

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.825.11.083.2

Малолina Е.А.^{1,2}, Лебедева А.Л.^{1,3}, Кулибин А.Ю.², Евдокимов В.В.^{1,4}, Курило Л.Ф.³, Сорокина Т.М.³, Тюленев Ю.А.¹, Науменко В.А.¹, Куш А.А.¹

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГЕРПЕСВИРУСОВ СО ЗРЕЛЫМИ СПЕРМАТОЗОИДАМИ ЧЕЛОВЕКА В МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ *IN VITRO*

¹ ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; ² ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, 119334, г. Москва; ³ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва; ⁴ ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии» Департамента здравоохранения г. Москвы, 127473, г. Москва

ДНК герпесвирусов человека (ГВЧ), в том числе вируса простого герпеса (ВПГ) и цитомегаловируса (ЦМВ), часто присутствует в эякулятах пациентов с различными заболеваниями урогенитального тракта и бесплодием. Установлено, что по крайней мере часть вирусной ДНК ассоциирована с клеточной фракцией эякулята, однако оставалось неясным, как вирус попадает в эякулят, может ли он находиться внутри гамет, способен ли инфицировать зрелые половые клетки, в том числе подвижные сперматозоиды. Для решения этих вопросов была использована разработанная нами ранее и оптимизированная в настоящей работе модель герпесвирусной инфекции мужских гамет *in vitro* и проведено исследование взаимодействия ЦМВ и ВПГ со сперматозоидами человека. Анализ иммунофлюоресцентной окраски гамет на вирусные антигены установил, что ЦМВ инфицирует 2% гамет *in vitro*, в то время как ВПГ – 17,26 ± 2,58% сперматозоидов. Во фракции прогрессивно подвижных сперматозоидов доля инфицированных гамет составляла 13,99 ± 4,64%. Локализацию антигенов ВПГ изучали с помощью конфокальной микроскопии. В части клеток вирусный белок gB обнаружен на мембране сперматозоидов. Наряду с этим оптическое сканирование других клеток показало внутриклеточную локализацию вирусных белков. Чаще всего вирусные белки наблюдали в головке и шейке сперматозоидов, реже – в средней части и хвосте, редко – в экваториальной области. В целом антигены ГВЧ при заражении *in vitro* располагались в тех же участках сперматозоидов, что и в эякулятах инфицированных пациентов. Доля гамет, содержащих ДНК ВПГ по данным ДНК-ДНК-гибридизации *in situ* составляла 16,94 ± 5,28%, что соответствует данным о степени заражения гамет, полученным с помощью иммунофлюоресценции. Можно заключить, что зрелые мужские гаметы способны инфицироваться ГВЧ при прохождении по половому тракту, прочно связываться с клеточной мембраной и проникать внутрь сперматозоида. Взаимодействие ГВЧ с прогрессивно подвижными сперматозоидами указывает на возможность вертикальной передачи вирусов при оплодотворении и целесообразность диагностики герпесвирусной инфекции эякулята.

Ключевые слова: герпесвирусы человека; вирус простого герпеса; цитомегаловирус; сперматозоиды человека; инфицирование гамет *in vitro*; мужское бесплодие; вертикальная передача вирусов; ДНК-ДНК-гибридизация; локализация вирусных антигенов; конфокальная микроскопия.

Для цитирования: Малолina Е.А., Лебедева А.Л., Кулибин А.Ю., Евдокимов В.В., Курило Л.Ф., Сорокина Т.М., Тюленев Ю.А., Науменко В.А., Куш А.А. Взаимодействие герпесвирусов со зрелыми сперматозоидами человека в модельной системе *in vitro*. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3): 119-125.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-119-125

Malolina E.A.^{1,2}, Lebedeva A.L.^{1,3}, Kulibin A.Yu.², Evdokimov V.V.^{1,4}, Kurilo L.F.³, Sorokina T.M.³, Tulenev Ju.A.¹, Naumenko V.A.¹, Kushch A.A.¹

INTERACTION OF HERPESVIRUSES WITH MATURE HUMAN SPERMATOZOA IN THE MODEL SYSTEM *IN VITRO*

¹ Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation; ² Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, 119334, Russian Federation; ³ Research Center for Medical Genetics, Moscow, 115478, Russian Federation; ⁴ Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Department of Healthcare of the Government of Moscow, Moscow, Russia

The DNA of human herpesviruses (HHV), including the herpes simplex virus (HSV) and cytomegalovirus (CMV), is often identified in ejaculates of patients with urogenital diseases and infertility. At least a part of viral DNA is associated with cell fraction of ejaculate. However, it remains unclear how the semen is infected by the virus. It can be located in gametes or be capable of infecting mature germ cells, including motile sperm cells. In order to resolve this issue, interactions of the CMV and HSV with human sperm cells were studied using an original optimized model of the herpesviral infection of male gametes *in vitro*. The analysis of the immunofluorescent staining of gametes for viral antigens has shown that CMV infected 2% gametes, while HSV infected 17.26 ± 2.58% gametes. The fraction of progressively motile sperm cells contained 13.99 ± 4.64% infected cells. Localization of HSV was studied by the confocal microscopy. Sometimes, viral gB protein was found on sperm cell membrane. In addition, optical scanning of other cells has shown the intracellular localization of the viral proteins. In the majority of spermatozoa, the viral proteins were observed in the head and neck. In some cells, they were located in the middle piece or, rarely, in the equatorial segment. In general, after *in vitro* infection HSV antigens were located in the same areas of the sperm cells as in ejaculates from infected patients. According to DNA-DNA hybridization *in situ*, gametes containing HSV

Для корреспонденции: Малолina Екатерина Андреевна, канд. биол. наук, научный сотрудник ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: kate.ma85@gmail.com

DNA accounted for 16.94 ± 5.28%, which is consistent with the results obtained in the immunofluorescence assay. It can be concluded that mature male gametes are infected by HHV in the genital tract, where the virus binds to the sperm cell membrane and enters the cell. Interaction of HHV with progressively motile sperm cells implies a vertical viral transmission upon fertilization and points to the necessity of testing ejaculate for herpesviruses infections.

