

Влияние эндокринных дизрапторов бисфенола А и триклозана на качество спермы у мужчин и экспериментальных животных

Станислав Владимирович Чигринец^{1,2*}, Геннадий Васильевич Брюхин¹

¹Южно-Уральский государственный медицинский университет, г. Челябинск, Россия;

²ООО «ДНК клиника», г. Челябинск, Россия

Реферат

Цель. Установить связь между концентрацией эндокринных дизрапторов (бисфенола А, триклозана) в тканях яичка или семенной жидкости и качеством спермы у мужчин и экспериментальных животных.

Методы. Исследовано 53 образца семенной жидкости у мужчин с нормо- и патозооспермией. В семенной жидкости определяли концентрацию бисфенола А и триклозана методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Спермиологическое исследование проводили согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (2010). Экспериментальная часть работы выполнена на белых половозрелых лабораторных крысах-самцах Вистар (n=28). Определяли количество сперматозоидов в 1 мл спермы с регистрацией их подвижности и атипичных форм. Концентрацию бисфенола А и триклозана в яичках измеряли методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией.

Результаты. В 100 и 84,9% образцов эякулята обнаружены бисфенол А и триклозан со средней концентрацией 0,15 (0,06–0,31) нг/мл и 0,13 (0,05–0,22) нг/мл соответственно. С помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена были выявлены статистически значимые корреляционные связи между концентрацией эндокринных дизрапторов и параметрами эякулята: между бисфенолом А и общим количеством сперматозоидов, их концентрацией, долей прогрессивно подвижных сперматозоидов, долей сперматозоидов с нормальной морфологией и степенью фрагментации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) сперматозоидов. Концентрация триклозана коррелировала с долей сперматозоидов с нормальной морфологией и степенью фрагментации их ДНК. В экспериментальной части работы было показано, что бисфенол А снижал общее количество сперматозоидов с увеличением доли атипичных форм сперматозоидов и изменением доли фертильных сперматозоидов по сравнению с группой интактных животных. Триклозан снижал долю прогрессивно подвижных сперматозоидов.

Вывод. Бисфенол А и триклозан оказывают негативное влияние на качество спермы у мужчин и экспериментальных животных.

Ключевые слова: бесплодие, качество спермы, эндокринный дизраптор, бисфенол А, триклозан, эксперимент.

Для цитирования: Чигринец С.В., Брюхин Г.В. Влияние эндокринных дизрапторов бисфенола А и триклозана на качество спермы у мужчин и экспериментальных животных. *Казанский мед. ж.* 2019; 100 (4): 629–635. DOI: 10.17816/KMJ2019-629.

Effect of endocrine disrupting chemicals bisphenol A and triclosan on semen quality

S.V. Chigrinets^{1,2}, G.V. Bryukhin¹

¹South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia;

²DNK clinic, Ltd, Chelyabinsk, Russia

Abstract

Aim. To establish a relationship between the concentration of endocrine disruptors (bisphenol A, triclosan) in testicular tissues or seminal fluid and semen quality in men and experimental animals.

Methods. 53 samples of seminal fluid were investigated from men with normo- and pathozoospermia. In seminal fluid the level of bisphenol A and triclosan were determined by gas chromatography-mass spectrometry.

The spermiological study was carried out according to the World Health Organization guidelines (2010). The experimental part of the study was performed on adult male lab Wistar rats (n=28). The amount of spermatozoa per 1 ml of sperm was determined with the calculation of their motility and atypical forms. The concentration of bisphenol A and triclosan in the testicles was measured by gas chromatography-mass spectrometry.

Results. Bisphenol A and triclosan were detected in 100 and 84.9% of the ejaculate samples with a median concentration of 0.15 (0.06–0.31) ng/ml and 0.13 (0.05–0.22) ng/ml, respectively. With the Spearman's rank correlation coefficient, statistically significant correlation was found between the concentration of endocrine disruptors and ejaculate parameters: between bisphenol A and the total count of spermatozoa, their concentration, the proportion of progressively motile spermatozoa, the proportion of spermatozoa with normal morphology and degree of sperm DNA fragmentation. Triclosan concentration correlated with the proportion of spermatozoa with normal morphology and the degree of sperm DNA fragmentation. The experimental part of the study demonstrated that bisphenol A reduced the total number of spermatozoa with an increase in the proportion of atypical forms of spermatozoa and a violation of the proportion of fertile spermatozoa compared to the group of intact animals. Triclosan reduced the proportion of progressively motile spermatozoa.

