

УДК 616.69-008.66:578.7:576.31

## АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИИ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЭЯКУЛЯТЕ МУЖЧИН, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИРУСОМ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА

© 2008 г. Е. Н. Бочарова, Л. Ф. Курило\*, Л. В. Шилейко\*, Е. Е. Брагина\*\*, Ю. Б. Юров\*\*\*, С. Г. Ворсанова\*\*\*\*, И. Ю. Юров\*\*\*, Р. Р. Климова, А. А. Куш

Научно-исследовательский институт вирусологии имени Д.И.Ивановского РАМН  
123098 Москва, ул. Гамалеи, д. 16

\*ГУ Медико-генетический научный центр РАМН  
115478 Москва, ул. Москворечье, д. 1

\*\*Институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ  
119992 Москва, ул. Хохлова, стр. 4

\*\*\*ГУ Научный центр психического здоровья РАМН  
119152 Москва, Загородное шоссе, д. 2

\*\*\*\*ФГУ Московский НИИ педиатрии и детской хирургии Росздрава  
125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

E-mail: belnick@mail.ru

Поступила в редакцию 02.03.07 г.  
Окончательный вариант получен 01.07.07 г.

Проведены цитологическое и молекулярно-цитогенетическое исследования клеток образцов спермы пациентов, у которых с помощью вирусологического и иммуноцитохимического методов выявлено инфицирование сперматозоидов вирусом простого герпеса. Применяли следующие методы: 1) спермиологическое обследование, позволяющее судить о морфологии и функциональных свойствах половых клеток; 2) флуоресцентную гибридизацию *in situ* с ДНК-пробами, специфичными к хромосомам 1, X и Y, для анализа частоты нерасхождения хромосом в сперматозоидах; 3) количественный анализ незрелых половых клеток эякулята для выявления особенностей нарушения сперматогенеза. Установлено, что концентрация сперматозоидов, содержание сперматозоидов с нормальными подвижностью и морфологией в среднем не отличались от нормативных. Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* не выявлено различий в частоте нерасхождения хромосом 1, X и Y у инфертильных пациентов с вирусинфицированными сперматозоидами и у фертильных доноров. Сравнительный количественный анализ незрелых половых клеток эякулята пациентов с герпетическим инфицированием сперматозоидов и мужчин-доноров показал достоверное и значительное (в три раза) увеличение количества сперматоцитов I у инфицированных пациентов на предпахитенных стадиях профазы I мейоза: прелептотены, лептотены и зиготены. В то же время у пациентов с вирусинфицированными сперматозоидами выявлено статистически значимое уменьшение количества сперматоцитов I на стадиях пахитены и диплотены, сперматоцитов II и сперматид, а также двукратное увеличение количества неидентифицируемых незрелых половых клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что у пациентов с герпетическим инфицированием сперматозоидов происходит частичный блок сперматогенеза на начальных этапах профазы I мейоза. Данные настоящей работы открывают возможность дальнейшего изучения клеточных механизмов нарушения сперматогенеза при вирусном инфицировании человека.

**Ключевые слова:** сперматогенез, незрелые половые клетки, вирус простого герпеса, идентификация хромосом методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), ДНК-пробы.

Одним из факторов, влияющих на фертильность мужчин, являются инфекции, передаваемые половым путем (ИППП), в том числе генитальный герпес (ГГ), возбудителем которого является вирус простого герпеса (ВПГ). ВПГ – один из самых распространенных патогенов как среди животных, так и у человека (Halioa, Malkin, 1999).

Влияние ВПГ на структуру и жизненный цикл клеток млекопитающих исследуется главным

образом на клеточных моделях *in vitro*. При изучении фибробластов человека, инфицированных ВПГ, было установлено, что вирус блокирует митоз, индуцируя полиплоидию и эндоредупликацию (Chenet-Monte et al., 1986). В работах, выполненных на клеточных культурах, было показано также, что ВПГ оказывает генотоксическое действие, включающее хромосомные абберации в виде разрывов хромосом. Описаны также

деконденсация центромер и изменения структуры хроматина.

Показано, что повреждения чаще всего затрагивают хромосому 1 (Mincheva et al., 1984; Peat, Stanley, 1986). Недавно было обнаружено, что нарушения, вызываемые ВПГ, имеют неслучайный характер, затрагивая хромосому 1 в локусах *1q21* и *1q42* (Fortunato, Spector, 2003). Авторы этой работы утверждают, что наблюдаемые хромосомные разрывы происходят в клетках, находящихся в момент заражения вирусом в S-фазе митотического цикла. Данные о влиянии ВПГ на мейоз практически отсутствуют. В то же время показано, что высокодифференцированные клетки, какими являются сперматозоиды, могут содержать белки и геномную ДНК ВПГ, вирусные капсиды и инфекционно активный вирус (Kotronias, Kapranos, 1998; Kapranos et al., 2003; Бочарова и др., 2003, 2004, 2006).

Попытки моделирования герпетической инфекции зрелых половых клеток путем инкубации сперматозоидов с ВПГ *in vitro* не увенчались успехом: авторы обнаруживали прикрепление вирионов к поверхности сперматозоидов, но не их внутригаметное инфицирование (Pallier et al., 2002; Courtaget et al., 2004). Однако на модели экспериментального герпетического орхита показано, что клетки сперматогенного эпителия морских свинок чувствительны к ВПГ *in vivo* (Брагина и др., 2002). Эти данные позволили предположить возможность влияния ВПГ на процесс сперматогенеза. Оставалось невыясненным влияние ВПГ на процесс дифференцировки сперматогенных клеток человека *in vivo*.

Процесс сперматогенеза многоступенчат. Он включает дифференцировку стволовых половых клеток, проходящих на определенных стадиях развития и митотические деления (стволовые клетки и сперматоциты I и II).

Обычно для оценки сперматогенеза проводят изучение гистологических срезов или отпечатков, приготовленных из биопсийного материала яичек. Однако известно, что такая процедура может спровоцировать развитие аутоиммунного процесса (Райцина, 1985). В связи с этим разработан неинвазивный метод количественного исследования состава незрелых половых клеток (НПК) эякулята по стадиям их развития (Курило, Кулешов, 1988; Курило, Любашевская, 1990; Курило и др., 1995, 1997), который является адекватным для определения состава и количественного соотношения НПК.

С внедрением в медико-биологическую практику методов флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) появилась возможность диагностики количественных хромосомных аномалий в ядрах интерфазных клеток, даже таких, как сперматозоиды, хроматин которых конденсирован чрезвычайно плотно. Оригинальные модификации протокола FISH, в том числе для двух- и трехцвето-

вой флуоресцентной гибридизации *in situ*, позволяют идентифицировать несколько хромосом в интерфазной клетке (Soloviev et al., 1994, 1997; Yurov et al., 1996a, b, 1997). Таким образом с помощью метода количественного анализа состава НПК и FISH можно корректно оценить влияние ВПГ-инфицирования на клетки на различных стадиях сперматогенеза, а также определить нарушения сперматогенеза у различных групп обследуемых лиц, в том числе у суб- и инфертильных пациентов.

