

Оксидативный стресс и патозооспермия

В.В. Евдокимов¹, О.Б. Жуков¹, Ю.В. Кастрикин¹, А.А. Байжуманов², В.Б. Туровецкий², С.К. Пирутин²

¹ НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России

² Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Сведения об авторах:

Евдокимов В.В. – д.м.н., отд. андрологии и репродуктивного здоровья человека НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России; e-mail: vvevdok@mail.ru

Evdokimov V.V. – Dr. M.Sc., Department of Andrology and Human Reproductive Health Research Institute of Urology and Interventional Radiology N.A. Lopatkin – branch of FSBI NMRRС of the Ministry of Health of Russia; e-mail: vvevdok@mail.ru

Жуков О.Б. – к.м.н., научный сотрудник, заведующий отделом лучевой диагностики НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России; e-mail: ob.zhukov@yandex.ru

Zhukov O.B. – PhD, research officer, Head of the department of beam radiodiagnosics Research Institute of Urology and Interventional Radiology N.A. Lopatkin – branch of FSBI NMRRС of the Ministry of Health of Russia; e-mail: ob.zhukov@yandex.ru

Кастрикин Ю.В. – клинический ординатор НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России; e-mail: yurii_kn@mail.ru
Kastrikin Yu.V. – clinical resident Research Institute of Urology and Interventional Radiology N.A. Lopatkin – branch of FSBI NMRRС of the Ministry of Health of Russia; e-mail: yurii_kn@mail.ru

Байжуманов А.А. – к.б.н., старший научный сотрудник Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
Bajzhumanov A.A. – PhD, senior research officer Faculty of Biology, Moscow state University named after M.V. Lomonosov

Туровецкий В.Б. – к.б.н., старший научный сотрудник Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
Turovecckij V.B. – PhD, senior research officer Faculty of Biology, Moscow state University named after M.V. Lomonosov

Пирутин С.К. – к.б.н., старший научный сотрудник Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова
Pirutin S.K. – C. B.Sc., senior research officer Faculty of Biology, Moscow state University named after M.V. Lomonosov

Стандартное лабораторное исследование эякулята является необходимым, но недостаточным условием, для установления причины бесплодия у мужчины, особенно при его идиопатической форме. Полное исследование включает помимо морфологических методов биохимические, иммунологические и генетические тесты. В последние годы в качестве критерия нормальной фертильности эякулята используют эпигенетические методы: оценка уровня структурных нарушений ДНК и упаковки хроматина [1,2]. Проявленный интерес вызван тем обстоятельством, что, например, при варикоцеле или при воспалительном процессе в репродуктивных органах повышена генерация активных форм кислорода, вызывающих оксидативный стресс (ОС) [3-6]. Эпигенетические факторы приводят к нарушению молекулярной организации клеточных структур. При этом ряд авторов обнаруживали снижение активности антиоксидантной системы и ее компонентов, что приводило к повыше-

нию частоты фрагментации ДНК и оказывало влияние на ранние этапы эмбрионального развития [7]. Установлено также, что сперматозоиды с поврежденной ДНК сохраняют способность к оплодотворению яйцеклетки. Однако оказалось, что у партнерш мужчин с высоким уровнем повреждений ДНК в сперматозоидах повышена частота спонтанных аборт [1,4]. Обнаружено, что основными источниками фрагментации ДНК служат апоптоз и ОС [8]. Элиминация половых клеток путем апоптоза – это нормальный физиологический процесс, приводящий к ограничению числа клеток в популяции и к выбраковке аномальных сперматозоидов. При этом R. Smith и соавт. обнаружили значительное повышение маркеров апоптоза в спермоплазме [9]. Выявлена прямая связь повреждений ДНК и хроматина с воздействием активных форм кислорода и ОС [10]. По данным обзоров S.S. Chen и соавт. и R. Henkel и соавт. установлено, что в результате влияния ОС на сперматозоиды более 30% мужчин становятся субфертильными [2]. Факторами, вызывающими ОС, служат следую-

щие внешние воздействия: электромагнитное излучение, перегревание, высокие физические нагрузки, химические вещества, токсины и др., а также внутренние: инфекции, передающиеся половым путем (ИППП), варикоцеле, курение, избыточный вес, диабет и др. [10,11].

