

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Долгих О.В., Алексеев В.Б., Дианова Д.Г., Аликина И.Н., Никоношина Н.А.

Программированная гибель половых клеток *in vitro* у мужчин среднего и старшего возраста с хроническим простатитом в условиях экспозиции репротоксикантами (на примере бензола)

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. Вопросы изучения причин и механизма развития хронического простатита (ХП) как важнейшего предиктора мужского бесплодия являются чрезвычайно актуальными. Ароматические углеводороды как доказанные репротоксиканты угнетают сперматогенез и способствуют андрогенному дефициту. **Цель работы** — выявить особенности апоптоза сперматозоидов *in vitro* у мужчин среднего и старшего возраста с ХП в условиях экспозиции репротоксикантами (на примере бензола).

Материал и методы. Проведено исследование эякулята 30 мужчин с ХП: 19 мужчин до 36 лет и 11 мужчин старше 44 лет. Маркеры клеточной гибели (AnnexinV-FITC⁺PI⁻, AnnexinV-FITC⁺PI⁺, Вах, каспаза-3) идентифицировали методом проточной цитометрии. Образцы семенной жидкости без внесения бензола являлись контрольными пробами, с добавлением 0,001 мкг/мл бензола — опытными. Спонтанные и индуцированные бензолом пробы инкубировали 72 ч при 37 °С.

Результаты. В системе *in vitro* выявлено, что добавление в эякулят мужчин до 36 лет 0,001 мкг/мл бензола снижает содержание AnnexinV-FITC⁺PI⁻-сперматозоидов ($p < 0,05$). В сперме мужчин старше 44 лет достоверно снижено содержание CD95⁺- и AnnexinV-FITC⁺PI⁻-сперматозоидов на фоне повышения Вах по сравнению с результатами пациентов до 36 лет ($p < 0,05$).

Ограничения исследований: использование специфического клеточного материала — гамет, а также показателей кластеров клеточной дифференцировки, отражающих процессы клеточной гибели.

Заключение. Верификация в эксперименте *in vitro* особенностей летальной программы сперматозоидов у мужчин с ХП позволила выявить признаки угнетения апоптоза, ассоциированные с возрастом и химическим модификатором — бензолом. Выявлены признаки нарушения митохондриальной регуляции и фосфатидилсериневой реализации запрограммированной гибели сперматозоидов у мужчин старшего возраста относительно молодых мужчин. Содержание Вах, CD95⁺- и AnnexinV-FITC⁺PI⁻-сперматозоидов в эякуляте рекомендуется использовать в качестве диагностических предикторов нарушения фертильности спермы у мужчин с ХП в условиях модификации бензолом.

Ключевые слова: апоптоз; CD95⁺; сперматозоиды; AnnexinV-FITC⁺PI⁻; бензол

Соблюдение этических стандартов. Исследование выполнено в соответствии с нормами Хельсинкской декларации ВМА «Этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве испытуемого» (1964, 2013 гг.). Исследование одобрено ЛЭК ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН» Роспотребнадзора (протокол № 1 от 22.01.2020). Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Для цитирования: Долгих О.В., Алексеев В.Б., Дианова Д.Г., Аликина И.Н., Никоношина Н.А. Программированная гибель половых клеток *in vitro* у мужчин среднего и старшего возраста с хроническим простатитом в условиях экспозиции репротоксикантами (на примере бензола). *Здравоохранение Российской Федерации*. 2023; 67(6): 543–548. <https://doi.org/10.47470/0044-197X-2023-67-6-543-548> <https://elibrary.ru/oblhhd>

Для корреспонденции: Долгих Олег Владимирович, доктор мед. наук, зав. отделом 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; Алексеев В.Б. — концепция и дизайн исследования, редактирование; Дианова Д.Г. — концепция и дизайн исследования, написание текста; Аликина И.Н. — сбор и обработка материала; Никоношина Н.А. — написание текста. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

Поступила 28.07.2023

Принята в печать 11.10.2023

Опубликована 23.12.2023

© AUTHORS, 2023

Oleg V. Dolgikh, Vadim B. Alekseev, Dina G. Dianova, Inga N. Alikina, Natalya A. Nikonoshina

Apoptosis in germ cell *in vitro* in middle-aged and older men with chronic prostatitis under exposure to reprotoxicants (by the example of benzene)

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation

Introduction. The issues of studying the causes and development mechanism of chronic prostatitis as the most important factor in the formation of male infertility are extremely relevant nowadays. Confirmed reprotoxicants including aromatic hydrocarbons inhibit spermatogenesis and lead to androgen deficiency.