Цель настоящей работы – цитогенетическое и морфофункциональное изучение свойств клеток спермы человека, содержащей сперматозоиды, инфицированные ВПГ. Подобное исследование необходимо как для выяснения влияния вирусной инфекции на механизмы нарушения репродуктивных процессов, так и (в случае обнаружения такой зависимости) для разработки тактики противовирусной терапии при бесплодии и при нарушении развития плода в течение беременности (Бочарова и др., 2006). В работе проведен количественный анализ состава НПК по стадиям их развития и молекулярно-цитогенетический анализ сперматозоидов пациентов, у которых с помощью цитохимического и вирусологического исследований выявлено инфицирование сперматозоидов ВПГ.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Объект исследования.** Проведено исследование эякулята пациентов, которые обратились в ГУ Медико-генетический научный центр РАМН. Группа сравнения при проведении количественного анализа состава НПК по стадиям их развития состояла из 23 мужчин, проходивших обследование в качестве доноров спермы для искусственной инсеминации при выполнении программ терапии бесплодия с помощью методов репродуктивной медицины (Курило и др., 1995). От всех пациентов было получено информированное согласие на проведение исследований.

Эякулят получали путем мастурбации после 3–5 сут полового воздержания. Эякулят инкубировали 15–30 мин при температуре 37°C. Цельный эякулят центрифугировали 15 мин при 1500 об/мин. Осадок, содержащий фракцию клеток сперматогенного ряда, трехкратно промывали стерильным изотоническим раствором NaCl и использовали для выявления инфекционной активности ВПГ, а также приготовления препаратов для иммуноцитохимического исследования.

**Спермиологическое обследование** проводили согласно руководству ВОЗ (World Health Organization, 2000).

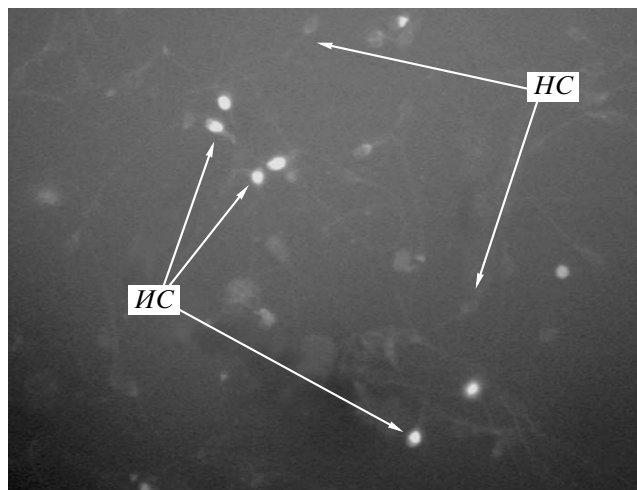
**Выявление антигенов (АГ) ВПГ в реакции непрямой иммунофлуоресценции (РИФ).** Для иммуноцитохимического исследования белков ВПГ

мазки из осадка половых клеток высушивали при комнатной температуре в течение 12–24 ч и фиксировали холодным (4°C) ацетоном. Белки ВПГ в половых клетках выявляли в РИФ по описанной ранее методике (Бочарова и др., 2003, 2006). В качестве специфического иммунного реагента использовали полученные и охарактеризованные в НИИ вирусологии РАМН моноклональные антитела (МКА) к индивидуальным белкам ВПГ, экспрессирующимся на разных стадиях жизненного цикла ВПГ (Климова и др., 1999). В качестве вторых антител (АТ) использовали кроличьи АТ к иммуноглобулинам мыши, меченные ФИТЦ (НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН). Положительную реакцию на наличие АГ ВПГ визуализировали в виде свечения шеек или головок сперматозоидов (рис. 1).

*Выявление инфекционной активности вирусов в образцах эякулята с помощью быстрого культурального метода (БКМ).* Для проведения БКМ в культуру клеток VERO, предварительно высаженных на покровные стекла в 24-луночные панели (“Costar”, США) в среде Игла-МЕМ (ПанЭко, Москва) с 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой, вносили 0.1–0.2 мл образцов эякулята. Материал сокультивировали с клетками VERO 24 ч в атмосфере 5%-ного CO<sub>2</sub> при температуре 37°C, промывали и фиксировали в холодном ацетоне 15 мин. Окраску МКА осуществляли как описано выше (Бочарова др., 2003).

*Метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH)* проводили по протоколу для трехцветовой FISH (Soloviev et al., 1994, 1995, 1997; Yurov et al., 1996a, b, 2002). Клетки эякулята 17 пациентов исследовали методом трехцветовой FISH с ДНК-зондами к хромосомам 1, X и Y. Цитологические препараты для исследования подготавливали стандартным способом: фиксировали в 3–5 сменах смеси метанол-уксусная кислота (3 : 1) (Yurov et al., 1996a). Препараты инкубировали в 2–3 N NaOH, 2 × SSC в течение 2–4 мин с последующей дегидратацией в 70, 80 и 100%-ном этаноле. ДНК-зонды (в гибридизационном растворе 55%-ного формамида и 2 × SSC) перед нанесением на стекла денатурировали отдельно, инкубируя в течение 2 мин при температуре 100°C.

На препараты эякулята наносили по 10 мкл ДНК-проб в готовой гибридизационной смеси. Препараты накрывали покровными стеклами, инкубировали во влажной камере при температуре 37–42°C в течение 17–18 ч и после удаления покровных стекол отмывали в растворе 50%-ного формамида и 2 × SSC при температуре 37–39°C или в 0.1–0.2 × SSC при температуре 56–60°C три раза по 5 мин соответственно. На препараты наносили 10 мкл ФИТЦ-авидина, разведенного в 5%-ном растворе обезжиренного молока до рабо-