Key words: *human herpesviruses; herpes simplex virus; cytomegalovirus; human sperm; infection of gametes in vitro; male infertility; vertical transmission; DNA-DNA hybridization; localization of viral antigens; confocal microscopy.*

For citation: Malolina E.A., Lebedeva A.L., Kulibin A.Yu., Evdokimov V.V., Kurilo L.F., Sorokina T.M., Tulenev Ju.A., Naumenko V.A., Kushch A.A. Interaction of herpesviruses with mature human spermatozoa in the model system *in vitro*. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(3): 119-125. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-119-125

For correspondence: Ekaterina A. Malolina, Candidate of Biology, Research scientist, Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: kate.ma85@gmail.com

Information about authors:

Malolina E.A., <http://orcid.org/0000-0003-3539-6829>

Kulibin A.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-5532-6794>

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

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

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

Funding. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project No. 14-04-32276 mol_a).

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

Received 09 November 2015
Accepted 19 November 2015

Введение

Инфекционные заболевания и воспалительные процессы в урогенитальном тракте занимают одно из первых мест среди причин мужского бесплодия. В настоящее время предостаточно немало свидетельств, доказывающих, что вирусные инфекции могут приводить к снижению фертильности либо за счет прямого токсического воздействия на клетки, либо вызывая иммунный ответ и развитие воспаления [1]. Если роль вирусов парогита или иммунодефицита человека в развитии бесплодия не вызывает сомнений, то степень воздействия на мужскую фертильность герпесвирусов человека (ГВЧ) до конца не выяснена. Во многих исследованиях установлено присутствие ГВЧ в эякулятах [2], однако частота их встречаемости сильно варьирует, что связано, по-видимому, с разной чувствительностью применяемых методов детекции вируса, неодинаковой распространенностью вирусов в различных странах, объемом выборок и особенностями контингента обследованных пациентов. Так, некоторые авторы находят вирус простого герпеса (ВПГ) 1-го и 2-го типов менее чем у 4% мужчин, как фертильных, так и страдающих бесплодием [2]. В то же время, например, в работах, выполненных на материале греческих клиник [3, 4], ВПГ в эякуляте выявляют у 29% и даже у 50% пациентов с проблемами фертильности, при этом используют гнездовую (nested) полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и гибридизацию *in situ*. В выборке пациентов с бесплодием, проходящих курс лечения в китайских клиниках, ВПГ обнаружен в 25% эякулятов [5], в японских клиниках – в 24% [6]. В работе Е.Н. Бочаровой и соавт. [7], проведенной на российской популяции пациентов, страдающих бесплодием, ВПГ выявлен в половине эякулятов, для обнаружения вируса использован комплекс методов: иммунофлюоресценция, гибридизация *in situ* и другие. В работе Р.Р. Климовой и соавт. [8] по данным изучения цельных эякулятов ВПГ присутствовал в 31% случаев у пациентов с проблемами фертильности и в 17% случаев у фертильных мужчин. Во фракции активно подвижных сперматозоидов ВПГ найден в 30 и 8% эякулятов соответственно. Некоторые исследователи не находят связи между присутствием

ВПГ в эякуляте и ухудшением показателей спермограммы [2]. Другие отмечают снижение концентрации и подвижности сперматозоидов в эякулятах, положительных на ВПГ, а также увеличение в них содержания морфологически аномальных форм гамет [2, 8, 9]. Также есть данные о том, что в группе пациентов, у жен которых в анамнезе имелись спонтанное прерывание беременности и неудачи экстракорпорального оплодотворения, высок уровень инфицирования сперматозоидов ВПГ [10]. Частота обнаружения ДНК другого представителя ГВЧ – цитомегаловируса (ЦМВ) в эякуляте здоровых доноров обычно колеблется в пределах 3–5%, в эякуляте пациентов с бесплодием – от 1,4 до 56,5% [2]. В проведенном нами [11] скрининге эякулятов пациентов с различными заболеваниями мочеполового тракта методом ПЦР установлено, что ЦМВ часто встречается у страдающих бесплодием мужчин с хроническими воспалительными заболеваниями мочеполовой системы, причем ДНК ЦМВ ассоциирована с клеточной фракцией эякулята. Установлено, что по крайней мере часть вирусной ДНК ассоциирована с клеточной фракцией эякулята, и это ставит ряд вопросов: как вирус попадает в эякулят, может ли он находиться внутри гамет, способен ли инфицировать зрелые мужские половые клетки и какова форма герпесвирусной инфекции сперматозоидов (литическая, abortивная, латентная). Пути проникновения вирусов в мужские гаметы до сих пор не ясны. Заразить зрелые сперматозоиды ЦМВ и ВПГ до недавнего времени не удавалось [12, 13]. Высказывалось предположение, что проникновение ГВЧ возможно лишь в ранних стадиях сперматогенеза в клетки с активно транскрибируемым хроматином. Нам удалось разработать модель заражения сперматозоидов *in vitro* и впервые доказать принципиальную возможность инфицирования зрелых гамет ЦМВ [11]. Поскольку выяснение вопроса о внутригаметной герпесвирусной инфекции имеет значение для оценки влияния ГВЧ на фертильность, а также для решения проблемы вертикальной передачи ГВЧ, цель настоящей работы состояла в оптимизации модельной системы *in vitro* и детальном изучении с ее помощью взаимодействия ГВЧ со сперматозоидами человека.

