

**ГЕРПЕСВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ МУЖСКИХ ГАМЕТ И БЕСПЛОДИЕ: ОТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЕЙ К РАЗРАБОТКЕ КЛИНИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ**

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, Москва

В работе суммированы результаты лаборатории о механизмах и последствиях взаимодействия герпесвирусов с мужскими половыми клетками. Во фракции сперматозоидов, полученной из клинических образцов эякулята, обнаружены ДНК герпесвирусов, белки и инфекционно активные вирус простого герпеса (ВПГ) и цитомегаловирус (ЦМВ). Выявлена корреляция между присутствием ВПГ в эякуляте и бесплодием в браке, невынашиванием беременности и нарушением ранних стадий эмбрионального развития. Проведен анализ взаимодействия герпесвирусов с мужскими гаметами. При заражении сперматозоидов ВПГ и ЦМВ *in vitro* обнаружено связывание вирусов преимущественно с головкой гаметы. Для изучения влияния герпесвирусов на сперматогенез разработаны следующие модели: 1. внутрибрюшинное заражение половозрелых мышей; 2. инфицирование половозрелых мышей через *rete testis*; 3. органная культура яичка человека. Проведенные исследования позволили: 1. установить пути проникновения вируса в мужские гонады; 2. выявить чувствительность сперматогониев, сперматоцитов и сперматид к ВПГ и ЦМВ; 3. доказать гаметотоксический эффект и необратимую потерю фертильности под действием герпесвирусов; 4. разработать экспериментальный метод восстановления сперматогенеза путём трансплантации тестикулярных клеток неонатальных мышей в семенники взрослых животных. Полученные результаты указывают на целесообразность обследования доноров спермы, а также мужчин, состоящих в бесплодном браке, на наличие герпесвирусов в эякуляте, а также разработки новых методов лечения бесплодия на основе специфической противовирусной терапии и современных клеточных технологий.

Ключевые слова: *вирус простого герпеса, ВПГ, цитомегаловирус, ЦМВ, мужские половые клетки, сперматогенез, передача герпесвирусной инфекции, нарушение фертильности.*

A.A. Kushch, V.A. Naumenko, R.R. Klimova, Yu.A. Tyulenev, E.A. Malolina

**HERPES VIRUS INFECTION OF HUMAN GAMETES AND MALE STERILITY: FROM
EXPERIMENTAL MODELS TO DEVELOPMENT OF CLINICAL RECOMMENDATIONS**

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Russian Ministry of Public Health, Moscow

This work summarizes our data on mechanisms and consequences of herpes virus infection of male gametes. Viral DNA and proteins as well as herpes simplex virus (HSV) and cytomegalovirus (CMV) infectious activity were revealed in sperm cell fraction. Detection of HSV in sperm was found to correlate with male infertility, miscarriages in female partners and embryo development disturbance. Investigation of virus-cell interaction was performed. Incubation of spermatozoa with herpes viruses *in vitro* resulted in HSV and CMV localization predominantly on sperm heads. Several models were developed for analysis of herpes viruses effects on spermatogenesis: 1. intraperitoneal infection of prepuberal mice; 2. infection of mature mice via *rete testis*; 3. human testis organotypic culture infected with herpes viruses. These approaches resulted in: 1. establishment of routes of testicular infection; 2. detection of immature germ cells sensitive for HSV and CMV (spermatogonia, spermatocytes, spermatides); 3. evidence for herpes viruses gametotoxic effect and consequent irreversible loss of fertility; 4. development of experimental method of spermatogenesis restoration based on transplantation of testicular cells from neonatal to adult mice. Results obtained suppose that it is necessary to screen ejaculates from donors and infertile patients for herpes viruses and to develop new approaches for infertility treatment based on combination of antiviral and cell therapies.

Key words: *herpes simplex virus, HSV, cytomegalovirus, CMV, male gametes, spermatogenesis, herpes virus transmission, fertility disorders.*

Лаборатория клеточной инженерии была создана по инициативе В.М. Жданова в 1986 г.. Перед лабораторией были поставлены задачи: разработка гибридной технологии получения моноклональных антител (МКА) к вирусным антигенам; использование МКА для изучения фундаментальных проблем вирусологии и вопросов практического здравоохранения. В настоящее время, коллекция гибридом, полученных в лаборатории клеточной инженерии, насчитывает более 50 клонов, продуцирующих МКА, взаимодействующие с белками вирусов – возбудителей наиболее распространенных и социально значимых заболеваний: гепатитов В и С, герпеса, цитомегаловирусной инфекции, иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции), клещевого энцефалита, гриппа птиц, гриппа человека. На основе МКА разработан ряд диагностикумов и тест-систем, приоритетный характер которых подтвержден 9 авторскими свидетельствами на изобретения и 4 патентами Российской Федерации.