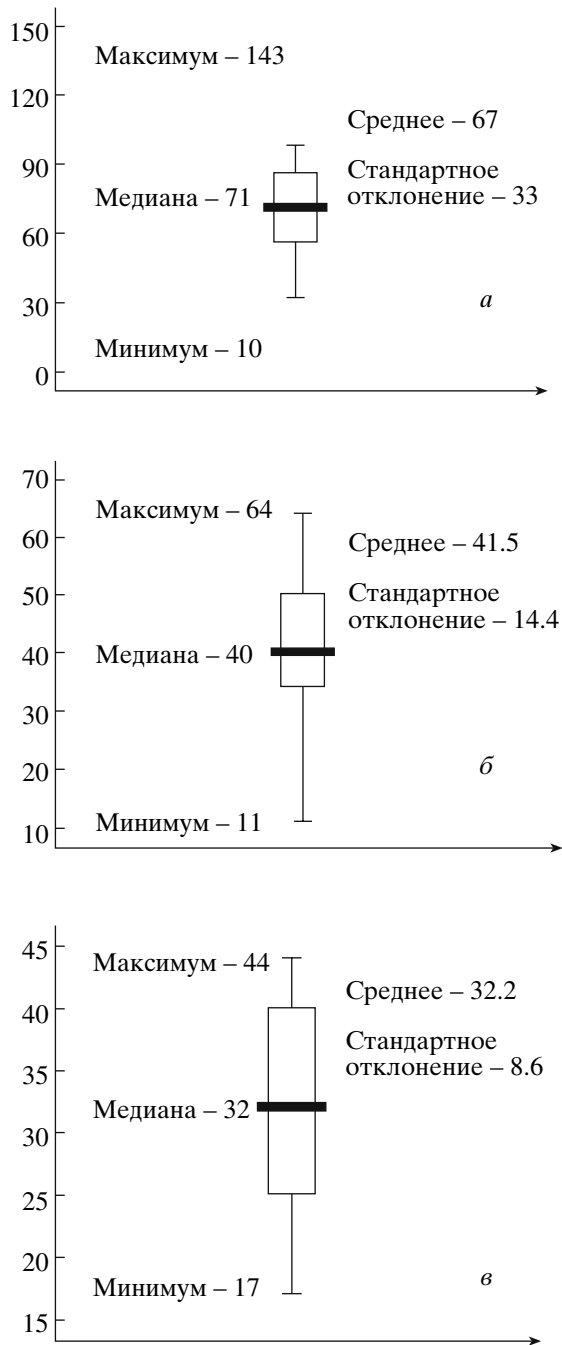


**Рис. 1.** Иммунофлуоресцентное выявление вируса простого герпеса (ВПГ) в сперматозоидах человека с помощью реакции иммунофлуоресценции с моноклональными антителами к белкам ВПГ. Сперматозоиды: ИС – содержащие антиген ВПГ, НС – неинфицированные. Увел. × 1000.

чей концентрации 5 мкг/мл, накрывали покровными стеклами и помещали во влажную камеру при температуре 37°C. Затем отмывали их в растворе 50%-ного формамида и 2 × SSC при температуре 37–39°C или в 0.1–0.2 × SSC при температуре 56–60°C три раза по 5 мин соответственно. Для амплификации сигнала на препараты наносили 10 мкл биотин-антиавидина, разведенного в 5%-ном растворе обезжиренного молока до рабочей концентрации 5 мкг/мл, отмывали как описано ранее. Для контрастного окрашивания применяли фотозащитный раствор с флуоресцентными красителями.

Микроскопический анализ проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Аxioplan II (“Zeiss”, Германия), оснащенного соответствующим набором светофильтров, как описано ранее (Ворсанова, Юров, 1999; Юров и др., 2005; Ворсанова и др., 2006).

*Количественный анализ состава НПК по стадиям их развития* проводили на суховоздушных препаратах ядер половых клеток из суспензии эякулята 24 пациентов после окрашивания красителем по Романовскому-Гимзе (Курило, Кулешов, 1988; Курило, Любашевская, 1990; Курило и др., 1995; 1997). Подсчитывали ядра клеток на разных стадиях развития: сперматоциты на стадии предпахитенного этапа развития (прелептотены, лептотены и зиготены), пахитены, диплотены, метафазы I и II, ядра сперматоцитов II порядка и сперматид. Определяли долю НПК каждой стадии от общего числа подсчитанных НПК. Сперматоциты I на стадиях прелептотены, лептотены и зиготены объединяли после подсчета в одну группу,



**Рис. 2.** Показатели спермиологического обследования пациентов, в эякуляте которых обнаружены сперматозоиды, инфицированные ВПГ: *а* – концентрация, млн/мл (количество сперматозоидов в 1 мл эякулята); *б* – количество подвижных сперматозоидов, %; *в* – количество сперматозоидов с нормальной морфологией, %.

представляющую сперматоциты до стадии пахитены. Кроме того, выделяли группу сперматоцитов II порядка и сперматид, не разошедшихся в MI и MII мейоза соответственно, которые опре-

деляли по наличию би- и тетрануклеарных комплексов. В отдельную группу объединяли половые клетки эякулята, идентификация которых по стадиям сперматогенеза была невозможна (дегенерирующие половые клетки). Препараты исследовали с помощью микроскопа Jenalumar (“Zeiss”, Германия). Для каждого образца эякулята подсчитывали не менее 200–300 НПК. Индекс НПК определяли как содержание НПК в общем количестве половых клеток на препарате и выражали в процентах.

Для статистической обработки полученных результатов использовали пакет компьютерных программ “STATISTICA 7 SP2”. Гипотезы о нормальном распределении исследуемых признаков проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента для независимых выборок с неравными дисперсиями, различия считали достоверными при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

*Спермиологическое обследование.* Параметры спермиологического обследования 17 мужчин с вирусинфицированными сперматозоидами представлены на рис. 2. На рисунке показана концентрация (количество сперматозоидов в 1 мл эякулята): медиана – 71 млн/мл (интерквартильный размах от 45 до 87.5 млн/мл) (рис. 2, *а*). Пониженная концентрация сперматозоидов выявлена у двух пациентов (10 млн/мл при нижней границе нормативного показателя 20 млн/мл). На рис. 2, *б* показано количество подвижных сперматозоидов: медиана – 40% (интерквартильный размах от 32 до 55%). Снижение подвижности сперматозоидов (<50%) обнаружено в эякуляте 12 пациентов, у 7 из них зарегистрировано менее 40% подвижных сперматозоидов. На рис. 2, *в* показано количество сперматозоидов с нормальной морфологией: медиана – 32% (интерквартильный размах от 25 до 40%). Цитологический анализ показал уменьшение содержания сперматозоидов нормальной морфологии (ниже нормативных показателей <30%) в эякуляте 7 пациентов, и значительное (<20%) – в 2 образцах эякулята. Однако средние значения изученных показателей в обследованной группе пациентов незначительно отличаются от нормативных показателей фертильных мужчин (World Health Organization, 2000).

