

УДК: 616.155.3 + 618.177] – 097

## **ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЖЕНЩИН, ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ И КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ЭЯКУЛЯТА**

**А. А. Савельева**

*Южно-Уральский государственный медицинский университет,  
Научно-исследовательский институт иммунологии Южно-Уральского  
государственного медицинского университета, г. Челябинск, Россия*

## **FUNCTIONAL ACTIVITY OF NEUTROPHILES SECRETED FROM FEMALE PERIPHERAL BLOOD UNDER THE EFFECT OF SEMINAL FLUID AND EJACULATE CELL ELEMENTS**

**A. A. Savelieva**

*South Ural State University of Medicine,  
Scientific-Research Institute of Immunology of South Ural State University of Medicine,  
Chelyabinsk, Russian Federation*

---

**Цель.** Изучить влияние семенной жидкости и клеточных элементов эякулята, полученных от здоровых мужчин, на лизосомальную, фагоцитарную активность нейтрофилов, выделенных из периферической крови, а также внутриклеточный кислородзависимый метаболизм и способность к образованию внеклеточных сетей данными клетками.

**Материалы и методы.** Проведена оценка уровня нейтрофильных внеклеточных ловушек и функциональной активности нейтрофилов, выделенных из периферической крови 17 здоровых женщин (возраст 19–35 лет) в первую фазу менструального цикла, под действием семенной жидкости (СЖ) и клеточных элементов эякулята (КЭЭ) здоровых мужчин (возраст 18–36 лет) *in vitro*. Спермиологический анализ включал стандартные показатели согласно рекомендациям ВОЗ. В исследовании использовалась семенная жидкость, характеризующаяся состоянием нормозооспермии. Определена концентрация ДНКазы семенной жидкости методом иммуноферментного анализа. Исследуемыми показателями функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов явились: лизосомальная, фагоцитарная активность, внутриклеточный кислородзависимый метаболизм изучаемых клеток. Параллельно поставлен опыт с использованием препарата «Пирогенал», который является активатором для нейтрофилов. Была проведена оценка тех же показателей под влиянием СЖ и КЭЭ.

**Результаты.** Установлено снижение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов. Также показано снижение уровня внеклеточных сетей, образуемых нейтрофилами, под действием семенной жидкости и увеличение данного показателя при взаимодействии с клеточными элементами эякулята. Роль пирогенала как активатора подтверждается статистическими результатами.

---

© Савельева А. А., 2014  
e-mail: pandora\_anna@mail.ru  
тел.: 8 909 068-45-28

[Савельева А. А. – аспирант кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, старший лаборант НИИ иммунологии].

**Выводы.** Фагоцитарная активность нейтрофильных гранулоцитов снижается под действием не только семенной жидкости, но и клеточных элементов эякулята. Нейтрофилы, вступая во взаимодействие с семенной жидкостью и клеточными элементами эякулята, активируются по пути NETosis. Семенная жидкость здоровых мужчин, обладая ДНКазной активностью, способствует разрушению нейтрофильных внеклеточных ловушек.

**Ключевые слова.** Нейтрофилы, семенная жидкость, нейтрофильные внеклеточные ловушки.

Nowadays, immunological aspect of sterility is an important and priority direction to be studied.

**Aim.** To study the effect of seminal fluid and cell elements of ejaculate received from healthy men on lysosomal, phagocytic activity of neutrophils secreted from female peripheral blood as well as intracellular oxygen-dependent metabolism and ability of these cells to form extracellular traps.

**Materials and methods.** The level of neutrophilic extracellular trap and functional activity of neutrophils secreted from peripheral blood of 17 healthy women (aged 19-35) during the first phase of menstrual cycle under the effect of seminal fluid (SF) and ejaculate cell elements (ECE) of healthy men (aged 18-36) in vitro was assessed. Spermologic analysis included WHO standard indices. Seminal fluid characterized by normozoospermia state was used in the study. Seminal fluid DNCase concentration was determined with the method of immunofluorescent analysis. Neutrophilic granulocyte functional activity indices to be studied were the following: lysosomal, phagocytic activity, intracellular oxygen-dependent metabolism of the studied cells. Simultaneously, the experiment using the drug "pyrogenal" as a neutrophile activator was performed. The same indices influenced by SF and ECE were estimated.

**Results.** Decreased phagocytic activity of neutrophilic granulocytes was stated. The level of extracellular traps formed by neutrophils was shown to fall under the effect of seminal fluid and to raise while interacting with ejaculate cell elements. The role of pyrogenal as an activator is proved by statistical results.

