

РОЛЬ МУЖСКОГО ФАКТОРА В НЕВЫНАШИВАНИИ БЕРЕМЕННОСТИ

© Е.В. МАРКЕЛОВА¹, М.С. ТУЛУПОВА², М.Б. ХАМОШИНА², Н.С. ЧЕПУРНОВА¹, Т.А. НЕВЕЖКИНА¹

¹ ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Владивосток, Россия,

² ФГБОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки России, Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Охрана материнства и детства признана приоритетным направлением в здравоохранении. Невынашивание беременности является наиболее частым осложнением гестационного периода. Эффективно решить проблему репродуктивных потерь можно только на этапе прегравидарной подготовки супружеской пары.

Цель исследования — оценить участие мужского фактора бесплодия в семейной паре путем анализа показателей спермограммы и цитокинового профиля у мужчин в супружеских парах с синдромом потери плода.

Материалы и методы. Проведено обследование 471 мужчины из супружеских пар с синдромом потери плода. Всем пациентам проведено андрологическое обследование, включающее оценку полового статуса с определением объема и консистенции тестикул, пальцевое ректальное исследование, анкетирование, позволяющие оценить андрогенный статус и половую функцию. Обследование на инфекции, передающиеся половым путем, проводили согласно общепринятым стандартам.

Результаты. У мужчин основных групп было установлено статистически значимое снижение общей подвижности сперматозоидов, а также количества сперматозоидов с прогрессивным движением. Зарегистрировано значительное снижение уровня лимонной кислоты, что может свидетельствовать о значительном угнетении функции предстательной железы. В ходе проведенного обследования мужчин частота встречаемости патоспермии составила 89% случаев. Ведущим причинным фактором патоспермии, явились инфекции половых путей.

Выводы. В существующей практике недооценено значение сперматозоидов мужчин, перенесших вирусную и хламидийную инфекцию половых путей, как источника инфицирования половой партнерши и причины репродуктивных потерь. При истинном инфекционном генезе разницы между спонтанным и привычным невынашиванием нет, если в основе лежит вирусная инфекция или вирусно-бактериальная ассоциация.

Ключевые слова: бесплодие, папилломавирусная инфекция, генитальный герпес, спермограмма.

THE ROLE OF MALE FACTOR IN PREGNANCY LOSS

© E.V. MARKELOVA¹, M.S. TULUPOVA², M.B. KHAMOSHINA², N.S. CHEPURNOVA¹, T.A. NEVEZHINA¹

¹ Educational Institution of Higher Education «Pacific State Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Vladivostok, Russia;

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Peoples' Friendship University of Russia» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

ABSTRACT

Maternal and child health is recognized as a priority in healthcare. Miscarriage is the most common complication of the gestational period. Effectively solving the problem of reproductive losses is possible only at the stage of pregravid preparation of a married couple.

Objective. To assess the participation of the male factor in studies of spermogram and cytokine profile in men.

Materials and methods. A survey of 471 men from couples with fetal loss syndrome was conducted. The control group consists of 177 men from couples without reproductive losses. All patients underwent an andrological examination, including the assessment of sexual status with the determination of the volume and consistency of the testicles, digital rectal examination, questionnaires, which allow to assess the androgen status and sexual function. Examination for sexually transmitted infections was carried out according to generally accepted standards.

Results. In men of the main groups, a statistically significant decrease in the total sperm motility, as well as the number of spermatozoa with progressive movement, was found. A significant decrease in the level of citric acid was recorded, which may indicate a significant inhibition of prostate function. During the examination of men, the incidence of pathospermia was 89% of cases. The leading causative factor of pathospermia is genital tract infection.

Conclusion. In existing practice, the importance of sperm of men who have had a viral and chlamydial infection of the genital tract, as a source of infection of the sexual partner and the cause of reproductive loss, is underestimated. With true infectious genesis, there is no difference between spontaneous and habitual miscarriage, if the basis is a viral infection or a viral-bacterial association.

Keywords: infertility, human papillomavirus infection, genital herpes, spermogram.