Предприняты многочисленные попытки нейтрализовать негативное влияние ОС: устранение этиопатогенетического фактора, например, варикоцеле, ИППП; этиотропное лечение антиоксидантами, которые, как клинически установлено, имеют значимый эффект. Он состоит в повышении подвижности сперматозоидов и улучшении их морфологии. Например, после проведения варикоцелэктомии отмечается повышение целостности ДНК сперматозоидов, снижение индекса фрагментации ДНК до нормального уровня [12-14].

В связи с изложенным, целью нашего исследования явилось определение уровня ОС и антиоксидантной активности эякулята при различных видах патозооспермии, обусловленной заболеваниями органов репродуктивной системы. ■

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служил эякулят, полученный в соответствии с рекомендациями ВОЗ 5-го издания [15]. Всего обследовано 69 мужчин в возрасте от 20 до 45 лет. В группе пациентов с варикоцеле (14 человек) диагноз установлен по данным ультразвукового исследования (УЗИ) с цветной доплерографией венозного кровотока органов мошонки. Группа с азооспермией (11 человек) состояла из пациентов с необструктивной формой азооспермии. В группу с астенозооспермией (14 человек) входили пациенты без варикоцеле и хронического простатита. Группа с нормозооспермией (14 человек) представлена фертильными мужчинами. Отдельно выделена группа пациентов с варикоцеле (16 человек), которые были обследованы до и после варикоцелэктомии.

Образцы эякулята после разжижения подвергали стандартному морфологическому изучению по рекомендациям ВОЗ. Тот же образец центрифугировали 25 мин при 3000 об/мин. Супернатант (спермоплазму) отбирали по 200 мкл и оставляли в холодильнике при минус 80°C для определения величин исследуемых биохимических параметров.

Биохимический анализ спермоплазмы включал определение следующих параметров:

1. Содержание общего белка – г/л,
2. Активность супероксиддисмутазы (СОД) – у.е./ мг белка,
3. Содержание продуктов, образующихся в результате процессов перекисного окисления липидов

(ПОЛ) и реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-АП) – мкМ аскор ОЕ.

4. Общая антиоксидантная активность (ОАА).

Выбор параметров был обусловлен тем, что СОД является основным антиоксидантным ферментом, который ответственен за утилизацию супероксиданион-радикала. Количество ТБК-АП является маркером ОС, а определение ОАА позволяет оценить состояние антиоксидантной системы.

Исследование биохимических параметров спермоплазмы проводили на кафедре биофизики биофака МГУ им. М.В. Ломоносова с использованием ряда методов, описанных в работе М. Valko и соавт. [16].

Метод определения активности СОД основан на измерении количества продукта автоокисления адреналина в щелочной среде, при образовании которого происходит генерация супероксид-анион радикалов. Этот продукт автоокисления имеет максимум поглощения при 320 нм. Активность СОД оценивали по ингибированию процесса автоокисления адреналина добавлением образцов спермоплазмы и выражали в у.е. на мг белка, где за одну условную единицу активности фермента принимали такое его количество, которое необходимо для ингибирования образования продукта автоокисления на 50%. Расчет содержания ТБК-АП продуктов проводили с учетом коэффициента молярной экстинкции МДА и выражали в нмоль/мл спермоплазмы. Оптическую плотность измеряли при 532 нм. Определение ОАА спермоплазмы проводили методом, ко-

торый основан на способности водорастворимых антиоксидантов восстанавливать Fe³⁺ до Fe²⁺. Измеряли образовавшийся окрашенный продукт комплекса восстановленного железа с 2,4,6-трипиридилтиразином, поглощающий при 593 нм. ОАА выражали в мкМ аскорбиновой кислоты согласно калибровочной кривой.

Все измерения оптической плотности проводили на спектрофотометре Hitachi 556 (Япония).

Для обработки полученных результатов применяли методы описательной статистики с использованием программ STATISTICA. Средние значения по группам представлены в виде $M \pm s$ с исключением значений, отклоняющихся от средней арифметической более, чем на + 2s. Значимость различий между группами проверяли с помощью t – критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В таблице 1 представлены результаты исследования эякулята в виде среднеарифметических значений параметров и их среднеквадратических ошибок ($M \pm s$), и проценты отклонения показателя в сравнении с величиной соответствующего параметра в группе пациентов с нормозооспермией.

