

АКТИВНОСТЬ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ СПЕРМОПЛАЗМЫ ПРИ ОЦЕНКЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ МУЖСКОЙ ИНФЕРТИЛЬНОСТИ

Д.О. Герловский, Н.М. Литвинко

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

Актуальность. Мужское бесплодие является распространённой проблемой во всем мире. Для результативного лечения необходимо как можно раньше выявить заболевание репродуктивной системы и установить его этиологию. Для проведения ранней диагностики необходим поиск соответствующих молекул-маркеров, присутствие которых свидетельствовало бы о начале патологического процесса [1]. В качестве таких маркеров была изучена общая активность протеаз и фосфолипаз семенной жидкости в сопоставлении с общим количеством белка спермоплазмы. Как было нами ранее показано сопоставление уровня активности ФЛА₂ в семенной жидкости пациентов с диагнозом бесплодие и людей с нормальной репродуктивной функцией экспресс-методом гель-диффузии даёт возможность прогнозной оценки потенциальной мужской инфертильности [2]. Тем не менее, использованный метод гель-диффузии является полуколичественным, работает при сравнении опытного и контрольного образцов, и не даёт однозначного ответа на вопрос о конкретных значениях скоростей реакций гидролиза и активности ферментов [3].

Целью настоящей работы являлось изучение общей протеазной и ФЛА₂ активности в сопоставлении с общим количеством белка спермоплазмы у здорового донора и больного бесплодием. А также изучение субстратной специфичности ФЛА₂ спермоплазмы при количественном анализе.

Материалы и методы. В работе были использованы классические методы определения протеазной активности и общего количества белка с применением реактива Фолина. В случае изучения общей протеазной активности исследовали реакцию гидролиза белка под действием спермоплазмы течения 30 минут с использованием БСА (козеина) в качестве субстрата реакции. В качестве продукта реакции регистрировали количество образовавшегося тирозина. В случае изучения общей ФЛА₂ активности исследовали реакцию гидролиза фосфолипидов под действием спермоплазмы в течении 60 минут (для расчёта активности) и нескольких суток (для определения специфичности к субстрату) с использованием фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) в качестве субстрата реакции в составе смешанных мицелл фосфолипид:ТХ100 (1:3). В качестве продуктов реакции регистрировали количество образовавшегося лизолипида и исходного субстрата, разделённых методом ТСХ (Рисунок 1), с последующим анализом соответствующих пятен на количественное содержание фосфора методом Васьковского [4].

Результаты и выводы. Изучение общей протеазной активности при гидролизе белка под действием спермоплазмы течения 30 минут с использованием БСА (козеина) в качестве субстрата

реакции в вышеописанных условиях эксперимента показало значение скоростей реакции гидролиза на уровне 0,12 мкмоль/мл*мин для больного с диагнозом бесплодие и 0,062 мкмоль/мл*мин – для здорового донора, из чего можно сделать вывод об увеличении активности в два раза. Концентрация белка в условиях эксперимента *in vitro* для больного с диагнозом бесплодие и для здорового донора не отличалась и составила 0,88 мг/мл, что в пересчёте на исходный образец спермоплазмы составляло 8,8 мг/мл. Определённое значение концентрации белка несколько ниже литературных данных (70 мг/мл), что может объясняться временем хранения исследованных образцов, содержащих протеазную активность. Конечная общая протеазная активность спермоплазмы в пересчёте на мг белка составила 0,136 МЕ/мг в случае больного и 0,07 МЕ/мг в случае здорового доноров, что свидетельствует об увеличении активности ферментов при развитии заболевания.

Изучение общей ФЛА₂ активности при гидролизе фосфолипидов под действием спермоплазмы с использованием фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) в качестве субстрата реакции в составе смешанных мицелл фосфолипид:ТХ100 (1:3), показало наличие пятен гидролизованного субстрата, что может свидетельствовать о достаточной чувствительности метода с использованием ТСХ для анализа активности данного фермента (Рисунок 1).