*Детекция хромосом 1, X и Y методом FISH в сперматозоидах пациентов с выявленным герпетическим инфицированием.* Изучен материал от 17 пациентов, у которых методами РИФ и/или БКМ было выявлено герпесвирусное инфицирование сперматозоидов. Исследование проводили с использованием ДНК-проб, специфичных для хромосом 1, X и Y, при этом подсчитывали флуо-

Частота численных нарушений хромосом в сперматозоидах пациентов, инфицированных вирусом простого герпеса, обнаруженная методом трехцветовой FISH

№ пациента	Количество клеток с различными FISH-сигналами на хромосомах										Всего патологических клеток	
	2n		1 × 2		XX		YY		XY			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
1	9	0.28	2	2	2	0.06	2	0.06	11	0.34	28	0.88
2	15	0.38	4	5	5	0.13	4	0.10	1	0.03	28	0.70
3	1	0.03	3	3	3	0.08	3	0.08	0	0	8	0.20
4	7	0.18	1	3	3	0.08	1	0.03	0	0	14	0.35
5	4	0.10	4	2	2	0.05	4	0.10	1	0.03	12	0.30
6	15	0.38	2	1	1	0.03	2	0.05	6	0.15	31	0.78
7	4	0.10	2	1	1	0.03	2	0.05	3	0.08	16	0.40
8	10	0.25	1	5	5	0.13	1	0.03	3	0.08	24	0.55
9	6	0.15	2	2	2	0.05	2	0.05	5	0.13	18	0.45
10	6	0.15	2	3	3	0.08	2	0.05	4	0.1	19	0.48
11	8	0.20	2	3	3	0.08	2	0.05	2	0.05	22	0.55
12	8	0.20	0	3	3	0.08	0	0.00	2	0.05	17	0.43
13	7	0.18	1	1	1	0.03	1	0.03	1	0.03	11	0.28
14	11	0.28	4	1	1	0.03	4	0.10	4	0.1	23	0.58
15	9	0.28	1	1	1	0.03	1	0.03	2	0.05	18	0.45
16	6	0.15	0	1	1	0.03	0	0.00	4	0.1	11	0.28
17	1	0.13	0	0	0	0.00	0	0.00	3	0.4	4	0.53
M ± σ	0.2 ± 0.1		0.09 ± 0.06		0.06 ± 0.04		0.05 ± 0.03		0.1 ± 0.11		0.48 ± 0.18	

Примечание. Два сигнала на хромосомах: 2n – 1 и сигналы XY(или XX, или YY); 1 × 2 – 1; XX – X; YY – Y; XY – X и Y.

ресцентные сигналы в ядрах сперматозоидов. Гаплоидными считали клетки, имеющие по одному сигналу на хромосоме 1. Эффективность гибридизации, оцененная по наличию сигналов хромосомы 1, составляла 99%. Гиперплоидными считали клетки, имеющие по два и более флуоресцентных сигналов хромосом 1, X и Y. Анализировали по 4000 ядер в препаратах, полученных от каждого пациента, за исключением препаратов от пациентов № 1 и 17, от которых проанализировано 3200 и 740 ядер соответственно (таблица). Определяли частоту анеуплоидии по изученным хромосомам на 100 клеток для каждого образца и в исследуемой группе в целом.

На рисунке 3, а (вклейка) приведены результаты FISH с хромосомо-Х-специфичным и хромосомо-У-специфичным ДНК-зондами в гаплоидных сперматозоидах. В каждом ядре на хромосомах X (зеленый цвет) или Y (красный цвет) наблюдается по одному сигналу. На рисунках 3, б – г представлены различные типы дисомии: ядро сперматозоида с сигналами на хромосоме 1 (желтый сигнал), X (зеленый сигнал) и Y (красный сигнал) – рис. 3, б; две клетки с хромосомами X и Y (А), одна клетка – с двумя хромосомами Y (Б) – рис. 3, в; представлены также результаты FISH с ДНК-зондами, специфичными для хромосомы 1, X и Y (рис. 3, г). Наблюдаются сперматозоиды с различным числом сигналов

на хромосомах 1 (синий цвет), X (зеленый цвет) и Y (красный цвет): видны сигналы на хромосомах 1 и Y (А) и хромосомах 1, X и Y (Б).

Результаты проведенного исследования на сперматозоидах представлены в таблице. Показано, что частота полиплоидии по хромосомам 1, X и Y у пациентов с вирусинфицированными сперматозоидами составляет  $0.2 \pm 0.1\%$ , анеуплоидии по хромосомам 1, X и Y –  $0.09 \pm 0.06$ ,  $0.06 \pm 0.04$ ,  $0.05 \pm 0.03\%$  соответственно, частота анеуплоидии XY –  $0.1 \pm 0.11\%$ . Общее количество численных хромосомных аномалий в сперматозоидах мужчин исследуемой группы составляло около 0.5%.

*Количественный анализ состава НПК эякулята* проводили в материале, полученном от 24 пациентов, в сперматозоидах которых обнаружены белки ВПГ методом РИФ и/или инфекционная активность ВПГ методом БКМ. При подсчете определяли ядра следующих групп клеток: сперматоцитов I на стадии предпахитенного этапа развития; сперматоцитов I на стадии пахитены; сперматоцитов I на стадии диплотены; сперматоцитов I и II на стадии метафазы I и II (M I и M II); сперматоцитов II и сперматид, а также неидентифицируемые половые клетки. Кроме того, отдельно подсчитывали количество сперматоцитов II и сперматид, не разошедшихся в M I и M II мейоза. Некоторые из групп незрелых половых клеток, находящихся на разных стадиях сперматогенеза представлены на рис. 4: ядро сперматоцитов I на стадии лептотены (Лт) – рис. 4, а; ядро сперматоцита на стадии поздней зиготены (ПЗт) – рис. 4, б; ядро сперматоцита I на стадии пахитены (Пт), показано разрушение ядерной оболочки – рис. 4, в; ядро сперматоцита I на стадии ранней диплотены (РДт) – рис. 4, г; ядро сперматоцита I на стадии диплотены (Дт) – рис. 4, д; ядро сперматоцита на стадии метафазы (Мтф) – рис. 4, е; ядра сперматид (Ст), не разошедшихся в делениях мейоза: би- и тетрануклеарный комплексы соответственно – рис. 4, ж и з.