**Conclusions.** Phagocytic activity of neutrophilic granulocytes is decreased under the effect of not only seminal fluid, but ejaculate cell elements, as well. Neutrophils interacting with seminal fluid and cell elements of ejaculate are activated on the way of NETosis. Seminal fluid of healthy men possessing DNCase activity contributes to destruction of neutrophilic extracellular traps.

**Key words.** Neutrophils, seminal fluid, neutrophilic extracellular traps.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема бесплодного брака выражена особенно остро. Много усилий направлено на преодоление бесплодия. Менее изученными остаются вопросы иммунологии репродукции. Ранее роль семенной жидкости сводилась исключительно к реализации транспортировки сперматозоидов к месту оплодотворения. В настоящее время расширилось представление о функциях семенной жидкости [1]. Считается, что семенная плазма обеспечивает не только транспортировку и выживание жизнеспособных сперматозоидов в женских половых путях, но также участвует в ликвидации нежизнеспособных сперматозоидов в матке [6]. Кроме того многочисленные исследования указывают на иммунорегуляторное действие

семенной жидкости в женском репродуктивном тракте. Исследования на животных выявили значительное увеличение фертильности при искусственном осеменении с использованием семенной плазмы при оплодотворении [4]. Данная группа исследователей приводит сведения о связывании сперматозоидов и нейтрофилов влагалища, обусловленное нейтрофильными внеклеточными сетями, в 10 % случаев. Причину связывания сперматозоидов и нейтрофилов также объясняют непосредственным взаимодействием клеточных мембран [5]. Аналогичные результаты получены авторами данного исследования с использованием нейтрофилов, выделенных из периферической крови и матки. Феномен связывания сперматозоидов нейтрофильными внеклеточными сетями является малоизученным. Кроме того, подобные исследования проводились

исключительно на животных. Поэтому изучение влияния семенной жидкости на функциональную активность нейтрофилов, которые являются ключевыми иммунокомпетентными клетками нижнего отдела репродуктивного тракта женщин, и способность ими формировать внеклеточные сети является актуальным и новым направлением в области иммунологии репродукции человека.

**Цели исследования:** 1) оценить влияние семенной жидкости и клеточных элементов эякулята на функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов, выделенных из периферической крови; 2) определить соотношение морфологических форм нейтрофилов, выделенных из периферической крови, под действием семенной жидкости и клеточных элементов эякулята.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведена оценка уровня нейтрофильных внеклеточных ловушек и функциональной активности нейтрофилов, выделенных из периферической крови 17 здоровых женщин (возраст 19–35 лет) в первую фазу менструального цикла, под действием семенной жидкости (СЖ) и клеточных элементов эякулята (КЭЭ) здоровых мужчин (возраст 18–36 лет) *in vitro*. Спермиологический анализ включал стандартные показатели согласно рекомендациям ВОЗ. В исследовании использовалась семенная жидкость, характеризующаяся состоянием нормозооспермии. Также определена концентрация ДНКазы семенной жидкости методом иммуноферментного анализа набором DNase ELISA Kit, которая у обследуемых мужчин соответствовала средним значениям  $3,92 \pm 0,06$  нг/мл. Отсутствие инфекций половых путей среди мужчин подтверждалось методом ПЦР в реальном времени. Иссле-

дуемыми показателями функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов явились: лизосомальная, фагоцитарная активность, внутриклеточный кислородзависимый метаболизм изучаемых клеток [2]. Кроме того, определено процентное содержание нейтрофилов с неизменным ядром, с недифференцированным ядром и количество внеклеточных ловушек, образованных нейтрофильными гранулоцитами, выделенными из периферической крови женщин, под действием СЖ и КЭЭ. Морфологические формы нейтрофилов определялись согласно методу индикации окрашиванием акридиновым оранжевым [3]. Параллельно был поставлен опыт с использованием препарата «Пирогенал», который является активатором для нейтрофилов. Проведена оценка тех же показателей под влиянием СЖ и КЭЭ. Чистую фракцию нейтрофилов получали из периферической крови разделением клеточных элементов путем центрифугирования на двойном градиенте плотности фиколлурографин. К взвеси нейтрофилов (концентрация  $5 \cdot 10^6$  клеток/мл) добавляли СЖ, КЭЭ инкубировали *in vitro* в течение 30 минут при температуре  $+37$  °С. В качестве контроля использовали взвесь клеток с физиологическим раствором (ФР). Кроме того, для дополнительной активации нейтрофильных гранулоцитов применяли препарат «Пирогенал» (НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи, «Медгамал», Россия) – иммуностропный липополисахарид, оказывающий пирогенное и интерферогенное действие, иммуномодулятор широкого спектра действия, в концентрации 0,02 мкг/мл, которая соответствует разовой терапевтической дозе. В опыте с пирогеналом нейтрофилы предварительно инкубировались в течение 30 минут при температуре  $+37$  °С. Далее оценивалось соотношение морфологических форм нейтрофилов и число НВЛ. Затем нейтрофилы подверга-

