

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

Кафедра клинической лабораторной диагностики

**КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ
ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБЩЕЙ АКТИВНОСТИ
ФОСФОЛИПАЗЫ А₂ ПРИ ФОРМАХ МЕМБРАННОЙ
ПАТОЛОГИИ, СОПРОВОЖДАЮЩИХСЯ РАЗВИТИЕМ
ВОСПАЛИТЕЛЬНО-ДЕСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ
В ОРГАНИЗМЕ**

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано учебно-методическим объединением
в сфере дополнительного образования взрослых
по профилю образования «Здравоохранение»

Минск БелМАПО

2021

УДК 577.152.3:544.6.076.242]:616-092-002-07(075.9)

ББК 53.4_я73

К 49

Рекомендовано в качестве учебно-методического пособия
НМС Государственного учреждения образования
«Белорусская медицинская академия последипломного образования»
протокол № 8 от 28.12.2020

Рекомендовано учебно-методическим объединением в сфере дополнительного
образования взрослых по профилю образования «Здравоохранение»
от 22 марта 2021 года (протокол № 1)

Авторы:

Камышников В.С., заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики БелМАПО, д.м.н., профессор

Литвинко Н.М., начальник Отдела научно-аналитической работы аппарата Национальной академии наук Беларуси, заведующий лабораторией прикладной энзимологии ИБОХ НАН Беларуси, д.х.н., доцент

Пехтерева Н.В., соискатель кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО;

Юрага Т.М., старший научный сотрудник Научно-исследовательской лаборатории БелМАПО;

Яковлев-Малых Н.Н., старший преподаватель кафедры клинической лабораторной диагностики БелМАПО

Герловский Д.О., научный сотрудник лаборатории прикладной энзимологии ИБОХ НАН Беларуси, к.х.н.

Скоростецкая Л.А., старший научный сотрудник лаборатории прикладной энзимологии ИБОХ НАН Беларуси

Рецензенты:

Сердюченко Н.С., Академик-секретарь Отделения медицинских наук НАН Беларуси, член-корреспондент, д.м.н., профессор

Борисенко Т.Б., врач лабораторной диагностики (заведующий) клинко-диагностической лаборатории УЗ «1-я городская клиническая больница» г. Минска, к.м.н.

Кафедра биохимии УО «Белорусский государственный медицинский университет»

К 49

Клинико-патогенетическая и диагностическая значимость исследования общей активности фосфолипазы A_2 при формах мембранной патологии, сопровождающихся развитием воспалительно-деструктивных процессов в организме: учеб.-метод. пособие / В.С. Камышников [и др.]. – Минск: БелМАПО, 2021. – 31 с.

ISBN 978-985-584-558-5

В учебно-методическом пособии отражены основные результаты выполнения научно-исследовательских работ, реализованных в рамках творческого сотрудничества специалистов БелМАПО с Институтом биоорганической химии НАН Беларуси, приведшего к разработке новой методологии и созданию на ее основе оригинальной технологии оценки защитной функции липидной фазы липидно-белковых структур мембран и биологических жидкостей.

Представлены современные сведения о механизмах участия ФЛА₂ в формировании мембранной патологии, а также о значимости исследования активности ферментов семейства фосфолипаз A_2 в решении проблемы ранней диагностики и оценки прогноза осложненного течения ишемической болезни сердца.

Учебно-методическое пособие предназначено для слушателей, осваивающих содержание образовательных программ: переподготовки по специальностям «Клиническая лабораторная диагностика» «Урология», «Кардиология», «Онкология», «Акушерство и гинекология», «Хирургия»; повышения квалификации врачей лабораторной диагностики, врачей-терапевтов, врачей-кардиологов, врачей-урологов и других специальностей.

УДК 577.152.3:544.6.076.242]:616-092-002-07(075.9)

ББК 53.4_я73

ISBN 978-985-584-558-5

© Камышников В.С., [и др.], 2021

© Оформление БелМАПО, 2021

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
Перечень сокращений.....	6
1. Общее представление о семействе фосфолипаз A_2 и механизмах их участия в формировании мембранной патологии.....	7
2. Сопряженность путей окислительной трансформации фосфолипидов с системами биохимической защиты организма: роль фосфолипазы A_2 в обеспечении сопряжения и развитии отдельных форм мембранной патологии.....	9
3. Фосфолипаза A_2 как маркер воспалительно-деструктивных процессов в организме.....	10
3.1. Участие липопротеин-ассоциированной и секреторной фосфолипаз A_2 в механизмах формирования атерогенных нарушений.....	10
3.2. Участие фосфолипаз A_2 в воспалительных процессах.....	12
3.3. Участие фосфолипаз A_2 в регуляции структурно-функционального состояния мембран клеток и формировании мембранной патологии.....	13
4. Технологии исследования содержания (активности) ферментов семейства фосфолипазы A_2	15
5. Разработка методологии исследования осуществляемого фосфолипазой A_2 сопряжения ферментативного превращения фосфолипидов с системами биохимической защиты	17
6. Значимость разработанного метода оценки способности биологических жидкостей ингибировать процесс активации свободно-радикального окисления «in vitro», основанного на определении общей активности фосфолипазы A_2	21
7. Результаты апробации разработанного метода оценки состояния защитных, антиоксидантных свойств липидной фазы липидно-белковых комплексов по характеру изменения показателей общей активности фосфолипазы A_2 до и после облучения реакционной смеси коротковолновым монохроматическим световым потоком.....	23
Заключение.....	28
Список литературы.....	29

ВВЕДЕНИЕ

В настоящем учебно-методическом пособии отражены общие сведения об отдельных представителях семейства фосфолипаз A_2 , их роли в формировании мембранной патологии при заболеваниях, сопровождающихся воспалительно-деструктивными изменениями в тканевых элементах васкулярной и других систем организма, а также о методологии и лабораторно-диагностической значимости определения активности фосфолипазы A_2 .

