

© Е. Е. Брагина, Е. Э. Арифалин, П. О. Хафизова, 2011  
УДК 611.013.11.12:616-022.1

**Е. Е. Брагина<sup>1</sup>**  
докт. биол. наук

**Е. Э. Арифалин<sup>1</sup>**

**П. О. Хафизова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ, Москва

<sup>2</sup>Московский государственный университет, Москва

## Вирусное инфицирование сперматозоидов

В последнее десятилетие вирусное инфицирование спермы в целом и сперматозоидов является предметом интенсивных исследований. Для целого ряда вирусов известно, что они могут инфицировать сперматозоиды. В сперматозоидах выявлены геномы ряда вирусов: иммунодефицита человека, папилломы человека, гепатита В, гепатита С, простого герпеса. Возникает вопрос: способны ли инфицированные вирусами сперматозоиды переносить их в яйцеклетку при оплодотворении, что является истинным путем вертикальной передачи инфекции. В данной работе мы постарались показать, что вирусное инфицирование сперматозоидов — достаточно широко распространенное явление. В настоящее время еще не достаточно данных, которые позволили бы абсолютно достоверно определить роль вертикальной передачи вирусов в распространении инфекции и в аномалиях эмбрионального развития. Однако мы можем констатировать, что накапливается все больше фактов, которые не позволяют игнорировать это явление.

*Ключевые слова: вирусное инфицирование, сперматозоиды*

Вирусологические исследования эякулята человека в большом объеме стали проводиться в последние несколько десятилетий в связи с развитием техники оплодотворения *in vitro* и риском инфицирования яйцеклетки. Эти исследования преследуют двоякую цель. С одной стороны, изучается возможность горизонтальной передачи вирусов, то есть передача половым партнерам. Наличие гематотестикулярного барьера, предохраняющего вирусы в эякуляте от иммунной защиты организма и от лекарственной терапии, возможно, позволяет эякуляту служить резервуаром сохранения инфекции. С другой стороны, сперматозоиды способны переносить генетическую информацию потомству при оплодотворении яйцеклеток. Для целого ряда вирусов известно, что они могут инфицировать сперматозоиды. Возникает вопрос — способны ли инфицированные вирусами сперматозоиды переносить их в яйцеклетку при оплодотворении, что является истинным

путем вертикальной передачи инфекции. Стандартные протоколы для выявления вирусов в сперме и в сперматозоидах практически отсутствуют. В данном обзоре мы постарались показать, что вирусное инфицирование сперматозоидов — достаточно широко распространенное явление. В настоящее время еще недостаточно данных, которые позволили бы абсолютно достоверно определить роль вертикальной передачи вирусов в распространении инфекции и в аномалиях эмбрионального развития. Однако мы можем констатировать, что накапливается все больше фактов, которые не позволяют игнорировать это явление.

Взаимодействие сперматозоидов с вирусами отличается от инфицирования соматических клеток, что обусловлено особенностями структуры сперматозоидов. Ядро морфологически нормального зрелого сперматозоида содержит хроматин плотной консистенции, его плотность в 40 раз превышает плотность хроматина соматических клеток [1]. Это обуславливает особенности взаимодействия ядерных и неядерных, ДНК- и РНК-содержащих вирусов с мужскими гаметами. Так как этот раздел иссле-

Елизавета Ефимовна Брагина  
e-mail: bragor@mail.ru

дований мало освещен в русскоязычной литературе, мы подробнее остановимся на работах зарубежных исследователей, освещающих вирусное инфицирование сперматозоидов.

### Вирус иммунодефицита человека

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) относится семейству *Retroviridae* рода *Lentivirus*. Геном ВИЧ состоит из двух идентичных копий одноцепочечной молекулы РНК, содержащей три структурных гена. Геном ВИЧ кодирует фермент обратную транскриптазу, которая превращает вирусную РНК в ДНК, и фермент интегразу, которая обеспечивает встраивание вирусной ДНК в хромосому клетки-хозяина.

