

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 616.697-022:578.825.11+578.827.11-078

*Евдокимов В.В.^{1,4}, Науменко В.А.¹, Тюленев Ю.А.¹, Курило Л.Ф.², Ковалык В.П.³, Сорокина Т.М.²,
Лебедева А.Л.², Гомберг М.А.⁴, Куш А.А.¹*

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ДНК ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА И ГЕРПЕСВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА У МУЖЧИН ПРИ НАРУШЕНИИ ФЕРТИЛЬНОСТИ

¹ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; ²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва; ³ФГБУ «Клинико-диагностический центр Федерального клинического центра высоких медицинских технологий» Федеральное медико-биологическое агентство России, 109147, г. Москва; ⁴ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии» Департамента здравоохранения г. Москвы, 127473, г. Москва

Бесплодие является актуальной медицинской и социальной проблемой, у 50% пар оно связано с мужским фактором, и в половине случаев этиология его остается неизвестной. Цель работы состояла в изучении распространения и количественном анализе герпесвирусов человека (ГВЧ) и папилломавирусов высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) у мужчин с бесплодием, а также в оценке влияния этих инфекций на показатели спермы. Исследовали образцы эякулятов 196 мужчин, разделенных на 3 группы. В 1-ю группу вошли мужчины с бесплодием неясной этиологии ($n = 112$), во 2-ю группу – пациенты, у жен которых были в анамнезе зафиксированы случаи самопроизвольного прерывания беременности ($n = 63$), в 3-ю группу (контрольную) – здоровые мужчины, обратившиеся для профилактического обследования ($n = 21$). Количественный анализ ДНК ГВЧ (цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр и вирус герпеса человека 6) и ВПЧ ВКР 12 типов, относящихся к кластерам А5/6, А7 и А9, проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, спермиологическое исследование осуществляли согласно рекомендациям ВОЗ. ДНК ГВЧ и ВПЧ ВКР в эякуляте обнаружены суммарно у 42/196 (21,4%) мужчин: у 31 и 11 пациентов в 1-й и 2-й группе соответственно ($p > 0,05$). Ни у одного из здоровых мужчин вирусная ДНК в эякуляте не была обнаружена. ГВЧ выявили у 24/42, ВПЧ ВКР – у 18/42 мужчин ($p > 0,05$) без значимых различий между группами. Среди ВПЧ ВКР в эякулятах чаще встречались генотипы кластера А9 (14/18; $p = 0,04$). Сравнительный анализ спермограмм показал, что у инфицированных пациентов были значительно снижены подвижность, а также количество морфологически нормальных сперматозоидов по сравнению со здоровыми мужчинами. При количественном определении вирусных ДНК обнаружено, что в эякулятах 31% мужчин вирусная нагрузка была $> 3 \text{ Ig}10$ на 100 тыс. клеток. Обнаружение ГВЧ и ВПЧ ВКР в эякулятах ассоциируется с мужским бесплодием, и количественное определение вирусных ДНК в эякулятах является полезным индикатором для мониторинга вирусных инфекций при бесплодии и своевременного принятия решения о начале терапии.

Ключевые слова: мужское бесплодие; эякулят; герпесвирусы; вирусы папилломы человека высокого канцерогенного риска; полимеразная цепная реакция в реальном времени; показатели спермы.

Для цитирования: Евдокимов В.В., Науменко В.А., Тюленев Ю.А., Курило Л.Ф., Ковалык В.П., Сорокина Т.М., Лебедева А.Л., Гомберг М.А., Куш А.А. Количественная оценка ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска и герпесвирусов человека у мужчин при нарушении фертильности. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (2): 63-68.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2- 63-68

*Evdokimov V.V.^{1,4}, Naumenko V.A.¹, Tulenev Yu.A.¹, Kurilo L.F.², Kovalyk V.P.³, Sorokina T.M.²,
Lebedeva A.L.², Gomberg M.A.⁴, Kushch A.A.¹*

QUANTITATIVE DNA EVALUATION OF THE HIGH CARCINOGENIC RISK OF HUMAN PAPILLOMA VIRUSES AND HUMAN HERPES VIRUSES IN MALES WITH FERTILITY DISORDERS

¹Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation; ²Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115478, Russian Federation;

³Clinical and Diagnostic Center, Federal Clinical Center of High Medical Technologies, Moscow, 109147, Russian Federation; ⁴Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, 127473, Russian Federation

Infertility is an actual medical and social problem. In 50% of couples it is associated with the male factor and in more than 50% of cases the etiology of the infertility remains insufficiently understood. The goal of this work was to study the prevalence and to perform quantitative analysis of the human herpes viruses (HHV) and high carcinogenic risk papilloma viruses (HR HPV) in males with infertility, as well as to assess the impact of these infections on sperm parameters.