С помощью МКА изучена тонкая антигенная структура и топология антигенных детерминант вирусов, выявлены неизвестные ранее эпитопы, индуцирующие образование вируснейтрализующих антител и обладающие протективными свойствами. Полученные МКА используются для решения актуальных проблем медицинской науки и здравоохранения: создания ДНК-вакцин; разработки алгоритма диагностики и лечения герпесвирусных инфекций у недоношенных новорожденных и часто болеющих детей. В настоящее время проводится комплексное изучение роли герпесвирусов в развитии мужского бесплодия и в нарушениях беременности. Данному направлению исследований лаборатории посвящена представленная статья.

Актуальность проблемы. Серологические исследования свидетельствуют о чрезвычайно широком распространении герпесвирусов в человеческой популяции. В некоторых регионах земного шара антитела к вирусам простого герпеса (ВПГ) 1-го и 2-го типов и цитомегаловирусу (ЦМВ) выявляют у большинства лиц репродуктивного возраста [1, 2]. Показано, что герпесвирусы пантропны и способны поражать практически все органы и системы человека, вызывая заболевания различной степени тяжести [3, 4]. В то же время, роль герпесвирусных инфекций в развитии мужского бесплодия изучена недостаточно. Наименее исследованы молекулярные и клеточные механизмы взаимодействия герпесвирусов с мужскими гаметами – клетками, обладающими уникальными особенностями.

Формирование сперматозоидов происходит в ходе сперматогенеза из сперматогониев через стадии сперматоцитов и сперматид. В результате зрелые гаметы представляют собой клетки с минимальным объёмом цитоплазмы, гиперспирализованным хроматином и сниженной биосинтетической активностью. В то же время, для успешной репликации вируса требуются активно функционирующие клеточные системы синтеза биомолекул. В связи с этим,

остаётся открытым вопрос о том, могут ли герпесвирусы находиться внутри зрелой половой клетки, и если да – то каково состояние их генома.

Не раскрыты также механизмы передачи герпесвирусов через сперму. Для инфицирования эпителиальных клеток генитального тракта женщины вирусу необходимо преодолеть мукозный барьер. Так как сперматозоиды способны к активному движению, можно предположить, что половая передача герпесвирусов осуществляется подвижными гаметами, которые выполняют функцию вектора для доставки к чувствительным клеткам [5]. Проверка данной гипотезы требует детального исследования взаимодействия герпесвирусов со сперматозоидами.

Взаимодействие ВПГ и ЦМВ со зрелыми половыми клетками. Изучение клеточной фракции эякулята показало присутствие ДНК герпесвирусов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [6, 7]. Быстрым культуральным методом в эякуляте обнаружена инфекционная активность ВПГ и ЦМВ [7]. Представленные данные убедительно свидетельствуют о контакте вируса со сперматозоидом, однако не являются строгим доказательством внутриклеточной локализации. Для получения новых данных были использованы подходы, позволяющие локализовать вирусные маркеры *in situ*. Так, методом непрямой иммунофлуоресценции в препаратах сперматозоидов были обнаружены антигены ВПГ [8], а методами ПЦР *in situ* [9, 10] и ДНК-гибридизации *in situ* [11] – ДНК герпесвирусов.

Детальное изучение взаимодействия герпесвирусов со сперматозоидами проводили в экспериментах *in vitro*. Сперматозоиды человека инкубировали с ВПГ или ЦМВ в предварительно подобранных условиях, затем проводили иммуноцитохимическую реакцию с помощью вирусспецифических МКА. В полученных цитологических препаратах изучали локализацию вирусных белков методом сканирующей конфокальной микроскопии. Оказалось, что от 0,1 % до 2 % клеток были окрашены МКА, что согласуется с ранее полученными данными о доле пораженных клеток в естественно инфицированном эякуляте [9, 10]. Белки ВПГ и ЦМВ наблюдали в определенных локусах: чаще всего окрашенными оказывались головки и шейки сперматозоидов, реже – средняя часть и хвост; наблюдали также различное сочетание указанных сайтов окраски (рис. 1). В некоторых клетках окраску выявляли преимущественно в периакросомальной, экваториальной и субакросомальной зонах. Сохранение окраски после прохождения гамет через градиент и серии отмывок указывает на прочное прикрепление вируса к мембране сперматозоида. Более того, наличие дискретных локусов локализации вирусных белков позволяет предположить специфическое взаимодействие вируса с клеточными рецепторами.