Purpose: to identify the features of spermatozoa apoptosis *in vitro* in middle-aged and older men with chronic prostatitis under exposure to reprotoxicants (using benzene as an example).

Material and methods. A study of the ejaculate in thirty men with chronic prostatitis was conducted. 19 men were under 36 years old, 11 men were over 44 years old. Intracellular and membrane cell death markers (AnnexinV-FITC⁺PI⁻, AnnexinV-FITC⁺PI⁺, Bax, caspase-3) in semen samples were identified by flow cytometry. Seminal fluid samples without benzene were control; samples with the addition of 0.001 μ/ml of benzene were experimental. Spontaneous and benzene-induced samples were incubated for 72 hours at 37 °C.

Results. The *in vitro* system revealed that the addition of 0.001 μg/ml benzene to the ejaculate of men under 36 years of age reduces the content of AnnexinV-FITC⁺PI⁻-spermatozoa ($p < 0.05$). The content of CD95⁺- and AnnexinV-FITC⁺PI⁻-spermatozoa in the sperm of men over 44 years of age was significantly reduced against the background of an increase in Bax compared with the results of patients under 36 years of age ($p < 0.05$).

Limitations. The study limitations are the use of specific cellular material — gametes, as well as indicators of cell differentiation clusters reflecting the cell death.

Conclusion. *In vitro* experiment verification features of sperm lethal program in men with chronic prostatitis revealed the signs of apoptosis inhibition associated with age and a chemical modifier — benzene. We revealed the signs of the violations in mitochondrial regulation and phosphatidylserine realization of programmed germ cell death in older men relative to young men were revealed. It is recommended to use the content of Bax, CD95⁺- and AnnexinV-FITC⁺PI⁻-spermatozoa in an ejaculate as the diagnostic predictors of sperm fertility disorders in men = with chronic prostatitis under benzene exposure.

Keywords: apoptosis; CD95⁺; spermatozoa; AnnexinV-FITC⁺PI⁻; benzene

Compliance with ethical standards: The study was carried out in accordance with the norms of the Helsinki Declaration of the WMA “Ethical principles of medical research with human participation as a subject” (1964, 2013). The study was approved by the LEC of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies (protocol No. 1 of 22.01.2020). All participants signed a voluntary consent to participate in the study.

For citation: Dolgikh O.V., Alekseev V.B., Dianova D.G., Alikina I.N., Nikonoshina N.A. Apoptosis in germ cell *in vitro* in middle-aged and older men with chronic prostatitis under exposure to reprotoxicants (by the example of benzene). *Zdravookhranenie Rossiiskoi Federatsii (Health Care of the Russian Federation, Russian journal)*. 2023; 67(6): 543–548. <https://doi.org/10.47470/0044-197X-2023-67-6-543-548> <https://elibrary.ru/oblhhd> (in Russian)

For correspondence: Oleg V. Dolgikh, MD, PhD, DSci, Head of the Department of immunobiological diagnostic methods of the Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, 614045, Russian Federation. E-mail: oleg@fcrisk.ru

Information about the authors:

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

Alekseev V.B., <https://orcid.org/0000-0001-5850-7232>

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

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

Nikonoshina N.A., <https://orcid.org/0000-0001-7271-9477>

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received: July 28, 2023

Accepted: October 11, 2023

Published: December 23, 2023

Введение

Хронический простатит (ХП) является одним из наиболее распространённых урологических заболеваний у мужчин молодого и среднего возраста [1]. Важнейшими факторами риска ХП являются малоподвижный образ жизни, половые инфекции, частые переохлаждения, несбалансированный рацион питания, условия внешнесредового воздействия ряда веществ с репротоксикантными свойствами, дезадаптационные гормональные сбои и нарушения иммунного ответа при психоэмоциональном стрессе [2].

Клеточная гибель (апоптоз) является важнейшим регулятором физиологических и патологических процессов в организме, лежит в основе функционирования как репродуктивной, так и иммунной системы. Для обеспечения клеточного гомеостаза необходима адекватная система равновесия между пролиферацией, дифференцировкой и гибелью клетки — как половой, так и иммунной [3]. Возраст, вредные привычки, питание, инфекционные процессы, химические внешнесредовые факторы могут влиять на запрограммированную гибель различных типов клеток, включая сперматозоиды [4].