В учебном пособии представлено описание методов исследования, разработанных в ходе выполнения пяти заданий НИР, реализованных в период 2010-2020 гг.:

1. Задание ГП «Импортозамещающая фармпродукция» (подпрограмма «Диагностикумы») – «Разработка и апробация новой биохимической тест-системы для выявления воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта по фотометрическому определению активности панкреатической фосфолипазы A_2 в крови» (научные руководители: доцент, доктор хим. наук Литвинко Н.М. и профессор, доктор мед. наук Камышников В.С.; срок выполнения: 2010 – 2014 гг. и на период до 2020 г.);

2. Задание ГП «Импортозамещающая фармпродукция» (подпрограмма «Диагностикумы») – «Разработка и освоение технологии производства набора реагентов для характеристики антирадикальной активности фармсубстанций и биологических жидкостей на базе стабильных радикалов» (научные руководители темы НИР – доктор хим. наук Киселев П.А., профессор, доктор мед. наук Камышников В.С.; срок выполнения: 2011 – 2015 гг.);

3. Задание ГПНИ «Конвергенция» «Лабораторная верификация патохимических изменений в поджелудочной железе при экспериментальном панкреатите» (научные руководители и исполнители темы: доцент, доктор хим. наук Литвинко Н.М., профессор, доктор мед. наук Камышников В.С., профессор, доктор мед. наук Воробей А.В., старший научный сотрудник НИЛ БелМАПО Юрага Т.М.; срок выполнения: 2015 г.);

4. ГПНИ «Химические технологии и материалы» (подпрограммы «Биологически активные вещества»), тема НИР «Клинико-лабораторное обоснование методологии исследования и оценки состояния защитных свойств биологических жидкостей при мембранной патологии» по заданию «Сопряжение превращения фосфолипидов с системами биохимической защиты при патологических состояниях организма» (Государственный заказчик Национальная академия наук Беларуси и Министерство образования Республики Беларусь; организации-исполнители: ИБОХ НАН Беларуси, БГУ, БелМАПО; научные руководители: доцент, доктор хим. наук

Литвинко Н.М., профессор, доктор мед. наук Камышников В.С.; срок выполнения: 2 кв. 2016 г. – 4 кв. 2020 г.);

5. Задание БРФФИ – «Разработка инновационных технологий лабораторного исследования предикторов осложненного течения ИБС на основе оценки характера сопряжения процессов антиокислительной защиты, протео- и фосфолиполиза» (научный руководитель: профессор, доктор мед. наук Камышников В.С., ответственный исполнитель: Яковлев-Малых Н.Н.; срок выполнения: 2 кв. 2018 г. – 1 кв. 2020 г.).

Новые лабораторные методы исследования активности фосфолипаз A_2 созданы в рамках тесного творческого сотрудничества БелМАПО с Институтом биоорганической химии НАН Беларуси. В условиях эксперимента на животных и в клинике апробирован разработанный метод определения активности панкреатической фосфолипазы A_2 , предложен способ определения общей активности фосфолипазы A_2 , а также разработана новая, не имеющая аналогов методология оценки защитной, антиоксидантной способности липидной фазы липидно-белковых структур при воздействии на биологический объект факторов, индуцирующих состояние оксидативного стресса. Обосновано использование теста определения общей активности фосфолипазы A_2 в качестве нового, весьма информативного биомаркера деструктивных процессов в организме, вызываемых влиянием факторов инициации оксидативного стресса.

Все разработки способствуют совершенствованию технологий лабораторно-диагностического исследования пациентов с использованием созданных в ходе выполнения заданий НИР оригинальных отечественных тест-систем, производство которых осуществляется на базе Хозрасчетного опытного предприятия НАН Беларуси.

Авторы учебно-методического пособия выражают надежду на то, что изложенные в нем сведения о сути новой методологии и принципах реализации новых методов лабораторного исследования составят необходимую основу для дальнейшего широкого их использования в медицинской практике.

Перечень сокращений

АО – антиоксиданты
АОА – антиоксидантная активность
АОЗ – антиоксидантная защита
АОС – антиоксидантная система
вчСРБ – высокочувствительный СРБ
ГП – государственная программа
ГПНИ – государственная программа научных исследований
ДК₂₃₃ – диеновые конъюгаты
ДК₂₇₈ – диенкетоны
ЖК – жирные кислоты
ИБОХ – институт биоорганической химии
ИБС – ишемическая болезнь сердца
ИМ – инфаркт миокарда
лизоФХ – лизофосфатидилхолины
ЛПВП – липопротеины высокой плотности
ЛПНП – липопротеины низкой плотности
ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности
ЛП-ФЛА₂ – липопротеинассоциированная фосфолипаза А₂
МДА – малоновый диальдегид
ММП – матриксные металлопротеиназы
НАН – национальная академия наук
НИЛ – научно-исследовательская лаборатория
ОКС – острый коронарный синдром
окЛПНП – окисленные липопротеины низкой плотности
окФЛ – окисленные фосфолипиды
ОС – окислительный стресс
ПОЛ – перекисное окисление липидов
сФЛА₂ – секреторная фосфолипаза А₂
СР – свободные радикалы
СРБ – С-реактивный белок
СРО – свободно-радикальное окисление
ФАТ-ацетилгидролаза – фактор активации тромбоцитов-ацетилгидролаза
ФЛ – фосфолипиды
ФЛА₂ – фосфолипаза А₂
ФЛА₂-ФОА – набор реагентов для определения активности панкреатической фосфолипазы
ФХ – фосфатидилхолины

1. Общее представление о семействе фосфолипаз A_2 и механизмах их участия в формировании мембранной патологии

Фосфолипазы (фосфатацилгидролазы) — ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление сложноэфирных связей в молекулах фосфолипидов. Фосфолипиды (ФЛ), именуемые также фосфатидами, представляют собой класс органических соединений – фосфорилированных липидов, содержащих в составе своих молекул помимо жирных кислот и фосфорилированного остатка аминок спирта (холина, этаноламина и т.д.) трехатомный спирт глицерол (глицериновые ФЛ) либо двухатомный ненасыщенный аминок спирт сфингозин, другие спирты – диолы (неглицериновые фосфолипиды). В зависимости от того, какая из четырех эфирных связей молекул фосфолипидов гидролизуется ферментом, различают несколько видов фосфолипаз: *A*, *B*, *C*, *D*. Известна также цифровая номенклатура фосфолипаз, соответствующая положению расщепляемой сложноэфирной связи: 1, 2, 3, 4 [7].