лись воздействию СЖ и КЭЭ, и проводился аналогичный подсчет. Контролем в данном случае являлась взвесь клеток с пирогеналом. Данные анализировали с применением непараметрического метода *U*-критерий Манна–Уитни для расчета уровня значимости.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Данные относительно функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов под действием СЖ и КЭЭ представлены в табл. 1. Лизосомальная активность под влиянием СЖ при сравнении с группой кон-

троля снижается. При сравнении опытных групп между собой получено достоверное снижение лизосомальной активности в группе, взаимодействующей с СЖ. При сравнении значений внутриклеточной кислородзависимой бактерицидности статистически значимых различий в сравниваемых группах не получено. Однако значения таких показателей, как фагоцитарная активность, интенсивность фагоцитоза и фагоцитарное число, указывают на значительное снижение фагоцитарной активности нейтрофилов под действием СЖ и КЭЭ.

Таблица 1

**Функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов, выделенных из периферической крови, после инкубации с СЖ и КЭЭ (n=17)**

Показатель		Исследуемые группы		
		контроль	опыт	
		Нф + ФР Медиана (LQ – UQ)	Нф + СЖ Медиана (LQ – UQ)	Нф + КЭЭ Медиана (LQ – UQ)
Лизосомальная активность, усл. ед.		316,5 [254,5 – 351,5]	260 [223,0 – 282,5] *	325 [274,0 – 340,5]**
НСТ-тест спонтанный	активность, %	25 [16,5 – 35]	17 [13 – 32]	20 [10,0 – 25,5]
	интенсивность, усл. ед.	0,29 [0,2 – 0,37]	0,18 [0,14 – 0,32]	0,22 [0,11 – 0,30]
НСТ-тест индуцированный	активность, %	24 [19 – 36]	21 [10 – 23]	22 [8,5 – 25,0]
	интенсивность	0,26 [0,21 – 0,36]	0,21 [0,11 – 0,29]	0,24 [0,09 – 0,30]
Фагоцитарная активность	интенсивность фагоцитоза, усл. ед.	0,23 [0,16 – 0,32]	0,07 [0,03 – 0,08] *	0,09 [0,05 – 0,12]*
	фагоцитарная активность, %	16 [14,0 – 20,5]	6 [3 – 7] *	7 [5,00 – 9,00]*
	фагоцитарное число	1,36 [1,16 – 1,55]	1,2 [1,0 – 1,32] *	1,2 [1,0 – 1,33]*

Примечание: \* – достоверность по сравнению с контролем; \*\* – достоверность по сравнению с группой нейтрофилов под влиянием семенной жидкости.

Результаты соотношения морфологических форм нейтрофилов и количество НВЛ под действием СМ и КЭЭ, а также с предварительной инкубацией с пирогеналом представлены в табл. 2. Образование внеклеточных сетей происходит поэтапно: сначала (нейтрофил с неизменным – сегментированным ядром) реализуется взаимодействие рецепторов нейтрофилов с сигнальными молекулами, затем после активации происходит изменение ультраструктуры ядра и гранул – ядерная и гранулярные мембраны

распадаются, содержимое гранул растворяется, компоненты будущей ловушки заполняют объем клетки полностью (нейтрофил с недифференцированным ядром); затем нейтрофильный гранулоцит выбрасывает высокоактивную смесь во внеклеточное пространство, образуя НВЛ [7]. Под действием СЖ и КЭЭ происходит снижение содержания нейтрофилов с сегментированным ядром, возрастает содержание нейтрофилов с недифференцированным ядром. При сравнении группы контроля и опытной группы

(нейтрофилов, инкубированных с СЖ), не выявлено статистически значимых различий по числу НВЛ. Под действием КЭЭ отмечено увеличение содержания внеклеточных сетей, образуемых нейтрофилами, что подтверждает результаты исследований, проведенных на животных. Вероятно, клеточная фракция эякулята несет в своем составе факторы, провоцирующие образование нейтрофильных внеклеточных ловушек. Кроме того, можно предположить, что именно сперматозоиды обуславливают образование НВЛ. С другой стороны, необходимо отметить, что семенная жидкость обладает ДНКазной

активностью, благодаря чему, вероятно, происходит расщепление внеклеточной ДНК.