Роль апоптоза в регуляции сперматогенеза и нарушении фертильности спермы изучается достаточно активно. Однако сведений о возможных механизмах инициации и завершения летальной программы сперматозоида в эякулированном семени недостаточно. Остаются малоизученными природа и причины изменения уровня маркёров гибели мужской половой клетки. Доказано, что тип клеточной смерти и степень её выраженности во многом обуславливают интенсивность и длительность воспалительной реакции, а механизмы реализации летальной программы определяются совокупностью сигналов, поступающих сперматозоиду. Очевидно, что дальнейшее изучение механизмов гибели клеток репродуктивного тракта при воздействии сперматотоксинов будет способствовать совершенствованию мер профилактики и терапии нарушений мужской фертильности.

Цель работы — сравнительная оценка апоптоза сперматозоидов *in vitro* у разновозрастных мужчин с ХП, экспонированных репротоксикантами (на примере бензола).

Материал и методы

При выполнении исследования учтены требования, изложенные в Хельсинкской декларации ВМА «Этические принципы медицинских исследований с участием человека в качестве испытуемого» (1964, 2013 гг.). Исследование одобрено ЛЭК ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН» Роспотребнадзора (протокол № 1 от 22.01.2020). Согласие на участие в исследовании подписали все участники. В работу включены результаты исследования эякулята 30 мужчин с установленным диагнозом ХП (N41.1 по МКБ-10), из них 19 мужчин в возрасте 30–36 лет (33,79 (0,44) 95% ДИ 32,92–34,66) и 11 мужчин в возрасте 44–51 год (45,00 (0,67) 95% ДИ 44,26–46,10) ($t = 13,99$; $p < 0,001$). Молодые мужчины страдают ХП в течение 1–5 лет, мужчины среднего возраста — более 5 лет.

Критерии включения в исследование: подтверждённый диагноз ХП, отсутствие приёма иммуноотропных лекарственных препаратов в предшествующие 6 мес. Критерии исключения: неподтверждённый диагноз ХП, участие в другом исследовании.

Транслокацию фосфатидилсерина на наружный слой плазматической мембраны гаметы выявляли с помощью

аннексина V, меченного флуоресцеинизотиоцианатом (FITC). Для оценки жизнеспособности сперматозоида также выполняли окрашивание ДНК пропидия йодидом (PI). Сперматозоиды были определены на ранней стадии апоптоза (AnnexinV-FITC⁺PI⁻) и на поздней стадии апоптоза/некроза (AnnexinV-FITC⁺PI⁺). Каждую субпопуляцию выражали как долю от общей численности сперматозоидов. В образцах сперматозоидов с использованием моноклональных антител к соответствующему биомаркёру определяли уровень активности каспазы-3 (CASP-3) и экспрессии Вах, содержание сперматозоидов, экспонирующих CD95⁺-антиген (FAS) на приборе «FACSCalibur» («Becton Dickinson»).

Для оценки действия химического вещества на клеточную гибель свежие образцы биоматериала инкубировали с бензолом (ТСО 7141-95 МСО 0038:1998, 1,5 см³) в концентрации 0,001 мкг/мл в течение 72 ч при 37 °С (опытные пробы) [4, 5]. Контрольные пробы без добавления бензола также инкубировали в идентичном интервале и соответствующем температурном режиме.

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с использованием программы Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). Для описания количественных признаков данные представлены в виде $M \pm m$; 95% ДИ, где M — среднее арифметическое значение, m — стандартная ошибка среднего; 95% ДИ — доверительный интервал для среднего. Для проверки гипотез о виде распределения применен критерий Колмогорова–Смирнова. Во всех случаях распределение признаков соответствовало закону нормального распределения. Две независимые выборки сравнивали с использованием двухвыборочного t -критерия Стьюдента. Уровень значимости (p), на котором выполнена проверка нулевых гипотез, принимался равным 0,05.

Результаты

В системе *in vitro* установлено, что внесение бензола в концентрации 0,001 мкг/мл в пробы эякулята пациентов молодого возраста способствует статистически значимому ($p = 0,048$) снижению содержания AnnexinV-FITC+PI-сперматозоидов в 2,6 раза относительно контроля. Однако не выявлено различий между анализируемыми показателями в контрольных и опытных образцах спермы мужчин среднего возраста (таблица).

