Hill: University of North Carolina; 2015: 187–205.
16. Sun S., Zhang C., Gao J., Qin Q., Zhang Y., Zhu H., et al. Benzoquinone induces ROS-dependent mitochondria-mediated apoptosis in HL-60 cells. *Toxicol. Ind. Health.* 2018; 34(4): 270–81. <https://doi.org/10.1177/0748233717750983>
17. Frank A.K., Pietsch E.C., Dumont P., Tao J., Murphy M.E. Wild-type and mutant p53 proteins interact with mitochondrial caspase-3. *Cancer Biol. Ther.* 2011; 11(8): 740–5. <https://doi.org/10.4161/cbt.11.8.14906>