Для корреспонденции: Евдокимов Владимир Вадимович, аспирант лаб. клеточной инженерии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: vladimir.evdokimov@gmail.com

Ejaculate samples obtained from 196 males fall into 3 groups. Group 1 included men with the infertility of unknown etiology ($n = 112$); group 2, patients who had female partners with the history of spontaneous abortion ($n = 63$); group 3 (control), healthy men ($n = 21$).

HHV and HR HPV DNA in the ejaculates were detected in a total of 42/196 (21.4%) males: in 31 and 11 patients in groups 1 and 2, respectively ($p > 0.05$) and in none of healthy males. HHV were detected in 24/42; HR HPV, in 18/42 males ($p > 0.05$) without significant difference between the groups. Among HR HPV genotypes of the clade A9 in ejaculate were more frequent (14/18, $p = 0.04$). Comparative analysis of the sperm parameters showed that in the ejaculates of the infected patients sperm motility as well as the number of morphologically normal cells were significantly reduced compared with the healthy men. The quantification of the viral DNA revealed that in 31% of the male ejaculates the viral load was high: $>3 \lg_{10}/100000$ cells.

Conclusion. The detection of HHV and HR HPV in the ejaculate is associated with male infertility. Quantification of the viral DNA in the ejaculate is a useful indicator for monitoring viral infections in infertility and for decision to start therapy.

Key words: male infertility; ejaculate; herpes viruses; high carcinogenic risk human papilloma viruses; real-time PCR; parameters of sperm.

For citation: Evdokimov V.V., Naumenko V.A., Tulenev Yu.A., Kurilo L.F., Kovalyk V.P., Sorokina T.M., Lebedeva A.L., Gomberg M.A., Kushch A.A. Quantitative DNA evaluation of the high carcinogenic risk of human papilloma viruses and human herpes viruses in males with fertility disorders. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2):63-68. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-63-68

For correspondence: Vladimir V. Evdokimov, Postgraduate student, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: vladimir.evdokimov@gmail.com

Information about authors:

Evdokimov V.V., <http://orcid.org/0000-0003-3910-2488>

Naumenko V.A., <http://orcid.org/0000-0002-4107-8109>

Tulenev Yu.A., <http://orcid.org/0000-0003-3995-4533>

Kurilo L.F., <http://orcid.org/0000-0003-3603-4838>

Kovalyk V.P., <http://orcid.org/0000-0002-7050-2642>

Sorokina T.M., <http://orcid.org/0000-0002-1709-423X>

Lebedeva A.L., <http://orcid.org/0000-0001-7536-6486>

Gomberg M.A., <http://orcid.org/0000-0002-1950-7982>

Kushch A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 11 May 2015

Accepted 29 May 2015

Введение

Бесплодие наблюдается у 12–15% пар репродуктивного возраста и является актуальной медицинской и социальной проблемой, несмотря на успехи репродуктивных технологий [1]. Почти в 50% случаев причина бесплодия связана с мужским фактором [2], более чем в 50% случаев мужского бесплодия его этиология остается неизвестной. Идиопатическое бесплодие представляет собой особенно трудную проблему, так как эмпирическое лечение в подобных случаях не приводит к успеху. С тех пор как в сперме впервые была обнаружена ДНК вируса простого герпеса (ВПГ) [3], изучению роли вирусов в качестве этиологического фактора мужского бесплодия были посвящены работы нескольких исследовательских групп [4–7]. Присутствие маркеров ВПГ и цитомегаловируса (ЦМВ) в органах и тканях мужской репродуктивной системы, а также данные о повышенной частоте обнаружения этих вирусов в эякуляте бесплодных мужчин [8–10] указывают на возможную связь герпесвирусной инфекции с нарушением фертильности. В сперме мужчин из бесплодных пар обнаруживают также другие герпесвирусы человека (ГВЧ) – вирус герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6), вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) [11, 12]. Однако мнения исследователей относительно роли герпесвирусов в этиологии мужского бесплодия расходятся от полного отрицания их влияния на процесс созревания мужских половых клеток [13] до установления прямой корреляции между вирусным инфицированием эякулята и мужским бесплодием [4, 14].

Вирусы папилломы человека (ВПЧ), как и герпесвирусы, широко распространены в человеческой популяции [15]. Данные различных авторов об обнаружении ВПЧ среди мужчин значительно варьируют от 1,3 до 72,9%, при этом частота выявления ДНК ВПЧ в сперме также различается от 0 до 100% [16].