Сравнительная оценка показателей, характеризующих клеточную гибель, выявила, что до внесения бензола в образцах семенной жидкости у разновозрастных пациентов статистически значимо ($t = 2,10$; $p = 0,044$) снижено в 3,5 раза количество Annexin V-FITC⁺PI-сперматозоидов по сравнению с результатами лиц молодого возраста (таблица). В контрольных образцах эякулята у мужчин старше 44 лет обнаружено статистически значимое ($t = 2,42$; $p = 0,022$) снижение количества сперматозоидов, экспонирующих CD95⁺-маркер, относительно аналогичных значений у мужчин до 36 лет.

В контрольных и опытных пробах эякулированных сперматозоидов лиц среднего возраста был статистически значимо ($t = 2,27$; $p = 0,032$ и $t = 2,26$; $p = 0,032$ соответственно) повышен уровень Вах по отношению к результатам более молодых пациентов, кратность превышения составила 1,3 и 1,6 раза соответственно.

При сравнительной оценке продукции каспазы-3 в контрольных и экспериментальных пробах у мужчин разных возрастных групп не выявлено достоверных различий ($t = 0,168$; $p = 0,790$ и $t = 0,175$; $p = 0,864$ соответственно).

Показатели апоптоза, характеризующие гибель сперматозоидов в условиях контаминации бензолом, $M \pm m$ (95% ДИ)
Apoptosis indicators characterizing sperm death under benzene contamination, $M \pm m$ (95% CI)

Показатель Indicator	Мужчины в возрасте 30–36 лет ($n = 19$) Men aged 30–36 years ($n = 19$)				Мужчины в возрасте 44–51 лет ($n = 11$) Men aged 44–51 years ($n = 11$)			
	проба без бензола sample without benzene	проба с бензолом sample with benzene	t	p	проба без бензола sample without benzene	проба с бензолом sample with benzene	t	p
AnnexinV-FITC ⁺ PI ⁻ -сперматозоиды, % AnnexinV-FITC ⁺ PI ⁻ -spermatozoas, %	3,55 ± 1,17 (1,94–5,15)	1,35 ± 0,30 (0,75–1,95)	-2,126	0,048	1,00 ± 0,32* (0,39–1,64)	0,61 ± 0,21 (0,19–1,03)	-1,355	0,205
AnnexinV-FITC ⁺ PI ⁺ -сперматозоиды, % AnnexinV-FITC ⁺ PI ⁺ -spermatozoas, %	50,79 ± 4,64 (41,69–59,89)	42,75 ± 4,95 (45,53–61,17)	-1,789	0,090	47,55 ± 8,04 (31,78–63,32)	36,71 ± 7,55 (21,91–51,51)	-1,243	0,242
Вах, %	28,70 ± 1,86 (25,25–31,15)	25,20 ± 2,83 (19,96–30,00)	-1,905	0,075	38,55 ± 3,92* (31,99–45,11)	40,67 ± 6,23* (30,00–51,90)	0,699	0,500
CD95 ⁺ -сперматозоиды, % CD95 ⁺ -spermatozoas, %	26,28 ± 3,43 (19,56–33,00)	29,45 ± 4,25 (21,12–37,78)	10,034	0,315	14,21 ± 3,62* (9,48–18,94)	17,15 ± 5,43 (12,60–21,70)	1,466	0,173
Каспаза 3, нг/мл Caspase 3, ng/ml	6,43 ± 1,32 (3,84–9,02)	6,43 ± 1,40 (3,69–9,17)	0,168	0,790	4,01 ± 0,80 (2,46–5,56)	4,13 ± 0,87 (2,30–5,72)	0,175	0,864

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с мужчинами в возрасте 30–36 лет.

Note. * $p < 0.05$ in comparison 30–36 year men.

Обсуждение

Сравнительная оценка показателей эякулированной спермы у средневозрастных мужчин относительно молодых мужчин выявила ингибирование клеточной гибели за счёт рецептор-опосредованного апоптоза на фоне энергетической митохондриальной дисфункции и дальнейшим её усугублением после инкубации проб с бензолом. Следовательно, у мужчин с ХП с возрастом происходят нарушения клеточной гибели сперматозоидов, отмечается перестройка иммунной системы, ассоциированная с возрастом и химическим фактором.