Одной из глобальных проблем нашей страны является сохраняющаяся негативная демографическая ситуация, которая характеризуется как кризисная. Несмотря на внедрение в практику врача акушера-гинеколога алгоритмов прегравидарной подготовки, потери желанных беременностей остаются на прежнем уровне. Каждая 4–5-я желанная беременность прерывается, причем 70–80% — на сроке 6–8 нед. гестации. Причины невынашивания беременности общеизвестны, объединены в группы, доказано их сочетанное влияние [1]. Принято считать, что успешность зачатия, течение беременности и здоровье ребенка зависят, прежде всего, от здоровья его матери [2]. Такова же позиция социума. Соответственно среднестатистический мужчина изначально и не планирует обследоваться и ле-

читься, считая себя абсолютно здоровым. Однако в немалой степени благодаря развитию и широкому внедрению в практику программ экстракорпорального оплодотворения, при которых в обязательном порядке исследуется сперматогенез, в последнее время в репродуктивной медицине активно изучается влияние мужского фактора на фертильность и здоровье потомства [3]. Генетический вклад родителей в здоровье своего потомства в целом одинаков и для женщины, и для мужчины. Центральное место в мужской репродуктивной сфере занимает сперматогенез. Это сложный многостадийный процесс развития и созревания сперматозоидов из незрелых половых клеток. В среднем продолжительность созревания сперматозоида занимает около двух с половиной месяцев. Нормальное протекание сперматогенеза требует скоординированного влияния многочисленных факторов (генетических, клеточных, гормональных и других). Подобная сложность делает сперматогенез «легкой мишенью» для всякого рода негативных воздействий. В супружеских парах с невынашиванием беременности нарушения сперматогенеза установлены у 42–58% мужчин. Существует огромное количество причин нарушения репродуктивной функции у мужчин. По своему характеру эти факторы могут быть физическими (воздействие высоких или низких температур, радиоактивное и другие типы излучения и прочее), химическими (воздействие различных токсических веществ, побочный эффект лекарств и др.), биологическими (инфекции, передающиеся половым путем, различные заболевания внутренних органов) и социальными (хронические стрессы). Лидирующее положение занимает биологический фактор, а именно инфицирование урогенитального тракта.

Цель исследования — оценить участие мужского фактора бесплодия в семейной паре путем анализа показателей спермограммы и цитокинового профиля у мужчин в супружеских парах с синдромом потери плода.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено обследование 471 мужчины из супружеских пар с синдромом потери плода — основная группа, которые распределены следующим образом: 1-я подгруппа — мужчины из супружеских пар со спорадическим невынашиванием беременности — 245 (52,01%); 2-я подгруппа — мужчины из супружеских пар с привычным невынашиванием беременности — 226 (47,98%). Средний возраст мужчин основной группы составил $34,2 \pm 4,1$ года. Контрольную группу составили 177 мужчин из супружеских пар без репродуктивных потерь, средний возраст — $31,8 \pm 3,4$ года. Для исключения влияния соматических заболеваний на секрецию тестостерона в основную группу не включали пациентов с установленными ранее любыми соматическими заболеваниями и изменением кариотипа. Всем пациентам проведено андрологическое обследование, включающее оценку полового статуса с определением объема и консистенции тестикул, пальцевое ректальное исследование, анкетирование, позволяющие оценить андрогенный статус и половую функцию. Обследование на инфекции, передающиеся половым путем, проводили согласно общепринятым стандартам. Исследование эякулята выполняли согласно протоколу ВОЗ (5-е изд., 2010). Материал для трансмиссионной электронной микроскопии фиксировали 2% глутаровым альдегидом, приготовленным на 0,1 М какодилатном буфере, pH 7,2 в течение суток при 4°C, затем промывали в трех порциях какодилатного буфера и дегидратировали в серии спиртов возрастающей концентрации, помещали в ацетон и заливали в смесь эпоксидных смол — Epon и Araldite (Sigma-Aldrich, США). Срезы материала изготавливали на микротоме Leica EM UC6 (Leica Mikrosystems, Германия). Полутонкие срезы докрашивали 1%-м раствором метиленового синего, ультратонкие срезы контрастировали 0,5%-м водным раствором ацетат уранила и цитратом свинца по Рейнольдсу (1963). Весь гистологический материал анализировали с помощью светового микроскопа Axio Imager (Carl Zeiss, Германия). Ультратонкие срезы исследовали на электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Определение уровня ИЛ-10, ИЛ-13, ИФН γ в сыворотке крови и эякуляте проводили с помощью специфических реактивов фирмы R & D Diagnostics, Inc. (США) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. Учет результатов производили с помощью иммуноферментного анализатора Multiscan (Финляндия). Расчеты количества цитокина проводили путем построения калибровочной кривой с использованием компьютерной программы. Количество выражали в пг/мл. Анализ полученных результатов проводили при помощи программы SPSS v.16. методом вариационной статистики с использованием двухвыборочного t-критерия Стьюдента и критерия Манна—Уитни (p_u). При нормальном распределении и случайные величины указывали в виде среднего значения, стандартного отклонения ($\bar{X} \pm \sigma$). Количественные признаки, не имеющие нормального распределения, оценивали с помощью непараметрических методов и представили в виде медианы (Me), 25%-го и 75%-го квартилей (Q25; Q75), минимального (min) и максимального (max) значений. Для выявления взаимосвязи между переменными использован коэффициент корреляции рангов Спирмена. Уровень статистической значимости, при котором отклонялись нулевые гипотезы, составлял менее 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе настоящего исследования выявлено, что у мужчин частота встречаемости патоспермии составила 89% случаев. Наиболее частыми отклонениями сперматогенеза явились тератозооспермия за счет аномальных включений в хроматин головки сперматозоида — вакуолей, уменьшение размеров акросомы и также наличие вакуолей, и астенозооспермия за счет агглютинации и агрегации, а не за счет изменений анатомии хвоста сперматозоида, что согласуется с данными литературы [4].