Материал и методы

Клинический материал. Образцы спермы получены от мужчин, поступивших для профилактического обследования в Медико-генетический научный центр. До исследования информированное согласие на участие в нем было получено от каждого пациента. Процедуры исследования были проведены в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрены местным комитетом по биоэтической этике в ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Образцы эякулята пациенты получали путем мастурбации после 3-дневного полового воздержания.

ПЦР в реальном времени. Для обнаружения ДНК ГВЧ методом ПЦР использовали наборы реагентов фирмы «ИнтерЛабСервис» (Москва): комплект реагентов для экстракции ДНК из клинического материала АмплиСенс ДНК-сорб-В; набор реагентов для ПЦР в режиме реального времени для обнаружения ЦМВ, вируса Эпштейна-Барр и ГВЧ 6-го типа АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL; набор реагентов для ПЦР в режиме реального времени для определения ВПГ 1-го и 2-го типов АмплиСенс HSV1, II-FL. β -глобиновый ген применяли в качестве эндогенного внутреннего контроля.

В экспериментах использовали образцы, не содержащие ДНК ГВЧ.

Инфицирование сперматозоидов. В работе использовали штаммы F ВПГ 1-го типа и ЦМВ AD 169, полученные из Государственной коллекции вирусов ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. ВПГ-1 накапливали путем пассирования на культуре клеток почечного эпителия зеленой маргаритки линии Vero в среде Игла MEM, ЦМВ – на культуре клеток фибробластов легких эмбриона человека (ФЛЭЧ) в среде DMEM с добавлением 10% сыворотки эмбриона коровы. Инфекционную множественность вирусов определяли в культуре клеток модифицированным методом бляшек и выражали в бляшкообразующих единицах (БОЕ), содержащихся в 1 мл (БОЕ/мл), используя формулу:

$$A = a \cdot b / v,$$

где A – число БОЕ/мл; a – среднее число бляшек на 1 лунку; b – разведение вируса; v – объем вносимого вирусосодержащего материала.

Для заражения из образцов спермы выделяли подвижные сперматозоиды методом градиентного разделения с использованием среды Спермселект («ПанЭко», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Инфицирование гамет ГВЧ проводили при 37°C на шейкере в течение 0,5, 1 или 2 ч. Клетки заражали вирусами с множественностью инфицирования от 0,1 до 10 БОЕ на клетку. После инкубации с вирусом сперматозоиды несколько раз отмывали от неприкрепившихся вирусных частиц центрифугированием. Далее часть образцов продолжали инкубировать еще 18 ч при 37°C и 5% уровне CO₂ в воздухе. Оценивали подвижность сперматозоидов и готовили препараты фиксированных клеток – мазки.

Иммуноцитохимический анализ. Для выявления вирусных антигенов мазки сперматозоидов окрашивали первичными моноклональными антителами (МКА) к белку ЦМВ pp65, а также МКА к белкам ВПГ gB, ICP0 («Abcam», Великобритания), ICP4 («Abcam») и поликлональными антителами к структурным белкам ВПГ («Abcam»). Затем образцы инкубировали с соответствующими вторичными антителами и докрасивали ядра с помощью DAPI или пропидия йодида. Препараты анализировали и фотографировали на эпифлюоресцентном (Keyence BZ-9000, Япония) и конфокальном (Leica TCS

SP5 STED, Германия) микроскопах. Для локализации вирусных белков в инфицированных клетках изучали серийные оптические срезы с шагом 0,5–1 мкм.

Гибридизация *in situ*. Для выявления вирусной ДНК в клетках на цитологическом препарате применяли метод ДНК-ДНК-гибридизации *in situ*. Клетки фиксировали в 4% параформальдегиде («AppliChem», Германия). Использовали биотинилированные зонды ДНК ВПГ («Enzo Life Sciences», США) и набор Ultra Sensitive Enhanced Hrp-DAB *in situ* detection system («Enzo») в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистический анализ. Для статистической обработки результатов применяли пакет прикладных компьютерных программ Statistica 6.0 и Biostat. Статистические различия анализировали с помощью критериев Стьюдента и Манна-Уитни. Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Для оптимизации инфицирования сперматозоидов *in vitro* были проведены эксперименты, при выполнении которых варьировали продолжительность инкубации клеток с вирусами, температуру инкубационной смеси, концентрацию клеток, количество и инфекционную активность вирусов. Установлено, что эффективность заражения сперматозоидов ЦМВ и ВПГ различалась. Так, после 2-часовой инкубации сперматозоидов человека с ЦМВ инфицировалось лишь небольшое количество клеток: положительный сигнал при окрашивании образцов МКА к мажорному белку тегумента ЦМВ pp65 наблюдали в 2% гамет. Представляло интерес сравнить количество клеток, зараженных *in vitro*, с количеством ЦМВ-инфицированных клеток в эякулятах обследованных пациентов. Анализ 7 положительных образцов, содержащих ДНК ЦМВ, показал, что доля инфицированных клеток значительно различалась и колебалась от 0,1 до 45%. При этом количество инфицированных клеток прямо зависело от количества ДНК ЦМВ в эякуляте, которое по данным ПЦР варьировало от 15 до 68 070 (медиана 6489) копий ДНК на 100 тыс. клеток.