Результаты количественного анализа состава НПК эякулята пациентов с вирусинфицированными сперматозоидами представлены на рис. 5. Было установлено статистически значимое увеличение ( $p < 0.05$ ) содержания общей фракции НПК в эякуляте у 22 (91.6%) из 24 пациентов с вирусинфицированными сперматозоидами по сравнению с содержанием НПК в эякуляте 23 доноров спермы. Индекс НПК в этих группах составлял  $8.34 \pm 0.69$  и  $2.1 \pm 0.34\%$  от общего количества подсчитанных половых клеток соответственно. Обнаружено статистически значимое ( $p < 0.05$ ) увеличение числа клеток, находившихся на стадиях прелептотены, лептотены и зиготены ( $1.93 \pm 0.42\%$ ), по сравнению с таковым у доноров спермы ( $0.66 \pm 0.16\%$ ). В то же время доли клеток, находившихся на последующих стадиях сперматогенеза (пахитена, диплотена), ока-

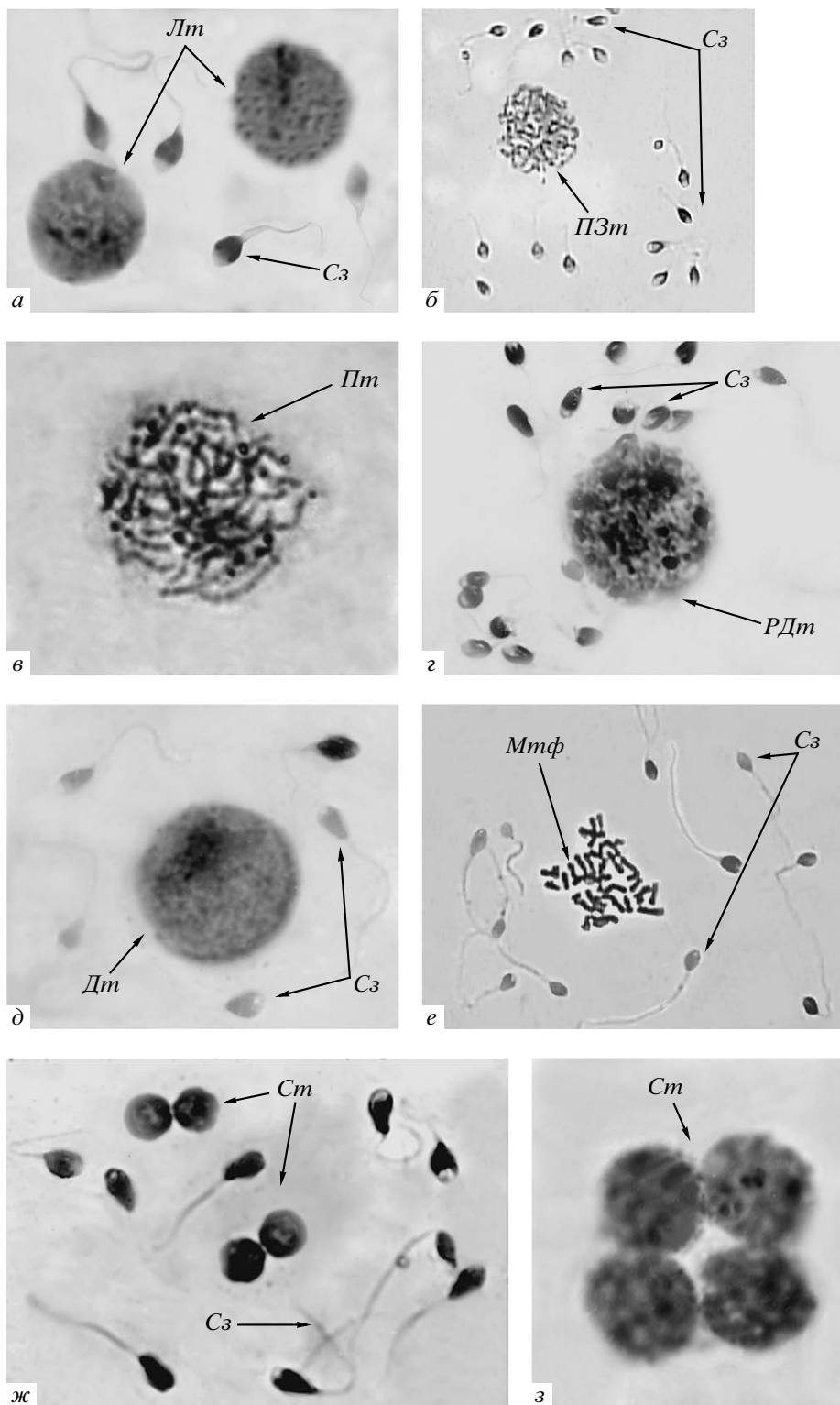
зались статистически значимо меньшими, чем у доноров ( $0.08 \pm 0.07$  и  $0.45 \pm 0.10\%$  соответственно). Эти отклонения нашли свое отражение в количественных показателях последующих стадий сперматогенеза: наблюдали отсутствие сперматоцитов в метафазе M I и M II, а количество сперматоцитов II и сперматид ( $87.07 \pm 1.16\%$ ) было статистически значимо меньшим, чем у фертильных мужчин ( $91.99 \pm 0.89\%$ ). Нарушение сперматогенеза выразилось также в статистически значимом ( $p < 0.05$ ) повышении в эякуляте концентрации неидентифицируемых клеток, которые имеют патологически измененную морфологию и представляют собой дегенерирующие половые клетки:  $5.85 \pm 0.85\%$  – у доноров и  $10.61 \pm 1.04\%$  – у пациентов с вирусинфицированными сперматозоидами.

Подсчет разошедшихся сперматид показал, что средние значения этого показателя для доноров спермы ( $22.98 \pm 2.65\%$ ) и для обследуемых лиц ( $21.80 \pm 1.64\%$ ) не различались статистически значимо ( $p > 0.05$ ).