В ходе настоящего исследования установлено, что ведущим причинным фактором патоспермии явились инфекции половых путей. При этом в структуре вирусных инфекций преобладала папилломавирусная (60,5%) и несколько более трети (39,5%) приходилось на долю герпесвирусов. В структуре папилломавирусной инфекции (ВПЧ) лидировали 6, 52 и 18 штаммы (соответственно 40,7; 27,1 и 12,7%), в структуре герпесвирусной инфекции — вирус простого герпеса 2-го типа, цитомегаловирус и вирус Эпштейна—Барр (соответственно 70,2; 10,4 и 9,1%).

У 45,2% обследованных мужчин обнаружены *C. trachomatis*, у 4,8% — *Tr. vaginalis*, у 16,1% — *M. genitalium*. Среди микроорганизмов, которые традиционно относят к условно-патогенным, чаще всего выявляли *U. urealyticum* (85,5%), *M. hominis* (43,5%), *U. parvum* (37,1%) и *S. epidermidis* (24,2%). Наиболее частыми ассоциациями были герпетическая, папилломавирусная инфекции в сочетании с хламидийной.

Всем супружеским парам проведено специфическое лечение инфекций, передающихся половым путем, по стандартным методикам. Проведен контроль излеченности в соответствии с общепринятыми алгоритмами. Критерием

Таблица 1. Показатели спермограмм мужчин с хроническим уретритом
Table 1. Spermograms of men with chronic urethritis

Показатель спермограммы		Больные с уретритом		Контрольная группа (n=177)
		1-я подгруппа (n=245)	2-я подгруппа (n=226)	
Объём, мл	≥1,5	3,05±0,36	3,83±0,47	3,10±0,39
Вязкость, см	до 2	1,06±0,18	1,13±0,16	1,18±0,15
Время разжижения, мин	15–60	10,65±1,60**	13,73±1,50	25,0±4,47
Кислотность, pH	7,2–7,8	7,65±0,04	7,71±0,05	7,32±0,11
Концентрация в 1 мл эякулята, млн	≥15	126,59±13,07	97,93±11,74	97,60±21,39
Лимонная кислота, ммоль/л	≥20	16,29±3,05*	14,12±1,99***	24,60±0,97
Фруктоза, ммоль/л	≥13	38,90±7,20	54,35±13,73	46,28±2,12
Цинк, мкм/дл	≥2,4	4,27±0,89	2,32±0,37	3,42±0,78
Общее кол-во сперматозоидов, млн	≥39	102,60±12,50***	113,40±16,50**	277,22±53,66
Морфологически нормальные формы, %	≥4	80,3±4,3	72,70±4,90	82,32±3,45
Аномалия головки, %	<1–25	19,65±4,29	28,73±2,68**	16,36±2,51
Общая подвижность, %	≥40	60,65±3,45***	65,56±2,51**	84,80±5,83
Прогрессивное движение, %	≥32	41,60±2,60***	43,00±2,90***	75,40±5,45
Непрогрессивно подвижные, %		26,30±3,30***	29,30±3,00***	9,40±2,10
Неподвижные, %	–	38,10±2,60***	33,80±2,20***	15,20±1,71
Жизнеспособность, %	≥58	76,50±5,60	84,40±1,60	81,80±6,14