Роль пирогенала как активатора подтверждается статистическими результатами. После инкубации с пирогеналом снижается содержание нейтрофилов с неизменным ядром и возрастает число НВЛ. Под действием СЖ следует отметить более высокий уровень нейтрофилов с сегментированным ядром и более низкие значения НВЛ. В свою очередь под действием КЭЭ происходит возрастание уровня НВЛ, что можно объяснить также наличием в эякуляте активной ДНКазы.

Таблица 2

**Морфологические формы нейтрофилов, выделенных из периферической крови здоровых женщин, и число НВЛ после инкубации с пирогеналом, СЖ, КЭЭ и совместной инкубации с пирогеналом и СЖ, КЭЭ (n=17; медиана (LQ – UQ))**

Исследуемые группы		Морфологические формы нейтрофилов (Нф)		
		нейтрофилы с сегментированным ядром, %	нейтрофилы с недифференцированным ядром, %	НВЛ, %
Контроль	Нф + ФР	66 [52,0 – 68,5]	18 [16 – 29]	13 [2 – 20]
	Нф + СЖ	55,5 [40 – 64]*	35 [26,5 – 38,5]*	6 [4,0 – 8,5]
Опыт	Нф + КЭЭ	45 [19 – 48]*	40 [27 – 42]*	16 [11 – 30]*, ***
	Нф, активированные пирогеналом	40 [30 – 46]*	28 [17,0 – 39,5]	16 [10,0 – 33,5]*
	Нф, активированные пирогеналом + СЖ	60 [46,5 – 68,0]**	26 [19,5 – 28,0]	10 [4 – 14]**
	Нф, активированные пирогеналом + КЭЭ	44 [33 – 57]	36 [20,0 – 38,5]	18 [9 – 22]***

Примечание: \* – достоверность по сравнению с контролем; \*\* – достоверность по сравнению группой нейтрофилов, активированных пирогеналом; \*\*\* – достоверность по сравнению с группой нейтрофилов, взаимодействовавших с СЖ.

### Выводы

Проведенное исследование позволяет выделить следующие ключевые аспекты. Во-первых, установлено снижение фагоцитарной активности нейтрофильных гранулоцитов под действием не только семенной жид-

кости, но и клеточных элементов эякулята. Данное обстоятельство может быть обусловлено адсорбцией на эякулированных сперматозоидах компонентов семенной плазмы. Во-вторых, нейтрофилы, вступая во взаимодействие с семенной жидкостью и клеточными элементами эякулята, активируются по пути NETosis, на что указывает снижение

уровня содержания нейтрофилов с неизменным ядром и возрастание уровня нейтрофилов с недифференцированным ядром. В-третьих, семенная жидкость здоровых мужчин, обладая ДНКазной активностью, способствует разрушению нейтрофильных внеклеточных ловушек.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Бабаян А. А., Смольникова В. Ю., Николаева М. А., Степанова Е. О., Калинина Е. А.* Влияние иммунорегуляторных свойств семенной плазмы на репродуктивную функцию женщин. *Гинекология* 2012; 4: 80–82.
2. *Виксман М. Е., Маянский А. Н.* Способы оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинего тетразолия: метод, рекомендации. Казань: Казанский НИИЭМ 1979; 11.
3. *Долгушин И. И., Андреева Ю. С.* Способ обнаружения нейтрофильных ловушек: пат. № 2384844 Рос. Федерации (Российская Федерация). Заявл. 01.04.2008; опубл. 20.03.2010. Бюл. № 8; 7.
4. *Troedsson M. H. T., Desvousges A., Alghamdi A. S., Dabms B., Dow C. A., Hayna J., Valesco R., Collaban P. T., Macpherson M. L., Pozor M., Bubi W. C.* Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Animal Reproduction Science* 2005; 89 (1): 171–186.
5. *Abdorrabman S., Alghamdi A.S., Bethany J., Funnell, Scott L Bird, G. Cliff Lamb, Aaron K. Rendabl, Patrick C. Taube, Douglas N. Foster* Comparative studies on bull and stallion seminal DNase activity and interaction with semen extender and spermatozoa. *Animal reproduction science* 09/2010; 121 (3–4): 249–258.
6. *Abdorrabman S., Alghamdi A. S., Bethany J. Lovaas, Scott L. Bird, G. Cliff Lamb, Aaron K. Rendabl, Patrick C. Taube, Douglas N. Foster* Species-specific interaction of seminal plasma on sperm–neutrophil binding. *Animal Reproduction Science* 2009; 114 (4): 331–344.
7. *Fuchs T. A., Abed U., Goosmann C.* Novel cells death program leads to neutrophil extracelllular traps. *J. Cell. Biol.* 2007; 176 (2): 231–241.

Материал поступил в редакцию 24.04.2014