Conclusion. Bisphenol A and triclosan have a negative effect on sperm quality in men and experimental animals.

Keywords: infertility, sperm quality, endocrine disruptor, bisphenol A, triclosan, experiment.

For citation: Chigrinets S.V., Bryukhin G.V. Effect of endocrine disrupting chemicals bisphenol A and triclosan on semen quality. *Kazan medical journal*. 2019; 100 (4): 629–635. DOI: 10.17816/KMJ2019-629.

Вопросы охраны здоровья мужчин в России сегодня становятся наиболее актуальными, поскольку здоровье мужчин выступает значимым показателем демографического, трудового и оборонного потенциала нации.

С позиции холистического подхода мужской фактор бесплодия — интегральный показатель нездоровья мужчины репродуктивного возраста и лимитирующий фактор суммарного коэффициента рождаемости в популяции. При этом качество эякулята следует рассматривать как фундаментальный биомаркер мужского здоровья [1–4].

Известно, что доля мужского фактора бесплодия составляет не менее 50% [5]. В литературе обсуждают следующие возможные причины мужского бесплодия неизвестной этиологии, на долю которого приходится не менее 30%: активные формы кислорода, генетические, эпигенетические факторы и эндокринные дизрапторы [5].

В 1993 г. впервые в литературу был введен термин «эндокринные дизрапторы» (эндокринные дизрегуляторы, гормоноподобные ксенобиотики), к которым были отнесены химические соединения, способные нарушать функции эндокринной системы [6]. На сегодняшний день значение эндокринных дизрапторов в регуляции деятельности систем жизнеобеспечения и размножения изучено не до конца.

К наиболее известным нестойким убиквитарным эндокринным дизрапторам относятся фталаты, бисфенол А и триклозан.

Бисфенол А и триклозан человек широко использует в повседневной жизни, поэтому его

обнаруживают в образцах мочи в 100 и 93% случаев соответственно [7].

Бисфенол А входит в состав полимерных материалов, которые применяют для производства широчайшего круга изделий: детских игрушек, пластиковых контейнеров, упаковки для продуктов питания и напитков, материалов для зубных пломб, деталей для автомобилей и др. Загрязнение продуктов питания и питьевой воды происходит за счёт миграции бисфенола А из материалов упаковки, пластиковых бутылок и внутреннего покрытия консервных банок.

Источником триклозана становятся средства личной гигиены: дезодоранты, зубная паста, крем для бритья, жидкость для полоскания рта, косметика, мыло для рук, а также бытовые чистящие средства. В организм человека триклозан попадает главным образом через кожу и желудочно-кишечный тракт, его можно обнаружить в различных биологических жидкостях и тканях организма.

Содержание бисфенола А и триклозана главным образом определяют в моче, крови и материнском молоке. Однако, как показали T. Geens и соавт. [8], бисфенол А и триклозан неодинаково накапливаются в тканях организма человека, поэтому мониторинг их концентрации по образцам мочи не может отражать истинного влияния ксенобиотиков на функционирование репродуктивных органов.

Цель исследования — установить связь между концентрацией эндокринных дизрапторов (бисфенола А, триклозана в тканях яичка или семенной жидкости) и качеством спермы у мужчин и экспериментальных животных.

В наблюдательном одноцентровом одномоментном (поперечном) исследовании, которое было проведено в ООО «ДНК клиника» (Челябинск) с ноября 2017 г. по июнь 2018 г. приняли участие 53 мужчины (средний возраст $30,8 \pm 3,6$ года). Пациенты обратились в клинику для выполнения спермиологического анализа в связи с бесплодием в браке, невынашиванием беременности партнершей, а также планированием беременности или донорством спермы.

