

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра молекулярной биологии**

Аннотация к дипломной работе

КВАШНИНА
Маргарита Александровна

**ЛИПОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ КАК МАРКЕРЫ
ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

Научный руководитель:
Доцент кафедры микробиологии,
Кандидат химических наук, доцент
Герловский Д.О.

Минск, 2025

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 53 с., 31 рис., 10 табл., 20 источников.

Ключевые слова: ФЛА 2, фосфолипаза А2, панкреатит, сыворотка крови, ферментативная активность, гидролиз, фосфолипид, ТСХ, спектрофотометрия, степень гидролиза.

Объект исследования: Сыворотки и спермоплазма здоровых и больных доноров.

Цель: установить клиническую значимость ФЛА 2.

Материалы и методы: В работе были применены следующие методы: перегонка растворителей, перекристаллизация веществ, ТСХ, спектрофотометрия, флэш-хроматография, выделение фосфолипидов.

Было разработано 3 метода определения активности фосфолипазы А2 в образцах больных и здоровых доноров: 1) экспрессный метод диффузии фермента в тонком слое агарозного геля – для качественной оценки активности по радиусу зоны просветления (наличие которых было свойственно только для больных т.е. у людей с повышенной фосфолипазной активностью, радиус зоны просветления СВ2, СВ4, СВ5, СВ7, СВ8 и СП1 варьировался от $3,07 \pm 0,05$ мм до $4,78 \pm 0,05$ мм, у СВ1, СВ3, СВ8 и СП2 зоны просветления не наблюдалось); 2) количественный метод с использованием ТСХ и спектрофотометрии, включая экстракцию продуктов и определение содержания фосфора. По значениям оптической плотности продукта и субстрата, произвели расчет степени гидролиза и скорости реакции по которым судили об активности фермента, показатели степени гидролиза практически не менялась у здорового человека ($h=20-23\%$) СВ1, СВ3, СП2, СВ6, в то время как у больных людей эти значения росли ($h=60-68\%$) СВ2, СВ4, СП1, СВ5, СВ7, СВ8. 3) метод позволяющий оценивать активность фосфолипазы по изменению оптических свойств гемоглобина в растворе, где гемоглобин выступает в качестве индикатора, который реагирует на продукты гидролиза – жирные кислоты и лизофосфолипиды, при этом происходит появление разностного спектра, что отражает активность фермента.

Все приведенные методы (экспрессный метод диффузии фермента в тонком слое агарозного геля, количественный метод с использованием ТСХ и спектрофотометрии, метод в присутствии гемоглобина в качестве индикатора степени фосфолиполиза) являются пригодными для сравнительного анализа активности фосфолипаз в биологических образцах, что дает нам возможность использовать фосфолипазу как один из маркеров для диагностики панкреатита.

РЭФЕРАТ

Дыпломная праца 53 с., 31 мал., 10 табл., 20 крыніц.

Ключавыя словы: ФЛА 2, фасфаліпаза A2, панкреатыт, сыватка крыві, ферментатыўная актыўнасць, гідроліз, фасфаліпідаў, ТСХ, спектрафатометрыя, ступень гідролізу.

Аб'ект даследавання: Сываткі і спермаплазма здаровых і хворых донараў.

Мэта: ўсталяваць клінічную значнасць ФЛА 2.

Матэрыялы і метады: У працы былі ўжытыя наступныя метады: перагонка растваральнікаў, перакрышталізацыя рэчываў, ТСХ, спектрафатометрыя, флэш-храматаграфія, вылучэнне фасфаліпідаў.