Сперматозоиды могут принимать участие в горизонтальном распространении ВИЧ путем передачи вирусов соматическим клеткам: *in vitro* показано, что сперматозоиды от здоровых доноров могут нести на поверхности ВИЧ-1 и переносить в культивируемые лимфоциты [2]. Показан перенос ВИЧ-1 через семенную жидкость бессимптомных носителей [3]. ВИЧ способен прикрепляться к поверхности сперматозоидов, это взаимодействие может играть важную роль в горизонтальной передаче заболевания [4].

Имеется большое количество сообщений о наличии нуклеиновых кислот и белков ВИЧ в созревающих сперматидеях и зрелых сперматозоидах ВИЧ-позитивных пациентов. В. Мицциасиа и соавт. [5] выявляли ДНК ВИЧ-1 в сперматозоидах пациентов, имеющих серопозитивную реакцию, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) *in situ*. Подвижные сперматозоиды, способные к оплодотворению, содержат РНК ВИЧ-1 (ДНК, но не РНК ВИЧ выявили в 69 % образцов очищенных сперматозоидов ВИЧ-позитивных мужчин [4], то есть геном ВИЧ в сперматозоидах, так же как и геном самих сперматозоидов, находится в неактивном состоянии).

Р. Риомбони и соавт. [6], используя иммуноэлектронную микроскопию и гибридизацию *in situ*, показали, что ВИЧ-1 связывается и входит в сперматозоиды *in vivo* и *in vitro*, эти частицы переносятся сперматозоидами в яйцеклетки и присутствуют в зиготе и в бластомерах ранних эмбрионов. В сперматозоидах ВИЧ-инфицированного пациента оболочечные вирусы были обнаружены в цитоплазматической капле сперматозоида. При инкубации здоровых сперма-

тозоидов с ВИЧ выявлены вирусные частицы, прикрепленные к наружной стороне плазматической мембраны или под плазматической мембраной. Результаты подтверждены методом иммуноэлектронной микроскопии — антитела к ВИЧ, меченные коллоидным золотом, обнаружены в субакросомальном пространстве. Интересные результаты получены при исследовании яйцеклеток, оплодотворенных сперматозоидом ВИЧ-инфицированного пациента: частицы, морфологически идентичные ВИЧ, обнаружены в зиготе на стадии 2 бластомеров. Из этого можно сделать заключение, что подвижные сперматозоиды, способные к оплодотворению, содержат ВИЧ и могут передавать его при оплодотворении. Это подтверждается данными I. L. Chrystie и соавт. [7], которые выявляли ВИЧ РНК во фракции подвижных сперматозоидов. При отмывании сперматозоидов в части образцов количество ВИЧ РНК не снижалось, что свидетельствует в пользу внутриклеточной локализации вируса.

ВИЧ-1 переносится сперматозоидами в яйцеклетки и присутствует в зиготе и в бластомерах ранних эмбрионов. Были получены сперматозоиды человека, содержащие плазмиду с ДНК *gag* гена ВИЧ-1. *FISH*-сигнал наблюдали в ядрах и хромосомах трансфектированных сперматозоидов, в мужских пронуклеусах и зиготах после гетерологического оплодотворения яйцеклеток хомячка. После оплодотворения ДНК гена методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (RT-ПЦР, *real time*) определяли в двухклеточном эмбрионе. Белок, кодируемый этим геном, выявляли в эмбрионе, но не в сперматозоидах. Это указывает на то, что сперматозоиды переносят в яйцеклетку неактивный ген, способный реплицироваться в эмбрионе и активирующийся при попадании в яйцеклетку [8].

В настоящее время для серодискордантных пар с мужским инфицированием ВИЧ-1 общепринятым методом является промывание сперматозоидов в градиенте плотности перед искусственным оплодотворением [9]. Это снижает, но не исключает риск переноса ВИЧ от инфицированных мужчин неинфицированным женщинам. Соответственно, необходима стандартизация методов молекулярно-биологической диагностики ВИЧ в сперматозоидах перед использованием их для вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ).

## Вирус гепатита В

Вирус гепатита В (ВГВ) — крупный ДНК-содержащий вирус. Молекула ДНК ВГВ кольцевая, и только частично двухспиральная. Известно, что ВГВ контаминирует различные жидкости организма, включая сперму [10]. Показано, что эякулят, как и другие биологические жидкости, является вектором распространения гепатита В у человека. Передача ВГВ через эякулят показана экспериментально на приматах.

