

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 612.616.083.3

Долгушин И.И., Савочкина А.Ю., Савельева А.А.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ДНКазы I В СЕМЕННОЙ ЖИДКОСТИ

ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России, 454048, г. Челябинск, Россия

ДНКазы I является наиболее изученной среди других ДНКаз. Сравнительные исследования показали, что ДНКазы I из разных биологических жидкостей обладает сходными свойствами. В данном исследовании представлены результаты определения концентрации ДНКазы I семенной жидкости условно здоровых мужчин методом иммуноферментного анализа. Показана адаптация тест-системы DNase ELISA Kit для определения в семенной жидкости с использованием двух способов вычисления конечных результатов.

Ключевые слова: семенная жидкость; ДНКазы I.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60 (7): 50–53.

Dolgushin I.I., Savochkina A.Yu., Savelieva A.A.

THE DETECTION OF CONCENTRATION OF DNAASE I IN SEMINAL FLUID

The South Ural state medical university of Minzdrav of Russia, 454048 Chelyabinsk, Russia

The DNAase I is the most studied one among other DNAases. The comparative studies demonstrated that DNAase I from various biological fluids has similar characteristics. The article presents the results of detection of concentration of DNAase I in seminal fluid of conditionally healthy males using technique of enzyme-linked immunosorbent assay. The adaptation of test system DNase ELISA Kit is demonstrated to detect DNAase I in seminal fluid using two modes of calculation of end results.

Key words: seminal fluid; DNAase I

Citation: *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (7): 50–53. (in Russ.)*

Введение. Семенная жидкость (сперма) является многокомпонентным продуктом мужской половой системы. Состав спермы представлен совокупностью сперматозоидов, секретов добавочных желез мужской половой системы и клеток, не относящихся к половым [1]. Одним из известных, но мало изученных ферментов семенной жидкости является ДНКазы. До недавнего времени биологическая роль данного фермента в семенной жидкости рассматривалась исключительно с точки зрения устранения ДНК патогенов, а также собственного поврежденного генетического материала, который образуется от несостоятельных сперматозоидов. В настоящее время имеются данные об обнаружении в семенной жидкости следующих ДНКаз: ДНКазы I человека, ДНКазы II, фосфодиэстераза I (оптимум pH 9,0–10,0). О наличии в семенной жидкости таких ДНКаз, как ДНКазы γ , ДНКазы DFF40, эндонуклеаза G, нет убедительных сведений. ДНКазы I является наиболее изученным ферментом среди других ДНКаз. С момента открытия ДНКазы I предпринимались попытки использовать ее в диагностике и лечении различных заболеваний [2]. Все подходы в диагностике, как правило, сводились к изучению ДНКазной активности в основном крови. В настоящее время коммерческие тест-системы для определения ДНКазной активности методом иммуноферментного анализа (ИФА) разработаны для работы с сывороткой крови. Методы, позволяющие определять активность данного фермента в других биологических жидкостях, более трудоемкие и требуют специального оборудования, например путем электрофореза. Сравнительные испытания ДНКазы I из разных органов и биологических жидкостей показали, что данный фермент обладает сходными физико-химическими и

каталитическими свойствами. Для ДНКазы I характерен нейтральный pH-оптимум. В семенной жидкости pH колеблется от 7,2 до 8,0, во влагалище нормальная микрофлора обуславливает кислую среду: pH 4,0–4,5. Сдвиг кислотности влагалища фиксируется при различных патологических состояниях в связи со сдвигом соотношения нормальной микрофлоры условно-патогенные микроорганизмы. При бактериальном вагинозе происходит защелачивание среды, увеличивается содержание внеклеточных сетей, образуемых нейтрофилами женского репродуктивного тракта [2]. Хроматиновые образования, вероятно, препятствуют прохождению сперматозоидов к месту оплодотворения. В данных условиях ДНКазы I проявляет активность. Нам представлялось интересным определить концентрацию ДНКазы I в семенной жидкости методом ИФА.