Фосфолипазы, как и все липолитические ферменты, отличаются от остальных энзимов тем, что осуществляют свою каталитическую функцию не в свободном объеме, а на поверхности раздела фаз липид-вода. Активация эндогенных мембранных фосфолипаз является одним из основных процессов, приводящих к нарушению барьерной функции липидного бислоя при патологии [7].

К семейству фосфолипаз A_2 (ФЛА₂) относятся ферменты (липопротеин-ассоциированная, секреторные и др.), характеризующиеся способностью высвобождать из молекул фосфолипидов остаток полиненасыщенной жирной кислоты, занимающий второе (по расположению ОН-групп) место в молекуле трехатомного спирта глицерола.

При этом происходит превращение молекулы фосфолипида в биоактивный продукт – лизофосфолипид, производящий выраженный детергентный и провоспалительный эффекты, и в жирную кислоту, служащую источником образования различных медиаторов биохимических процессов: простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов.

Известно, что арахидоновая кислота (основной продукт вызываемой ФЛА₂ «деградации» фосфолипидов) является исходным субстратом для образования (с участием циклооксигеназы) тромбаксана и простагландинов, а с участием липоксигеназы – лейкотриенов и липоксинов, что сказывается на изменении состояния регуляции метаболических процессов в клетке. Таким образом, активация ФЛА₂ способна приводить как к нарушению структурно-функциональных свойств мембран клеток, так и к изменению в них процессов метаболизма.

ФЛА₂ является одним из наиболее важных ферментов трансформации фосфолипидов, составляющих липидную фазу всех без исключения мембран клеток организма, в том числе плазматических, митохондриальных, лизосомальных, а также мономолекулярного слоя липидно-белковых комплексов (липопротеинов) плазмы. ФЛА₂ обнаружена практически во всех тканях человеческого организма, и ее нахождение в нем не ограничивается каким-то определенным местом локализации.

Характерной особенностью ФЛА₂ является то, что она осуществляет свою каталитическую функцию на поверхности «липид-вода». Таким своеобразным «водоразделом» и служат все биологические мембраны, состоящие из двух основных липидных компонентов (фосфолипидов несколько разной химической природы и свободного холестерина).

С учетом того обстоятельства, что все клетки человеческого организма состоят главным образом из мембран (на их долю приходится, например, около 80% массы сухой ткани легких), изменения их структурно-функциональных свойств вследствие вызываемой ФЛА₂ трансформацией фосфолипидов в другие продукты не могут не отразиться на структурно-функциональных, биофизических свойствах фосфолипидов мембран, состоянии их проницаемости, а, следовательно, – на формировании мембранной патологии, к которой относится большинство из часто встречающихся соматических заболеваний.

К тому же, имеет значение и высвобождение под влиянием фермента жирных кислот, служащих источником образования биологически активных продуктов – простагландинов, простациклинов и других, – оказывающих характерное влияние на метаболизм клеток.

Установлено, что ФЛА₂ проявляет наиболее высокую селективность («средство») к окисленным жирным кислотам и поэтому осуществляет гидролиз преимущественно окисленных фосфолипидов мембран и липидно-белковых комплексов биологических жидкостей. Она обладает уникальной способностью – удалять окисленные фосфолипиды, восстанавливая нарушенную микроструктуру мембран, и выступать тем самым в качестве защитной реакции по отношению к влиянию факторов инициации оксидативного стресса [1, 13].

2. Сопряженность путей окислительной трансформации фосфолипидов с системами биохимической защиты организма: роль фосфолипазы А2 в обеспечении сопряжения и развитии отдельных форм мембранной патологии

Липопротейн-ассоциированная фосфолипаза А2 (Лп-ФЛА2) была открыта в 1983 году как фермент, разрушающий фактор активации тромбоцитов (ФАТ), в силу чего она получила известность под названием «ФАТ-ацетилгидролаза». Лп-ФЛА₂ представляет собой Са²⁺-независимый фермент с молекулярной массой 45 кДа, действующий преимущественно на водорастворимые, полярные фосфолипиды с «усеченными» в процессе окисления *sn*-2 жирнокислотными цепями, не проявляя при этом энзиматической активности в отношении длинноцепочечных жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов клеточных мембран.

Продукция ЛП-ФЛА₂ осуществляется клетками, вовлеченными в процесс воспаления, – такими, как макрофаги, моноциты, тучные клетки, клетки Купфера и Т-лимфоциты, т.е. «воспалительными» клетками миелоидного происхождения.

К тому же, ЛП-ФЛА₂ активно продуцируется пенистыми клетками, находящимися внутри уязвимых бляшек стенки артериальных сосудов.

После попадания фермента в русло крови ЛП-ФЛА₂ связывается в основном с апо-В липопротейнов низкой плотности и с липопротейном (а). В норме около 80% ЛП-ФЛА₂ плазмы крови находятся в составе комплекса с ЛПНП, остальные 20% – с липопротейнами высокой плотности (ЛПВП) и липопротейнами очень низкой плотности (ЛПОНП).

При проникновении такого комплекса из русла крови в эндотелий сосудистой стенки в условиях оксидативного стресса (ОС) (как одного из факторов атерогенеза) происходит окисление всех компонентов ЛПНП, в результате чего образуются обладающие наиболее высокой атерогенностью окисленные липопротейны низкой плотности (окЛПНП), содержащие в себе окисленные фосфолипиды (ок-ФЛ), которые выступают в роли активатора липопротейн-ассоциированной ФЛА₂. При этом степень повышения активности ЛП-ФЛА₂ соответствует объему образования окисленных фосфолипидов в окЛПНП.

В результате гидролиза ок-ФЛ, осуществляемого ЛП-ФЛА₂, образуются провоспалительные и проатерогенные продукты, каковыми являются лизофосфатидилхолины (лизоФХ) и окисленные жирные кислоты (окЖК), проявляющие, в частности, способность выступать в качестве молекул адгезии моноцитов: будучи привлечены в интиму, моноциты дифференцируются в ней в макрофаги, которые, в свою очередь,

превращаются в пенные клетки. Свободная же арахидоновая кислота, высвобождающаяся в процессе ферментативного гидролиза фосфолипидов, превращается под влиянием циклооксигеназы в тромбин и простагландины, а с участием липоксигеназы, – в лейкотриены и липоксины. Эти биологически активные вещества способны оказать существенное влияние на каждую клетку жизненно важных органов.