Наличие определенных сайтов прикрепления герпесвирусов к мембране сперматозоида, возможно, объясняется неравномерным распределением рецепторов, посредством которых

происходит связывание патогена с клеткой. Такое предположение позволяют сделать данные, полученные при изучении сперматозоидов, зараженных вирусом папилломы человека. Локализация данного вируса в экваториальной зоне головки сперматозоида совпадает с расположением рецепторов (синдекан-1), с которыми специфически связывается вирусный капсидный белок L1 [12]. Герпесвирусы используют ряд рецепторов для проникновения в чувствительные клетки [3, 4]. Однако взаимодействие ВПГ и ЦМВ с рецепторным аппаратом сперматозоида не изучено, что диктует необходимость проведения соответствующих исследований.

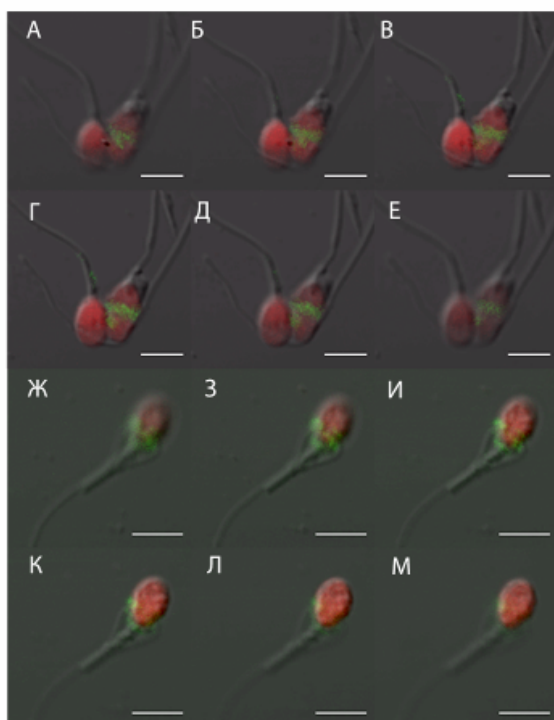


Рисунок 1. Локализация ВПГ в сперматозоидах методом конфокальной микроскопии. Представлены серийные оптические срезы с шагом 0,5 мкм. Через 1 ч после заражения *in vitro* белки ВПГ (зелёный сигнал) выявляли в экваториальной области головки сперматозоидов (А–Е) и в области шейки сперматозоидов (Ж–М); ядра клеток окрашены пропидия иодидом (красный сигнал). Шкала 5 мкм.

Неоднородный характер связывания герпесвирусов со сперматозоидами (разные локусы связывания или их отсутствие) может объясняться также разной степенью зрелости половых клеток. Не исключено, что на распределение мембранных белков сперматозоидов влияет преждевременная капацитация или акросомальная реакция в экспериментальных условиях. Так, показано, что индукция акросомальной реакции предотвращает связывание сперматозоида с герпесвирусом 6-го типа [13].

Влияние ВПГ и ЦМВ на сперматогенез. Герпесвирусы способны реплицироваться в эпителиальных клетках уrogenитального тракта и добавочных железах, что создает условия для контакта зрелых гамет с вирусом в сперме. Незрелые половые клетки находятся в яичках, которые представляют собой иммунопривилегированный орган. Интактный гематотестикулярный барьер (ГТБ), согласно существующим представлениям, обеспечивает

защиту гамет от патогенов, циркулирующих в крови, в частности от ВПГ [14]. Вместе с тем проникновение вируса в мужские гонады может происходить до формирования защитного барьера (в препубертатном периоде), а также в обход ГТБ (восходящая инфекция уrogenитального тракта).

Нами предложено несколько экспериментальных моделей, позволяющих проверить указанные гипотезы и изучить влияние вируса на незрелые половые клетки, находящиеся на разных стадиях дифференцировки. Одна из них состояла в получении тестикулярной инфекции после внутрибрюшинного заражения препубертатных мышей. ВПГ проникал гематогенным путём в незащищенный барьером семенник. Накопление вирусных маркеров происходило в течение первой недели инфекции, после чего вирусная нагрузка постепенно снижалась. Несмотря на сравнительно быструю элиминацию вируса, в течение месяца после заражения в инфицированных органах наблюдали повышенный уровень апоптоза и снижение пролиферативной активности незрелых половых клеток [15].