Апоптоз является энергозависимым процессом. На ранних этапах апоптоза содержание АТФ значительно, однако на более поздних стадиях развития процесса наблюдается снижение его уровня [6]. Не исключено, что истощение АТФ инициирует аутофагию [7]. Альтернативный уровень регуляции апоптоза осуществляется через инактивацию проапоптотических членов семейства Bcl-2. Увеличение экспрессии белка Вах свидетельствует о повышении проницаемости наружной мембраны митохондрии, характеризующейся высвобождением цитохрома *c*, прокаспазы-3, прокаспазы-9 и снижением уровня АТФ [8]. В системе *in vivo* установлено, что присутствие цитохрома *c* необходимо для активации как proCASP-9, так и proCASP-3 [9]. Для завершения митохондриального апоптоза с участием цитохрома *c* формируется апоптосома с последующей активацией CASP-9. Иницирующая каспаза-9 способствует расщеплению эффекторной каспазы-3, которая является «точкой невозврата» клеточной гибели [10]. Идентифицировано более 1000 субстратов для эффекторных каспаз. В линии клеток HeLa снижение уровня цитозольного АТФ начиналось сразу после активации CASP-3 и способствовало каспазозависимому расщеплению каналов *PANX1*, подтверждая, что истощение внутриклеточного АТФ в апоптотических клетках является «запрограммированным» процессом [6].

Ключевая роль в запуске рецептор-опосредованного апоптоза принадлежит FAS (CD95⁺). Взаимодействие в системе FAS/FASL приводит к образованию сигнального комплекса, индуцирующего смерть клетки (DISC). Фор-

мирование DISC ведёт к активации иницирующей каспазы-8, которая расщепляет и активирует каспазу-эффектор. Гибель клеток, опосредованная FAS-рецептором, является формой апоптоза, при которой активация каспазного каскада возможна без участия митохондрий. Между тем существуют доказательства взаимодействия и перекрёстного регулирования различных механизмов клеточной гибели. Так, на уровне каспазы-8 и промотора апоптоза Bid внешний и внутренний пути апоптоза могут пересекаться [7]. В случае дефицита каспазы-8 происходят расщепление белка семейства Bcl-2 и выход цитохрома *c* из митохондрии. Цитохром *c* в сочетании с высвобождением SMAC и Omi обеспечивает полную активацию каспаз и выполнение апоптоза. Показано, что CASP-8, инактивируя RIPK-3, угнетает некроптоз, а CASP-3, инактивируя GSDM-D, снижает эффективность пироптоза [7, 11]. При высокой экспрессии белка гасдермина Е каспаза-3 может расщеплять GSDM-E, вызывая пироптоз [12]. Отмечено, что в ряде случаев дефицит FAS обусловлен значительной активностью каспазы-3 и повышенным уровнем цитохрома *c*. Запуск некроптоза (через FAS, TNFR1) происходит в случае ингибирования апоптоза [13]. Вероятно, в определённых условиях клетки могут «перепрограммировать» свою гибель, а выживание клетки зависит не только от стимулирования путей сохранения жизни, но и от ингибирования сигналов апоптоза.

Известно, что митохондрии не только определяют энергетический потенциал клетки и её жизненный путь, но также выполняют важную роль в развитии иммунного ответа, воспаления и клеточного старения. Митохондриальная ДНК, являясь одним из участников запуска сигнального пути cGAS-STING, способствует продукции интерферона-β1, интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли. Секрция интерлейкина-1β и -18 происходит в результате активации инфламмосомы при выходе мтДНК и высвобождении активных форм кислорода (АФК) из митохондрии. В результате PANX1-опосредованного экспорта АТФ из митохондрии происходят активация и хемотаксис антигенпрезентирующих клеток [14]. При физиологических адаптационных процессах в молодом организме повреждённые митохондрии эффективно утилизируются,