Секреторная фосфолипаза A₂ (сФЛА₂) – это другой фермент из семейства фосфолипаз A₂. СекФЛА₂ представляет собой Ca²⁺-зависимый фермент с молекулярной массой 14 кДа. Наиболее активно ферментативную активность подавляют вещества, связывающие кальций – ЭДТА и др.

ФЛА₂ присутствует в эндоплазматическом ретикулуме оседлых макрофагов, тучных клеток, тромбоцитов, фибробластов, а также в клетках печени, селезенки, тимуса, костного мозга и кишечника. Клетки интимы (пула интерстициальной ткани) также способны секретировать ФЛА₂.

Секрецию ФЛА₂ активируют первичные медиаторы биологической реакции воспаления (провоспалительные интерлейкины и интерферон γ), липополисахариды, форболовые эфиры и факторы роста.

Таким образом, сФЛА₂ следует рассматривать как белок острой фазы, содержание которого определяется уровнем секреции низкомолекулярных воспалительных маркеров – цитокинов и др. (в том числе интерлейкина-1 β , фактора некроза опухоли- α и интерферона). В отличие от ЛП-ФЛА₂ уровень сФЛА₂ коррелирует с содержанием С-реактивного белка (СРБ).

Глюкокортикоиды и противовоспалительные нестероидные препараты ингибируют высвобождение из клеток сФЛА₂.

Активно секретуют ФЛА₂ клетки рыхлой соединительной ткани, что дает основание судить об участии этого фермента в патогенезе различных системных заболеваний соединительной ткани. Показано, что сФЛА₂ имеет тесную пространственную связь с коллагеновыми волокнами [5, 6].

3. Фосфолипаза A₂ как маркер воспалительно-деструктивных процессов в организме

3.1. Участие липопротеин-ассоциированной и секреторной фосфолипаз A₂ в механизмах формирования атерогенных нарушений

ЛП-ФЛА₂ способна проявлять не только прямое влияние на состояние обменных процессов в организме, но и опосредованное, реализуемое высвобождаемыми при ферментативном распаде фосфолипидов лизофосфатидилхолинами (ЛФХ) и окисленными жирными кислотами

(окЖК), обладающими свойством оказывать провоспалительный и проатерогенный эффекты.

Попадающие в интиму сосудов моноциты, дифференцирующиеся в ней в макрофаги с последующим превращением в пенистые клетки, участвуют в секреции ЛП-ФЛА₂, локально увеличивая концентрацию этого фермента в самой сосудистой стенке, особенно атеросклеротически измененной. Этим и объясняется то обстоятельство, что ЛП-ФЛА₂ в большом количестве обнаруживается в атеросклеротических бляшках, имеющих некротическое ядро и склонных к разрыву: по мнению многих авторов, фермент именно оттуда попадает в кровоток при выраженных атерогенных нарушениях в организме.

Оказалось, что провоспалительный эффект влияния липопротеин-ассоциированной ФЛА₂ метаболически тесно сопряжен с производимым ею проатерогенным эффектом, в проявлении которого участвуют и продукты метаболизма фосфолипидов. Так, установлено, что лизо-ФХ присуща способность вызывать локальный синтез матриксных металлопротеиназ (ММП) – ферментов, разрушающих коллагеновый «каркас» оболочки атероматозной бляшки, создавая условия к ее разрыву и последующей эмболизации липидным детритом мелких сосудов сердца.

Таким образом, повышенное содержание ЛП-ФЛА₂ в сыворотке крови указывает на наличие атеросклеротической бляшки, склонной к разрыву, и является независимым фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе коронарного атеросклероза, инфаркта миокарда и мозгового инсульта [11].

При этом следует иметь в виду, что ЛП-ФЛА₂ способна проявлять не только атерогенный, но и антиатерогенный эффект: вследствие снижения предрасположенности к тромбообразованию за счет гидролитического разрушения фактора активации тромбоцитов (прежнее название ЛП-ФЛА₂ – «ФАТ-ацетилгидролаза», или ацетилгидролаза фактора активации тромбоцитов) и уменьшения содержания в структуре мембран и липидно-белковых комплексов окисленных фосфолипидов с присущим им проатерогенным действием.

Подобно ЛП-ФЛА₂ сФЛА₂ имеет отношение как к развитию воспалительных процессов в стенке сосудов, так и к атерогенезу. Показано присутствие сФЛА₂ в гладкомышечных клетках стенки нативных артерий; у пациентов с ИБС она выявлена в липидном ядре атеросклеротических бляшек, а именно, – в богатых макрофагами его участках, а также во внеклеточном матриксе поврежденной интимы.

3.2. Участие фосфолипаз A_2 в воспалительных процессах

В силу характерных особенностей, проявляемых метаболическим влиянием ЛП-ФЛА₂, этот фермент рассматривают как провоспалительный фермент, специфичный в отношении индикации *сосудистого воспаления*. По этой причине установление активности ЛП-ФЛА₂ рассматривают как высокоспецифичный тест (маркер) именно васкулярного, сосудистого, но не системного воспаления, о котором обычно принято судить на основании результатов определения высокочувствительного С-реактивного белка (вЧСРБ). При этом тест определения активности ЛП-ФЛА₂ оказывается в 100 раз более чувствительным в отношении выявления сосудистого воспаления, чем тест определения вЧСРБ! [16].

Высокое содержание фосфолипаз A_2 в плазме (сыворотке) крови отмечено при многих воспалительных заболеваниях, в том числе при панкреатите, ревматоидном артрите, сепсисе, а также при заболеваниях легких, псориазе, болезни Крона.

При воспалительных процессах, вызванных бактериями, сФЛА₂ участвует в первичной защите организма от этих патогенных микроорганизмов. Установлено, что у пациентов с бактериальными инфекциями обнаруживается высокая концентрация сФЛА₂ в сыворотке крови, слезах, семенной плазме.