М. Nadchouel и соавт. [11] методом молекулярной гибридизации показали наличие интегрированной последовательности ДНК ВГВ в сперматозоидах инфицированных пациентов. ВГВ встраивается в хромосомы сперматозоидов. Интеграция вирусной ДНК в хромосомы сперматозоидов носит неспецифический характер, однако вызывает мутагенный эффект, что ведет к нестабильности хромосом сперматозоидов и может приводить к аномалиям развития эмбриона [12]. После оплодотворения гены ВГВ в сперматозоидах реплицируются и экспрессируют РНК и белки на стадии одно- и двухклеточного эмбриона при гетерологичном оплодотворении инфицированными сперматозоидами [13]. Выявление ДНК ВГВ происходит также в отсутствии серологических маркеров инфекции.

М. Ahmed и соавт. [14] получили плазмиду, несущую ген S гепатита В и ген белка с зеленой флюоресценцией в качестве метки. Плазида была введена в сперматозоиды человека, после чего осуществили гетерологическое оплодотворение этими сперматозоидами овоцитов хомяка. Ген гепатита В определялся вместе с зеленым белком на стадии двухклеточного эмбриона, что свидетельствует о возможности вертикальной передачи вируса через сперматозоиды.

## Вирус гепатита С

Вирус гепатита С (ВГС) — небольшого размера оболочечный вирус с одноцепочечной молекулой РНК [15]. В отличие от ВИЧ, ВГС не содержит обратной транскриптазы и не встраивается в геном инфицированной клетки.

Данные о возможности полового пути заражения ВГС, как и о роли семенной жидкости в качестве резервуара инфекции, противоречивы. Некоторые исследователи считают, что этот риск минимален — от 0 до 3 % [16], другие отмечают факторы риска [17]. РНК ВГС выявлен в семенной плазме людей, инфицированных ВИЧ [18], типирование показало, что в семенной плазме и в крови — один и тот же тип вируса.

Данные о наличии ВГС в сперме противоречивы, что, по-видимому, во многом зависит от метода выявления вируса. Имеются сообщения о выявлении РНК ВГС в отмытой фракции подвижных сперматозоидов методом ПЦР с обратной транскрипцией [19]. М. Meseguer и соавт. [20] выявили РНК ВГС во фракции отмытых подвижных сперматозоидов методом гнездовой ПЦР в образцах, негативных по методу РТ-ПЦР. Выделение и отмывка фракции подвижных сперматозоидов уменьшает наличие вируса на 90 % [21].

Описанные единичные попытки выявления ВГС в сперматозоидах показывают, что, как и в случае с ВИЧ, инфицирование сперматозоидов может представлять опасность переноса ВГС потомству не только при применении репродуктивных технологий, но и при естественном оплодотворении. Поэтому сперматозоиды ВГС-инфицированных пациентов могут быть использованы для лечения бесплодия методами ВРТ только при получении отрицательных результатов при исследовании на ВГС.

## Литература

1. Fuentes-Mascorro G., Serrano H., Rosado A. Sperm chromatin // Arch. Androl. 2000. Vol. 45. P. 215–225.
2. Dussaix E., Guetard D., Dauguet C. et al. Spermatozoa as potential carriers of HIV // Res. Virol. 1993. Vol. 144. P. 437–445.
3. Borzy M. S., Connell R. S., Kiessling A. A. Detection of human immunodeficiency virus in cell-free seminal fluid // J. Acquir Immune Defic Syndr. 1988. Vol. 1. P. 419–424.
4. Cardona-Maya W., Velilla P., Montoya C. J. et al. Presence of HIV-1 DNA in spermatozoa from HIV-positive patients: changes in the semen parameters // Curr. HIV Res. 2009. Vol. 7. P. 418–424.
5. Muciaccia B., Corallini S., Vicini E. HIV-1 viral DNA is present in ejaculated abnormal spermatozoa of seropositive subjects // Hum. Reprod. 2007. Vol. 22. P. 2868–2878.
6. Piomboni P., Baccetti B. Spermatozoon as a vehicle for HIV-1 and other viruses: a review // Mol. Reprod. Dev. 2000. Vol. 56 (Suppl. 2). P. 238–242.
7. Chrystie I. L., Mullen J. E., Braude P. R. et al. Assisted conception in HIV discordant couples: evaluation of se-