При заражении *in vitro* сперматозоидов высокоактивным ВПГ-1 было обнаружено значительно больше инфицированных клеток по сравнению с ЦМВ уже после часовой инкубации. Подсчеты числа клеток, положительно окрашенных поликлональными антителами к гликопротеинам оболочки вируса и белку капсида ВПГ, показали, что эффективность заражения составила $17,26 \pm 2,58\%$. При этом доля инфицированных гамет статистически значимо не изменялась при их дальнейшем культивировании и через 18 ч после заражения составляла $19,06 \pm 4,18\%$. Жизнеспособность клеток после 18-часового инкубирования оставалась высокой и равнялась в среднем $90,7 \pm 7,5\%$ в контрольных образцах и $89,3 \pm 8,1\%$ в инфицированных ($p > 0,05$).

Для выяснения вопроса о влиянии заражения *in vitro* на подвижность сперматозоидов сравнивали долю прогрессивно подвижных гамет ($a + b$) в 10 образцах, зараженных вирусом, и в 10 контрольных неинфицированных образцах. Оказалось, что количество подвижных клеток через 18 ч после заражения статистически значимо не различалось и составляло $52,4 \pm 20,7\%$ в контроле и $59,2 \pm 19,2\%$ в опыте.

Важные данные получены при анализе подвижных сперматозоидов. Подсчеты показали, что через 18 ч после заражения во фракции подвижных сперматозоидов

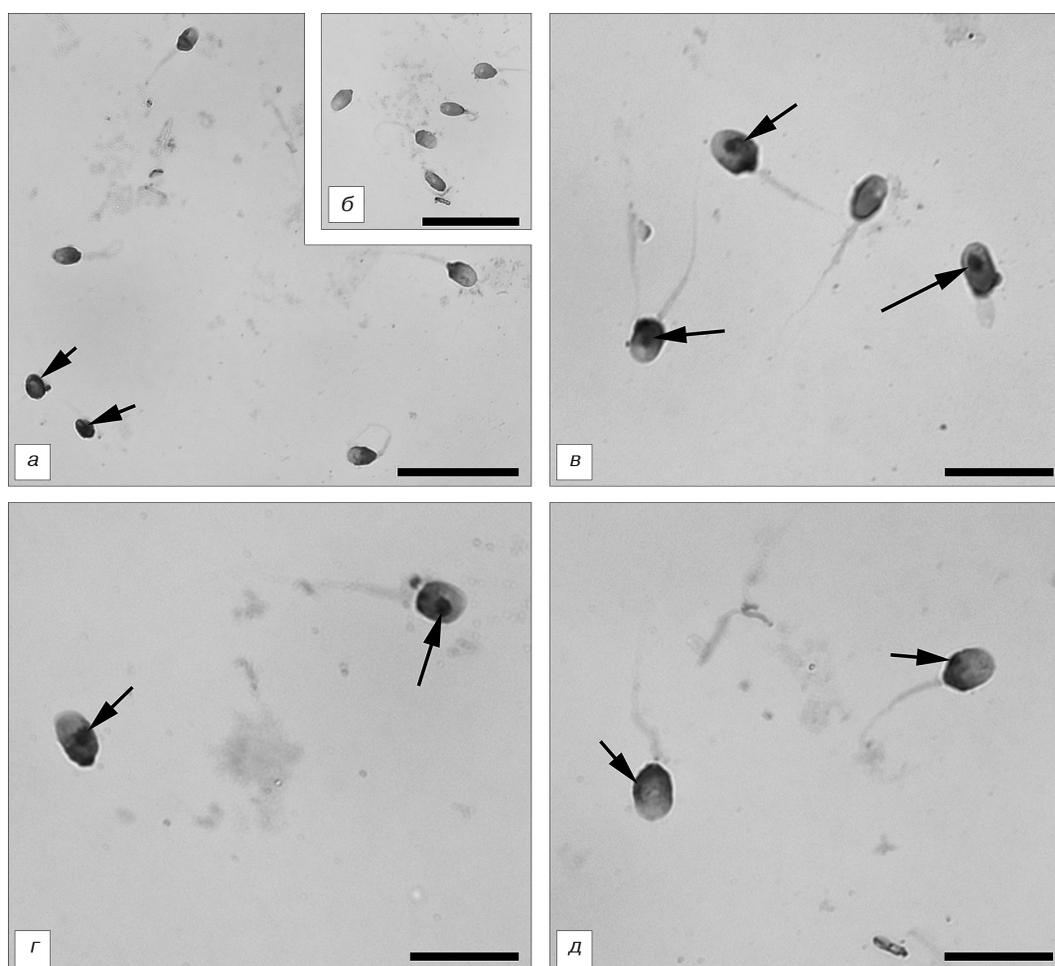


Рис. 3. Локализация ДНК ВПГ в сперматозоидах по результатам ДНК-ДНК-гибридизации *in situ*.

Гибридационный сигнал (коричневая окраска, стрелки) детектируется в головках сперматозоидов (а): в экваториальной зоне (в, з) и пришеечной части головки (д); б – отрицательный контроль. Ядра клеток докрасены гематоксилином Карацци. Масштаб: 20 мкм (а, б), 10 мкм (в–д).