Другая модель воспроизводила восходящую инфекцию уrogenитального тракта. Для этого семенники мыши заражали через *rete testis*, что позволило изучить влияние ВПГ на сперматогенез половозрелых животных. Маркеры ВПГ были выявлены и в половых (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды), и в соматических (Сертоли, перициты) клетках семенника мыши (рис. 2). Как и в случае препубертатных животных, для тестикулярной инфекции было характерно острое течение (пик вирусной нагрузки на 6-й день инфекции) и ещё более выраженные деструктивные изменения: блок сперматогенеза, дезорганизация и атрофия сперматогенного эпителия, орхит, фиброз семенных канальцев и как результат – отсутствие сперматозоидов в эпидидимисе с 21-го дня инфекции. Гибель клеток Сертоли, необходимых для регенерации герминативной ткани, указывает на необратимость дегенеративных изменений в инфицированных семенниках. Для восстановления сперматогенеза, поврежденного в ходе ВПГ инфекции, использовали специфическую противовирусную терапию в сочетании с клеточными технологиями. На фоне перорального курса ацикловира в семенники мышей на 21-й день инфекции инъецировали суспензии клеток семенников неонатальных трансгенных мышей, экспрессирующих репортерный ген *LacZ*. Уже через 1 месяц после трансплантации клетки Сертоли мышей-доноров, идентифицируемые по гистохимической окраске на продукт гена *LacZ*, формировали новые семенные канальцы в семенниках мышей-реципиентов (рис. 3.А). Через 5 мес. в большей части новых канальцев клетки Сертоли поддерживали развитие половых клеток донора. Дифференцировка половых клеток доходила до стадии удлиняющихся сперматид (рис. 3.Б), которые могут быть использованы при лечении бесплодия методами вспомогательных репродуктивных технологий.

Учитывая невосприимчивость лабораторных животных к ЦМВ человека, оценку влияния этого вируса на сперматогенез проводили с использованием ещё одной модельной системы – органной культуры яичка человека [16]. Заражение органной культуры ЦМВ показало, что вирус оказывает цитотоксический эффект на незрелые половые клетки, но не на сперматозоиды. Кроме того, было установлено, что наиболее часто вирус обнаруживался в наименее зрелых клетках [10, 16]. Это указывает на существование обратной зависимости между чувствительностью половых клеток к инфицированию и степенью их дифференцировки. Аналогичная закономерность была обнаружена и в органной культуре мужских гонад, инфицированной ВПГ [16, 17].

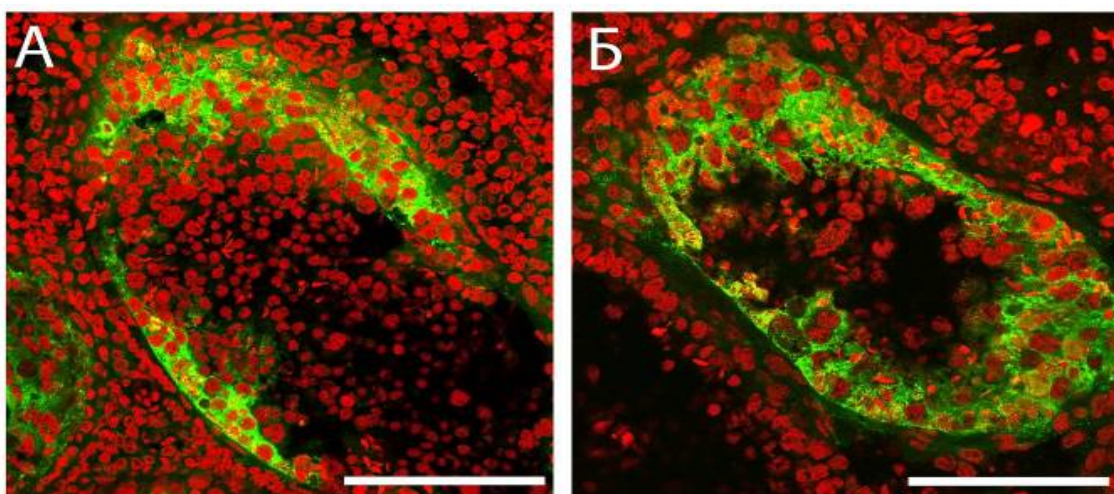


Рисунок 2. Локализация ВПГ в семенных канальцах методом конфокальной микроскопии. Белки ВПГ (зелёный сигнал) обнаружены в клетках Сертоли и незрелых половых клетках в семеннике мыши на 6-й день после заражения через *rete testis*; ядра клеток окрашены пропидия иодидом (красный сигнал). Шкала 50 мкм.