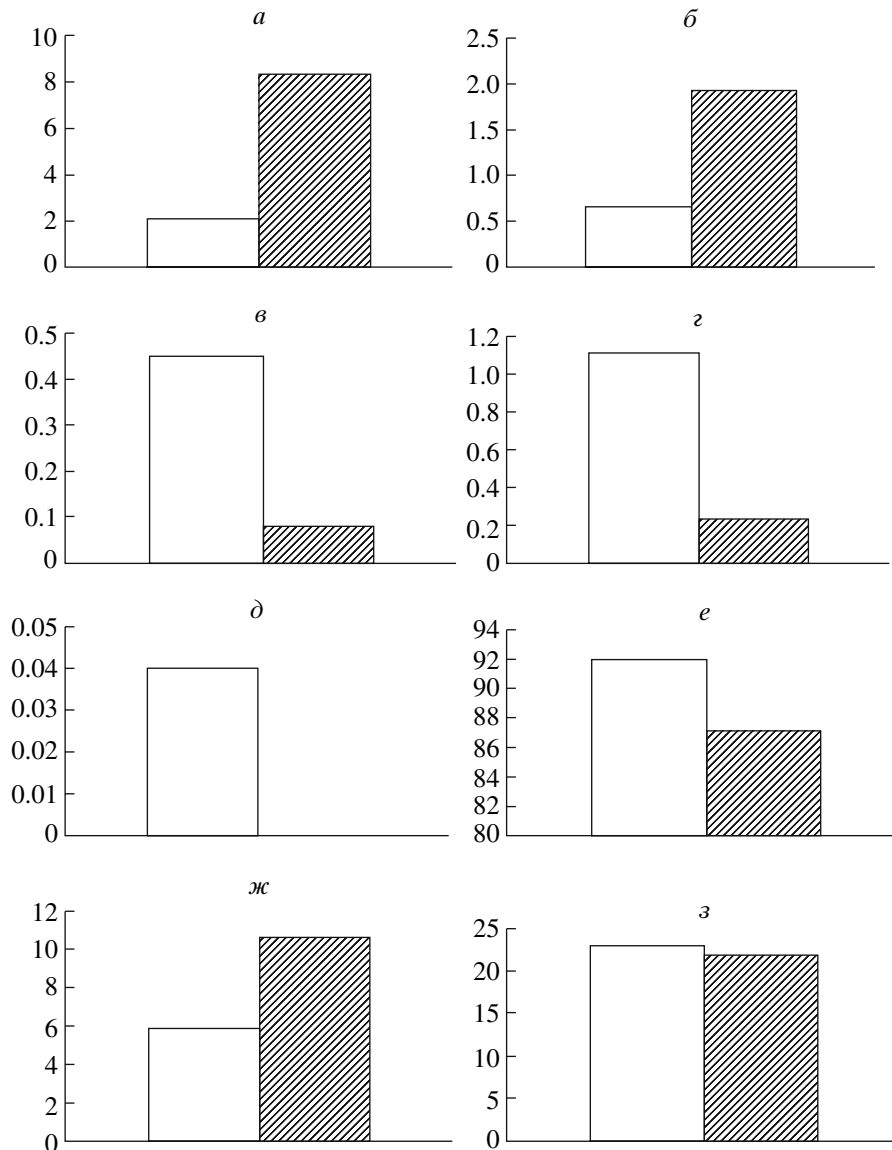
## ОБСУЖДЕНИЕ

Интенсивное развитие методов вспомогательной репродукции, начавшееся около 30 лет назад, привлекло внимание исследователей к проблеме вирусного инфицирования эякулята. Для ряда вирусов, в том числе и для ВПГ (Брагина и др., 2000; Бочарова и др., 2003, 2004), доказана возможность внутригаметного инфицирования. Мы проводили исследование сперматогенеза пациентов, в сперматозоидах которых были обнаружены маркеры ВПГ. Проведены морфофункциональное спермиологическое обследование, молекулярно-цитогенетический и количественный анализ состава НПК.

Имеются единичные и при этом разноречивые литературные данные о влиянии герпетического инфицирования на сперматогенез. Например, группа исследователей (Kapranos et al., 2003) установили корреляцию между ухудшением показателей спермограммы и наличием герпетического инфицирования сперматозоидов у мужчин с проблемами фертильности. Напротив, Бочарова и др. (2006) не обнаружили различий в показателях спермограммы пациентов с выявленным герпетическим инфицированием и без него. Есть основания полагать, что расхождения в результатах связаны с различными по объемам и анамнезам выборками обследованных лиц. Общим для обследованных групп являлось отсутствие у пациентов клинических симптомов ГГ. В нашей работе установлено, что средние значения изученных показателей традиционного спермиологического обследования, таких как концентрация сперматозоидов и содержание сперматозоидов с нормальной морфологией, в инфицированных об-



**Рис. 4.** Незрелые половые клетки, находящиеся на разных стадиях сперматогенеза в эякуляте обследованных: *а* – ядра сперматоцитов I на стадии лептотены (*Лт*), сперматозоиды (*Сз*); *б* – ядро сперматоцита I на стадии поздней зиготены (*ПЗт*); *в* – ядро сперматоцита I на стадии пахитены (*Пт*) (ядерная оболочка разрушена); *г* – ядро сперматоцита I на стадии ранней диплотены (*РДт*); *д* – ядро сперматоцита I на стадии диплотены (*Дт*); *е* – ядро сперматоцита на стадии метафазы (*Мтф*); *ж* – ядра неразшедшихся сперматид (*Ст*) – бинуклеарный комплекс (поздняя стадия); *з* – ядра сперматид, не разошедшихся в делениях мейоза – тетрануклеарный комплекс. Увел.: *а, в – д, ж, з* – х 1000; *б, е* – х 400.



**Рис. 5.** Сравнение индекса незрелых половых клеток (НПК) и показателей состава НПК по стадиям сперматогенеза в эякуляте пациентов с герпесвирусным инфицированием сперматозоидов и доноров: *a* – индекс НПК (доля НПК в общем количестве половых клеток, %); *б-ж* – доля НПК каждой стадии от общего числа подсчитанных НПК; сперматоциты I на стадиях: *б* – прелептотены-зиготены, *в* – пахитены, *г* – диплотены; *д* – сперматоциты на стадиях MI, MII; *е* – сперматоциты II и сперматиды; *ж* – неидентифицируемые (дегенерирующие) половые клетки; *з* – доля неразощедшихся сперматоцитов II и сперматид от общего количества сперматоцитов II и сперматид, %. По оси ординат (*б-ж*) – количество НПК исследуемых стадий, %.

(□) – доноры,  $n = 23$ ; (▨) – пациенты с герпесвирусным инфицированием сперматозоидов,  $n = 24$ .

разцах соответствуют нормативным показателям, установленным ВОЗ для фертильных мужчин (World Health Organization, 2000). Количество клеток с нормальной морфологией составило в среднем 32.2%, несмотря на то что в 35% образцов количество сперматозоидов с нормальной морфологией было менее 30%. Доля подвижных сперматозоидов у ВПГ-инфицированных лиц по сравнению с нормативными снижена: среднее значение этого показателя в группе пациентов с ВПГ-инфекцией составляет

41, 5%. Следует отметить, что в московском регионе содержание подвижных сперматозоидов у фертильных мужчин в среднем не превышает 40% (Брагина, Абдумаликов, 2002). Это может быть следствием различной чувствительности лиц к ВПГ-инфекции и выражаться в различной доле инфицированных половых клеток в сперме. С другой стороны, нельзя исключить того, что изучение большей по объему группы позволит выявить изменения подвижности и морфологии половых клеток, которые не были



определены при спермиологическом исследовании в нашей работе.

С развитием молекулярно-цитогенетических методов стало возможным проводить анализ хромосом в сперматозоидах с использованием хромосомоспецифичных ДНК-зондов. Методом FISH в сперматозоидах были идентифицированы хромосомы 1, X и Y. Выбор ДНК-зондов к указанным хромосомам определялся тем, что при мейотическом делении у человека чаще всего наблюдается нерасхождение хромосом X и Y (Martin, 2003), в то же время при ВПГ-инфекции клеток повреждения чаще затрагивают хромосому 1 (Mincheva et al., 1984; Peat, Stanley, 1986). Анализ показал, что частота нерасхождения хромосом 1, X и Y в сперматозоидах из эякулята 17 пациентов с вирусинфицированными сперматозоидами не отличается от таковой в группе фертильных мужчин. Частота выявленных нарушений не выше той, которая была обнаружена у здоровых половозрелых мужчин с нормозооспермией (Hummelen, van et al., 1996; Shi, Martin, 2000; Martin, 2003).