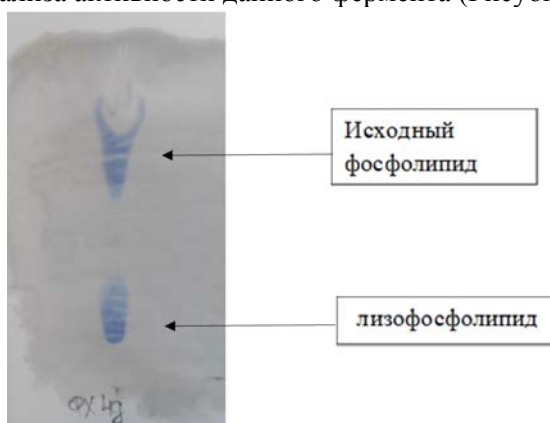


Рисунок 1. – Наличие пятна гидролизованного субстрата (ФХ, ФЭА) после инкубации со спермоплазмой.

Значение скоростей реакции гидролиза под действие ФЛА₂ спермоплазмы в течении 60 минут в условиях эксперимента составило 0,0026 мкмоль/мин*мл для здорового донора и 0,0195 мкмоль/мин*мл – для больного, что с учётом количественного содержания белка спермоплазмы составляет 0,003 МЕ/мг для здорового донора и 0,022 МЕ/мг – для больного. Полученные данные свидетельствуют об увеличении активности ФЛА₂ при развитии патологии. Сравнение степени увеличения активности двух гидролаз говорит о большей чувствительности ФЛА₂ при использовании в качестве маркера заболевания.

Подбор субстрата для изучения общей активности ФЛА₂ в реакции гидролиза фосфолипидов под действием спермоплазмы в течении нескольких суток показал предпочтительное использование фосфатидилхолина (ФХ) в качестве субстрата реакции в сравнении с фосфатидилэтаноламином (ФЭА) в составе смешанных мицелл фосфолипид:ТХ100 (1:3) (рисунок 2).

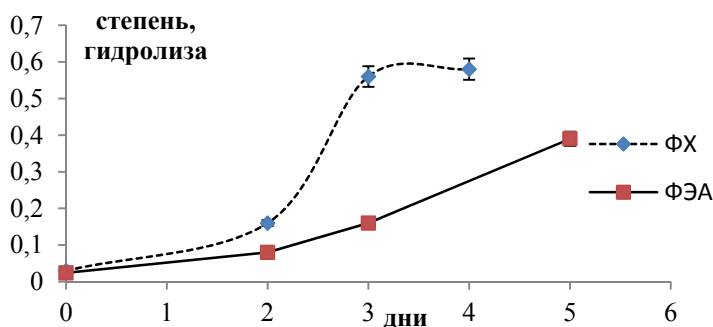


Рисунок 2. – Зависимость степени гидролиза фосфолипидов, выраженной в долях единицы, от времени реакции под действием ФЛА₂ спермоплазмы при использовании ФХ и ФЭА.

Заключение. Таким образом, в дополнении к ранее изученному методу гель-диффузии, полученные результаты свидетельствуют об увеличении активности изученных гидролаз при развитии патологического процесса, а также возможности использования метода ТСХ для количественного анализа активности ФЛА₂ спермоплазмы, с предпочтительным использованием фосфатидилхолина (ФХ) в качестве субстрата реакции.

Список использованных источников

1. Камышников В.С. Клиническая лабораторная диагностика (методы и трактовка лабораторных исследований) / В. С. Камышников [и др.]; под общ. ред. В.С. Камышникова. М.:МЕВ пресс-информ., 2015. – 720 с.
2. Папино Д.С., Литвинко Н.М., Герловский Д.О. Использование метода определения лецитиназной активности при диффузии фермента в желточно-солевой агар для диагностики заболеваний репродуктивной системы/Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнологии микроорганизмов», г. Минск, 27-29 ноября 2019 г., С.379 – 381.
3. Литвинко Н. М. Набор реагентов «ФЛА2-ФОА» для определения активности панкреатической фосфолипазы А₂ в крови человека методом фотометрического анализа / Литвинко Н. М., Камышников В. С., Воробей А. В., Вижинис Ю. И., Юрага Т. М., Скоростецкая Л. А. //Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2016, С. 121.
4. Vaskovsky, V.E. A universal reagent for phospholipid analysis / V.E. Vaskovsky, E.Y. Kostetsky, J.M. Vasendin // J. of Chromatography. – 1975. – Vol. 114, № 1. – P. 129 –141.