Одной из разновидностей фосфолипаз, претерпевающих увеличение активности при развитии воспалительных и деструктивных процессов в поджелудочной железе, является термостабильная, *панкреатическая фосфолипаза A_2* . Она рассматривается как патогенетический фактор формирования воспалительного и некробиотического процесса при деструктивной форме панкреатита [14]. Так, исследование сыворотки крови у пациентов с разными формами панкреатита показало значительное увеличение активности панкреатической ФЛА₂ лишь у лиц с деструктивной формой панкреатита, в то время как при остром отечном и хроническом панкреатите активность фермента была в норме. Установлена строгая корреляция между показателями смертности и активности панкреатической ФЛА₂ в сыворотке пациентов с *некротическим панкреатитом* [3].

Полученные в последнее десятилетие результаты показали важную роль нарушений про-/антиоксидантного статуса в становлении *мужской инфертильности*. Усиление процессов свободнорадикального окисления липидов влечет за собой нарушение состояния мембранных структур клеток, чему не может не способствовать индуцируемое окисленными фосфолипидами повышение активности фосфолипазы A_2 , под влиянием

которой усиливается образование лизофосфолипидов (лизолецитинов и др.). Сопровождаемое этими метаболическими сдвигами изменение биофизических, структурно-функциональных свойств мембран (в том числе сперматозоидов), проявляемое повышением микровязкости их липидной фазы, не может не отразиться на функциональном состоянии спермиев (в том числе их подвижности). А параллельно происходящее увеличение содержания ряда других биологически активных веществ (простагландинов, простоциклинов, иных метаболитов арахидоновой кислоты), в свою очередь, приносят свойственный им провоспалительный эффект, который еще более влияет на изменение свойств семенной плазмы.

В результате выполненного нами исследования установлены существенные изменения общей активности ФЛА₂ в спермоплазме и сыворотке крови мужчин, страдающих суб- и инфертильностью, что дает основание рассматривать сдвиги в активности этого фермента как один из важных факторов патогенеза этого расстройства [2, 9, 10,11].

3.3. Участие фосфолипаз А₂ в регуляции структурно-функционального состояния мембран клеток и формировании мембранной патологии

Оксидативный стресс (ОС) как основной фактор формирования мембранной патологии проявляется нарушением баланса, «равновесия» между состоянием про- и антиоксидантной активностью биологических жидкостей и тканей: чаще всего вследствие ослабления антиоксидантной защиты организма. В результате создаются благоприятные условия для непосредственного воздействия молекулярного кислорода и его активных форм на остатки полиненасыщенных жирных кислот фосфолипидов с образованием их гидрофильных производных – ацилгидроперекисей, совокупность которых формирует своеобразные очаги ее повышенной проницаемости для содержимого клеток. Происходящее при этом нарушение упорядоченности структуры липидной фазы мембран, ее своеобразное «разрыхление», в свою очередь, способствует более легкому проникновению кислорода вглубь мембраны и, тем самым, – дальнейшему все более нарастающему окислению фосфолипидов [4, 15].

Поскольку окисленные фосфолипиды являются наилучшим субстратом для ФЛА₂, активность ее значительно повышается, что приводит к удалению и расщеплению их молекул с образованием лизофосфатидилхолинов и окисленных полиненасыщенных жирных кислот. Лизофосфатидилхолины (провоспалительные липиды), будучи детергентами, еще более нарушают структурно-функциональные свойства мембраны. При этом из мембраны

исчезают легкоокисляемые фосфолипиды (кефалины и др.), обуславливающие текучесть (малую микровязкость клетки), в результате чего мембрана обогащается насыщенными, малоподвижными фосфолипидами, что существенно нарушает ее биофизические свойства, повышает микровязкость. К тому же, изменяется липидное окружение встроенных в мембрану рецепторов (аденилатциклазы), воспринимающих сигналы со стороны гормонов белковой природы.

Другой продукт ферментативного гидролиза молекулы фосфолипида – свободная жирная кислота, например, арахидоновая, превращается под влиянием циклооксигеназы в тромбоксан и простагландины, а с участием липооксигеназы – в лейкотриены и липоксины, т.е. в биологически активные вещества, оказывающие существенное влияние на процессы метаболизма в клетке.

Таким образом, увеличение активности ФЛА₂ способствует усугублению нарушений метаболизма в клетке и выраженности мембранной патологии вследствие:

- изменения фосфолипидного состава мембран, состоящего, прежде всего, в уменьшении содержания фосфатидилхолинов и возрастании их окисленных форм и лизолецитинов, что обуславливает повышение микровязкости (уменьшение жидкости) липидной фазы мембраны, формированию в ней участков повышенной проницаемости (своеобразных «пор»), обуславливающих синдром цитолиза;

- первичное локальное увеличение содержания в мембране митохондрий продуктов свободнорадикального (перекисного) окисления липидов (лизофосфолипидов), которые вместе с высвобождаемыми ненасыщенными жирными кислотами способны подавлять процесс биологического окисления. Этому способствует характерное для свободно-радикальной патологии изменение структурно-функциональных свойств самой мембраны митохондрий;

- нарушение рецепторных свойств отдельных участков плазматической мембраны к восприятию влияния гормонов белковой природы, изменение состояния альфа- и бета- адренорецепторов;

- появление спектра биологически активных веществ как производных высвобожденной под влиянием ФЛА₂ арахидоновой кислоты – простагландинов (простоциклинов), оказывающих провоспалительный эффект.

Дальнейшее расширение полученных к настоящему времени сведений о метаболической функции фосфолипаз А₂, о производимых ими структурно-функциональных изменениях наружных и внутренних мембран клетки, а

также о клинической значимости определения активности ФЛА₂ возможно лишь при разработке новых методологий и технологий исследования, доступных для использования в лабораторной практике.

4. Технологии исследования содержания (активности) ферментов семейства фосфолипаз А₂

К настоящему времени известны методы определения содержания ФЛА₂ в сыворотке крови с использованием титриметрической (ацидометрической) и радиометрической (по определению радиоактивности оставшегося нерасщепленным субстрата) технологий исследования. Ацидометрический метод оказался малочувствительным и не нашел широкого применения в медицине. Существенным недостатком его оказалось влияние на ферментативную активность изменения рН среды, а также относительно низкая аналитическая чувствительность.

Для определения содержания жирных кислот (ЖК), высвобождающихся в процессе гидролиза фосфолипидов, применялись также не получившие к настоящему времени широкого использования методы кондуктометрии, полярографии, газожидкостной хроматографии меченых соединений.