На основании данных эпидемиологических и молекулярно-биологических исследований типы ВПЧ разделяют на клайды и относят к клайдам низкого, промежуточного или высокого онкогенного риска [17]. Типы высокого канцерогенного риска (ВКР) составляют клайды А9 (типы 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67), А7 (типы 18, 39, 45, 59, 68, 70, 85), А5 (типы 26, 51, 69, 82), А6 (типы 30, 53, 56, 66) и А11 (типы 34, 73). Разделение на клайды важно для динамического наблюдения за вирусной инфекцией и более точного прогнозирования ее развития, так как разные типы ВПЧ обладают неодинаковым онкогенным потенциалом, а также способностью к персистенции [18]. В то же время общепринятые критерии, позволяющие оценивать риск прогрессирования папилломавирусной инфекции (ПВИ) у мужчин, пока не разработаны.

Помимо онкогенного аспекта, в настоящее время активно изучаются роль ВПЧ в формировании мужского бесплодия и его влияние на течение беременности. Так, согласно данным метаанализа 9 исследований, включивших более 2 тыс. беременных и новорожденных, был сделан вывод о возможности вертикального пути передачи ВПЧ [19], показано негативное влияние на течение беременности в I триместре, результатом которого мо-

гут явиться неразвивающаяся беременность и самопроизвольный выкидыш [20].

Цель настоящего исследования состояла в изучении распространения и количественном анализе ГВЧ и ВПЧ ВКР у мужчин с идиопатическим бесплодием и пациентов, у постоянных партнерш которых были случаи самопроизвольного прерывания беременности, а также в оценке влияния вирусных инфекций на показатели спермы.

Материал и методы

Пациенты. Обследованы 196 мужчин, поступивших в медицинские учреждения Москвы: ФГБНУ МГНЦ и ФГБУЗ КБ №84. Пациенты были включены в одну из 3 групп.

В 1-ю группу (средний возраст 32,8±6,8 года; $n = 112$) вошли мужчины с бесплодием неясной этиологии. Диагноз с использованием стандартных процедур устанавливали исключением урогенитальных нарушений и злокачественных опухолей, инфекций урогенитального тракта, варикоцеле, эндокринных нарушений и иммунологических факторов как возможных причин бесплодия [21]. У пациентов регистрировали бесплодие, если после 12 мес регулярной половой жизни без контрацепции у женщины не наступала беременность. У большинства обследованных лиц в этой группе (57%) показатели спермы соответствовали нормативам ВОЗ, у части (43%) было отмечено бесплодие с патозооспермией неясного генеза.

Во 2-ю группу (средний возраст 36,1±8,1 года; $n = 63$) вошли пациенты, у партнерш которых в анамнезе были 1 случай или более самопроизвольного прерывания беременности неясной этиологии в I триместре (далее – невынашивание беременности).

3-ю группу (сравнения) (средний возраст 32,5±9,3 года; $n = 21$) составили практически здоровые мужчины, обратившиеся с целью профилактического обследования.

До исследования от каждого пациента получено информированное согласие на выполнение обследования. Процедуры исследования проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрены местным комитетом по биомедицинской этике в ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи».

Клинический материал. Исследовали образцы эякулятов, полученные пациентами путем мастурбации после 3-дневного полового воздержания. Объем спермы составлял от 1,5 до 3 мл. Образцы сразу были разделены на 2 равные части: первую использовали для спермиоло-

гического анализа, вторую – для экстракции ДНК с последующим выявлением вирусных ДНК.

Спермиологическое обследование проводили согласно Руководству ВОЗ [22]. Оценивали основные параметры спермограммы: объем спермы, концентрацию и степень подвижности сперматозоидов, а также количество морфологически нормальных форм половых клеток.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). ДНК ВПЧ в клиническом материале определяли методом ПЦР с помощью реагентов фирмы «ИнтерЛабСервис» (Москва): комплект реагентов для экстракции ДНК «АмплиСенс ДНК-сорб-В» и набор реагентов для выявления ДНК ВПЧ 12 типов ВКР: типы 16, 31, 33, 35, 52, 58 (клайд А9); 18, 39, 45, 59 (клайд А7); 51 (клайд А5); 56 (клайд А6). Использовали набор для ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-FL. Амплификацию проводили с помощью Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия). При интерпретации количественных данных руководствовались рекомендациями производителя тест-систем, разработанными для анализа ВПЧ в урогенитальных соскобах: концентрации ВПЧ ≤ 3 lg 10/100 тыс. кл. оцениваются как клинически малозначимые, от 3 до 5 lg 10/100 тыс. кл. – как клинически значимые; более 5 lg 10/100 тыс. кл. – как клинически значимые с высоким риском развития дисплазии.

Для количественного определения ДНК ГВЧ (ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6) в клинических материалах использовали набор реагентов для ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени – АмплиСенс EBV/CMV/HHV6–скрин-FL.

Для эндогенного внутреннего контроля использовали β -глобиновый ген.