При проведении количественного анализа состава НПК в эякуляте пациентов с вирусинфицированными сперматозоидами выявляется достоверное, по сравнению с данными группы доноров, и значительное (в три раза) увеличение количества сперматозоидов I на стадиях профазы I мейоза (предпахитенные стадии): прелептотены, лептотены и зиготены. Эти стадии характеризуются синтезом ДНК (в прелептотене), образованием синаптонемного комплекса (в лептотене, зиготене), а также конъюгацией гомологичных хромосом в зиготене.

Вероятно, предпахитенный блок является одной из возможных причин в цепи нарушений на последующих стадиях сперматогенеза и определяет снижение количества сперматозоидов I на стадиях пахитены. Последствия этого нарушения сохраняются и в диплотене, проявляясь статистически значимым уменьшением количества сперматозоидов на этой стадии в группе пациентов с герпетическим инфицированием, что, по нашему мнению, свидетельствует о частичном блоке сперматогенеза на последующих стадиях. Было также отмечено снижение доли сперматозоидов II и сперматид, свидетельствующее о блоке на начальных этапах спермиогенеза.

Значимыми представляются данные о том, что у пациентов с вирусинфицированными сперматозоидами в два раза возрастает количество неидентифицируемых (дегенерирующих) половых клеток. Это свидетельствует об интенсивных дегенеративных процессах в популяции половых клеток.

Наличие предпахитенного блока мейоза свидетельствует о нарушении деления клеток в сперматогенезе и, возможно, о патологии процессов, обуславливающих конъюгацию гомологичных

хромосом в зиготене и кроссинговер в пахитене профазы I мейоза, а также снижение количества сперматозоидов I, вступающих в следующие стадии гаметогенеза.

Изменение количественного и качественного состава НПК у пациентов с герпетическим инфицированием сперматозоидов, впервые продемонстрированное в нашей работе, может свидетельствовать о том, что на стадии сперматогенеза происходит частичная элиминация поврежденных при инфицировании половых клеток. В то же время часть инфицированных клеток способна завершить сперматогенез, о чем свидетельствует выявление ДНК ВПГ с помощью гибридизации *in situ* в некоторых подвижных сперматозоидах нормальной морфологии (Бочарова и др., 2004). Это может быть следствием заражения половых клеток на поздних стадиях цитодифференцировки. Не исключено, что участие инфицированных клеток в оплодотворении может приводить к негативным последствиям при беременности, что было продемонстрировано при исследовании группы пациентов, у жен которых в анамнезе имелись беременности, закончившиеся спонтанным прерыванием (Бочарова и др., 2006).

Таким образом, получены оригинальные данные, свидетельствующие о влиянии ВПГ на сперматогенез человека, что открывает возможность дальнейшего изучения механизмов вирусного инфицирования при нарушениях сперматогенеза и репродукции. Полученные результаты обосновывают необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на изучение влияния ВПГ на репродуктивную систему мужчин.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бочарова Е.Н., Абдумаликов Р.А., Брагина Е.Е. и др. Обнаружение белков и капсидов ВПГ в сперматозоидах человека // ДАН. 2003. Т. 391. № 6. С. 836–841.
- Бочарова Е.Н., Климова Р.Р., Завалишина Л.Э. и др. Выявление ДНК вируса простого герпеса в сперматозоидах человека методом гибридизации *in situ* // Матер. Всерос. науч.-практ. конф. "Медицинская микробиология – XXI век". Саратов, 2004. С. 44–45.
- Бочарова Е.Н., Брагина Е.Е., Гусак Ю.К. и др. Спонтанное прерывание беременности, неудачи при использовании репродуктивных технологий и герпетическое инфицирование сперматозоидов // Андрология и генитал. хирургия. 2006. № 1. С. 59–65.
- Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А. Руководство по сперматологии. М.: Сорек-полиграфия, 2002. 108 с.
- Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А., Курило Л.Ф. и др. Выявление сперматозоидов, инфицированных вирусом простого герпеса // Вестн. дерматологии и венерологии. 2000. № 5. С. 18–22.
- Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А., Бочарова Е.Н. и др. Внутриклеточное инфицирование сперматозоидов че-