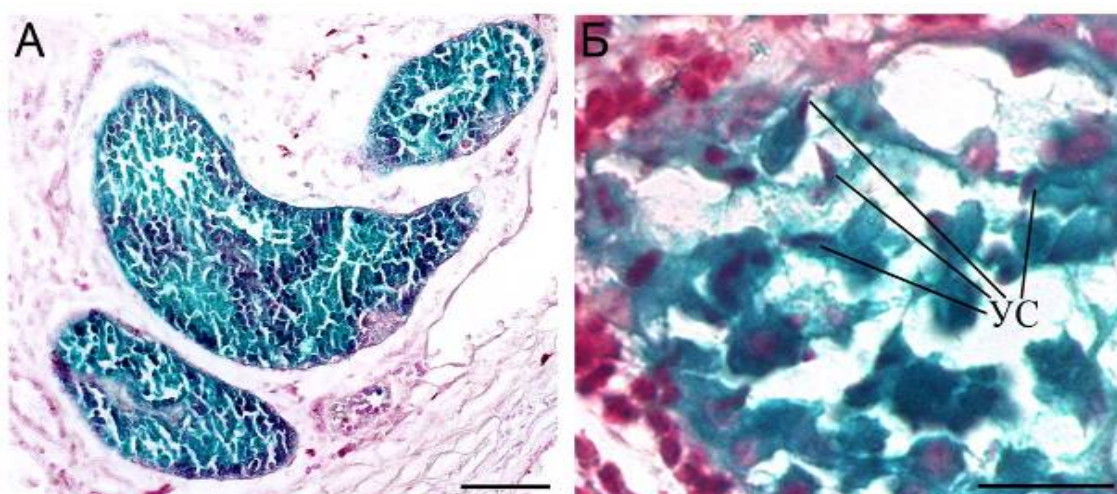


Рисунок 3. Результаты трансплантации неонатальных тестикулярных клеток в семенники мышей, поврежденные ВПГ. Представлены новые семенные канальцы, образованные клетками доноров (А), и удлиняющиеся сперматиды (УС) в них (Б). Гистохимическая окраска на продукт гена LacZ (синий); ядра клеток окрашены нейтральным красным. Шкала 100 мкм

для (А), 10 мкм для (Б).

Использованные экспериментальные модели позволили впервые установить факт инфицирования ВПГ и ЦМВ незрелых половых клеток. Герпесвирусы способны вызывать острую литическую инфекцию сперматогенных клеток на ранних стадиях инфекции как *in vitro*, так и *in vivo*. В то же время выраженный гаметотоксический эффект наблюдается и на поздних сроках, когда активность инфекционного процесса резко снижается. Это означает, что герпесвирусы могут оказывать не только прямое, но и опосредованное повреждающее действие. Патогенетические механизмы, лежащие в основе непрямого воздействия, пока не изучены, однако можно высказать некоторые предположения. Во-первых, ранее нами было показано, что ВПГ способен вызывать нарушение пролиферации и дифференцировки сперматогониев и сперматоцитов [18]. Во-вторых, деструктивные изменения в семенных канальцах могут быть вызваны сокращением популяции чувствительных к вирусу клеток Сертоли, обеспечивающих питание половых клеток и архитектуру канальца. В-третьих, воспалительная инфильтрация семенника при ВПГ-инфекции приводит к повышению проницаемости ГТБ, потере толерантности иммунокомпетентных клеток к мужским гаметам и – как следствие – фагоцитозу половых клеток. Кроме того, токсическое действие на мужские гаметы могут оказывать провоспалительные цитокины (интерлейкины-1а и -б, интерфероны, фактор некроза опухоли альфа), индуцируемые вирусной инфекцией семенника.

Результаты экспериментальных исследований демонстрируют принципиальную возможность инфицирования незрелых половых клеток, указывают на потенциальные пути проникновения вируса в мужские гонады и позволяют предположить негативные последствия герпесвирусной инфекции для репродуктивного здоровья.