При оценке качества 53 образцов эякулята мужчины были разделены на две группы: первая ($n=19$) — мужчины с нормозооспермией, планирующие беременность в супружеской паре, и доноры спермы; вторая группа ($n=34$) — мужчины с патозооспермией, идиопатической формой бесплодия сопоставимые по возрасту, индексу массы тела, абстиненции, курению и приёму алкоголя.

Спермиологическое исследование проводили согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ; 2010) с учётом оценки количества сперматозоидов, их подвижности и морфологии, а также индекса фрагментации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) сперматозоидов [9]. Заключение по спермограмме (нормозооспермия или патозооспермия) было основано на критериях, изложенных в тех же рекомендациях ВОЗ (2010) [9].

Для оценки фрагментации ДНК сперматозоидов использовали метод дисперсии хроматина спермы с помощью набора Gold Cyto DNA Assist Kit (laboratories AG, Германия). Нормативным значением степени фрагментации ДНК сперматозоидов считали 15% и менее (низкий риск нарушения фертильности).

Бисфенол А и триклозан в семенной жидкости определяли на газовом хроматографе с масс-спектрометром Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corporation, Япония). Данные обрабатывали с помощью программы GCMSsolution 4,3 (Shimadzu Corporation, Япония).

Экспериментальная часть работы выполнена на белых половозрелых лабораторных крысах-самцах линии Вистар с массой тела 150–193 г (всего 28 животных). Крысы были разделены на три рандомизированные группы (контроль и две испытываемые группы). Крысы первой испытываемой группы ($n=10$) получали бисфенол А, крысы второй испытываемой группы ($n=8$) получали триклозан. Контрольную группу составили интактные животные в количестве 10 особей. Подопытные животные в течение 2 мес ежедневно получали с пищей бисфенол А и триклозан со степенью гомоген-

ности $>97\%$ (Sigma-Aldrich, США) в количестве 200 мг/кг [10, 11].

Работа с лабораторными животными выполнена в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР №755 от 12.08.1977).

После взвешивания семенников зрелые сперматозоиды получали из придатка семенника, разрезая его вдоль в среде дозированного количества 5% раствора декстрозы (глюкозы в объеме 1 мл), предварительно подогретого до 37°C . Затем отрезком отмытой резиновой трубки эпидидимис активно перемещали в течение 2 мин для освобождения от части сперматозоидов. В полученной эпидидимальной суспензии определяли суммарное содержание сперматозоидов в 1 мл [12].

В камере Горяева подсчитывали сперматозоиды с учётом характера их подвижности. Подвижность сперматозоидов определяли по общепринятой методике 4-балльной оценки сперматозоидов по характеру подвижности [13]:

0) неподвижные;

1) «дергающиеся» (колебательное местное движение, когда есть движение хвоста, но не происходит перемещения сперматозоидов, либо движение по круговой траектории);

2) слабо подвижные (медленное прямолинейное движение);

3) прогрессивно подвижные (поступательное движение со спиральным вращением вокруг своей оси) сперматозоиды.

Для оценки патологических форм сперматозоидов смешивали часть полученной суспензии с 1% раствором эозина Y в соотношении 1:10. Затем через 30 мин готовили мазки, которые после просушивания на воздухе фиксировали метиловым спиртом и подвергали микроскопии [14]. Подсчитывали на 200 клеток процентное содержание сперматозоидов с дефектами головки, шейки, тела и хвоста.

Для оценки концентрации исследуемых эндокринных дизрапторов в тканях яичек левое яичко было полностью гомогенизировано в стеклянно-тефлоновом гомогенизаторе, а затем подвергнуто центрифугированию при 700 g в течение 10 мин при температуре 4°C , чтобы удалить детрит и ядра. Образовавшаяся в результате надосадочная жидкость была использована для определения концентрации бисфенола А и триклозана методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией.

Исследование одобрено 21.11.2017 локальным комитетом по этике Южно-Уральского государственного медицинского университета (г. Челябинск), выписка из протокола №9.