Несмотря на небольшие объемы групп наблюдения, все основные показатели фертильности эякулята в группе пациентов с варикоцеле имели сниженный уровень по сравнению с показателями в группе нормозооспермии. В группе

Таблица 1. Морфологические параметры эякулята в разных группах пациентов

Параметр	Норма (14 чел.)	Варикоцеле (14 чел.)	Астенозооспермия (14 чел.)	Азооспермия (11чел.)
Объем эякулята, мл	4,7 ± 0,4 (100%)	3,3 ± 0,3* (70%)	5,1 ± 0,5 (108%)	2,7 ± 0,4* (57%)
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	72,7 ± 6,3 (100%)	64,5 ± 6,1 (88%)	45,7 ± 4,2* (63%)	0
Живые клетки, %	74,7 ± 2,9 (100%)	61,5 ± 3,5* (82%)	55,1 ± 1,9* (73%)	0
Активная подвижность клеток, %	31,0 ± 2,6 (100%)	11,5 ± 2,3* (37%)	5,4 ± 0,9* (17%)	0
Общая подвижность клеток, %	51,5 ± 3,8 (100%)	29,7 ± 2,5* (57%)	19,6 ± 2,1* (38%)	0
Нормальные формы клеток, %	34,1 ± 1,2 (100%)	26,4 ± 1,3* (77%)	21,3 ± 1,6* (62%)	0

*различие достоверно по сравнению с нормой (p<0,05)

Таблица 2. Биохимические параметры спермоплазмы в разных группах пациентов

Показатель	Норма (14 чел.)	Варикоцеле (14 чел.)	Астенозооспермия (14 чел.)	Азооспермия (11чел.)
Общий белок, г/л	63,5 ± 3,9 (100%)	56,3 ± 6,3 (88%)	64,3 ± 5,3 (101%)	57,6 ± 8,0 (90%)
FRAP, OE	1693 ± 121 (100%)	1549 ± 119 (91%)	1742 ± 128 (103%)	1760 ± 146 (104%)
СОД, у.е./мг белка	2,24 ± 0,15 (100%)	2,65 ± 0,3 (118%)	2,42 ± 0,26 (108%)	2,43 ± 0,66 (108%)
ТБК-АП, мкМ аскор OE	2,23 ± 0,15 (100%)	2,06 ± 0,36 (92%)	2,27 ± 0,24 (101%)	2,33 ± 0,23 (104%)

пациентов с астенозооспермией все показатели, кроме объема эякулята, также характеризуются существенно более низким уровнем в сравнении с нормой и варикоцеле. Следует отметить, что во всех обследованных группах в образцах эякулята уровень лейкоцитов находился в пределах нормативных показателей, т.е. не более 1 млн/мл.

В таблице 2 представлены данные о состоянии оксидантной и антиоксидантной систем в тех же группах пациентов. В группе с варикоцеле выявлено незначительное снижение антиоксидантной активности эякулята на фоне некоторого повышения СОД. При астенозооспермии наблюдали тот же уровень, что и при нормоспермии. При азооспермии также не наблюдалось существенных отличий от нормы. Концентрация белка во всех группах находилась на одном уровне, т.е. не зависела от вида патозооспермии и не имела достоверных различий.

В таблице 3 представлены величины морфологических парамет-

ров эякулята у пациентов отдельной группы до и после операции по поводу варикоцеле (послеоперационное обследование проведено через 3-6 месяцев). Не обнаружено значительного повышения всех показателей, однако можно выделить положительные сдвиги подвижности и морфологии сперматозоидов.

Таблица 4 демонстрирует изменения состояния оксидантной и антиоксидантной систем эякулята. Сравнивали биохимические показатели у пациентов с варикоцеле до операции и после операции. Обнаружено значительное повышение величины антиоксидантного показателя ОАА и ТБК-АП и одновременно существенное снижение показателя ОС (СОД). При этом концентрация белка достоверно не изменялась.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты обследования пациентов с разными видами патозооспермии показывают наличие существенных изменений

морфологических параметров сперматозоидов и в меньшей степени – биохимических параметров спермоплазмы.

Варикоцеле и астенозооспермия сопровождаются падением активной подвижности сперматозоидов до 37% и 17%, соответственно по отношению к группе с нормозооспермией. Также заметно уменьшение числа нормальных форм половых клеток: до 77% и 62%, соответственно (по сравнению с нормозооспермией). Такие изменения можно рассматривать как результат влияния ОС, что подтверждается некоторым повышением активности СОД в этих группах на 18% и 8%, как ответ на усиление продукции АФК, и соответственно снижением общей антиоксидантной активности на 9%. Несмотря на незначительные сдвиги величин клеточных параметров антиоксидантной защиты, они направлены на нейтрализацию свободных радикалов, т.е. действуют синхронно и однонаправленно. Следует также подчеркнуть, что во всех анализах эякулята количество лейкоцитов не превышало нормального уровня, т.е. отсутствовал воспалительный компонент и все обнаруживаемые изменения, вероятно, обусловлены ишемией, связанной с варикоцеле.