Статистический анализ. Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных компьютерных программ Statistica 6.0 и BIOPSTAT. Статистические различия анализировали, применяя критерии хи-квадрат, Стьюдента, Манна – Уитни. Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

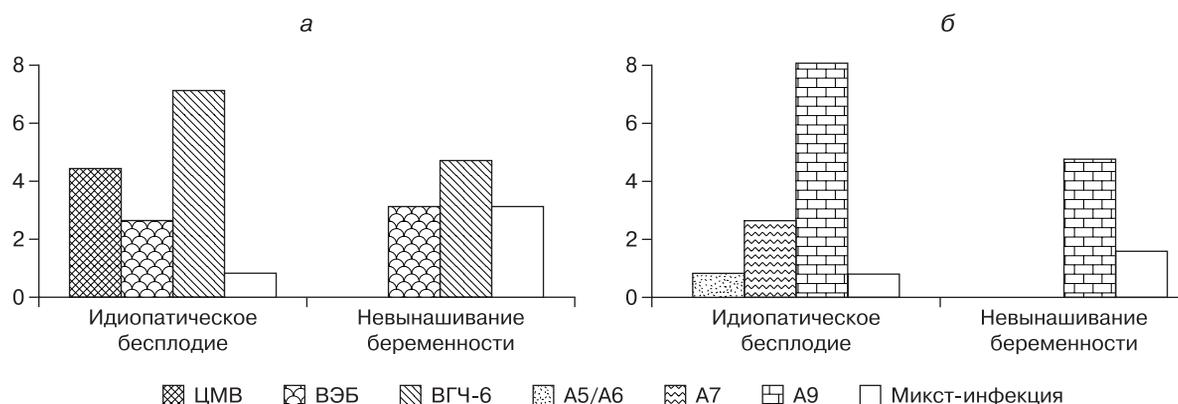
Изучены эякуляты пациентов 1–3-й группы. Суммарно ДНК ГВЧ и ВПЧ ВКР методом ПЦР была выявлена в эякулятах у 42 (21,4%) из 196 обследованных пациентов. Среди 42 пациентов с инфицированными эякулятами у 31 (73,8%) было идиопатическое бесплодие, у 11 (26,2%) – история невынашивания беременности у партнерш; различие между 1-й и 2-й группой статистически незначимо ($p = 0,3$). В 3-й

Таблица 1

Частота встречаемости ДНК ГВЧ и ВПЧ ВКР в эякулятах мужчин с бесплодием

| Пациенты | ЦМВ | ВЭБ | ВГЧ-6 | ВПЧ | | | Сочетания вирусов | | | | Итого | |
|--|----------|---------|----------|---------|---------|----------|-------------------|-----------|---------|---------|-----------|--|
| | | | | A5/6 | A7 | A9 | ВГЧ-6+ВЭБ | ЦМВ+ВГЧ-6 | A5/6+A9 | A7+A9 | | |
| 1-я группа | | | | | | | | | | | | |
| Идиопатическое бесплодие ($n = 112$) | 5* (4,5) | 3 (2,7) | 8 (7,1) | 1 (0,9) | 3 (2,7) | 9 (8,0) | 1 (0,9) | 0 | 1 (0,9) | 0 | 31 (27,7) | |
| 2-я группа | | | | | | | | | | | | |
| Невынашивание ($n = 63$) | 0 | 2 (3,2) | 3 (4,8) | 0 | 0 | 3 (4,8) | 0 | 2 (3,2) | 0 | 1 (1,5) | 11 (17,5) | |
| 3-я группа | | | | | | | | | | | | |
| Здоровые ($n = 21$) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Всего... ($n = 196$) | 5 (2,6) | 5 (2,6) | 11 (5,6) | 1 (0,5) | 3 (1,5) | 12 (6,1) | 1 (0,5) | 2 (1,0) | 1 (0,5) | 1 (0,5) | 42 (21,4) | |

Примечание. * – количество пациентов (%).



Структура выявленных ГВЧ (а) и ВПЧ ВКР (б) в группах обследованных пациентов.

По горизонтали – группы пациентов; по вертикали – количество пациентов, в эякулятах которых обнаружены ДНК герпесвирусов ВЭБ, ЦМВ, ГВЧ-6 и их сочетания (а); ДНК ВПЧ ВКР А5/А6, А7, А9 и их сочетания (б).

группе ни у одного из практически здоровых фертильных мужчин, проходивших профилактическое обследование, ДНК вирусов в сперме не была обнаружена.

Результаты сравнительного анализа частоты обнаружения ДНК исследуемых вирусов в сперме мужчин 1–3-й группы представлены в табл. 1.