Клинические аспекты проблемы взаимодействия ВПГ и ЦМВ с мужскими гаметами. Одним из последствий вирусного заражения гамет является передача инфекции со сперматозоидом. Особенную актуальность данная проблема приобрела с внедрением вспомогательных репродуктивных технологий. Существующие протоколы оплодотворения донорской спермой включают отмывку сперматозоидов. Однако, как правило, отмывки не позволяют получить свободные от вируса гаметы: сперматозоиды остаются зараженными ЦМВ в 89% образцов, ВПГ – в 59 % образцов [19]. Решением данной проблемы может быть обследование каждого образца донорской спермы на присутствие герпесвирусов. Другой вариант предотвращения передачи вирусов со спермой заключается в усовершенствовании методов очистки гамет от патогенов [20, 21]. Кроме того, идентификация рецепторов сперматозоида и их вирусных лигандов позволит специфически воздействовать на адсорбцию и элиминацию патогена.

В настоящее время нет прямых доказательств вертикальной передачи ВПГ и ЦМВ со сперматозоидом. Учитывая невысокую долю пораженных гамет в инфицированном эякуляте [9, 10], данный путь трансмиссии, если и возможен, представляется довольно редким событием. В то же время следует отметить, что первичное инфицирование женщины ВПГ или ЦМВ во время беременности может быть причиной невынашивания или аномалий развития плода [22, 23]. Таким образом, независимо от того, возможна или нет вертикальная передача, присутствие герпесвирусов в сперме представляет угрозу для исхода беременности и здоровья ребенка. Действительно, было показано, что невынашивание беременности коррелирует с выявлением ВПГ в эякуляте партнера [6]. Кроме того было установлено, что присутствие ВПГ в клеточной фракции эякулята негативно влияет на результаты экстракорпорального оплодотворения, значительно снижая частоту формирования бластоцист, имплантации эмбрионов и наступления беременности [24].

Важным последствием герпесвирусной инфекции эякулятов является бесплодие. Недавно разработанная в лаборатории экспериментальная модель герпесвирусной инфекции семенника мыши впервые позволила получить прямое доказательство негативного влияния ВПГ на фертильность [15]. Новорожденных мышей заражали ВПГ внутрибрюшинно, что позволило вирусу проникнуть в семенники до формирования ГТБ. После достижения инфицированными животными половозрелого возраста проводили их спаривание с неинфицированными самками. Количество родившихся мышат от инфицированных самцов было в 7 раз меньше, чем от неинфицированных животных. Доля фертильных самцов в опытной группе составила 12,5 %, что оказалось значительно ниже, чем в контрольной группе (87,5 %, $p < 0.05$).

Результаты описанного эксперимента хорошо согласуются и дополняют ранее опубликованные нами данные о высокой частоте обнаружения герпесвирусов в эякуляте пациентов с бесплодием и о связи герпесвирусной инфекции с нарушением фертильности [25].

Учитывая полученные результаты, можно рекомендовать исследование эякулята мужчин на наличие ВПГ в случае бесплодия неясной этиологии. При обнаружении вируса может быть целесообразным проведение противовирусного лечения. Об этом свидетельствуют данные о наступлении беременности у ранее бесплодных пар после прохождения партнером курса специфической терапии [26, 27].

Вопрос о целесообразности обследования пациентов, состоящих в бесплодном браке, на другие вирусы, в частности ЦМВ, остается открытым. На сегодняшний день в качестве возможных этиологических агентов мужского бесплодия рассматривают широкий круг

патогенов как вирусной (ВИЧ, вирусы гепатита В и С, папилломы человека, герпесвирусы 1-8 типов), так и бактериальной природы (хламидии, микоплазмы, уреаплазмы) [28, 29]. Существенным недостатком большинства популяционных исследований является изучение узкого круга инфекционных агентов, в результате чего истинный вклад отдельного патогена может быть искажен за счет отсутствия данных о других вирусах и бактериях. Другая сложность в оценке роли герпесвирусов в развитии бесплодия заключается в том, что в проводимых исследованиях значительно отличаются пороги чувствительности используемых методов. Решить эту проблему позволит разработка диагностических критериев на основе количественных методов определения вирусной нагрузки. Важнейшей задачей в этом направлении является проведение масштабных исследований для обоснования клинически значимых концентраций вирусов в сперме.

Экспериментальные данные, полученные в лаборатории, показывают, что появились перспективы лечения мужского бесплодия герпесвирусной этиологии. Для этого в настоящее время развиваются новые подходы, основанные на сочетании противовирусной терапии и современных клеточных технологий.