При исследовании содержания фосфолипаз А₂ используется также метод, основанный на определении способом тонкослойной хроматографии продуктов ферментативного расщепления фосфолипидов: лихофосфатидилхолинов и ЖК. Достоинствами его являются высокая точность, чувствительность и специфичность, а недостатками – многостадийность и методические трудности, которые возникают при проведении кинетических исследований.

Известен спектрофотометрический метод определения активности ФЛА₂ на основе использования тиоэфирных аналогов субстратов. В ходе гидролиза тиосубстратов освобождается SH-группа, которая реагирует далее с тиольным реагентом – 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной кислотой). Концентрация полученного в результате реакции хромогенного аниона 5-тио(2-нитробензоата) измеряется фотометрически при длине волны 412 нм.

Используются также методы, состоящие в применении окрашенных субстратов либо субстратов, имеющих флуоресцентную метку в гидрофобной и гидрофильной области молекулы липида: при одинаковой чувствительности методы с использованием флуоресцентных и окрашенных субстратов проще в исполнении, менее трудоемки и требуют меньших затрат времени для выполнения анализа.

Приведенные технологии определения активности ФЛА₂ трудоемки, связаны с применением специальных ферментов, субстратов на проведение исследований и по этой причине не находят использования в медицинской практике.

Более широкое применение нашел иммуноферментный метод определения содержания ЛП-ФЛА₂ с использованием высокоспецифичных моноклональных антител (PLAC-тест) и выражением численных значений показателей в размерности единиц массовой концентрации (мкг/л). Он разрешен для клинического применения «Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA)». Этому тесту присвоен знак "СЕ", подтверждающий соответствие стандартам качества и безопасности Европейского Союза.

Верхней границей физиологического уровня ФЛА₂ предложено считать согласованное группой экспертов США значение концентрации 200 мкг/л.

В Республике Беларусь для определения активности ФЛА₂ используется производимый на базе ХОП ИБОХ НАН Беларуси набор реагентов «ФЛА₂-ФОА» (ТУ ВУ 100185093074-2015) для определения активности ФЛА₂ в крови человека методом фотометрического анализа, вошедший в «Каталог инновационных разработок «Химические технологии и наноиндустрия» (Минск, 2016). Применение этого набора реагентов позволяет реализовать разработанную белорусскими учеными уникальную, не имеющую мировых аналогов, технологию исследования. Известно, что присутствие жирной кислоты в растворе метгемоглобина приводит к его превращению в гемихром. Различие способности гемоглобина двух форм поглощать монохроматические световые потоки в видимой области спектра четко выявляется в разностном спектре, отражающем показатели оптической плотности реакционной смеси при длинах волн 423 и 405 нм [8].

Ход исследования состоит в том, что в опытную кювету спектрофотометра, содержащую мицеллярную форму субстрата, соль кальция и гемоглобин, добавляется препарат фермента фосфолипазы А₂, которая гидролизует фосфолипид с высвобождением жирной кислоты, образующей в дальнейшем комплекс с метгемоглобином, превращая его в гемихром. Результатом такого превращения и является возникновение разностного спектра.

Этот оригинальный метод исследования был разработан и апробирован в рамках выполнения двух тем НИР: задания ГП «Импортозамещающая фармпродукция» – «Разработка и апробация новой биохимической тест-системы для выявления воспалительных процессов желудочно-кишечного тракта по фотометрическому определению активности панкреатической

фосфолипазы A_2 в крови» и задания ГПНИ «Конвергенция» «Лабораторная верификация патохимических изменений в поджелудочной железе при экспериментальном панкреатите» [10].

В соответствии с тем, что направления исследований, выполненных в рамках двух указанных тем, были ориентированы на определение панкреатической ФЛА₂, отличающейся от всех остальных ферментов семейства ФЛА₂ более высокой термостабильностью, на доаналитическом этапе исследования анализируемая проба биологической жидкости (сыворотки крови) подвергалась термической обработке в течение 45 минут при 60°C, что было достаточно для подавления активности всех иных фосфолипаз, кроме панкреатической, в сыворотке крови. Введение такого доаналитического этапа позволило не учитывать влияние на результат определения всех остальных – термолабильных ФЛА₂, в том числе липопротеин-ассоциированной и секреторной.

В ходе выполнения исследования, нацеленного на определение не панкреатической, а общей активности фосфолипазы A_2 , нами был исключен этот первый, доаналитический этап, для чего применялась нативная сыворотка без предварительной ее термической обработки.

Все последующие этапы исследования, используемые измерительное и вспомогательное оборудование, не отличались от представленных в инструкции, прилагаемой к зарегистрированному Министерством здравоохранения Республики Беларусь набору реагентов «ФЛА₂-ФОА» (ХОП ИБОХ НАН Беларуси).

5. Разработка методологии исследования осуществляемого ФЛА₂ сопряжения ферментативного превращения фосфолипидов с системами биохимической защиты

Вопреки «устоявшемуся» мнению о том, что про- и антиоксидантный баланс определяется соотношением отдельных представителей биологически важных веществ, относящихся к классам прооксидантов и антиоксидантов (АО), специалисты-биофизики не без основания полагают, что в обеспечении защитной, антиоксидантной функции существенную роль играют структурно-функциональные свойства липидной фазы мембран и липидно-белковых комплексов, во многом зависящие от молярного соотношения фосфолипидов (ФЛ) и холестерина, а также от фракционного состава общих фосфолипидов.

Нельзя не признать, что традиционно используемыми методами определения продуктов свободно-радикального (перекисного) окисления

липидов (первичных, вторичных и конечных) и отдельных антиоксидантов не учитывается интегральная способность липидной фазы структур биологических жидкостей проявлять защитный эффект в ответ на воздействие на биологические объекты факторов, производящих оксидативный стресс (ОС), т.е. противостоять их влиянию, так как оказалось, что антиоксидантная способность биологических структур зависит не только от липидного состава, но и от особенностей структурно-функциональных и биофизических свойств липидной фазы биологического материала. Выраженность этой защитной, антиоксидантной способности целесообразно оценивать с использованием тестов, показатели которых отражают характерный «отклик» поврежденных структур (липидов мембран, высокомолекулярных компонентов биологических жидкостей) на влияние факторов, создающих окислительный стресс [7].