Данные табл. 1 показали, что в сперме мужчин 2-й группы ДНК ГВЧ и ПВЧ ВКР обнаружена суммарно в 17,5% случаев, в сперме у мужчин 1-й группы – в 27,7% случаев. Несмотря на то что частота обнаружения вирусов у мужчин с идиопатическим бесплодием оказалась более чем в 1,5 раза выше, чем у мужчин, партнерши которых страдали невынашиванием беременности, статистической значимости различия между 1-й и 2-й группой не достигали ($p = 0,053$).

В структуре выявленных вирусов (см. рисунок) все 3 ГВЧ составили суммарно 57,1% (24/42), при этом в группе мужчин с идиопатическим бесплодием их ДНК выделена у 17/24 (70,8%), во 2-й группе – у 7/24 (29,2%); $p > 0,05$. ДНК ВПЧ ВКР обнаружена суммарно у 42,9% (18/42) пациентов: у 14/18 (77,8%) в 1-й группе и у 4/18 (22,2%) во 2-й без достоверного различия между этими группами ($p > 0,05$).

Анализ частоты встречаемости каждого из трех изученных ГВЧ показал (см. рисунок, а), что ни в одном из образцов спермы пациентов 2-й группы ЦМВ не встречался в виде моноинфекции, но в 2 образцах был обнаружен в сочетании с ВГЧ-6, в то время как у пациентов с идиопатическим бесплодием ЦМВ в виде моноинфекции обнаружен у 5/112 (4,5%) пациентов и не был выявлен в сочетаниях с другими ГВЧ. ВЭБ встречался у 2,7% (3/112) пациентов в 1-й группе в виде моноинфекции и у 1 (0,9%) пациента в сочетании с ВГЧ-6 (0,9%). Во 2-й группе ВЭБ был обнаружен только в 2 (3,2%) эякулятах. Наиболее часто в эякулятах встречался ВГЧ-6: у 8 (7,1%) пациентов 1-й группы в виде моноинфекции и у 1 (1/112; 0,9%) в сочетании с ВЭБ. Во 2-й группе ВГЧ-6 обнаружен у 3 (4,8%) пациентов в виде моноинфекции и у 2 (3,2%) в сочетании с ЦМВ. Суммарно в эякулятах 175 бесплодных мужчин обеих групп ВГЧ-6 был определен у 14 (8%), ВЭБ – у 6 (3,4%) и ЦМВ – у 7 (4%). Статистическая обработка данных показала, что различия в частоте встречаемости ГВЧ между сравниваемыми группами были незначимыми. Частота детекции 3 изученных ГВЧ также существенно не различалась ($p > 0,05$).

При анализе частоты встречаемости в сперме ВПЧ ВКР разных типов установлено, что в структуре выявленных генотипов ВПЧ наиболее распространенными были генотипы, относящиеся к клайду А9 (14/175; 8,0%), которые определены в виде моноинфекции у 12/175 (6,8%) пациентов в обеих группах и дополнительно у 2 (1%) пациентов в сочетаниях с А5/6 и А7 (см. рисунок, б; табл. 1).

При сравнительном анализе частоты встречаемости ВПЧ ВКР всех типов у пациентов 1-й (14/112; 12,5%) и 2-й групп (4/63; 6,3%) различия оказались статистически значимыми ($p = 0,02$). Наиболее часто среди ВПЧ ВКР в эякулятах встречались генотипы клайда А9 (14/18; 77,8%), различие с другими клайдами статистически значимо ($p = 0,04$). Следует отметить, что у пациентов 2-й группы не были обнаружены ВПЧ клайда А5/6. В то же время у пациентов 1-й группы выявлены ВПЧ всех изученных клайдов (А5/6, А7 и А9) не только в виде моноинфекции, но и в сочетаниях (см. рисунок, б).

Для оценки влияния изучаемых вирусов на основные показатели качества спермы анализировали спермограммы обследованных пациентов. Результаты изучения 34 спермограмм представлены в табл. 2.

Статистический анализ показал значительные различия в показателях спермы инфицированных пациентов по сравнению со здоровыми лицами: в 2,5 раза снижено

Таблица 2

Сравнительный анализ основных показателей спермограмм у инфицированных пациентов и здоровых мужчин

| Показатели спермы | Невынашивание беременности (n = 6) | Идиопатическое бесплодие (n = 15) | Здоровые (n = 13) |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|
| Концентрация сперматозоидов, 10 ⁶ /мл | 77,9±45,5 | 85,4±35,8 | 92,1±57,9 |
| Подвижность (а + б), % | 38,3±8,5* | 34,8±19,3** | 52,7±15,1*** |
| Морфологически нормальные формы, % | 19,6±8,5 ^o | 27,9±26,0 ^{oo} | 47,7±10,6 ^{ooo} |

Примечание. *** – $p = 0,0120$; ** – $p = 0,0452$; * – $p = 0,0165$; ^o – $p < 0,0001$.