находилось $13,99 \pm 4,64\%$ ВПГ-положительных клеток, что несколько меньше, чем в смешанной фракции подвижных и неподвижных гамет ($19,06 \pm 4,18\%$), однако это различие статистически незначимо ($p > 0,05$). Это указывает на потенциальную возможность вертикальной передачи ВПГ-инфекции со сперматозоидами.

Локализацию антигенов ВПГ в инфицированных сперматозоидах изучали методом сканирующей конфокальной микроскопии. Чаще всего вирусные белки, окрашенные поликлональными антителами, наблюдали в головке, в том числе в экваториальной области (рис. 1, а–ж, см. 3-ю полосу обложки), и шейке сперматозоидов (рис. 1, з, и). Реже прокрашивались средняя часть (рис. 1, и) и хвост. Встречали также различные сочетания окрашенных участков клетки. Изучение серийных оптических срезов показало, что идентифицированные вирусные белки локализованы внутри клетки.

Чтобы выяснить характер инфицирования сперматозоидов и форму инфекции, клетки изучали иммуноцитохимически с помощью МКА к сверххранним/ранним неструктурным белкам ВПГ-1 ICP0 и ICP4. При иммунофлюоресцентной окраске зараженных сперматозоидов не выявлено присутствия в гаметах этих антигенов.

В то же время окраска МКА к позднему вирусному белку гликопротеину gV ВПГ дала положительный ре-

зультат (рис. 2, см. 3-ю полосу обложки): gV был обнаружен на мембране сперматозоидов и локализован в шейке (см. рис. 2, а) и пришеечной части головки (см. рис. 2, в, з). Обращает на себя внимание нестандартная форма головки инфицированного сперматозоида на рис. 2, нарушение морфологии можно характеризовать как «клетка с округлой головкой».

Обнаружение вирусного белка на мембране может свидетельствовать о прочной связи вирусного белка с клеточной мембраной, а также о недостаточно эффективной отмывке зараженных клеток. Так как эффективность отмывки сперматозоидов от патогенов является весьма важным фактором при применении вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ), мы провели сравнительный анализ вирусной нагрузки в эякулятах, содержащих ВПГ, полученных от 56 пациентов. После выделения фракции подвижных сперматозоидов клетки отмывали центрифугированием (10 мин при 1500 об/мин). Отмывку считали эффективной при уменьшении количества вирусных частиц во фракции подвижных сперматозоидов по сравнению с цельным эякулятом. В результате элиминация ВПГ была отмечена в 28 образцах из 56, т. е. эффективность отмывки (отношение количества эффективных отмывок к общему количеству отмывок) составила 50%.

Данные о присутствии в сперматозоидах ДНК ВПГ бы-

ли получены с помощью ДНК-ДНК-гибридизации гамет *in situ* с олигонуклеотидными зондами, комплементарными к участку вирусного генома (рис. 3). Доля гамет, содержащих ДНК ВПГ, составляла $16,94 \pm 5,28\%$ в образцах, отобранных сразу после заражения, и $18,90 \pm 6,05\%$ во фракции подвижных сперматозоидов через 18 ч после заражения ($p > 0,05$). Вирусная ДНК локализовалась в головке сперматозоидов, в том числе в экваториальной зоне (см. рис. 3, в, з), и области шейки (см. рис. 3, д).

Обсуждение

Ранее мы показали принципиальную способность ЦМВ инфицировать мужские гаметы *in vitro* [11], однако эффективность и характер взаимодействия вируса со сперматозоидами не были изучены. В настоящей работе установлено, что при искусственном заражении ЦМВ инфицирует сперматозоиды человека с низкой эффективностью (2%). В то же время в некоторых проанализированных нами образцах спермы от пациентов, положительных на ДНК ЦМВ, доля инфицированных гамет достигала 45%. Мы предположили, что низкая эффективность заражения ЦМВ связана с невысокой активностью использованного вируса (0,1–1 БОЕ на клетку). Данное предположение подтвердилось при анализе клеток, инфицированных естественным путем. Количество зараженных клеток в эякулятах пациентов было прямо пропорционально количеству ЦМВ в эякуляте. В связи с этим в опытах с ВПГ использовали вирус с большей инфекционной множественностью (1–10 БОЕ на клетку). Действительно, в этом случае доля зараженных сперматозоидов по результатам иммунофлюоресцентного анализа составляла 17–19%.

Данные о степени инфицирования гамет ВПГ, полученные иммуноцитохимически, в дальнейшем были подтверждены с помощью ДНК-ДНК-гибридизации гамет *in situ*. Установлено, что доля сперматозоидов, содержащих ДНК ВПГ, полностью соответствует данным о степени заражения гамет, полученным с помощью иммунофлюоресценции. Более того, локализация вирусной ДНК также соответствует иммунофлюоресцентной картине, что дополнительно подтверждает специфичность обоих методов выявления вирусных маркеров.