Принцип такого методологического подхода базируется на представлении о том, что эффект воздействия факторов, способных «провоцировать» в биологических жидкостях и клеточных элементах тканей свободно-радикальное окисление (СРО) липидов, во многом зависит от исходной антиокислительной активности способности биологических объектов, определяемой комплексом факторов – как биохимических, так и биофизических (физико-химических), что, отчасти, связано со структурным строением мембран и липидно-белковых ассоциатов. В случае ослабления антиоксидантной защиты биологических структур возрастает вероятность СРО ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов. Поскольку же окисленные ФЛ представляют собой наилучший субстрат для ФЛА₂, это приводит к ее повышенной функциональной активности. Отсюда следует, что результаты сопоставления показателей активности ФЛА₂ до и после воздействия фактора инициации СРО в исследуемом биологическом материале должны характеризовать состояние антиокислительной защиты липидно-белковых комплексов биологических жидкостей и мембран клеточных элементов тканей жизненно важных органов (уведомление о положительном результате предварительной экспертизы по заявке на выдачу патента на изобретение № а2020040 от 06.04.2020).

В соответствии с изложенным, принцип предложенного нами метода оценки защитной, антиоксидантной способности липидной фазы биологических структур заключается в параллельно осуществляемом определении активности ФЛА₂ в двух пробах биологической жидкости, в одной из которых (опытной) устанавливается активность ФЛА₂ после 10-минутного (для сыворотки) и 15-минутного (для эякулята) облучения (с целью инициации оксидативного стресса) монохроматическим световым

поток (423 нм) содержащегося в реакционной смеси биологического материала; соответствие этой длины волны таковой, используемой для определения активности ФЛА₂, вместе с соблюдением строго стандартных условий проведения фотометрического исследования: с применением одной и той же модели прибора, кювет одного и того же типа и с соблюдением всегда постоянного расстояния между источником монохроматического светового излучения и расположением кюветы, – во многом обеспечивает высокую надежность получения результатов лабораторного исследования, упрощая его процедуру за счет исключения необходимости смены длины волны.

На основании установления (с учетом данных контрольной пробы, не подвергнутой фотооблучению) сдвига в показателях активности фермента после фотооблучения реакционной смеси оценивают проявление защитной реакции липидной фазы анализируемого биологического объекта в ответ на воздействие фактора, инициирующего окислительный стресс.

Реализация и стандартизация режима аналитического исследования достигается использованием для его выполнения отечественного автоматизированного фотометра – спектрофотометра РВ 2201 (СОЛАР, Беларусь), обладающего достаточно мощной, оригинальной импульсной ксеноновой лампой серии 1100 (США) с короткой дугой, которая генерирует микросекундные импульсы широкополосного света высокой интенсивности излучения (энергия вспышки 0,5 Дж, частота вспышек до 300 Гц, рассеиваемая мощность – до 20 Вт), и позволяющего в стандартизованном режиме производить облучение монохроматическим световым потоком (в том числе, в дальней ультрафиолетовой области) биологических объектов. Коротковолновое световое облучение исследуемой пробы биологической жидкости проводят в кювете с шириной оптического слоя 1 см при длине волны 423 нм в кюветном отделении спектрофотометра.

Для получения данных, позволяющих оценить защитную, антиоксидантную способность фосфолипидных комплексов биологических жидкостей по представленной методике, в качестве базового был использован метод определения активности ФЛА₂, реализованный с применением созданного и производимого на базе УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» оригинального набора реагентов «ФЛА₂-ФОА»; принцип исследования состоит в регистрации изменения оптической плотности гемоглобина вследствие связывания с ним высвобождаемого в ходе ферментативной реакции остатка жирной кислоты [9].

Ход определения заключается в постановке двух параллельных проб, содержащих одинаковые аликвоты анализируемого биологического

материала: одну из них (опытную) облучают монохроматическим световым потоком с длиной волны 423 нм в течение 10 минут (при исследовании сыворотки крови) и 15 минут (при исследовании эякулята), затем в обе пробы вносят реакционную смесь, содержащую 210 мкл раствора гемоглобина в концентрации 100 мкмоль/л, 3,8 мл буферного раствора, 42 мкл хлорида кальция в концентрации 0,1 моль/л и 50 мкл мицелл субстрата; через 60 и 100 минут определяют оптическую плотность при длине волны 423 нм, строят калибровочные графики и рассчитывают активность ФЛА₂ исследуемых проб. Затем вычисляют отношение показателей активности ФЛА₂ опытной пробы к таковой в другой (контрольной), не подвергнутой облучению. Результаты оценивают путем нахождения показателей соотношения значения активности ФЛА₂ после и до фотооблучения: Δ ФЛА₂.

Разработанный метод исследования прошел процедуру валидации. Произведена оценка его аналитических характеристик по установлению показателей сходимости, воспроизводимости и достоверности результатов исследования в серии.

Для оценки сходимости результатов измерений (т.е. соответствия полученных в строго контролируемых условиях результатов повторных определений в одном и том же биологическом материале) использовали аликвоты двух различных образцов сливной облученной сыворотки крови. Данные образцы анализировали 20 раз в соответствии с методикой испытаний в условиях повторяемости (1 исследователь, 1 день, одно и то же оборудование). Полученные результаты подвергались статистическому анализу с установлением $X_{ср}$, среднеквадратичного отклонения S и определения относительного стандартного отклонения (CV). Результаты измерений ($X_{ср} \pm 2S$) образцов составили $5,93 \pm 0,10$, $3,59 \pm 0,28$, соответственно. Коэффициент вариации в образцах – 1,77; 7,80; эти значения удовлетворяют требованиям, предъявляемым к клинико-лабораторным методам анализа.

Оценку воспроизводимости результатов исследования (соответствие результатов повторных определений, полученных при выполнении исследований проб одного и того же биологического материала в различных условиях его анализирования) в серии проводили с использованием двадцати образцов одного и того же биологического материала: с использованием двух образцов сливной облученной сыворотки крови. Полученные результаты подвергались статистическому анализу с установлением $X_{ср}$, среднеквадратичного отклонения (S) и определения относительного стандартного отклонения (CV). Результаты измерений образцов находились в пределах $X_{ср} \pm 2S$ и составляли $2,03 \pm 0,03$, $3,84 \pm 0,05$, $2,57 \pm 0,85$, $3,31 \pm 0,86$,

соответственно. Коэффициент вариации в образцах составил 2,97; 5,88, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к клинико-лабораторным методам анализа.