Было распрацавана 3 метаду вызначэння актыўнасці фосфолипазы A2 ва ўзорах хворых і здаровых донараў: 1) экспрэсны метад дыфузіі фермента ў тонкім пласце агарознага геля - для якаснай ацэнкі актыўнасці па радыусе зоны прасвятлення (наяўнасць якіх было ўласціва толькі для хворых т. Е. У людзей з падвышанай фосфолипаз CB5, CB7, CB8 і СП1 вар'іраваўся ад $3,07 \pm 0,05$ мм да $4,78 \pm 0,05$ мм, у CB1, CB3, CB8 і СП2 зоны прасвятлення не назіралася); 2) колькасны метад з выкарыстаннем ТСХ і спектрафатометрыі, уключаючы экстракцыю прадуктаў і вызначэнне зместу фосфару. Па значэннях аптычнай шчыльнасці прадукта і субстрата, зрабілі разлік ступені гідролізу і хуткасці рэакцыі па якіх судзілі аб актыўнасці фермента, паказчыкі ступень гідролізу практычна не змянялася ў здоровага чалавека ($h = 20-23\%$) CB1, CB3, СП2, CB6, у той час як у хворых людзей гэтыя значэння раслі ($h = 6026, 6\%$ CB7, CB8. 3) метад які дазваляе ацэньваць актыўнасць фасфаліпазы па змене аптычных уласцівасцяў гемаглабіну ў растворы, дзе гемаглабін выступае ў якасці індикатара, які рэагуе на прадукты гідролізу - тоўстыя кіслоты і лизофосфолипиды, пры гэтым адбываецца з'яўленне рознаснага спектру, што адлюстроўвае актыўнасць фермента.

Усе прыведзеныя метады (экспрэсны метад дыфузіі фермента ў тонкім пласце агарознага геля, колькасны метад з выкарыстаннем ТСХ і спектрафатометрыі, метад у прысутнасці гемаглабіну ў якасці індикатара ступені фасфаліполізу) з'яўляюцца прыдатнымі для параўнальнага аналізу актыўнасці фосфолипаз ў біялагічных узорах, што дае панкреатыту.

ABSTRACT

Diploma work 53 p., 31 fig., 10 tables, 20 sources.

Keywords: FLA 2, phospholipase A2, pancreatitis, blood serum, enzymatic activity, hydrolysis, phospholipid, TLC, spectrophotometry, degree of hydrolysis.

Object of the study: Sera and sperm plasma of healthy and sick donors.

Objective: to establish the clinical significance of FLA 2.

Materials and methods: The following methods were used in the work: distillation of solvents, recrystallization of substances, TLC, spectrophotometry, flash chromatography, isolation of phospholipids.

Three methods were developed for determining the activity of phospholipase A2 in samples from patients and healthy donors: 1) a rapid method of enzyme diffusion in a thin layer of agarose gel - for a qualitative assessment of activity by the radius of the clearing zone (the presence of which was characteristic only of patients, i.e. in people with increased phospholipase activity, the radius of the clearing zone of CB2, CB4, CB5, CB7, CB8 and SP1 varied from 3.07 ± 0.05 mm to 4.78 ± 0.05 mm, in CB1, CB3, CB8 and SP2 no clearing zone was observed); 2) a quantitative method using TLC and spectrophotometry, including extraction of products and determination of phosphorus content. Based on the optical density values of the product and substrate, the degree of hydrolysis and reaction rate were calculated, which were used to judge the enzyme activity. The degree of hydrolysis indicators remained virtually unchanged in healthy individuals ($h=20-23\%$) CB1, CB3, SP2, CB6, while in sick individuals these values increased ($h=60-68\%$) CB2, CB4, SP1, CB5, CB7, CB8. 3) a method that allows one to evaluate the activity of phospholipase by changing the optical properties of hemoglobin in a solution, where hemoglobin acts as an indicator that reacts to hydrolysis products – fatty acids and lysophospholipids, resulting in the appearance of a difference spectrum, which reflects the enzyme activity. All the methods presented (the rapid method of enzyme diffusion in a thin layer of agarose gel, the quantitative method using TLC and spectrophotometry, the method in the presence of hemoglobin as an indicator of the degree of phospholipolysis) are suitable for comparative analysis of phospholipase activity in biological samples, which gives us the opportunity to use phospholipase as one of the markers for the diagnosis of pancreatitis.