Обращает на себя внимание группа с азооспермией, где биохимические показатели незначительно отличались от группы с нормозооспермией, т.е. секреция этих компонентов эякулята зависит не от концентрации сперматозоидов, а от выработки их клетками эпителия придатков, семенных пузырьков, предстательной железы [9]. Наиболее показательны выглядят изменения величины параметров эякулята в отдельной группе

Таблица 3. Параметры эякулята у пациентов с варикоцеле (до и после варикоцелэктомии)

Показатель	Варикоцеле до операции (8 чел)	После варикоцелэктомии (8 чел.)
Объём эякулята, мл	3,3 ± 1,4 (100%)	3,6 ± 1,3 (109%)
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	68,6 ± 15,1 (100%)	65,0 ± 16,4 (95%)
Живые клетки, %	62,0 ± 11,5 (100%)	62,1 ± 6,7 (100%)
Активная подвижность клеток, %	10,6 ± 4,3 (100%)	13,5 ± 3,6 (127%)
Общая подвижность клеток, %	29,4 ± 5,5 (100%)	32,2 ± 4,2 (109%)
Нормальные формы клеток, %	25,6 ± 11,1 (100%)	28,0 ± 5,6 (109%)

Таблица 4. Биохимические параметры спермоплазмы при варикоцеле (до и после операции)

Показатель	Варикоцеле до операции (8 чел)	После варикоцелэктомии (8 чел.)
Общий белок, г/л	57,05 ± 13,8 (100%)	56,7 ± 10,1 (99%)
FRAP, OE	1548 ± 218 (100%)	2047 ± 332* (132%)
СОД, у.е./мг белка	3,2 ± 0,8 (100%)	2,4 ± 0,5* (75%)
ТБК-АП, мкМ аскор OE	2,2 ± 0,8 (100%)	2,7 ± 0,5 (122%)

пациентов с варикоцеле. Обследование пациентов в дооперационном периоде обнаруживает снижение параметров общей и активной подвижности сперматозоидов по отношению к нормативам ВОЗ. В постоперационном периоде (через 3-6 месяцев) отмечено незначительное улучшение характеристик морфологических параметров: активной подвижности – на 27%, общей подвижности – на 9%, морфологии – на 9%. Эти результаты совпадают с данными, полученными в других работах [11,13,14]. В этом же периоде выявлено повышение общей антиоксидантной активности эякулята на 32% и одновременно значительное снижение оксидантной активности на 25%. Известно, что супероксиддисмутаза инактивирует АФК, защищая сперматозоиды от оксидативного влияния. В этих условиях

происходит снижение негативного эффекта ОС на эякулят и его компоненты. ОС обусловлен нарушением равновесия между продукцией активных форм кислорода и внутриклеточной антиоксидантной системой. Избыток АФК приводит к индуцированному апоптозу сперматозоидов и повреждению их ДНК.

На основании полученных результатов об улучшении морфологических характеристик сперматозоидов и биохимических показателей эякулята можно предположить, что варикоцеле является этиологическим фактором, создающим условия для появления ОС, а варикоцелеэктомия нейтрализует избыток АФК и уменьшает фрагментацию ДНК, как подчеркивалось в других работах [7,12]. Оксидативный стресс имеет место только в группе больных с варикоцеле, но не у паци-

ентов с патозооспермией, что может указывать на патогенетическую роль хронической ишемии, сопровождающей варикоцеле, в инициации избыточной продукции АФК.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что при обнаружении варикоцеле, сопровождаемого астенотератозооспермией, необходимо обследование пациента на предмет выявления степени фрагментации ДНК. Хирургическая коррекция варикоцеле приводит к повышению фертильности эякулята, по всей вероятности, за счет снижения уровня ОС, и увеличению числа клеток с нормальной упаковкой хроматина, что обеспечивает потенциал оплодотворения яйцеклетки в условиях супружеской половой жизни, либо при использовании эякулята в процедурах вспомогательных репродуктивных технологий. ■

Ключевые слова: *сперматозоиды, патозооспермия, биохимические параметры.*

Key words: *spermatozoa, pathozoospermia, biochemical parameters.*

Резюме:

Введение. Анализ отечественной и зарубежной литературы последних лет свидетельствует о том, что окислительный стресс сопровождает и/или является одним из патогенетических звеньев в развитии многих видов репродуктивной патологии мужчин различного возраста. На состояние здоровья мужского населения оказывают влияние факторы, связанные с образом жизни, состоянием окружающей среды, генотипом популяции. Эти изменения выражаются не только в ухудшении функции сперматогенеза, но и в возникновении оксидативного стресса в крови и семенной жидкости мужчин репродуктивного возраста. Соответственно, специалисты по мужскому репродуктивному здоровью активно изучают основные аспекты диагностики и влияния оксидативного стресса (ОС) на фертильность мужчин с целью оценки возможного использования антиоксидантов для улучшения параметров эякулята.