Примечание. * — $p_u < 0,05$; ** — $p_u < 0,01$; *** — $p_u < 0,001$ — статистически значимые различия по сравнению с показателями пациентов контрольной группы; p_{u1-2} — сравниваемые группы больных уретритом мужчин.

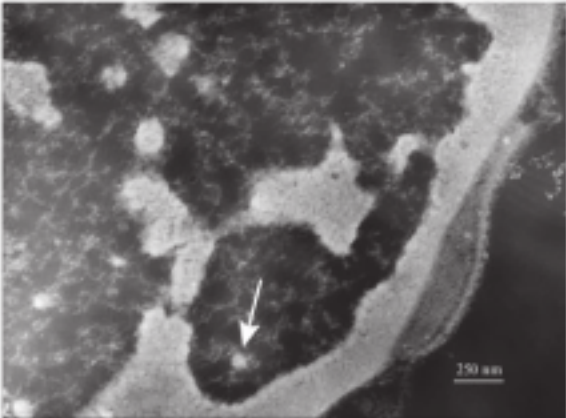


Рис. 1. Формирование вирусных частиц вируса простого герпеса в ядре сперматозоида. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 16\,000$.
Fig. 1. The formation of HSV viral particles in the sperm nucleus, an increase of $\times 16\,000$. Hematoxylineosin stain.

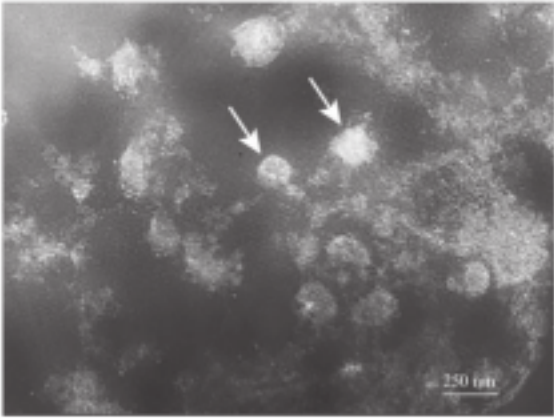


Рис. 2. Скопление вирусных частиц в цитоплазме сперматозоида. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 16\,000$.
Fig. 2. The accumulation of viral particles in the cytoplasm of the sperm, an increase of $\times 16\,000$. Stained with hematoxylineosin.

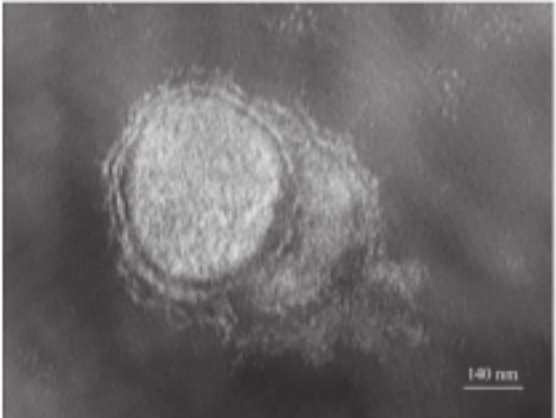


Рис. 3. Хламидия, окруженная многослойной мембраной, в вакуоли цитоплазмы сперматоцита. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 20\,000$.
Fig. 3. Chlamydia in a vacuole of the spermatocyte cytoplasm, surrounded by a multilayer membrane, an increase of $\times 20\,000$. Hematoxylineosin stain.