Таблица 1. Сопоставление групп по возрасту, индексу массы тела, периоду воздержания, статусу курения и употреблению алкоголя

Параметры		Первая группа (n=19), нормозооспермия	Вторая группа (n=34), патозооспермия	p
		Me (Q ₁ -Q ₃)	Me (Q ₁ -Q ₃)	
Возраст, годы		32,0 (29,5–34,0)	31,0 (28,0–33,0)	0,157
Период воздержания, сут		3,0 (3,0–4,0)	4,0 (3,0–4,0)	0,105
Индекс массы тела, кг/м ²		25,1 (22,4–26,7)	25,5 (24,2–26,8)	0,356
Курение	некурящие	11 (44%)	14 (56%)	0,901
	курящие	6 (46,2%)	7 (53,8%)	
Алкоголь	непьющие	8 (44,4%)	10 (55,6%)	1,0
	пьющие	8 (44,4%)	10 (55,6%)	

Таблица 2. Корреляционные связи между концентрацией бисфенола А, триклозана в семенной жидкости и параметрами эякулята у мужчин

Параметры	Бисфенол А, нг/мл		Триклозан, нг/мл	
	r	p	r	p
Общее количество сперматозоидов, млн	-0,330	0,016*	-0,188	0,211
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	-0,309	0,024*	-0,206	0,170
Прогрессивно подвижные сперматозоиды (a+b), %	-0,575	<0,001*	-0,237	0,113
Сперматозоиды с нормальной морфологией, %	-0,397	0,003*	-0,420	0,004*
Индекс ДНК фрагментации сперматозоидов, %	0,349	0,025*	0,604	<0,001*

Примечание: *p <0,05; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота.

Размер выборок предварительно не рассчитывали.

Статистический анализ полученных данных выполняли с помощью программы IBM SPSS Statistics v. 21 (IBM Corp., Armonk, NY, США). Проверка нормальности распределения переменных проведена с учётом объёма выборки с использованием критерия Колмогорова–Смирнова или Шапиро–Уилка. Результаты исследования представлены как медиана с интерквартильным размахом Me (Q₁; Q₃) или как средняя величина со стандартным отклонением (M±σ) при нормальном распределении. Для определения статистически значимых различий между группами использовали U-критерий Манна–Уитни. Для установления связи между показателями вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия между группами считали статистически значимыми при p <0,05.

Характеристика пациентов, вошедших в исследование, была следующей: средний возраст (±σ) составил 30,8±3,6 года, средний индекс массы тела (±σ) — 25,4±2,9 кг/м². При этом 42% мужчин были с избыточной массой тела (индекс массы тела 25–30 кг/м²), 11% — с ожирением I степени (индекс массы тела >30 кг/м²).

Группы сравнительного анализа были сопоставимы по возрасту, периоду воздержания от семяизвержений, индексу массы тела, курению и приёму алкоголя (табл. 1).

При этом частота патозооспермии среди курящих и употребляющих алкоголь составила 53,8 и 55,6%, среди некурящих и не употребляющих алкоголь — 56,0 и 55,6% соответственно (см. табл. 1)

В 100 и 84,9% образцов эякулята были обнаружены бисфенол А и триклозан со средней концентрацией 0,15 (0,06–0,31) нг/мл и 0,13 (0,05–0,22) нг/мл соответственно. Группа мужчин с патозооспермией (64%) была представлена следующим образом: частота тератозооспермии — 30% (n=16), астенотератозооспермии — 22,5% (n=12), олиготератозооспермии — 7,5% (n=4), олигоастенотератозооспермии — 4% (n=2).

Группы пациентов, включённых в исследование, статистически значимо различались по концентрации бисфенола А и триклозана в семенной жидкости (p <0,001; p=0,045 соответственно), а также индексу фрагментации ДНК сперматозоидов (p=0,001; p=0,004 соответственно). Так, у мужчин с нормозооспермией концентрации бисфенола А и триклозана