Анализ локализации антигенов ВПГ показал, что в целом белки ВПГ располагались в тех же участках сперматозоидов, что и белки ЦМВ, как в случае искусственно зараженных клеток ЦМВ, так и в эякулятах инфицированных пациентов [11]. Сходная локализация вирусных маркеров в головках сперматозоидов ранее была продемонстрирована в работе Е.Н. Бочаровой и соавт. [7], проводивших скрининг положительных на ВПГ эякулятов пациентов, страдающих бесплодием. Примечательно, что в работе, проводившейся на ГВЧ 6-го типа [14], также было осуществлено инфицирование сперматозоидов человека вирусом *in vitro*, причем степень заражения была сходной с полученной нами для ВПГ. Однако вирусные частицы ГВЧ 6-го типа никогда не располагались в шейке сперматозоидов, самом распространенном месте прикрепления ВПГ и ЦМВ, но локализовались в верхней части головки в районе акросомы. После проведения искусственной акросомной реакции в отсутствие интактной акросомы ГВЧ 6-го типа к гаметам не прикреплялся. В то же время для вируса папилломы человека (ВПЧ) [15] не отмечено его прикрепление к акросоме. В инфицированных ВПЧ эякулятах вирусные частицы располагаются в экваториальной области головки, как это часто наблюдается и в случае ВПГ и ЦМВ.

Оптическое скринирование сперматозоидов, окрашенных поликлональными антителами и МКА, показало внутриклеточную локализацию белков ВПГ. Кроме того, гликопротеин gV был обнаружен на мембране клеток и, по-видимому, прочно связывался с мембранными рецепторами, так как был выявлен после градиентного центрифугирования и отмывок. Вирусная контаминация сперматозоидов представляет серьезную проблему для использования ВРТ в лечении бесплодия. Внутригаметная локализация вирусов в подвижных сперматозоидах не позволяет произвести очистку от инфекционных агентов путем стандартных процедур отмывки, но и в случаях прикрепления вирусных частиц к мембране сперматозоида отмывка может оказаться неэффективной. Об этом свидетельствуют результаты настоящей работы, показавшие, что снижение вирусной нагрузки после отмывки наблюдали только в 50% ВПГ-положительных образцов.

Сходные данные были получены авторами, изучавшими эякуляты ВИЧ-инфицированных пациентов. Исследования, проведенные с ВИЧ-инфицированными эякулятами, показали, что после очистки сперматозоидов градиентным центрифугированием инфекционная активность ВИЧ снижается [16], однако эффективность отмывки остается низкой [17].

В настоящей работе для выявления антигенов ВПГ, кроме поликлональных антител, были использованы МКА к сверхранним/ранним неструктурным белкам ВПГ-1 ICP0 и ICP4. Белки ICP0 и ICP4 в сперматозоидах выявлены не были. Так как экспрессия α -генов, которые кодируют эти белки, необходима для экспрессии β -генов, кодирующих структурные белки и ферменты, главствующие в репликации ДНК ВПГ, можно предположить, что репродукции вируса и литического цикла в сперматозоидах не происходило. Это может быть связано с низкой активностью метаболических процессов в зрелых сперматозоидах, хотя, по некоторым данным, транскрипция и трансляция клеточных РНК могут иметь место в сперматозоидах, хотя и в очень ограниченных масштабах, главным образом на митохондриальных рибосомах [18, 19]. Данное предположение подтверждают и приведенные выше количественные данные: доля зараженных сперматозоидов со временем не увеличивалась, т. е. распространения вируса не происходило. По-видимому, поздний белок gV, который был выявлен на сперматозоидах и локализовался на мембране клеток, принадлежит к тем вирусным частицам, которые инфицировали сперматозоиды (а не является синтезированным *de novo*). Таким образом, можно предположить, что инфекция сперматозоидов протекает в abortивной форме: после проникновения вирусной ДНК и белков тегиента и нуклеокапсида экспрессии вирусного генома не происходит. Есть основания считать, что герпесвирусная инфекция зрелых сперматозоидов *in vitro* представляет новую модель для изучения молекулярных механизмов установления латенции, которая отличается от классической модели инфицированных нейронов. Действительно, в некоторых нейронах обнаружена экспрессия ICP4 и некоторых других белков ВПГ [20]. Использование модели инфицирования сперматозоидов *in vitro* открывает перспективы изучения реактивности вируса после попадания его в ооцит в результате оплодотворения.

Необходимо отметить, что инфицирование сперматозоидов ВПГ не снижало их подвижности. Интересно, что в литературе нет однозначного мнения о влиянии ГВЧ на сперматозоиды. Некоторые исследователи не находят связи между присутствием вирусов в эякуляте

и ухудшением показателей спермограммы, другие отмечают снижение концентрации и подвижности сперматозоидов в эякулятах, положительных на ГВЧ, а также увеличение в них содержания морфологически аномальных форм гамет [2, 8, 9, 21]. Возможно, имеют место 2 варианта инфицирования сперматозоидов вирусом. В первом варианте развития событий уже зрелые гаметы инфицируются ГВЧ при их прохождении по половым путям, причем, по данным работы, проведенной на ГВЧ 6-го типа [14], прикрепление вируса к сперматозоидам может происходить очень быстро – за минуты. Этот вариант аналогичен проводимому нами инфицированию гамет *in vitro*, и в этом случае морфология гамет и их подвижность не изменяются. При втором варианте инфицирование может происходить раньше: ГВЧ могут заражать предшественники гамет непосредственно в яичках и влиять на морфологию сперматозоидов либо инфицировать гаметы, находящиеся в придатке яичка эпидидимисе, где наблюдается созревание гамет и приобретение ими подвижности. В последнем случае ГВЧ могут отрицательно воздействовать на подвижность и морфологию сперматозоидов. Косвенным подтверждением возможности заражения мужских гамет ГВЧ как в яичках, так и в половых путях могут служить данные обнаружения ВПГ и ЦМВ в яичках, эпидидимисе и семенных пузырьках человека [22, 23].