излеченности мужчин являлась нормализация сперматогенеза, т.е. вхождение показателей спермограммы в допустимый физиологический коридор по данным критериев ВОЗ (5-е издание) и отсутствие патогенной микрофлоры урогенитального тракта, выявленной при первичном обследовании.

Однако при наступлении планированной беременности в 11% случаев эмбриофетопотери повторились. Перед нами встала задача поиска способа для контроля нормализации сперматогенеза путем детального обследования качества эякулята. Методом выбора стала электронная микроскопия.

Известно, что сперматозоид человека состоит из трех основных анатомических регионов: головки, средней части, или шейки, и жгутика. Весь сперматозоид окружен плазматической мембраной. Головка содержит хроматин, плотно упакованный. Плотная упаковка необходима для более компактной формы клетки и, как следствие, уменьшения энергетических затрат на продвижение сперматозоида по половому тракту. Головка сперматозоида имеет акросому — мембранный мешочек с протеолитическими ферментами, необходимыми для проникновения через оболочки ооцита в процессе оплодотворения. Под акросомой расположена постакросомальная пластинка, которая

Таблица 2. Регуляторный коэффициент соотношения ИФН γ /ИЛ-10+ИЛ-13 в сыворотке венозной крови и эякуляте у мужчин контрольной и основной групп
Table 2. The regulatory coefficient of the ratio of IFN γ /IL-10+IL-13 in the serum of venous blood and ejaculate in the studied groups and the control group

Коэффициент	Контрольная группа (n=177)	Основная группа (n=471)
ИФН γ /ИЛ-10+ИЛ-13, сыворотка венозной крови	0,21±0,02	0,05±0,001***↓
ИФН γ /ИЛ-10+ИЛ-13, эякулят	0,41±0,01	0,25±0,02*↓ ₁₋₂

Примечание. * — $p < 0,05$; *** — $p < 0,001$ — статистически значимые различия с показателями исследуемых контрольной группы; между подгруппами: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; *** — $p < 0,001$, где 1, 2 — исследуемые подгруппы.

является точкой инициации слияния мембран ооцита и сперматозоида. Ядро сперматозоида лежит на так называемой базальной пластинке у основания головки — место соединения головки и шейки. В шейке сперматозоида находятся митохондрии, спиралевидно располагаясь вокруг аксонемы, они обеспечивают энергией, необходимой для движения жгутика. При исследовании ультраструктур сперма дополнительных включений в виде вакуолей, изломов продольных направлений, наличия дополнительных частиц на мембране сперматозоида.

При ультраструктурном исследовании сперматозоидов пациентов обеих исследуемых групп обнаружены сперматозоиды преимущественно с дефектной морфологией. А именно, в ядрах хроматин грубозернистый, ядерная мембрана прерывистая, цитоплазма вакуолизирована, преобладали сперматозоиды с микроголовками и цитоплазматической каплей. Эти сперматозоиды не могут принимать участие в оплодотворении, так как сперматозоиды с микроголовками — половые клетки с редуцированным геномом, а с цитоплазматической каплей — незрелые формы [5]. В цитоплазме этих клеток обнаружены вирусные частицы размером 50–90 нм (рис. 1, 2), от 1 до 10. Вирусные частицы наблюдались как отдельно (см. рис. 1), так в скоплениях в вакуолях цитоплазмы. Вирусные частицы обнаружены также в вакуолях и на поверхности ядер сперматозоидов.

Одновременно с тем в вакуолях цитоплазмы исследованных образцов выявлены бактерии — хламидии (рис. 3). Это согласуется с данными литературы [5], которые доказывают, что воспалительные процессы сопровождаются прикреплением хламидий к сперматозоидам, в результате этого они поражают 33–45% сперматозоидов, а среднее число возбудителей на одном сперматозоиде достигает трех. В нашем исследовании выявлено также и внутриядерное бактериальное поражение.