Материалы и методы. Для осуществления поставленной цели было обследовано 150 условно здоровых мужчин в возрасте от 18 до 36 лет. Спермограмма включала стандартные показатели согласно рекомендациям ВОЗ [3]. Отсутствие инфекций половых путей подтверждалось методом ПЦР в реальном времени. После проведенных исследований исключены лица с азооспермией и инфекциями половых путей. Таким образом, обследуемую группу составили 68 человек. Образцы семенной жидкости замораживали при -4°C . Далее проводилось оттаивание и определение концентрации ДНКазы I. Используемая тест-система DNase ELISA Kit основана на сэндвич-методе твердофазного ИФА с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента. Исследования проводилось по методике, приложенной к тест-системе. Оптическая плотность каждой лунки планшета измерялась на автоматическом ИФА-анализаторе Personal LAB при длине волны 450 нм. Учет результатов проводился по данным 4-параметрической калибровочной кривой. В ходе статистической обработки полученных данных использовали методы описательной статистики. Для количественных показателей

Для корреспонденции: Савельева Анна Александровна, pandora_anna@mail.ru

For correspondence: Savelieva A.A., pandora_anna@mail.ru

Таблица 1

Данные описательной статистики количественных показателей семенной жидкости ($n = 68$)

Параметр спермограммы	Нормативное значение	Полученный результат, $M \pm m$
Объем, мл	2–6	3,78±1,877
Вязкость, см	< 2	0,8±1,24
pH	7,2–8,0	7,67±0,293
Количество сперматозоидов в 1 мл, $\cdot 10^6$	> 20 (15)	45,2±31,52
Общее количество сперматозоидов, $\cdot 10^6$	> 40 (39)	158,7±121,98
Сперматозоиды с прогрессивным движением, %	> 25 (32)	30,6±19,24
Сперматозоиды с непрогрессивным движением, %	< 50	24,5±9,50
Неподвижные сперматозоиды, %	< 50 (60)	44,9±20,93
Жизнеспособные сперматозоиды, %	> 50 (58)	92,2±8,78
Лейкоциты в 1 мл, $\cdot 10^6$, млн/мл	< 1	1,7±1,47
Нормальные сперматозоиды, %	> 50	58,4±12,47
Дефекты головки, %		16,0±8,10
Дефекты шейки, %		11,9±5,96
Дефекты хвостика, %		11,6±6,86

рассчитывали: средние значения, 95% доверительный интервал для среднего (95% ДИ) [4]. Расчет 95% ДИ проводили с помощью процедуры бутстрепа ($n = 9999$). Расчеты и графические построения выполнены в программах Statistica (version 8.0; StatSoft Inc.), PAST (version 2.17c) [5].

Результаты и обсуждение. Проведена оценка показателей спермограммы у обследуемых мужчин. Исследование эякулята включало изучение как макроскопических параметров или оценку физико-химических свойств эякулята, так и микроскопических параметров. Согласно полученным данным, средние значения следующих показателей спермограммы соответствуют нормативным: объем, вязкость, pH, количество сперматозоидов в 1 мл, общее количество сперматозоидов, показатели, относящиеся к подвижности половых клеток, жизнеспособность сперматозоидов, количество морфологически нормальных сперматозоидов и доля сперматозоидов с дефектами. Данные спермограммы представлены в табл. 1.

Полученные значения оптической плотности соответствовали проценту снижения концентрации ДНКазы, согласно инструкции производителя [6]. Поскольку данная

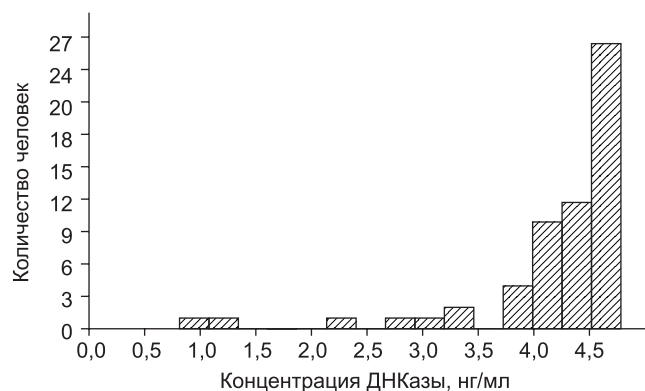


Рис. 1. Распределение значений концентрации ДНКазы I, полученных с помощью алгоритма point to point.

величина трудна для интерпретации результатов, необходимо перевести полученные данные в «понятный» показатель — концентрация фермента. В инструкции имеется ряд значений, по которым можно рассчитать концентрацию недостающих значений методом интерполяции. Расчет концентраций провели двумя способами. Первый способ заключался в построении графика по заданным в инструкции экспериментальным значениям с помощью алгоритма point to point, где по оси абсцисс выставили собственные результаты — процент снижения активности, по оси ординат получали значения концентрации mKuU/m. Далее проводился перевод в нг/мл путем деления полученных значений на 4. Затем по полученным значениям построили гистограмму, изображение указывает на ненормальный характер распределения полученных значений. Наблюдается резкий ограничитель после концентрации 4,775 нг/мл, что может указывать на внешний ограничитель, например полученный при обработке данных (рис. 1).