Суммируя результаты работы, можно сделать следующие выводы. Использование оптимизированной модели заражения *in vitro* показало, что зрелые мужские гаметы могут инфицироваться ГВЧ во время их прохождения по половому тракту, причем с высокой степенью эффективности. Изучение локализации вирусных ДНК и белков позволило установить, что ГВЧ способны не только прикрепляться к мембране сперматозоидов, но и проникать внутрь клеток. Отсутствие неструктурных α -белков ВПГ после заражения *in vitro* указывает на abortивный характер герпесвирусной инфекции зрелых мужских гамет. Установленный нами факт, что переносчиками ГВЧ могут быть прогрессивно подвижные сперматозоиды, указывает на возможность вертикальной передачи вирусов при оплодотворении от сперматозоидов к зиготе. Полученные данные свидетельствуют о необходимости диагностики герпесвирусной инфекции эякулятов как при проведении ВРТ, так и при нарушениях фертильности мужчин в парах с бесплодием. Обнаружение ГВЧ в урогенитальном тракте открывает возможность разработки тактики лечения бесплодия у больных, выделяющих ГВЧ с эякулятом.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 14-04-32276 мол_а.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–6, 11–20, 22, 23 см. REFERENCES)

7. Бочарова Е.Н., Завалишина Л.Э., Брагина Е.Е., Климова Р.Р. и др. Выявление геномной ДНК вируса простого герпеса методом гибридизации *in situ* в сперматозоидах человека при нарушении фертильности. *Доклады Академии наук*. 2007; 412(3): 417–21.
8. Климова Р.Р., Чичев Е.В., Науменко В.А., Гаджиева З.С., Цибизов 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; (1): 27–30.
9. Науменко В.А., Тюленев Ю.А., Пушкарь Д.Ю., Сегал А.С., Ковалев В.А., Курило Л.Ф. и др. Влияние вируса простого герпеса на сперматогенез. *Урология*. 2011; (6): 32–6.

10. 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.
21. Евдокимов В.В., Ковалык В.П., Курило Л.Ф., Сорокина Т.М., Лебедева А.Л., Тюленев Ю.А. и др. Распространение герпесвирусов и вируса папилломы человека у мужчин с бесплодием и воспалительными заболеваниями урогенитального тракта и их влияние на основные показатели спермы. *Урология*. 2015; (6): 55–9.

REFERENCES

1. Dejuq N., Jégou B. Viruses in the mammalian male genital tract and their effects on the reproductive system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001;65(2): 208–31.
2. Kaspersen M.D., Höllsberg P. Seminal shedding of human herpesviruses. *Virol. J.* 2013; 10: 226.
3. Kapranos N., Petrakou E., Anastasiadou C., Kotronias D. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil. Steril.* 2003; 79(3): 1566–70.
4. Michou V., Liarmakopoulou S., Thomas D., Tsimaratou K., Makarounis K., Constantoulakis P. et al. Herpes virus infected spermato-following density gradient centrifugation for IVF purposes. *Andrologia*. 2012; 44(3): 174–80.
5. Chen M., Cai L.Y., Kanno N., Kato T., Lu J., Jin F. et al. Detection of human herpesviruses (HHVs) in semen of human male infertile patients. *J. Reprod. Dev.* 2013; 59(5): 457–62.
6. El Borai N., Inoue M., Lef@èvre C., Naumova E.N., Sato B., Yamamura M. Detection of herpes simplex DNA in semen and menstrual blood of individuals attending an infertility clinic. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 1997; 23(1): 17–24.
7. Bocharova E.N., Zavalishina L.E., Bragina E.E., Klimova P.P. et al. Detection of genomic DNA of the herpes simplex virus by hybridization *in situ* of human sperm with impaired fertility. *Doklady Akademii nauk*. 2007; 412(3): 417–21. (in Russian)
8. Klimova R.R., Chichev E.V., Naumenko V.A., Gadzhieva Z.S., Tsbizov 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; (1): 27–30. (in Russian)
9. Naumenko V.A., Tyulenev Yu.A., Pushkar' D.Yu., Segal A.S., Kovalev V.A., Kurilo L.F. et al. Impact of herpes simplex virus on spermatogenesis. *Urologiya*. 2011; (6): 32–6. (in Russian)
10. Bocharova E.N., Bragina E.N., Gusak Yu.K., Zykova M.S., Likhav 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)
11. Naumenko V.A., Tyulenev Yu.A., Kurilo L., Shileiko L., Sorokina T., Evdokimov V.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.
12. Deture F.A., Drylie D.M., Kaufman H.E., Centifanto Y.M. Herpesvirus type2: study of semen in male subjects with recurrent infections. *J. Urol.* 1978; 120(4): 449–51.
13. Pallier C., Tebourbi L., Chopineau-Proust S., Schoevaert D., Nordmann P., Testart J. et al. Herpesvirus, cytomegalovirus, human sperm and assisted fertilization. *Hum. Reprod.* 2002; 17(5): 1281–7.
14. 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.
15. Foresta C., Patassini C., Bertoldo A., Menegazzo M., Francavilla F., Barzon L. et al. Mechanism of human papillomavirus binding to human spermatozoa and fertilizing ability of infected spermatozoa. *PLoS One*. 2011; 6(3): e15036.
16. Loskutov N.M., Huyser C., Singh R., Walker D.L., Thornhill A.R., Morris L. et al. Use of a novel washing method combining multiple density gradients and trypsin for removing human immunodeficiency virus-1 and hepatitis C virus from semen. *Fertil. Steril.* 2005; 84(4): 1001–10.
17. Chrystie I.L., Mullen J.E., Braude P.R., Rowell P., Williams E., Elkington N. et al. Assisted conception in HIV discordant couples: eval-