- ловека вирусами группы герпеса // Андрология и генитал. хирургия. 2002. № 3. С. 81–82.
- Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Молекулярно-цитогенетическая пре- и постнатальная диагностика хромосомной патологии // Вест. РАМН. 1999. № 11. С. 12–15.
- Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б., Чернышев В.Н. Медицинская цитогенетика. М.: Медпрактика-М, 2006. 300 с.
- Климова Р.Р., Масалова О.В., Атанадзе С.Н. и др. Получение и свойства моноклональных антител к вирусу простого герпеса 1 и 2 типа // Микробиология, эпидемиология и иммунология. 1999. Т. 5. С. 99–103.
- Курило Л.Ф., Кулешов Н.П. Подходы к цитогенетическому обследованию лиц с мужским бесплодием // Диагностика и лечение бесплодного брака. Сб. науч. трудов / Под ред. Пшеничниковой Т.Я. М.: ВНИЦ ОЗМР МЗ СССР, 1988. С. 232–237.
- Курило Л.Ф., Любашевская И.А. Возможности количественного кариологического анализа состава незрелых половых клеток эякулята // Тез. докл. XXII науч. конф. болгарских аспирантов в СССР “Актуальные проблемы современной науки – 90”. М., 1990. С. 52.
- Курило Л.Ф., Дубинская В.П., Остроумова Т.В. и др. Оценка сперматогенеза по незрелым половым клеткам эякулята // Пробл. репродукции. 1995. № 3. С. 33–38.
- Курило Л.Ф., Чеботарев А.Н., Шилейко Л.В. и др. Сравнительный анализ соотношения незрелых половых клеток на разных стадиях их дифференцировки в биоптате яичка и эякулята у пациентов с азооспермией и олигозооспермией // Там же. 1997. № 3. С. 80–84.
- Райцина С.С. Сперматогенез и структурные основы его регуляции. М.: Наука, 1985. 207 с.
- Юров И. Ю., Ворсанова С.Г., Юров Ю.Б. Современные достижения в молекулярно-цитогенетической диагностике наследственных болезней (лекция) // Клини. и лаб. диагностика. 2005. № 11. С. 21–29.
- Chenet-Monte C., Mohammad F., Celluzzi C.M. et al. Herpes simplex virus gene products involved in the induction of chromosomal aberrations // Virus. Res. 1986. V. 6. № 3. P. 245–260.
- Courtot A.M., Pallier C., Testart J. Viral transmission and medically assisted procreation: the Herpesviridae case // Gynecol. Obstet. Fertil. 2004. V. 32. № 3. P. 233–240.
- Fortunato E.A., Spector D. H. Viral induction of site-specific chromosome damage // Rev. Med. Rev. 2003. V. 13. № 1. P. 21–37.
- Halioua B., Malkin J.E. Epidemiology of genital herpes – recent advances // Eur. J. Dermatol. 1999. V. 9. № 3. P. 177–184.
- Hummelen P., van, Lowe X.R., Wyrobek A.J. Simultaneous detection of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolor fluorescence in situ hybridization // Hum. Genet. 1996. V. 98. P. 608–615.
- Kapranos N., Petrakou E., Anastasiadou C. et al. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic // Fertil. Steril. 2003. V. 79. Suppl. 3. P. 1566–1570.
- Kotronias D., Kapranos N. Detection of herpes simplex virus DNA in human spermatozoa by *in situ* hybridization technique // In Vivo. 1998. № 12. P. 391–394.
- Martin R.H. Chromosomal abnormalities in human sperm // Advances in Male-Mediated developmental toxicity / Eds. Robaire B., Hales B.E. V. 518. N. Y.: Plenum Press, 2003. P. 181–188.
- Mincheva A., Dundarov S., Bradvarova I. Effects of herpes simplex virus strains on human fibroblast and lymphocyte chromosomes and localization of chromosomal aberration // Acta Virol. 1984. V. 28. № 2. P. 97–106.
- Pallier C., Tebourbi L., Chopineau-Proust S. et al. Herpesvirus, cytomegalovirus, human sperm and assisted fertilization // Hum. Reprod. 2002. V. 17. № 5. P. 1281–1287.
- Peat D.S., Stanley M.A. Chromosome damage induced by herpes simplex virus type 1 in early infection // J. Gen. Virol. 1986. V. 67. P. 2273–2277.
- Shi Q., Martin R.H. Spontaneous frequencies of aneuploid and diploid sperm in 10 normal Chinese men: assessed by multicolor fluorescence in situ hybridization // Cytogenet. Cell. Genet. 2000. V. 90. № 1–2. P. 79–83.
- Soloviev I.V., Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Malet P. Microwave activation of fluorescence in situ hybridization: a novel method for rapid chromosome detection and analysis // Focus. 1994. V. 16. № 4. P. 115–116.
- Soloviev I.V., Yurov Y.B., Vorsanova S.G. et al. Prenatal diagnosis of trisomy 21 using interphase fluorescence in situ hybridization of post-replicated cells with site-specific cosmid and cosmid contig probes // Prenat. Diagn. 1995. № 15. P. 237–248.
- Soloviev I.V., Yurov Y.B., Ioannou P. et al. Identification and molecular-cytogenetic characterization of large subset of human plasmids, cosmids PAC and YAC clones: the search of DNA probes for pre- and postnatal diagnosis // Cesk. Pediatr. 1997. V. 52. № 7. P. 529–538.
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Univer. Press, 2000. 128 p.
- Yurov Y.B., Saias M.J., Vorsanova S.G. et al. Rapid chromosomal analysis of germ-line cells by FISH: an investigation of an infertile male with large-headed spermatozoa // Mol. Hum. Reprod. 1996a. V. 2. № 9. P. 665–668.
- Yurov Y.B., Soloviev I.V., Vorsanova S.G. et al. High resolution multicolor fluorescence in situ hybridization using cyanine and fluorescein dyes: rapid chromosome identification by directly fluorescently labeled alphoid DNA probes // Hum. Genet. 1996b. V. 97. № 3. P. 390–398.
- Yurov Y.B., Soloviev I.V., Vorsanova S.G. et al. DNA probes for pre- and postnatal diagnosis of chromosomal anomalies: a collection for FISH analysis // Cesk. Pediatr. 1997. V. 52. № 7. P. 550–554.
- Yurov Y.B., Vorsanova S.G., Soloviev I.V. et al. Original collection of DNA probes for preimplantational, fetal prenatal and postnatal diagnosis of chromosomal abnormalities by FISH // Early prenatal diagnosis, fetal cells and DNA in the mother: present state and perspectives / Eds. Macek M. Sr. et al. Prague: Karolinum Press, 2002. P. 275–283.

## Analysis of Germ Cell Populations in Ejaculate of Men Infected with Herpes Simplex Virus

E. N. Bocharova<sup>a</sup>, L. F. Kurilo<sup>b</sup>, L. V. Shileiko<sup>b</sup>, E. E. Bragina<sup>c</sup>, Yu. B. Yurov<sup>d</sup>,  
S. G. Vorsanova<sup>e</sup>, I. Yu. Yurov<sup>d</sup>, R. R. Klimova<sup>a</sup>, and A. A. Kushch<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ivanovsky Research Institute of Virology, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Gamalei 16, Moscow, 123098 Russia

<sup>b</sup> Medical Genetic Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Moskvorech'e 1, Moscow, 115478 Russia

<sup>c</sup> Belozerskii Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory, Moscow, 119992 Russia

<sup>d</sup> Research Center of Mental Health, Russian Academy of Medical Sciences, Zagorodnoe sh. 2, Moscow, 119152 Russia

<sup>e</sup> Moscow Research Institute of Pediatrics and Children's Surgery, ul. Taldomskaya 2, Moscow, 127412 Russia

E-mail: belnick@mail.ru

**Abstract**—Cytological and molecular genetics methods were used to study sperm from patients with sperm infected with herpes simplex virus (HSV) as indicated by virological and immunocytochemical tests. The following methods were used: (1) sperm analysis to evaluate the morphology and functional properties of sperm; (2) fluorescence in situ hybridization (FISH) with DNA probes specific for chromosomes 1, X, and Y to evaluate nondisjunction frequencies of these chromosomes in sperm; and (3) quantitative analysis of immature germ cells in the ejaculate to identify spermatogenic abnormalities. The total sperm count and the count of sperm with normal motility proved similar to the norm. FISH analysis demonstrated no difference in the nondisjunction frequency of chromosomes 1, X, and Y between infertile patients with HSV-infected sperm and fertile donors. Comparative quantitative analysis of immature germ cells from the ejaculate has demonstrated a significant and considerable (threefold) increase in the number of spermatocytes I at the prepachytene stages of prophase I (preleptotene, leptotene, and zygotene) in HSV patients compared to normal donors. At the same time, HSV patients demonstrated a significant decrease in the number of spermatocytes I, a decrease in the proportion of spermatocytes II and spermatids, and a twofold increase in the number of unidentifiable immature germ cells. The data obtained indicate a partial spermatogenic arrest at the early stages of meiotic prophase I in HSV patients, which prompts further research into the cellular mechanisms of abnormal spermatogenesis after viral infection in humans.

*Key words:* spermatogenesis, immature sperm cells, herpes simplex virus, chromosome identification by fluorescence in situ hybridization (FISH), DNA probes.