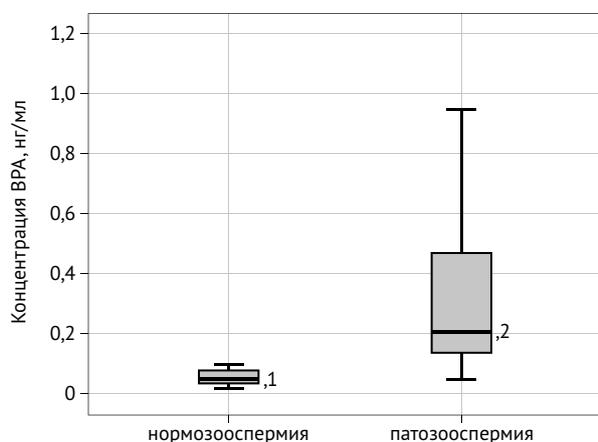


Рис. 1. Сравнение групп по концентрации бисфенола А (ВРА) в семенной жидкости

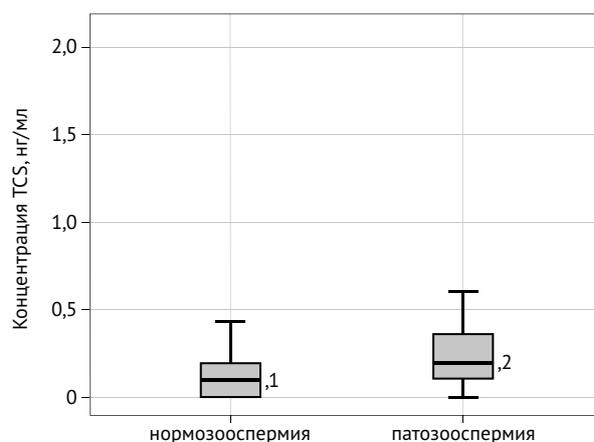


Рис. 2. Сравнение групп по концентрации триклозана (ТКС) в семенной жидкости

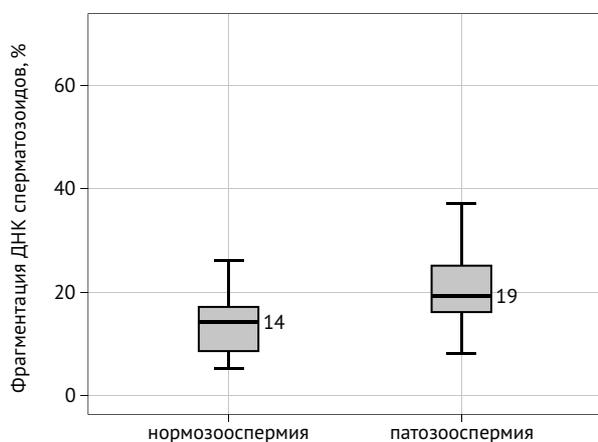


Рис. 3. Сравнение групп по степени фрагментации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) сперматозоидов, %

в семенной жидкости оказались меньше — 0,05 (0,04–0,08) нг/мл и 0,09 (0,0–0,19) нг/мл, чем у мужчин с патозооспермией — 0,21 (0,14–0,47) нг/мл и 0,20 (0,11–0,36) нг/мл соответственно. То же самое было справедливо и в отношении индекса фрагментации ДНК сперматозоидов — 14,0 (8,5–17,0)% против 19,0 (16,0–25,0)% (рис. 1–3).

Используя коэффициент ранговой корреляции Спирмена, между концентрацией бисфенола А, триклозаном в семенной жидкости и параметрами эякулята были обнаружены определенные корреляционные связи (табл. 2).

В экспериментальной части работы было выявлено, что различия между группами сравнения (опыт 1, опыт 2 и интактная) по концентрации бисфенола А и триклозана в тканях яичек были статистически значимыми ($p < 0,001$). Полученные результаты убедительно свидетельствуют о снижении абсолютной массы яичка во второй испытываемой группе, подверг-

шейся воздействию триклозана, по сравнению с группой контроля, тогда как в первой группе, подвергшейся воздействию бисфенола А, снижение массы яичка не имело статистической значимости ($p=0,001$ и $p=0,051$ соответственно).

Первая испытываемая группа крыс, подвергшихся воздействию бисфенола А, продемонстрировала снижение концентрации сперматозоидов со снижением доли прогрессивно подвижных и увеличением доли слабо подвижных сперматозоидов на фоне увеличения доли их атипичных форм по сравнению с группой интактных животных (табл. 3).