- uation of semen processing techniques in reducing HIV viral load. *J. Reprod. Immunol.* 1998; 41(1–2): 301–6.
18. Gur Y., Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev.* 2006; 20(4): 411–6.
 19. Miller D., Ostermeier G.C. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum. Reprod. Update.* 2006; 12(6): 757–67.
 20. Feldman L.T., Ellison A.R., Voytek C.C., Yang L., Krause P., Margolis T.P. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(2): 978–83.
 21. Evdokimov V.V., Kovalyk V.P., Kurilo L.F., Sorokina T.M., Lebedeva A.L., Tyulenev Yu.A. et al. Distribution of human herpes viruses and human papilloma virus in men with infertility and inflammatory diseases of the urogenital tract and their influence on the basic parameters of semen. *Urologiya.* 2015; (6): 55–9. (in Russian)
 22. Dalton A.D., Harcourt-Webster J.N. The histopathology of the testis and epididymis in AIDS—a post-mortem study. *J. Pathol.* 1991; 163(1): 47–52.
 23. DeTure F.A., Drylie D.M., Kaufman H.E., Centifanto Y.N. Herpesvirus type 2: isolation from seminal vesicle and testes. *Urology.* 1976; 7(5): 541–4.

Поступила 09.11.15

Принята в печать 19.11.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.281.8.03:616.98:578.826].076.9.036.8

Смирнов В.С.¹, Слита А.В.², Гаршинина А.В.², Беляевская С.В.², Аникин В.Б.², Зарубаев В.В.²

ВЛИЯНИЕ КОМБИНАЦИИ ГЛИЦИРРИЗИНОВАЯ КИСЛОТА + АЛЬФА-ГЛУТАМИЛ-ТРИПТОФАН НА ХОД ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹ЗАО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед»», 191023, г. Санкт-Петербург; ²ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург

В работе изучена активность препаратов глицирризиновой кислоты (GL) и дипептида глутамил-триптофана (EW) по отдельности и в комбинации (GL + EW) на модели экспериментальной аденовирусной инфекции у сирийских хомяков. Показано, что использование препаратов GL и GL+ EW снижает репликативную активность аденовируса в печени на 0,6–1,2 Ig TCID₅₀ в зависимости от препарата и срока развития инфекции, а также приводит к нормализации структуры печени животных как на уровне световой микроскопии, так и на ультраструктурном уровне. Полученные данные позволяют рассматривать эти препараты как потенциальный компонент комплексной терапии аденовирусной инфекции.

Ключевые слова: аденовирус; животная модель; глицирризиновая кислота; глутамил-триптофан; химиотерапия.

Для цитирования: Смирнов В.С., Слита А.В., Гаршинина А.В., Беляевская С.В., Аникин В.Б., Зарубаев В.В. Влияние комбинации глицирризиновая кислота + альфа-глутамил-триптофан на ход экспериментальной аденовирусной инфекции. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61 (2): 125–131.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-125-131

Smirnov V.S.¹, Slita A.V.², Garshinina A.V.², Belyaevskaya S.V.², Anikin V.B.², Zarubaev V.V.²

THE EFFECT OF COMBINATION OF GLYCYRRHIZIC ACID WITH ALPHA-GLUTAMYL-TRYPTOPHAN ON THE EXPERIMENTAL ADENOVIRAL INFECTION

¹MBRD “Cytomed”, St. Petersburg, 191023, Russian Federation; ²Influenza Research Institute, St. Petersburg, 197376, Russian Federation

In this work, the activity of glycyrrhizic acid (GL) and dipeptide alpha-glutamyl-tryptophane (EW) as single preparations or in combination (GL+EW) against experimental adenoviral infection in the Syrian hamsters was studied. Application of GL and GL+EW was shown to decrease the level of the adenovirus replication in liver tissue by 0.6 – 1.2 IgTCID₅₀ depending on the composition and time point of the post infection. It was also demonstrated that normalization of the structure of the liver tissue was required, which was shown on the level of both optical and electron microscopy. The results obtained in this work suggest that GL and GL+EW may be considered as potential component of the complex therapy of adenoviral infection.

Key words: adenovirus; animal model; glycyrrhizic acid; glutamyl-tryptophan; chemotherapy.

For citation: Smirnov V.S., Slita A.V., Garshinina A.V., Belyaevskaya S.V., Zarubaev V.V. The Effect of combination of glycyrrhizic acid with alpha-glutamyl-tryptophan on the experimental adenoviral infection. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal).* 2016; 61(3): 125–131. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-125-131

For correspondence: Vyacheslav S. Smirnov, Doctor of Medicine, Professor, Chief Research Scientist, MBRD “Cytomed”, St. Petersburg, 191023, Russian Federation, E-mail: vsmirnov@cytomed.ru

Information about authors:

Zarubaev V.V., <http://orcid.org/0000-0002-6837-5242>

Funding. The study of anti-viral activity of glycyrrhizic acid was supported by Cytomed, Ltd., St. Petersburg

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

Received 11 May 2015

Accepted 29 May 2015

Для корреспонденции: Смирнов Вячеслав Сергеевич, д-р мед. наук, проф., главный научный сотрудник ЗАО «Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед»», 191023, г. Санкт-Петербург, E-mail: vsmirnov@cytomed.ru