Таблица 3

Вирусная нагрузка в положительных образцах эякулята

| Концентрация вирусных ДНК | Вирусы | | | | Всего (n = 47) |
|--|------------------|-------------------|-----------------|--------------|------------------|
| | ВПЧ ВКР (n = 20) | ЦМВ (n = 7) | ГЧ-6 (n = 14) | ВЭБ (n = 6) | |
| Копии ДНК на 100 тыс. клеток, медиана [min; max] | 687 [8; 112 201] | 6489 [15; 68 070] | 374 [4; 13 628] | 49 [13; 216] | 217 [4; 112 201] |

количество морфологически нормальных форм половых клеток у мужчин 2-й группы и в 1,7-у пациентов 1-й группы ($p < 0,0001$ и $p = 0,01$ соответственно); в 1,5 раза снижена подвижность сперматозоидов (различие статистически значимо; $p = 0,01$ и $p = 0,04$ соответственно).

У 47 пациентов удалось оценить вирусную нагрузку в эякулятах. Результаты изучения концентрации ДНК ВПЧ ВКР и ГВЧ в эякулятах представлены в табл. 3.

Количественный анализ ДНК изученных вирусов выявил большой разброс между образцами: минимальное значение составило 4 копии ДНК на 100 тыс. клеток, максимальное – 112 201 копия на 100 тыс. клеток. Медианное значение по всем положительным образцам оказалось относительно невысоким – 217 копий на 100 тыс. клеток (2,34 lg 10). Поскольку количество образцов, содержащих ВПЧ ВКР А5/6 и А7 было небольшим (2 и 4 соответственно), медианное значение концентрации ДНК ВПЧ ВКР было вычислено по всем ($n = 20$) положительным по ВПЧ образцам и составило 687 копий на 100 тыс. клеток (2,84 lg 10). Сравнение концентраций ДНК ГВЧ показало, что медианное значение в образцах, содержащих ЦМВ, составляло 6489 копий на 100 тыс. клеток (3,81 lg 10), что значительно превосходило вирусную нагрузку в эякулятах пациентов, инфицированных ВЭБ и ГЧ-6, а также ВПЧ ВКР. Важно отметить, что у части пациентов (13/42, 30,9%) концентрация вирусной ДНК в эякуляте превышала средние значения более чем в 100 раз и достигала 4–5 lg 10 на 100 тыс. клеток.

Обсуждение

В настоящей работе ДНК исследуемых вирусов обнаружена в эякуляте у каждого 5-го из 196 обследованных мужчин. Герпесвирусы ЦМВ, ГЧ-6, ВЭБ выявлены у 12,2%, ВПЧ ВКР – у 9,2% пациентов без клинических признаков вирусных заболеваний. Ни у одного из практически здоровых фертильных мужчин ВПЧ ВКР в эякуляте не были обнаружены. Полученные данные ниже, чем частота встречаемости ВПЧ ВКР, выявленная в сперме пациентов клиники ЭКО в Мексике (59,73%) [23], но сходны с результатами, полученными в среднем по странам Северной, Южной и Западной Европы (12,4%) [24]. Данные о распространении ГВЧ в настоящем исследовании ниже, чем в сперме у пациентов с бесплодием в Китае (28%), но практически сходны с ранее полученными результатами [12] обследования пациентов с идиопатическим бесплодием (13,1%). Расхождения разных авторов могут быть следствием нескольких причин. В опубликованных работах представлены результаты обследования различных групп бессимптомных лиц как по количеству и возрасту, так и по составу: взрослых молодых мужчин, доноров спермы, пациентов клиник ЭКО и КВД (STD), партнеров женщин с цервикальной интраэпителиальной неоплазией

(CIN) [25]. Неодинаковы способы получения, доставки и предобработки клинических материалов, а также методы детекции ДНК вирусов и оценки результатов.

Один из активно изучаемых вопросов, касающихся бессимптомной инфекции мужчин, – влияние вирусов на качество спермы. В ряде работ показано, что присутствие ВПЧ в эякуляте ассоциируется со снижением подвижности сперматозоидов или рН эякулята, а также с уменьшением количества морфологически нормальных половых клеток [5, 26]. Другие авторы не подтверждают негативное влияние ВПЧ на основные показатели спермограммы [6]. Столь же значительны расхождения во мнениях относительно изменений качества спермы у ГВЧ-инфицированных пациентов. В работах одних авторов сообщается об уменьшении концентрации и подвижности сперматозоидов в ЦМВ-инфицированных эякулятах [11]. Другие исследователи не обнаружили влияния ЦМВ, ВЭБ или ГЧ-6 на параметры спермы [13].