но в случае хронических заболеваний, вредных привычек, старения, воздействия токсикантов окружающей среды наблюдается аномальная митофагия [15]. Репродуктивная система чувствительна к негативному воздействию химических веществ, включая бензол [4, 16]. Международное агентство по изучению рака относит бензол к группе 1А «канцерогенные для человека» [17]. Основным путем поступления бензола в организм — ингаляционный, однако возможны пероральный и кожный пути. В условиях хронического низкоуровневого воздействия бензола возникает риск развития рака, нарушения работы печени, почек, сердца и лёгких, дисфункции нервной системы, заболеваний костного мозга и кроветворения, изменения гаметогенеза и дисбаланса иммунной системы. Ряд исследователей идентифицируют бензол как сперматотоксин [18]. Обнаружено более выраженное негативное влияние бензола на мужчин старшего возраста независимо от наличия у них вредных привычек: курение, употребление алкоголя [19]. Наиболее эффективный метаболизм бензола с образованием высокотоксичных метаболитов осуществляется при низких уровнях его воздействия. В условиях экспозиции бензол обнаруживается в крови, моче, семенной жидкости, грудном молоке. Сравнительная характеристика уровня контаминации биосред у мужчин выявила, что максимальные концентрации бензола идентифицируются в сперме, т.к. репротоксикант способен проходить через гематотестикулярный барьер [20]. Бензол негативно влияет на дифференциацию сперматогониев в первичные сперматоциты, а также вызывает аномалии первичных сперматоцитов. Результаты экспериментальных исследований показали, что бензол дозозависимо увеличивал генерацию АФК в сперматозоидах, повышая риск повреждения ДНК и опасность накопления мутаций [21]. В зависимости от типа клетки и её функционального состояния АФК инициируют пироптоз, ферроптоз, некроз или нетоз. На клеточной линии лейкомии человека HL60 метаболиты бензола индуцировали АФК-опосредованную митофагию [22]. Вследствие индуцированного бензолом окислительного стресса модифицируются внутриклеточные сигнальные каскады [20]. Экспериментально продемонстрирована способность бензола и его метаболитов увеличивать число копий мтДНК. Результаты исследований подтвердили тропность метаболитов бензола (фенол, гидрохинон, катехол) к митохондриям сперматозоида, что способствует снижению энергообеспечения клетки и росту образования АФК [23]. Подавляя активность Bcl-2 и активируя Вах, АФК модулируют передачу апоптотических сигналов в клетке [14]. Показано, что в зависимости от дозы 1,4-бензохинон основной метаболит бензола, изменяя фосфорилирование Bcl-2, нарушал апоптоз [24]. Таким образом, бензол является фактором, в значительной степени модифицирующим жизненный цикл сперматозоида и, возможно, обуславливающим мужскую фертильность.

Сравнительная оценка показателей гибели сперматозоидов у средневозрастных мужчин относительно молодых мужчин выявила ингибирование реализации клеточной гибели преимущественно за счёт рецептор-опосредованного апоптоза на фоне энергетической митохондриальной дисфункции и дальнейшее её усугубление после инкубации проб с бензолом, подтверждаемое отрицательной динамикой изменения маркерных показателей. Очевидно, что у мужчин с ХП с возрастом происходят количественные и качественные изменения показателей, характеризующих гибель сперматозоида, отмечается перестройка

иммунной системы, ассоциированная с возрастом и химическим фактором, причём фактор возраста выступает в качестве приоритетного. Рассматриваемая гипотеза о влиянии возрастного и химического фактора в формировании нарушений жизненного цикла сперматозоидов получила подтверждение в рамках верификации изменений индикаторных показателей состояния апоптоза *in vitro*, отражающих влияние воспалительного процесса в предстательной железе в условиях возрастной и гаптенной модификации на репродуктивное здоровье мужчин.

Ограничение исследования заключается в использовании специфического клеточного материала — гамет, а также показателей, характеризующих кластеры клеточной дифференцировки, отражающие процессы клеточной гибели