Второй способ расчета концентрации проводился путем аппроксимации [7]. По имеющимся в инструкции «типичным» значениям для инактивированной сыворотки, провазимодействовавшей с ДНКазой Г¹ был построен график.

Точечный график дал ветвь гиперболы. Приближающую функцию искали в виде: $F(x, a, b) = a/x + b$. Для выбора данной функции в качестве искомой выполнено условие в удовлетворении данного соотношения:

$$y(2x_1x_2/(x_1+x_2)) - (y(x_1)+y(x_2))/2 = 0.$$

Получены недостающие значения, переведены в единицы измерения нанограм на 1 мл (нг/мл) и построена аналогичным способом гистограмма (рис. 2).

Данное распределение не является нормальным, но его вид более характерен для биологических данных.

Полученные величины концентрации ДНКазы I с использованием обоих способов расчета представлены в табл. 2.

Поскольку нормативных данных о концентрации изучаемого фермента в семенной жидкости нет, опираясь на полученные данные, мы искусственно разделили по концентрациям выборку на две группы: первая — с низкими значениями (соответствуют значениям, расположенным ниже 25-й квартили), вторая — со средними значениями (от 25-й до 75-й квартили). Характер распределений дает возможность предположить, что значения выше 75-й квартили не несут качественно новых различий в выборке.

Заключение. Успешное оплодотворение реализуется благодаря многофакторному взаимодействию различных компонентов как репродуктивной, так и иммунной системы. Нейтрофильные гранулоциты являются основными клетками врожденного иммунитета. Нейтрофилы активно мигрируют в женский репродуктивный тракт после осеменения, что представляет собой классическую воспалительную реакцию, и играют ключевую роль в удалении избытка сперматозоидов, в основном с помощью фагоцитоза [8–10]. Микроорганизмы,

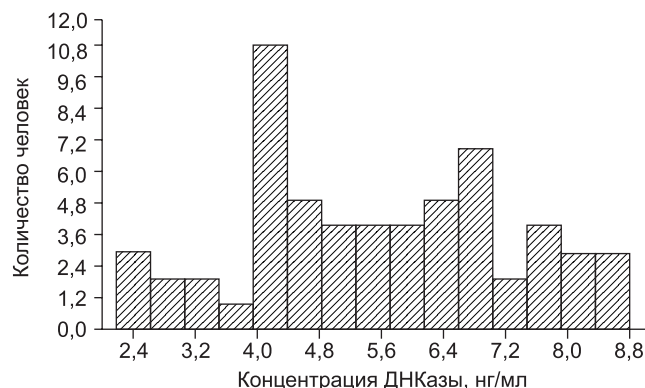


Рис. 2. Распределение значений концентрации ДНКазы I, полученных с использованием аппроксимации.

Таблица 2

Данные описательной статистики и полученных значений концентрации ДНКазы I семенной жидкости (нг/мл, n = 68)

Статистические параметры	Метод аппроксимации	Алгоритм point-to-point
Среднее	5,781	4,139
Минимум	2,166	0,650
Максимум	9,083	4,775
Стандартное отклонение	1,831	0,969
Стандартная ошибка	0,222	0,118
Медиана	5,894	4,475
25 квартиль	4,409	4,125
75 квартиль	7,377	4,675

