

ДИФФУЗИЯ ФОСФОЛИПАЗЫ А₂ В ЖЕЛТОЧНО-СОЛЕВОЙ АГАР КАК ЭКСПРЕСС-МЕТОД ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ

Папино Д.С.¹, Литвинко Н.М.², Герловский Д.О.²

¹*Белорусский государственный университет, Минск,
d.papino@yandex.ru*

²*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск*

Фосфолипаза А₂ (ФЛА₂, КФ 3.1.1.4) фермент, гидролизующий фосфолипиды. Данный фермент присутствует в клетках и межклеточной жидкости многих органов и играет важную роль в их функционировании. В семенной жидкости ФЛА₂ участвует в липидном обмене, воспалительных процессах, иммунных ответах. При изменении активности ФЛА₂ в мужской репродуктивной системе ухудшается процесс образования сперматозоидов, они становятся неспособными выполнять свою функцию, что в итоге может привести к бесплодию. Определение активности данного фермента в семенной жидкости может служить диагностическим маркером для исследования заболеваний мужской репродуктивной системы. Цель данной работы - исследование возможности использования экспрессного метода диффузии ФЛА₂ в тонком слое субстрат-содержащего агарозного геля для изучения активности фермента в семенной жидкости здорового и больного (бесплодие) донора.

В качестве субстрата использовался помещенный в чашки Петри желточно-солевой агар, содержащий фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин в липопротеиновой форме надмолекулярной организации субстрата [1]. Активность ФЛА₂ оценивали по размерам зоны просветления, образующейся вокруг места нанесения фермента [2]. Диффузию ФЛА₂ проводили в термостате при 50°C и 37°C. Зоны просветления были выявлены исключительно на чашках при 37°C, что свидетельствует о термолабильности данного фермента, в отличие от устойчивой к нагреванию секреторной формы ФЛА₂, выделяемой поджелудочной железой [3].

Обнаружено, что активность фосфолипаз семенной жидкости отличается у больного и здорового донора. У больного бесплодием размеры зоны просветления больше, чем у здорового донора (рисунок 1).

Показано, что зоны просветления, при исследовании активности фосфолипаз семенной жидкости, у больных составляли 400-700 мм², у здоровых – 0-150 мм²(рисунок 2).

Полученные результаты подтверждаются исследованием фосфолипазной активности спермоплазмы с использованием субстрата в составе мицеллярной фазы, при использовании диагностической тест системы «ФЛА₂-ФОА»,

разработанной в ИБОХ НАН Беларуси, в которой используется гемоглобин в качестве индикатора липолиза [4].

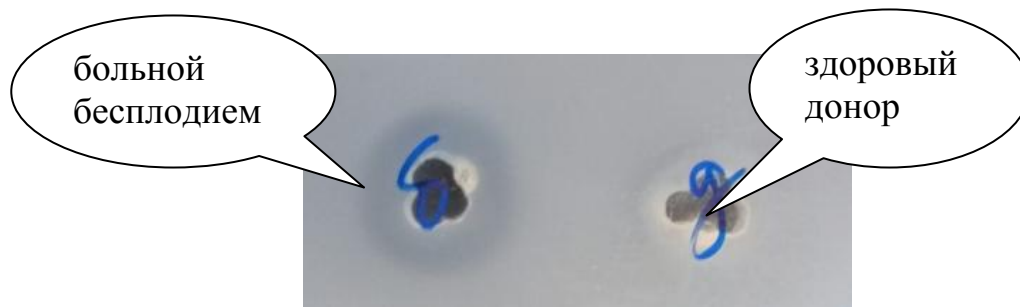
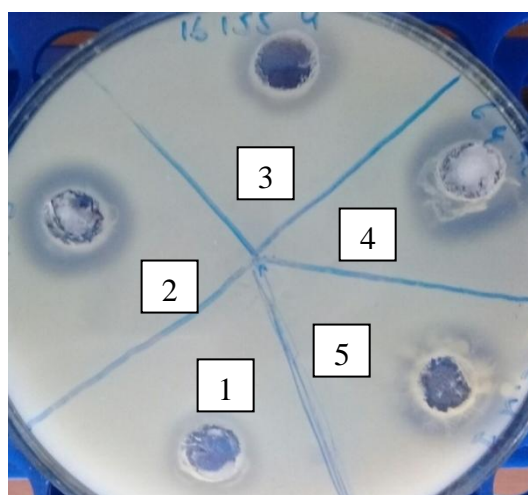


Рисунок 1 – Зоны просветления желточно-солевого агара при использовании семенной жидкости больного бесплодием и здорового донора.



1 – Здоровый донор
2,3,4,5 – больные бесплодием

Рисунок 2 – Активность ФЛА₂ в семенной жидкости больных и здоровых доноров

Полученные данные обсуждаются в свете того, что предложенный экспресс-метод оценки фосфолипазной активности семенной жидкости (секреторной ФЛА₂) с использованием гель-диффузии может быть использован для выявления корреляции между активностью фермента и диагностированным бесплодием, в дальнейшем может быть использован в диагностических целях.

Работа выполнена в рамках отдельного проекта фундаментальных и прикладных научных исследований НАН Беларуси, ПБП № 116-12-03-2019.

Литература

1. Способ определения эффекторных свойств физиологически активных соединений: пат. 5752 Респ. Беларусь, МПИ5 G 01 N 33/15, с 12 Q1/34 /

Н.М.Литвинко, [и др.]; заявитель Институт биоорганической химии НАН Беларуси – № а0000011; заявл. 04.01.00; опубл. 30.06.04; //Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2003. – С. 188.

2. Habermann, E. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases / E. Habermann, K.L. Hardt // J. Anal Biochem. – 1972. – Vol. 50, № – P. 163–173.

3. Рахуба, Г.Н. Липолитические реакции с участием фосфолипаз A_2 и механизмы их регуляции по принципу обратной связи: дис. ... канд. хим. наук : 03.00.04 / Г.Н., Рахуба. – Минск, 2007. – 143 л.

4. Тест-системы для выявления воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта по фотометрическому определению активности панкреатической фосфолипазы A_2 в крови / Н.М. Литвинко, В.С. Камышников, Л.А. Скоростецкая, Д.О. Герловский // ARS Medica. – 2011. - №13(49) – С. 66-75.