Заключение. Данные, полученные при исследовании эякулята пациентов и при использовании разработанных экспериментальных моделей, указывают на: 1) проникновение герпесвирусов в незрелые половые клетки и нарушение сперматогенеза; 2) ассоциацию ВПГ и ЦМВ со зрелыми гаметам; 3) корреляцию между выявлением ВПГ в эякуляте и бесплодием в браке; 4) нарушение ранних стадий эмбрионального развития при экстракорпоральном оплодотворении инфицированными ВПГ сперматозоидами; 5) связь невынашивания беременности с герпесвирусной инфекцией эякулята партнера; 6) принципиальную возможность лечения бесплодия герпесвирусной этиологии с помощью трансплантации клеток семенников неонатальных животных.

На основании полученных результатов можно сделать следующие рекомендации: 1. обследование доноров спермы и мужчин, состоящих в бесплодном браке, на наличие герпесвирусов в эякуляте; 2. количественное выявление маркеров герпесвирусов в образцах спермы для установления уровня вирусной нагрузки, клинически значимой для нарушения фертильности и горизонтальной передачи патогена; 3. разработка схем и методов противовирусной терапии бесплодия и мониторинг лечения пациентов, выделяющих герпесвирусы с эякулятом; 4. развитие клеточных технологий лечения мужского бесплодия.

Решение теоретических вопросов, поставленных в настоящей работе, а также внедрение сделанных рекомендаций в практическое здравоохранение будет способствовать улучшению демографической ситуации в стране.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 12-04-32258мол_а).

Конфокальная микроскопия выполнена в центре коллективного пользования по биологии развития на основе использования клеточных технологий и оптических методов исследования на базе ИБР РАН.

Литература.

1. Cannon M.J., Schmid D.S., Hyde T.B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev. Med. Virol.* 2010; 20 (4) : 202–213.
2. Looker K.J., Gartnett G.P. A systematic review of the epidemiology and interaction of herpes simplex virus types 1 and 2. *Sex. Transm. Infect.* 2005; 81 (2) : 103–107.
3. Roizman B., Knipe D.M., Whitley R.J. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe D., Howley P. (eds.). *Fields Virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2007 : 2502–2601.
4. Mocarski E.S. Jr., Shenk T., Pass R.F. Cytomegaloviruses. In: Knipe D., Howley P. (eds.). *Fields Virology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2007 : 2702–2772.
5. Ribbeck K. Do viruses use vectors to penetrate mucus barriers? *Biosci. Hypotheses.* 2009; 2 (6) : 329–362.
6. Бочарова Е.Н., Брагина Е.Н., Гусак Ю.К., Зыкова М.С., Лихаев Д.Н. и др. Спонтанное прерывание беременности, неудачи при использовании репродуктивных технологий и герпетическое инфицирование сперматозоидов. *Андрология и генитальная хирургия.* 2006; 1: 59–65.
7. Климова Р.Р., Чичев Е.В., Науменко В.А., Гаджиева З.С., Цибизов А.С. и др. Вирус простого герпеса и цитомегаловирус в эякуляте мужчин: вирус простого герпеса чаще встречается при идиопатическом бесплодии и коррелирует со снижением показателей спермы. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55 (1) : 12–16.
8. Бочарова Е.Н., Абдумаликов Р.А., Брагина Е.Е., Климова Р.Р., Адуева С.М. и др. Обнаружение белков и капсидов ВПГ в сперматозоидах человека. *ДАН.* 2003; 391 (6) : 836–