попавшие извне, транспортируются с эякулятом во влагалище или непосредственно в матку. Чтобы сохранить благоприятные условия для имплантации, эти потенциальные патогены должны быть успешно устранены. Взаимодействие между нейтрофилами и семенной жидкостью изучалось до настоящего времени на крупных домашних животных. Семенная плазма быков снижает возможность выделенных нейтрофилов фагоцитировать сперматозоиды быков [8]. В семенной плазме лошади содержатся факторы, снижающие связывание нейтрофилов со сперматозоидами *in vitro* [11], тем самым позволяя большему числу здоровых подвижных сперматозоидов достичь маточной трубы. Агрегаты, образуемые нейтрофилами и сперматозоидами, разрушаются под действием семенной плазмы. Когда выяснилось, что нейтрофилы способны продуцировать внеклеточные сети, данный вопрос вновь заинтересовал исследователей [12]. Сведения о ДНКазе семенной жидкости до настоящего времени остаются фрагментарными. Определение концентрации ДНКазы семенной жидкости дает новый подход к изучению процессов сопровождающих оплодотворение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быков В.Л. *Частная гистология человека*. Сотис; 2001.
2. Барановский А.Г., Бунева В.Н., Невинский Г.А. Дезоксирибонуклеазы человека. Обзор. *Биохимия*. 2004; 69 (6): 725–42.
3. Пегушина И.В., Долгушин И.И., Маркова В.А., Бондаренко Т.Г. Изучение влияния пирогенала в вагинальном секрете здоровых женщин. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2011; 35 (2): 51–2.
4. Ланг Т.А., Сесик М. *Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов*. М.: Практическая медицина; 2011.
5. *WHO Laboratory manual for the examination of the processing human semen 5th ed.* World Health Organization; 2010.
6. Hammer, Oyvind, Harper, David A.T., Paul D. Ryan. *Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*. Palaeontologia Electronica. 2001; 4 (1): 4.
7. *Инструкция по применению набора реагентов для иммуноферментного определения ДНКазной активности Abnova «Dnase ELISA Kit»*.

8. Гриценко В.А., Белосевич Е.В., Артищева Е.К. *Математические методы в географии: Учебное пособие*. Калининград; 1999.
9. Strzemiński P.J. Effect of bovine seminal plasma on neutrophil phagocytosis of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 87: 519–28.
10. Abdorrahman S., Alghamdi, Douglas N. Foster. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophils extracellular traps. *Biology of reproduction*. 2005; 73: 1174–81.
11. Katila T. Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reprod. Domest. Anim.* 2012; 47 (5): 31–41.
12. Alghamdi, Foster D.N., Troedsson M.H.T. *Equine seminal plasma reduced sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri*. Society for Reproduction and Fertility. 2004.
13. Brinkmann V., Rechard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellulartraps kill bacteria. *Science*. 2004; 303: 1532–5.

REFERENCES

1. Bykov V.L. *Private Histology [Chastnaya gistologiya cheloveka]*. St. Petersburg: Sotis; 2001. (in Russian)
2. Baranovskiy A.G., Buneva V.N., Nevinskiy G.A. Deoxyribonucleases of the person. Review. *Biokhimiya*. 2004; 69 (6): 725–42. (in Russian)
3. Pegushina I.V., Dolgushin I.I., Markova V.A., Bondarenko T.G. Study of the influence pyrogenal in vaginal secret of healthy women. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2011; 35 (2): 51–2. (in Russian)
4. Lang T.A., Sesik M. *How to describe the statistics in medicine. An annotated guide for authors, editors and reviewers [Kak opisyyvat' statistiku v meditsine. Annotirovannoe rukovodstvo dlya avtorov, redaktorov i retsenzentov]*. Moscow: Prakticheskaya meditsina; 2011. (in Russian)
5. *WHO Laboratory manual for the examination of the processing human semen 5th ed.* World Health Organization; 2010.
6. Hammer, Oyvind, Harper, David A.T., Paul D. Ryan. *Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*. Palaeontologia Electronica. 2001; 4 (1): 4.
7. *Instruction for use of reagents for ELISA determination of DNase activity Abnova «Dnase ELISA Kit» [Instruktsiya po primeneniyyu nabora reagentov dlya immunofermentnogo opredeleniya DNKaznoy aktivnosti Abnova «Dnase ELISA Kit»]*. (in Russian)
8. Gritsenko V.A., Belosevich E.V., Artishcheva E.K. *Mathematical methods in geography: Manual. [Matematicheskie metody v geografii: Uchebnoe posobie]*. Kaliningrad; 1999. (in Russian)
9. Strzemiński P.J. Effect of bovine seminal plasma on neutrophil phagocytosis of bull spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1989; 87: 519–28.
10. Abdorrahman S., Alghamdi, Douglas N. Foster. Seminal DNase frees spermatozoa entangled in neutrophils extracellular traps. *Biology of reproduction*. 2005; 73: 1174–81.
11. Katila T. Post-mating inflammatory responses of the uterus. *Reprod. Domest. Anim.* 2012; 47 (5): 31–41.
12. Alghamdi, Foster D.N., Troedsson M.H.T. *Equine seminal plasma reduced sperm binding to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and improves the fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri*. Society for Reproduction and Fertility. 2004.
13. Brinkmann V., Rechard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellulartraps kill bacteria. *Science*. 2004; 303: 1532–5.

Поступила 20.12.14

Received 20.12.14