Заключение

Проведённая сравнительная оценка апоптоза сперматозоидов *in vitro* у мужчин разного возраста с ХП, экспонированных бензолом, позволила установить выраженные спонтанные нарушения программы клеточной гибели половых клеток у мужчин старше 44 лет, а также одновременно более высокую чувствительность сперматозоидов к экзогенной химической нагрузке репротоксикантами (на примере бензола) у мужчин до 36 лет. Результаты данного исследования позволяют рекомендовать к использованию в качестве индикаторов репродуктивных нарушений AnnexinV-FITC⁺PI-сперматозоиды, CD95⁺-сперматозоиды, Вах для оценки воздействия сперматотоксинов (в том числе бензола) на фертильность разновозрастных мужчин, подвергающихся экспозиции экзогенными химическими факторами. Механизм формирования хронического воспалительного процесса в предстательной железе у мужчин среднего возраста связан с повышенной клеточной пролиферацией (AnnexinV-FITC⁺PI⁻) и вероятностью развития бесплодия в онтогенетическом аспекте. В молодом возрасте воспаление ассоциировано с альтерацией (CD95⁺, каспаза 3), которую относят к пусковым механизмам развития воспалительного процесса. В исследовании *in vitro* подтверждено, что у мужчин молодого возраста более выражена чувствительность к репротоксикантам (на примере бензола), что позволяет рассматривать экзогенные химические факторы, в том числе профессиональные, как причину снижения мужской фертильности.

ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 2, 3, 5, 6, 9–15, 17, 19–24 см. References)

1. Аполихин О.И., Комарова В.А., Никушина А.А., Сивков А.В. Болезни предстательной железы в Российской Федерации: статистические данные 2008–2017 гг. *Экспериментальная и клиническая урология*. 2019; (2): 4–13. <https://doi.org/10.29188/2222-8543-2019-11-2-4-12> <https://elibrary.ru/dhxmjip>
4. 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. *Медицина труда и промышленная экология*. 2022; 62(12): 797–801. <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2022-62-12-797-801> <https://elibrary.ru/fknkndv>
7. Долгих О.В., Дианова Д.Г., Кривцов А.В., Аликина И.Н. Сравнительная оценка показателей апоптоза сперматозоидов у мужчин молодого и среднего возраста методом проточной цитометрии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021; 172(10): 501–4. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-172-10-501-504> <https://elibrary.ru/xmamsq>
8. Дятлова А.С., Дудков А.В., Линькова Н.С., Хавинсон В.Х. Молекулярные маркеры каспаза-зависимого и митохондриального апоптоза: роль в развитии патологии и в процессах клеточного