Целью нашего исследования явилось определение уровня ОС и антиоксидантной активности эякулята при различных видах патозооспермии, обусловленной заболеваниями органов репродуктивной системы.

Материалы и методы. Материалом для исследования служил эякулят, полученный по параметрам рекомендаций ВОЗ 5-го издания. Всего обследовано 69 мужчин в возрасте от 20 до 45 лет. В группе пациентов с варикоцеле (14 человек) диагноз установлен по данным ультразвукового исследования с цветной доплерографией органов мошонки. Группа с азооспермией (11 человек) состояла из пациентов с необструктивной формой азооспермии. В группу с астенотератозооспермией (14 человек) входили пациенты без варикоцеле и хронического простатита. Группа с нормозооспермией (14 человек)

Summary:

Oxidative stress and pathozoospermia

V.V. Evdokimov, O.B. Zhukov, Yu.V. Kastrikin, A.A. Bayzhumanov, V.B. Turovetskiy, S.K. Pirutin

Introduction. The analysis of domestic and foreign publications indicates that oxidative stress is accompanying and/or plays one of pathogenic role in development of many types of reproductive disorders in men of various ethnic groups. The state of health of the male population affected by factors related to lifestyle, environment, population genotype. These changes are expressed not only in deterioration of spermatogenesis, but also in appearance of an oxidative stress signs in blood serum and ejaculate in men of reproductive age. Accordingly, specialists in male reproductive health are actively studying the main aspects of the diagnosis and effects of oxidative stress (OS) on male fertility, to assess the possible use of antioxidants to improve the parameters of the ejaculate. Accordingly, fertility specialists are actively exploring the diagnosis of such stress in spermatozoa and evaluating the possible use of antioxidants to ameliorate this condition.

The purpose of our research was definition of the OS level and antioxidant activity of the ejaculate at different types of the pathozoospermia caused by diseases of the organs of the reproductive system.

Materials and method. The material for the study was ejaculate, obtained from the parameters of the WHO recommendations of the 5th edition. A total of 69 men aged 20 to 45 years were examined. In the group of patients with varicocele (14 patients), the diagnosis was established per ultrasound with color Doppler ultrasound of the scrotal organs. The group with azoospermia (11 patients) consisted of patients with non-obstructive form of azoospermia. The group with astenoospermia

представлена фертильными мужчинами. Отдельно выделена группа пациентов с варикоцеле (16 человек), которые были обследованы до и после варикоцелэктомии.

Результаты. На основании полученных результатов можно предположить, что варикоцеле является этиологическим фактором, создающим условие для появления ОС, а варикоцелэктомия нейтрализует избыток АФК и уменьшает фрагментацию ДНК. Оксидативный стресс имеет место только в группе больных с варикоцеле, но не у пациентов с патозооспермией, что может указывать на патогенетическую роль хронической ишемии, сопровождающей варикоцеле, в инициации избыточной продукции АФК. Таким образом, при обнаружении варикоцеле, сопровождаемого астено-тератозооспермией, необходимо обследование пациента на предмет оценки степени фрагментации ДНК. Хирургическая коррекция варикоцеле приводит к повышению фертильности эякулята за счет снижения уровня ОС и увеличению числа клеток с нормальной упаковкой хроматина.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

(14 patients) included patients without varicocele and chronic prostatitis. The group with normozoospermia (14 persons) is represented by fertile men. Separately, a group of patients with varicocele (16 people) who were examined before and after varicocelectomy were identified.

Results. Based on the results obtained, it can be assumed that varicocele is the etiological factor that creates a condition for the emergence of the OS, and varicocelectomy neutralizes the excess of reactive oxygen species (ROS) and reduces the fragmentation of deoxyribonucleic acid (DNA). Oxidative stress occurs only in the group of patients with varicocele, but not in patients with pathozoospermia, which may indicate the pathogenetic role of chronic ischemia accompanying varicocele, in initiating excess ROS production. Thus, when a varicocele is detected accompanied by asthenoteratozoospermia, it is necessary to evaluate the degree of DNA fragmentation. Surgical correction of varicocele leads to an increase in the fertility of the ejaculate due to a decrease in the level of OS, and an increase in the number of cells with normal packing of chromatin.