При изучении количественных и качественных показателей спермограмм мужчин основной группы установлено статистически значимое снижение общей подвижности сперматозоидов, а также количества сперматозоидов с прогрессивным движением у пациентов обеих исследуемых подгрупп по сравнению с мужчинами контрольной группы. Количество неподвижных форм и форм с непрогрессивным движением значительно превышало референсные значения ($p < 0,001$) (табл. 1). Необходимо отметить, что у пациентов обеих исследуемых подгрупп зарегистрировано значительное снижение уровня лимонной кислоты. Самый низкий уровень этого показателя определен у пациентов 2-й подгруппы, что может свидетельствовать о значительном угнетении функции предстательной железы.

В последнее время убедительно показана роль иммунных механизмов в реализации заболеваний половой сферы инфекционного генеза, характер которых сопровождается активацией врожденного и адаптивного иммунитета, играющих важную роль в защите от инфекции.

Цитокины как молекулы короткодистантного действия при иммунном ответе практически не поступают в кровоток, поэтому в сыворотке крови их определяют в незначительных концентрациях. Не всегда есть смысл определять абсолютные показатели концентрации. Важно их соотношение. В связи с этим для обследования цитокинового статуса мы использовали не только сыворотку венозной крови пациентов, но и семенную жидкость мужчин из супружеских пар с невынашиванием беременности и без репродуктивных неудач. А также исследован регуляторный коэффициент соотношения ИФН γ и ИЛ-10+ИЛ-13 (табл. 2).

Значения регуляторного коэффициента в сыворотке венозной крови мужчин основной группы были ниже по сравнению с исследуемыми контрольной группы, различий между пациентами подгрупп не выявлено (см. табл. 2). В эякуляте наиболее выраженное снижение индекса ИФН γ /ИЛ-10+ИЛ-13 установлено у мужчин основной группы ($p < 0,01$). Зафиксированные данные свидетельствуют о дисрегуляции иммунного ответа на локальном и системном уровнях у этой категории пациентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что общепринятые критерии оценки состояния сперматогенеза по данным рутинного анализа спермы не являются окончательными. В существующей практике недооценено значение сперматозоидов мужчин, перенесших вирусную и хламидийную инфекцию половых путей, как источника инфицирования половой партнерши и причины репродуктивных потерь.

Наш опыт и результаты проведенного исследования свидетельствуют, что при истинном инфекционном генезе разницы между спонтанным и привычным невынашиванием нет, если в основе лежит вирусная инфекция или вирусно-бактериальная ассоциация.

Пути преодоления репродуктивных потерь в условиях сложной демографической ситуации — включение мужчин в обязательный алгоритм прегравидарного обследования и лечения не только у пар с бесплодием, но и в семьях с невынашиванием беременности вне зависимости от количества репродуктивных потерь.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ткаченко Л.В., Костенко Т.И., Углова Н.Д., Шкляр А.Л. Невынашивание беременности. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. 2015;1(53):3-9.
Tkachenko LV, Kostenko TI, Uglova ND, Shklyar AL. Miscarriage of pregnancy. Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta. 2015;1(53):3-9. (In Russ.).
2. Прокопцев В.И., Стрижак Д.А. Женское бесплодие воспалительного генеза. Молодой ученый. 2016;22(1):31-34.
Prokopenko VI, Strizhak DA. Female infertility of inflammatory genesis. Molodoy uchenyy. 2016;22(1):31-34. (In Russ.).
3. Гамидов С.И., Авакян А.Ю. Роль субклинического варикоцеле в патогенезе идиопатической патоспермии. Медицинский вестник Башкортостана. 2017;12(3) (69):13-16.
Gamidov SI, Avakyan AJu. The role of subclinical varicocele in the pathogenesis of idiopathic pathospermia. Medicinskij vestnik Bashkortostana. 2017;12(3)(69):13-16. (In Russ.).
4. Бочарова Е.Н. Генетически обусловленная ультраструктурная патология сперматозоидов. Вестник новых медицинских технологий. 2008;15(1):52-54.
Bocharova EN. Genetically determined ultrastructural sperm pathology. Vestnik novykh medicinskih tehnologij. 2008;15(1):52-54. (In Russ.).
5. Redgrove KA, McLaughlin EA. The Role of the Immune Response in Chlamydia trachomatis Infection of the Male Genital Tract: A Double-Edged Sword. *Frontiers in Immunology. 2014;5:534. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00534*