- старения. *Успехи современной биологии*. 2018; 138(2): 126–37. <https://doi.org/10.7868/S0042132418020023> <https://elibrary.ru/xmrnsh>
16. Шур П.З., Зайцева Н.В., Лир Д.Н. Обоснование методических подходов к количественной оценке риска репродуктивному здоровью, обусловленного вредными факторами производственной среды и трудового процесса. *Анализ риска здоровью*. 2022; (1): 48–57. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.1.05> <https://elibrary.ru/jahtnz>
 18. Шур П.З., Зайцева Н.В., Хасанова А.А., Четверкина К.В., Ухабов В.М. Разработка параметров для оценки неканцерогенного риска при хроническом ингаляционном поступлении бензола и среднегодовой предельно допустимой концентрации бензола по критериям риска для здоровья населения. *Анализ риска здоровью*. 2021; (4): 42–9. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2021.4.04> <https://elibrary.ru/izllvr>
- ### REFERENCES
1. Apolikhin O.I., Komarova V.A., Nikushina A.A., Sivkov A.V. Prostate diseases in the Russian Federation: statistical data for 2008-2017. *Eksperimental'naya i klinicheskaya urologiya*. 2019; (2): 4–13. <https://doi.org/10.29188/2222-8543-2019-11-2-4-12> <https://elibrary.ru/dhxmjp> (in Russian)
 2. Pirola G.M., Verdacchi T., Rosadi S., Annino F., de Angelis M. Chronic prostatitis: current treatment options. *Res. Rep. Urol*. 2019; 11: 165–74. <https://doi.org/10.2147/RRU.S194679>
 3. Kakarla R., Hur J., Kim Y.J., Kim J. Chwae Y. Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells. *Exp. Mol. Med*. 2020; 52(1): 1–6. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0362-8>
 4. 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. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya*. 2022; 62(12): 797–801. <https://doi.org/10.31089/1026-9428-2022-62-12-797-801> <https://elibrary.ru/fknddv> (in Russian)
 5. 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. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.126289>
 6. Imamura H., Sakamoto S., Yoshida T., Matsui Y., Penuela S., Laird D.W., et al. Single-cell dynamics of pannexin-1-facilitated programmed ATP loss during apoptosis. *eLife*. 2020; 9: e61960. <https://doi.org/10.7554/eLife.61960>
 7. Dolgikh O.V., Dianova D.G., Krivtsov A.V., Alikina I.N. Comparative evaluation of the parameters of spermatozoa apoptosis of young and middle-aged men by flow cytometry. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2021; 172(10): 501–4. <https://doi.org/10.47056/0365-9615-2021-172-10-501-504> <https://elibrary.ru/xmamsq> (in Russian)
 8. Dyatlova A.S., Dudkov A.V., Lin'kova N.S., Khavinson V.Kh. Molecular markers of caspase-dependent and mitochondrial apoptosis: the role of pathology and cell senescence. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2018; 138(2): 126–37. <https://doi.org/10.7868/S0042132418020023> <https://elibrary.ru/xmrnsh> (in Russian)
 9. He Y., Huang H., Li L., Yang X., Hao S., Zhao Y. Changes in apoptosis factors and activation of caspase-3 in tilapia muscle during storage. *Int. J. Food Prop*. 2018; 21(1): 1800–10. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1494199>
 10. Hussar P. Apoptosis regulators Bcl-2 and caspase-3. *Encyclopedia*. 2022; 2(4): 1624–36. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia2040111>
 11. Aizawa S., Brar G., Tsukamoto H. Cell death and liver disease. *Gut Liver*. 2020; 14(1): 20–9. <https://doi.org/10.5009/gnl18486>
 12. Jiang M., Qi L., Li L., Li Y. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. *Cell Death Discov*. 2020; 6: 112. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00349-0>
 13. Atkin-Smith G.K. Phagocytic clearance of apoptotic, necrotic, necroptotic and pyroptotic cells. *Biochem. Soc. Trans*. 2021; 49(2): 793–804. <https://doi.org/10.1042/BST20200696>
 14. Marchi S., Guilbaud E., Tait S.W.G., Yamazaki T., Galluzzi L. Mitochondrial control of inflammation. *Nat. Rev. Immunol*. 2023; 23(3): 159–73. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00760-x.23>
 15. Kanithi M., Junapudi S., Shah S.I., Matta Reddy A., Ullah G., Chidipi B. Alterations of mitochondrial network by cigarette smoking and e-cigarette vaping. *Cells*. 2022; 11(10): 1688. <https://doi.org/10.3390/cells11101688>
 16. Shur P.Z., Zaytseva N.V., Lir D.N. Substantiating methodical approaches to quantifying reproductive health risks caused by harmful occupational and work-related factors. *Анализ риска здоровью*. 2022; (1): 48–57. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2022.1.05> <https://elibrary.ru/zergib>
 17. Kuranchie F.A., Angnunavuri P.N., Attiogbe 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>
 18. Shur P.Z., Zaytseva N.V., Khasanova A.A., Четверкина К.В., Ухабов В.М. Establishing indicators for assessing non-carcinogenic risks under chronic inhalation exposure to benzene and average annual MPC for benzene as per health risk criteria. *Анализ риска здоровью*. 2021; (4): 42–9. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2021.4.04> <https://elibrary.ru/prammh>
 19. Fang Y., Wu H.T., Ye Y.J., Zhou L.F., Hu W., Zhang G.H., et al. Association between polymorphisms of metabolic enzyme genes and chromosomal damage in benzene-exposed workers in China. *J. Occup. Environ. Med*. 2017; 59(11): e215–20. <https://doi.org/stable/48501464>
 20. Longo V., Forleo A., Ferramosca A., Notari T., Pappalardo S., Siciliano P., et al. Blood, urine and semen Volatile Organic Compound (VOC) pattern analysis for assessing health environmental impact in highly polluted areas in Italy. *Environ. Pollut*. 2021; 286: 117410. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117410>
 21. Han L., Zhang W., Wang J., Jing J., Zhang L., Liu Z., et al. Shikonin targets to m6A-modified oxidative damage pathway to alleviate benzene-induced testicular injury. *Food Chem. Toxicol*. 2022; 170: 113496. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113496>
 22. Zhang C., Yu X., Gao J., Zhang Q., Sun S., Zhu H., et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy was activated against 1,4-Benzoquinone-induced apoptosis in HL-60 cells. *Toxicol. In Vitro*. 2018; 50: 217–24. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.03.002>
 23. Mandani P., Desai K., Highland H. Cytotoxic effects of benzene metabolites on human sperm function: an *in vitro* study. *ISRN Toxicol*. 2013; 2013: 397524. <https://doi.org/10.1155/2013/397524>
 24. 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>