Вторая опытная группа крыс, подвергшихся воздействию триклозана, показала снижение доли прогрессивно подвижных сперматозоидов и увеличение доли слабо подвижных сперматозоидов по сравнению с группой интактных животных (см. табл. 3).

При использовании коэффициента ранговой корреляции Спирмена между концентрацией бисфенола А, триклозана в тканях яичка и параметрами спермы были обнаружены определённые корреляционные связи (табл. 4).

Вместе с этим установлено, что исследуемые эндокринные дизрапторы имеют склонность накапливаться в тканях яичка. Так, у испытываемых животных концентрация бисфенола А в среднем в 28 раз, а триклозана в 4,5 раза превышала таковую по сравнению с интактными.

Кроме того, следует отметить тот факт, что концентрации бисфенола А и триклозана в яичке животных и человека были тождественны как в контрольных группах, так и в группах исследования.

При сопоставлении полученных результатов влияния исследуемых эндокринных дизрапторов на параметры спермы в клинике и

Таблица 3. Сопоставление групп по концентрации бисфенола А и триклозана в ткани яичка, а также по массе семенников и параметрам спермы у крыс

Параметр	Контроль (n=10)	Опыт 1 (бисфенол А; n=10)	p	Опыт 2 (триклозан; n=8)	p
	Me (Q ₁ -Q ₃)	Me (Q ₁ -Q ₃)		Me (Q ₁ -Q ₃)	
Бисфенол А, нг/мл	0,01 (0,00–0,03)	0,28 (0,22–0,29)	<0,001*	0,02 (0,01–0,05)	0,466
Триклозан, нг/мл	0,06 (0,05–0,08)	0,07 (0,04–0,08)	0,649	0,27 (0,23–0,46)	<0,001*
Масса правого яичка, г	1,61 (1,55–1,78)	1,44 (1,38–1,62)	0,051	1,45 (1,42–1,49)	0,001*
Концентрация сперматозоидов, млн	15,9 (14,7–17,4)	11,4 (9,8–14,3)	0,004*	15,3 (12,15–17,0)	0,475
Прогрессивно подвижные сперматозоиды, %	58,0 (56,5–61,5)	49,0 (47,0–53,0)	<0,001*	53,0 (50,5–56,0)	0,011*
Слабо подвижные сперматозоиды, %	26,5 (23,5–27,0)	35,0 (33,0–38,0)	0,001*	34,0 (30,5–37,0)	0,001*
Атипичные формы сперматозоидов, %	12,0 (9,0–12,0)	19,0 (15,0–19,0)	0,014*	12,5 (11,0–13,5)	0,202

Примечание: *p < 0,05.

Таблица 4. Корреляционные связи между концентрацией бисфенола А, триклозана в тканях яичка и параметрами спермы у крыс

Параметр	Бисфенол А, нг/мл		Триклозан, нг/мл	
	r	p	r	p
Масса правого яичка, г	-0,453	0,050	-0,779	<0,001*
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	-0,661	0,001*	-0,173	0,492
Доля прогрессивно подвижных сперматозоидов, %	-0,870	<0,001*	-0,655	0,006*
Доля слабо подвижных сперматозоидов, %	0,793	<0,001*	0,883	<0,001*
Атипичные формы сперматозоидов, %	0,562	0,010*	0,310	0,211

Примечание: *p < 0,05.

эксперименте было обнаружено ухудшение всех параметров спермы (количества, подвижности и морфологии сперматозоидов) при воздействии бисфенола А как у мужчин, так и у экспериментальных животных. Влияние триклозана на сперматогенез было неодинаковым и ограничивалось нарушением только морфологии сперматозоидов у мужчин или их подвижности у экспериментальных животных.

ВЫВОДЫ

1. Бисфенол А и триклозан могут вызывать нарушение сперматогенеза у мужчин и крыс, что подтверждено снижением параметров спермы в клинике и эксперименте.
2. Бисфенол А и триклозан следует рассматривать как возможные причинные факторы идиопатической инфертильности/субфертильности у мужчин.

3. Бисфенол А в сравнении с триклозаном продемонстрировал бóльшую степень накопления в тканях яичка, что показано в эксперименте.