- men processing techniques in reducing HIV viral load // J. Reprod. Immunol. 1998. Vol. 41. P. 301–306.
8. Wang D., Kang X. J., Li L. B. In vitro study on vertical transmission of the HIV-1 gag gene by human sperm // J. med. Virol. 2011. Vol. 83. P. 16–23.
  9. Persico T., Savasi V., Ferrazzi E. et al. Detection of human immunodeficiency virus-1 RNA and DNA by extractive and in situ PCR in unprocessed semen and seminal fractions isolated by semen-washing procedure // Hum. Reprod. 2006. Vol. 21 P. 1525–1530.
  10. Englert Y., Lesage B., Van Vooren J. P. Medically assisted reproduction in the presence of chronic viral diseases // Hum. Reprod. Update. 2004. Vol. 10. P. 149–162.
  11. Hadchouel M., Scotto J., Huret J. L. Presence of HBV DNA in spermatozoa: a possible vertical transmission of HBV via the germ line // J. med. Virol. 1985. Vol. 16. P. 61–66.
  12. Huang J., Huang T., Qiu H. et al. Studies on the integration of hepatitis B virus DNA sequence in human sperm chromosomes // Asian. J. Androl. 2002. Vol. 4. P. 209–212.
  13. Ali B., Huang T., Salem H., Xie Q. Expression of hepatitis B virus genes in early embryonic cells originated from hamster ova and human spermatozoa transfected with the complete viral genome // Asian. J. Androl. 2006. Vol. 8. P. 273–279.
  14. Ahmed M., Huang, T., Xie Q. A Sensitive and Rapid Assay for Investigating Vertical Transmission of Hepatitis B Virus via Male Germ Line Using EGFP Vector as Reporter // J. Biomed. Biotechn. 2008. Vol. 2008. P. 436–495.
  15. Zein N. N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes // Clin. Microbiol. Rev. 2000. Vol. 13. P. 223–235.
  16. Flamm S. L. Chronic hepatitis C virus infection // J.A.M.A. 2003. Vol. 289. P. 2413–2417.
  17. Clarke A., Kulasegaram R. Hepatitis C transmission — where are we now? // Int. J. STD AIDS. 2006. Vol. 17. P. 74–80.
  18. Leruez-Ville M., Kunstmann J. M., De Almeida M. Detection of hepatitis C virus in the semen of infected men // Lancet. 2000. Vol. 356. P. 42–43.
  19. Bourlet T., Levy R., Maertens A. et al. Detection and characterization of hepatitis C virus RNA in seminal plasma and spermatozoon fractions of semen from patients attempting medically assisted conception // J. clin. Microbiol. 2002. Vol. 40. P. 3252–3255.
  20. Meseguer M., Garrido N., Gimeno C. et al. Comparison of polymerase chain reaction-dependent methods for determining the presence of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus in washed sperm // Fertil. Steril. 2002. Vol. 78. P. 1199–1202.
  21. Bourlet T., Lornage J., Maertens A. et al. Prospective evaluation of the threat related to the use of seminal fractions from hepatitis C virus-infected men in assisted reproductive techniques // Hum. Reprod. 2009. Vol. 24. P. 530–535.

**Ye. Ye. Bragina<sup>1</sup>, Ye. A. Arifulin<sup>1</sup>, P. O. Khafizova<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>A. N. Belozersky Institute of Physical-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow

<sup>2</sup>Moscow State University, Moscow

### **Viral infection of spermatozoons**

In the last decade, a viral infection of semen and sperm is the subject of intensive research. A number of viruses can infect the sperm. The human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus are revealed in the sperm. The question arises — whether virus-infected sperm is capable of transferring it into the egg during fertilization, which is a true kind of vertical transmission. In this brief review we have tried to show that viral infection of sperm is rather widespread phenomenon. At the present time there are not enough data that would absolutely reliably determine the role of vertical virus transmission in the infection spread and abnormalities of embryonic development. However, we can state that facts do not allow to ignore this phenomenon.

**Key words:** viral infection, spermatozoons