Authors declare lack of the possible conflicts of interests.

ЛИТЕРАТУРА

1. Agarwal A, Said TM Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male fertility. *Hum Reprod* 2003;19(4): 331-345.
2. Chen SS, Huang WJ, Chang LS, Wei YH. Attenuation of oxidative stress after varicocelectomy in subfertile patients with varicocele. *J Urol* 2008; 179(2): 639-642. DOI: 10.1016/j.juro.2007.09.039
3. Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev* 2011;19(1): CD 007411. DOI: 10.1002/14651858.CD007411.pub2
4. Lachaud C, Tesarik J, Cacadas ML, Mendoza C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. *Hum Reprod* 2004;19(3): 607-610. DOI: 10.1093/humrep/deh130
5. Панкратова М.С., Юсипович А.И., Воронцова М.В., Коваленко С.С., Байжуманов А.А., Паршина Е.Ю. и др. Особенности кислородного и антиоксидантного статуса крови на фоне заместительной терапии гормоном роста у детей с соматотропной недостаточностью. *Проблемы эндокринологии* 2012(5):10-15.
6. Seli E, Gardner DK, Sakkas D, Moffatt O, Sakkas D. Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2004;82:378-383. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2003.12.039
7. Piomboni P, Gambera L, Serafini F, Campanella G, Morgante G, De Leo V. Sperm quality improvement after natural antioxidant treatment of asthenoteratozoospermic men with leucocytospermia. *Asian J Androl* 2008;10:201-206. DOI: 10.1111/j.1745-7262.2008.00356.x
8. Sadek A, Almoahmy AS, Zaki A, Aref M, Ibrahim SM, Mostafa T. Sperm chromatin condensation in infertile men with varicocele before and after surgical repair. *Fertil Steril* 2011;95(5):1705-1708. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.01.008
9. Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, Rios R, Morales I, et al. Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Hum Reprod* 2006;21(4):986-993. DOI: 10.1093/humrep/dei429
10. Gharagozloo P, Aitken RJ The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* 2011;26(7):1628-1640. DOI: 10.1093/humrep/der132
11. Божедомов В.А., Торопцева М.В., Ушакова И.В., Спориш Е.А., Ловыгина Н.А., Липатова Н.А. Активные формы кислорода и репродуктивная функция мужчин: фундаментальные и клинические аспекты (обзор литературы). *Андрология и генитальная хирургия*. 2011;(3):10-16.
12. Baaseem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A, et al. Varicocele and male factor infertility treatment. *Eur Urol* 2011;60:796-808. DOI: 10.1016/j.eururo.2011.06.018
13. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed* 2006;12 (5): 630-633.
14. Altunoluk B, Efe E, Kurutas EB, Gul AB, Atalay F, Eren M. Elevation of both reactive oxygen species and antioxidant enzymes in vein tissue of infertile men with varicocele. *Urol Int* 2012;88 (1):102-106.
15. Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. 5-е изд. М. 2012. 291 с.
16. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39(1):44-48. DOI: 10.1016/j.biocel.2006.07.001

REFERENCES (5, 10, 12)

5. Pankratova M.S., Yusipovich A.I., Vorontsova M.V. Osobennosti kislorodnogo i antioksidantnogo statusa krovi na fone zamestitel'noy terapii gormonom rosta u detey s somatotropnoy nedostatochnostyu. [Peculiarities of the blood oxygen and antioxidant status in the children presenting with somatotrophic insufficiency and managed by the substitution treatment with growth hormone]. *Problimi endokrinologii* 2012(5):10-15. (In Russian)
10. Rukovodstvo VOZ po issledovaniyu i obrabotke eyakulyata cheloveka. 5-e izd. M. 2012. 291 p. (In Russian)
12. Bozhedomov V.A., Toroptseva M.V. i dr. Aktivnyie formyi kisloroda i reproduktivnaya funktsiya muzhchin: fundamentalnyie i klinicheskie aspektyi (obzor literaturyi). [Reactive oxygen species and the reproductive function of men: basic and clinical aspects (review)]. *Andrologiya i genitalnaya hirurgiya* 2011; 3:10-16. (In Russian)