4. Бисфенол А ухудшал все параметры спермы (количество, подвижность и морфологию сперматозоидов) как у мужчин, так и у экспериментальных животных.

5. Триклозан влиял на сперматогенез по-разному и ограничивался нарушением только морфологии сперматозоидов у мужчин или их подвижности у экспериментальных животных.

6. Исследуемые эндокринные дизрапторы могут оказывать негативное влияние на фрагментацию дезоксирибонуклеиновой кислоты сперматозоидов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ventimiglia E., Montorsi F., Salonia A. Comorbidities and male infertility: a worrisome picture. *Curr. Opin. Urol.* 2016; 26 (2): 146–151. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000259.
2. Buck Louis G. Male fecundity and its implications for health and disease across the lifespan. *Hum. Reprod.* 2014; 29 (7): 1351–1352. DOI: 10.1093/humrep/deu108.
3. Eisenberg M., Li Sh., Behr B. et al. Semen quality, infertility and mortality in the USA. *Hum. Reprod.* 2014; 29 (7): 1567–1574. DOI: 10.1093/humrep/deu106.
4. Коршунов М.Н. 33-й Конгресс Европейской Ассоциации урологов 2018. Обзор выступлений по теме «Мужское бесплодие». *Дайджест урологии.* 2018; (3): 2–8. [Korshunov M.N. 33rd Congress of the European Association of urology 2018. Review of papers on the topic of “Male infertility”. *Dayzhest urologii.* 2018; (3): 2–8. (In Russ.)]
5. Nieschlag E., Behre H.M. *Andrology: male reproductive health and dysfunction.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag. 2010; 629 p. DOI: 10.1007/978-3-540-78355-8.
6. Colborn T., von Saal F.S., Soto A.M. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 1993; 101 (5): 378–384. DOI: 10.2307/3431890.
7. Li X., Ying G., Zhao J. et al. 4-Nonylphenol, bisphenol-A and triclosan levels in human urine of children and students in China, and the effects of drinking these bottled materials on the levels. *Environ. Intern.* 2013; 52: 81–86. DOI: 10.1016/j.envint.2011.03.026.
8. Geens T., Neels H., Covaci A. Distribution of bisphenol-A, triclosan and n-nonylphenol in human adipose tissue, liver and brain. *Chemosphere.* 2012; 87 (7): 796–802. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.01.002.
9. *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.* World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. 5th ed. Geneva: WHO. 2010; 287 p.
10. Жолдакова З.И., Сеницына О.О., Харчевникова Н.В. Современное состояние вопроса о токсичности бисфенола А при воздействии в дозах, близких к признанным безопасными. *Токсикол. вестн.* 2012; (4): 19–25. [Zholdakova Z.I., Sinitsina O.O., Kharchevnikova N.V. Current state of the issue of bisphenol A toxicity at exposure in doses close to those recognized safe. *Toksikologicheskii vestnik.* 2012; (4): 19–25. (In Russ.)]
11. Lan Z., Hyung Kim T., Shun Bi K. et al. Triclosan exhibits a tendency to accumulate in the epididymis and shows sperm toxicity in male sprague-dawley rats. *Environ. Toxicol.* 2015; 30 (1): 83–91. DOI: 10.1002/tox.21897.
12. Луцкий Д.Л., Николаев А.А. *Морфологическое исследование эякулята.* Методическое пособие. Астрахань. 1999; 46 с. [Lutskiy D.L., Nikolaev A.A. *Morfologicheskoe issledovanie eyakulyata.* Metodicheskoe posobie. (Morphological study of ejaculate. Methodological guide.) Astrakhan'. 1999; 46 p. (in Russ.)]
13. Bryukhin G.V., Sizonenko M.L. Characteristic of sperm motility in mature offspring of females with experimental liver diseases of various origins. *Bull. Exper. Biol. Med.* 2014; 158 (1): 27–29. DOI: 10.1007/s10517-014-2683-x.
14. Wyrobek A.J., Bruce W.R. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1975; 72 (11): 4425–4429. DOI: 10.1073/pnas.72.11.4425.