В настоящей работе при сравнении основных показателей спермы в вирусинфицированных образцах установлено, что подвижность сперматозоидов, а также количество морфологически нормальных половых клеток в эякулятах вирусинфицированных пациентов значительно снижены по сравнению со здоровыми мужчинами без проблем фертильности. Это указывает на возможность негативного влияния вирусных инфекций на репродуктивную функцию мужчин.

Отдельный вопрос – выяснение причины бесплодия семейных пар, вызванного невозможностью наступления или потерей беременности. Ответ на него представляет большую сложность в связи с необходимостью оценки роли как мужского, так и женского факторов. Полученные данные показали, что в эякулятах мужчин из 63 бесплодных пар с невынашиванием беременности ДНК ВПЧ ВКР встречалась значительно реже (6,3%), чем у мужчин с идиопатическим бесплодием (12,5%). Данные настоящей работы позволяют предположить, что при спонтанных абортах негативная роль ВПЧ-инфекции ассоциируется скорее с женским фактором, чем с мужским. В подтверждение этого предположения можно сослаться на результаты, показавшие, что у ВПЧ-позитивных женщин беременность наступает в 2,4 раза реже, чем у ВПЧ-негативных ($p < 0,02$) [27]. В случаях герпетического инфицирования сперматозоидов не выявлены статистически значимые различия между 1-й и 2-й группой, в то время как другие авторы отметили ассоциацию ГВЧ в эякулятах со спонтанным прерыванием беременности, а также с неудачами при использовании репродуктивных технологий [8].

В настоящее время многими исследователями признается, что скрининг герпесвирусов и ВПЧ необходим. Для оценки риска развития инфекционных и онкогенных заболеваний у женщин широко используют показатели вирусной нагрузки ВПЧ ВКР в органах урогенитального тракта (УГТ). Для мужчин аналогичные показатели пока не установлены. Высокие вирусные нагрузки в эякулятах у значительной части бессимптомных пациентов (30,9%) указывают на целесообразность разработки критериев оценки риска клинически выраженных заболеваний. Если учесть, что при высокой вирусной нагрузке персистенция вирусов в УГТ мужчин наблюдается статистически значимо чаще, чем при низкой вирусной нагрузке, можно предположить, что бессимптомные пациенты с высокой вирусной нагрузкой относятся к группе риска по прогрессированию заболевания и возможного развития онкопатоло-

логии. Однако для выяснения надежности использования количественного определения вирусной ДНК как предиктора неблагоприятного развития инфекции у мужчин необходимы дальнейшие динамические исследования с анализом течения заболевания и его исхода.

В заключение следует отметить, что вирусная ДНК не была выявлена ни у одного из практически здоровых мужчин, но была обнаружена в эякулятах у 24% пациентов с проблемами фертильности, причем ГВЧ и ВПЧ ВКР встречались приблизительно с одинаковой частотой. Эти результаты по крайней мере отчасти заполняют пробел в данных по Восточной Европе и указывают на возможную ассоциацию бессимптомной вирусной инфекции с нарушением фертильности у мужчин. Количественный анализ ДНК позволил определить у части пациентов с бесплодием высокие концентрации ДНК ГВЧ и ВПЧ ВКР. Это означает, что определение количества копий ДНК-содержащих вирусов можно использовать как полезный индикатор для мониторинга развития вирусных инфекций и своевременного принятия решения о начале терапии. Дальнейшие исследования помогут определить роль вирусных инфекций в нарушении репродуктивной функции у мужчин и разработать эффективные подходы для их лечения.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 1–6, 11–27 СМ. REFERENCES)

