

Определение фосфолипазной активности спермоплазмы больных бесплодием в качестве возможного диагностического подхода к установлению мужского бесплодия

ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь.

По данным ВОЗ 10-15% супружеских пар имеют проблемы с зачатием. При этом в 30-50% случаев бесплодие вызывается infertility у женщины. Фосфолипаза А₂ (КФ 3.1.1.4., ФЛА₂) известна как маркер воспалительно-деструктивных процессов в организме. Установлено, что ФЛА₂, участвуя в липидном обмене, регулирует процесс созревания сперматозоидов [1] и, следовательно, может служить диагностическим маркером готовности сперматозоидов к реализации своей основной функции. Нами обнаружена активация ФЛА₂ в спермоплазме у пациентов с бесплодием по сравнению со здоровыми людьми [2]. Цель данной работы – определение уровня фосфолипазной активности в спермоплазме и сыворотке крови пациентов с бесплодием в сравнении с больными ревматоидным артритом, характерным биохимическим признаком которого является повышенная активность ФЛА₂, как возможного критерия установления мужского бесплодия.

Для определения активности ФЛА₂ в сыворотке крови человека применяли разработанный ранее метод, в котором в качестве индикатора фосфолипазной реакции используется переход гемоглобина (Hb, Sigma, США) в гемихром. Реакционная смесь (4,2 мл на одну пробу) содержала 0,05М Трис-НСI-буферный раствор, рН 8,0, кофактор - 1 мМ СаCl₂ (конечная концентрация), Hb (конечная реакция 5 мкМ по гемю) и спермоплазму/сыворотку больных (от 1 до 20 мкл на 1 мл раствора). В качестве субстрата ФЛА₂ использовали смешанные мицеллы фосфатидилхолина яичного желтка (ФХ, Sigma) с желчной кислотой дезоксихолатом натрия (ДОХ, 72 мМ) в качестве детергента (соотношение ФХ/детергент=1/3, моль/моль). Реакционную смесь разливали в 2 кюветы по 2 мл, реакцию инициировали добавлением в опытную кювету 50 мкл раствора смешанных мицелл субстрата. В кювету сравнения добавляли такое же количество буферного раствора. Кюветы помещали в термостат (37° С) для проведения ферментативной реакции.

Через 30, 60, 120 и 180 минут кюветы доставали и записывали попарно дифференциальные спектры на спектрофотометре Спекорд uv-vis (Германия) либо определяли дифференциальную оптическую плотность (опытной кюветы против контрольной) на спектрофотометре Солар РV 1251С при длине волны 423 нм.

Показано, что активность ФЛА₂ в сыворотке крови больных бесплодием (группа 1) в 2 раза ниже, чем у пациентов с ревматоидным артритом (группа 2), в то время как в спермоплазме первой группы людей фермент активирован в 6 раз больше, чем в сыворотке крови второй группы и в 10 раз выше, чем в своей группе. Полученные результаты обсуждаются в свете возможного диагностического подхода к установлению мужского бесплодия.

Литература

1. Sato H. et al . J. Clin Invest. 2010; 120(5), P.1400–1414. doi:10.1172/JCI40493.
2. Папино Д.С., Литвинко Н.М., Герловский Д.О. Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнологии микроорганизмов», г. Минск, 27-29 ноября 2019 г., С.379 – 381.