9. *Науменко В.А., Климова Р.Р., Курило Л.Ф., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В. и др.* Выявление вируса простого герпеса в мужских половых клетках при экспериментальной инфекции органной культуры семенника и в эякуляте мужчин с нарушениями фертильности. *Акушерство и гинекология.* 2010; (3) : 42–46.
10. *Naumenko V.A., Tyulenev Yu.A., Yakovenko S.A., Kurilo L.F., Shileyko L.V. et al.* Detection of human cytomegalovirus in motile spermatozoa and spermatogenic cells in testis organotypic culture. *Herpesviridae;* 2011, 2 (1) : 7. Available at: <http://www.herpesviridae.org/content/2/1/7>.
11. *Бочарова Е.Н., Завалишина Л.Э., Брагина Е.Е., Климова Р.Р., Гусак Ю.К. и др.* Выявление геномной ДНК вируса простого герпеса методом гибридизации *in situ* в сперматозоидах человека при нарушении фертильности. *ДАН.* 2007; 412 (3) : 417–421.
12. *Foresta C., Patassini C., Bertoldo A., Menegazzo M., Francavilla F., et al.* Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One.* 2011; 6 (3). Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0015036>.
13. *Kaspersen M.D., Larsen P.B., Kofod-Olsen E., Fedder J., Bonde J., Höllsberg P.* Human herpesvirus-6A/B binds to spermatozoa acrosome and is the most prevalent herpes virus in semen from sperm donors. *PLoS One.* 2012; 7 (11). Available at: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0048810>.
14. *Burgos J.S., Ramirez C., Sastre I., Alfaro J.M., Valdivieso F.* Herpes simplex virus type 1 infection via the bloodstream with apolipoprotein E dependence in the gonads is influenced by gender. *J. Virol.* 2005; 79 (3) : 1605–1612.
15. *Naumenko V.A., Tyulenev Yu.A., Kushch A.A.* Herpes Simplex Virus Type I Infection of Mice Testis and Effect on Fertility. *World Academy of Science, Engineering and Technology.* 2012; 72. Available at: <http://www.waset.org/journals/waset/v72/v72-312.pdf>.
16. *Тюленев Ю.А., Науменко В.А., Климова Р.Р., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В. и др.* Разработка органной культуры мужских гонад для вирусологических исследований. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* 2010; 5 (4) : 66–69.
17. *Науменко В.А., Тюленев Ю.А., Пушкарь Д.Ю., Сегал А.С., Ковалев В.А. и др.* Влияние вируса простого герпеса на сперматогенез. *Урология.* 2011; 6 : 32–36.
18. *Тюленев Ю.А., Науменко В.А., Шилейко Л.В., Курило Л.Ф., Гущина Е.А., Альховский С.В. и др.* Нарушения сперматогенеза при заражении вирусом простого герпеса в препубертатном периоде: исследование на модели органной культуры семенника мыши.

Андрология и генитальная хирургия. 2012; 3 : 33–37.

19. Michou V., Liarmakopoulou S., Thomas D., Tsimaratou K., Makarounis K., et al. Herpes virus infected spermatozoa following density gradient centrifugation for IVF purposes. *Andrologia*. 2012; 44 (3) : 174–80.
20. Mencaglia L., Falcone P., Lentini G.M., Consigli S., Pisoni M., et al. ICSI for treatment of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus-serodiscordant couples with infected male partner. *Hum. Reprod.* 2005; 20 (8) : 2242–2246.
21. Garolla A., Lenzi A., Palù G., Pizzol D., Bertoldo A., et al. Human papillomavirus sperm infection and assisted reproduction: a dangerous hazard with a possible safe solution. *Hum. Reprod.* 2012; 27 (4) : 967–973.
22. Enright A.M., Prober C.G. Neonatal herpes infection: diagnosis, treatment and prevention. *Semin. Neonatol.* 2002; 7 (4) : 283–291.
23. Revello M.G., Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15 (4) : 680–715.
24. Цибизов А.С., Абдулмеджидова А.Г., Краснопольская К.В., Гаджиева З.С., Куц А.А. Обнаружение вируса простого герпеса в сперматозоидах человека коррелирует со снижением частоты формирования бластоцист и частоты имплантации эмбрионов при экстракорпоральном оплодотворении. *Онтогенез*. 2011; 42 (6) : 447–452.
25. Науменко В.А., Куц А.А. Герпесвирусы и мужское бесплодие: есть ли связь? Вопросы вирусологии. 2013; 58 (3): 4–9.
26. El Borai N., Le Fevre Ch., Inoue M., Naumova E.N., Sato K., Suzuki S., et al. Presence of HSV-1 DNA in semen and menstrual blood. *J. Reprod. Immunol.* 1998; 41 (1–2) : 137–147.
27. Kotronias D., Kapranos N. Detection of herpes simplex virus DNA in human spermatozoa by in situ hybridization technique. *In Vivo*. 1998; 12 (4) : 391–394.
28. Garolla A., Pizzol D., Bertoldo A., Menegazzo M., Barzon L., Foresta C. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *J. Reprod. Immunol.* 2013. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165037813000508#>.
29. Gdoura R., Kchaou W., Ammar-Keskes L., Chakroun N., Sellemi A., et al. Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *J. Androl.* 2008, 29 (2) : 198–206.