- Куш А.А., Науменко В.А., Климова Р.Р., Тюленев Ю.А., Малолينا Е.А. Герпесвирусная инфекция мужских гамет и бесплодие: от экспериментальных моделей к разработке клинических рекомендаций. *Вопросы вирусологии*. 2013; 1: 132–44.
- Бочарова Е.Н., Брагина Е.Н., Гусак Ю.К., Зыкова М.С., Лихаев Д.Н., Зотов В.В. и др. Спонтанное прерывание беременности, неудачи при использовании репродуктивных технологий и герпетическое инфицирование сперматозоидов. *Андрология и генитальная хирургия*. 2006; 1: 59–65.
- Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Латыпова М.Ф., Дмитриев Г.А. Выявление сперматозоидов, инфицированных вирусом простого герпеса. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2000; 5: 18–22.
- Климова Р.Р., Чичев Е.В., Науменко В.А., Гаджиева З.С., Цибилов А.С., Адиева А.А. 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): 27–31.
7. Kushch A.A., Naumenko V.A., Klimova R.R., Tyulenev Yu.A., Malolina E.A. Herpes virus infection of human gametes and male sterility: from experimental models to development of clinical recommendations. *Voprosy virusologii*. 2013; 1: 132–44. (in Russian)
8. Bocharova E.N., Bragina E.N., Gusak Yu.K., Zykova M.S., Likhayev D.N., Zotov V.V. et al. Spontaneous abortion, failure of reproductive technology and herpetic infection of sperm. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya*. 2006; 1: 59–65. (in Russian)
9. Bragina E.E., Abdumalikov R.A., Kurilo L.F., Shileyko L.V., Lатыпова M.F., Dmitriev G.A. Detection of spermatozoa infected with herpes simplex virus. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2000; 5: 18–22. (in Russian)
10. Klimova R.R., Chichev E.V., Naumenko V.A., Gadzhieva Z.S., Tsiibizov A.S., Adieva A.A. et al. Herpes simplex virus and cytomegalovirus in male ejaculate: herpes simplex virus is more common in idiopathic infertility and correlates with a decrease in sperm parameters. *Voprosy virusologii*. 2010; 55 (1): 27–31. (in Russian)
11. 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 herpesvirus in semen from sperm donors. *PLoS One*. 2012; 7 (11): e48810.
12. Naumenko V., Tyulenev Y., Kurilo L., Shileiko L., Sorokina T., Evdokimov V. et al. Detection and quantification of human herpes viruses types 4–6 in sperm samples of patients with fertility disorders and chronic inflammatory urogenital tract diseases. *Andrology*. 2014; 2 (5): 687–94.
13. Neofytou E., Sourvinos G., Asmarianaki M., Spandidos D.A., Makrigiannakis A. Prevalence of human herpes virus types 1–7 in the semen of men attending an infertility clinic and correlation with semen parameters. *Fertil. Steril.* 2009; 91 (6): 2487–94.
14. Ochsendorf F.R. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia*. 2008; 40 (2): 72–5.
15. Morris B.J., Gray R.H., Castellsague X., Bosch F.X., Halperin D.T., Waskett J.H. et al. The strong protection afforded by circumcision against cancer of the penis (Invited Review). *Adv. Urol.* 2011; 2011: 812 368.
16. Laprise C., Trottier H., Monnier P., Coutlée F., Mayrand M.H. Prevalence of human papillomaviruses in semen: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 2014; 29 (4): 640–65.
17. Chan S.Y., Delius H., Halpern A.L., Bernard H.U. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J. Virol.* 1995; 69 (5): 3074–83.
18. Bernard H.U., Calleja-Macias I.E., Dunn S.T. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Int. J. Cancer*. 2006; 118: 1071–6.
19. Medeiros L.R., Ethur A.B., Hilgert J.B., Zanini R.R., Berwanger O., Bozzetti M.C. et al. Vertical transmission of human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad. Saude Publica*. 2005; 21 (4): 1006–15.
20. Skoczynski M., Gozdicka-Jozefiak A., Kwasniewska A. Prevalence of human papillomavirus in spontaneously aborted products of conception. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2011; 90 (12): 1402–5.
21. Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R., Giwercman A., Kopa Z., Tourayne H., Krausz C. *Guidelines on Male Infertility*. European Association of Urology; 2013. Available at: http://www.uroweb.org/gls/pdf/16_Male_Infertility_LR.pdf.
22. World Health Organization. *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen*. Geneva: World Health Organization; 2010.
23. Flores-Sánchez I., Gutiérrez-Salinas J., Enriquez-Alvarado E., Hernández-Rodríguez S., Ramos-Barragán C., Salamanca-Ceciliano A. et al. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 in semen samples from patients in an assisted reproduction program. *Ginecol. Obstet. Mex.* 2010; 78 (12): 645–51.
24. Hebnés J.B., Olesen T.B., Duun-Henriksen A.K., Munk C., Norrild B., Kjaer S.K. Prevalence of genital human papillomavirus among men in Europe: systematic review and meta-analysis. *J. Sex Med.* 2014; 11 (11): 2630–44.
25. Lenzi A., Mirone V., Gentile V., Bartoletti R., Ficarra V., Foresta C. et al. Rome Consensus Conference – statement; human papilloma virus diseases in males. *BMC Public Health*. 2013; 13: 117.
26. Yang Y., Jia C.W., Ma Y.M., Zhou L.Y., Wang S.Y. Correlation between HPV sperm infection and male infertility. *Asian J. Androl.* 2013; 15 (4): 529–32.
27. Spandorfer S.D., Bongiovanni A.M., Fasioulotis S., Rosenwaks Z., Ledger W.J., Witkin S.S. Prevalence of cervical human papillomavirus in women undergoing in vitro fertilization and association with outcome. *Fertil. Steril.* 2006; 86 (3): 765–7.