Таким образом, при оценке сходимости и воспроизводимости результатов исследования установлено, что полученные значения CV не превышают 15%, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к клинико-лабораторным методам анализа: 97% измерений образцов находились в пределах $X_{ср} \pm 2S$.

О достоверности полученных результатов судили на основании данных, полученных с применением программы внутрिलाбораторного контроля качества SOLAR QC Tool (Республика Беларусь). При оценке воспроизводимости результатов исследования в серии методом контрольных карт (метод Шухарта) установлено, что двойное среднее квадратическое отклонение не выходит за пределы ($X_{ср} \pm 2\sigma$), что считается критерием точности анализа.

Предложенный метод оценки состояния защитной антиоксидантной способности липидсодержащих соединений и структур сыворотки крови и спермоплазмы по характеру ответной реакции ФЛА₂ анализируемого биологического образца на воздействие коротковолнового монохроматического светового потока (вызывающего процесс СРО и окислительную модификацию липидов в условиях *in vitro*) по показателям аналитических свойств удовлетворяет предъявляемым к нему необходимым требованиям; рабочие характеристики метода соответствуют регламентированным.

6. Значимость разработанного метода оценки способности биологических жидкостей ингибировать процесс активации свободно-радикального окисления «*in vitro*», основанного на определении общей активности фосфолипазы А₂

Оптимизация лабораторной технологии исследования состоит в использовании длины волны 423 нм – той же самой, которая требуется для определения активности ФЛА₂ –с соблюдением строго стандартных условий проведения фотометрического исследования на стандартном приборе одной и той же модели, притом с использованием кювет одного и того же типа и с соблюдением всегда постоянного расстояния между источником монохроматического светового излучения и расположением кюветы. Все это во многом способствует повышению надежности выполнения процедуры лабораторного исследования: в том числе благодаря исключения необходимости смены длины волны («перенастройки» прибора): для

фотооблучения анализируемой пробы применяется та же длина волны, которая используется при определении активности ФЛА₂, что, к тому же, усовершенствует и упрощает процедуру выполнения метода исследования [9].

В связи с тем, что ферментативная активность ФЛА₂ тесно связана с объемом образования окисленных ФЛ в условиях «окислительного стресса», а также тем, что на этот процесс влияет состояние антиокислительной обеспеченности организма, оказывающей эффект биологической защиты фосфолипидов мембран от свободно-радикального окисления, сопоставление показателей активности ФЛА₂ до и после воздействия фактора инициации СРО на биологический объект – Δ ФЛА₂ – позволяет получить представление о состоянии антиокислительной защиты липидных структур биологических жидкостей и мембран клеток.

Как показали результаты выполненного исследования, на основании численных значений показателя ΔАФК можно делать вывод о высокой или низкой степени антиоксидантной защиты фосфолипидных комплексов сыворотки крови от свободно-радикального окисления. Значения, увеличивающиеся в динамике проводимых исследований ΔАФК, свидетельствуют о проявлении защитного эффекта возрастания активности ФЛА₂. Эти процессы сопряжены со снижением содержания первичных продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов) на фоне увеличения общей антиокислительной активности сыворотки крови, противодействующей формированию оксидативного стресса и мембранной патологии организма.

Таким образом, с применением данного метода оказывается возможным оценить эффект биологической защиты и подверженность СРО самих нативных липидсодержащих биологических структур, что во многом определяется не только присутствием биологических антиоксидантов, но и их исходными структурно-функциональными свойствами, тогда как все известные способы оценки про-/антиоксидантного статуса основываются как на определении продуктов окислительного метаболизма полиненасыщенных жирных кислот – первичных, вторичных и конечных продуктов СРО липидов, так и отдельных антиоксидантов (либо общей антиоксидантной активности, обусловленной их совокупным влиянием).

Новый методологический подход представляется значительно более информативным, чем традиционный, базирующийся на непосредственном (прямом) определении отдельных антиоксидантов либо общей антиоксидантной активности (ОАА) биологического материала.

7. Результаты апробации разработанного метода оценки состояния защитных, антиоксидантных свойств липидной фазы липидно-белковых комплексов по характеру изменения показателей общей активности ФЛА₂ до и после облучения реакционной смеси коротковолновым монохроматическим световым потоком

Проведена апробация разработанного метода исследования при отдельных формах патологии. В качестве биологического материала использовались спермоплазма 50 человек (35 практически здоровых и 15 – мужчин, страдающих нарушением репродуктивной функции), а также сыворотка крови пациентов с патологией гепато-панкреато-билиарной системы (n=20), с ревматоидным артритом (n=40), ишемической болезнью сердца (n=57), а также практически здоровых людей мужского и женского пола (в соотношении 1:1), составивших контрольную группу, сопоставимую по возрастно-половому составу ее представителей с таковыми других исследуемых групп (n = 35).

По данным ВОЗ, в настоящий период времени 10-15% супружеских пар имеют проблемы с зачатием. При этом в 30-50% случаев бесплодность вызывается суб-/инфертильностью супруга. Одним из многочисленных факторов, обуславливающих *мужское бесплодие*, может быть влияние на репродуктивные органы состояния окислительного стресса (ОС), чаще всего создаваемого по причине ослабления антиоксидантной защиты организма. Происходящее при этом нарушение упорядоченности структуры липидной фазы мембран (вследствие ее «разрыхления»), в свою очередь, способствует более легкому проникновению кислорода в глубь мембраны и, тем самым, – дальнейшему усиленному окислению фосфолипидов.

С учетом полученных нами данных, патогенез развития мужского бесплодия может быть представлен схематически на рисунке 1. Как следует из приведенной схемы, отражающей влияние факторов оксидативного стресса на проявление фертильных свойств эякулята, наблюдаемое у пациентов с нарушением репродуктивной функции возрастание активности ФЛА₂ (как своеобразная реакция на формирование состояния оксидативного стресса) не может не оказать выраженного влияния на структурно-функциональное состояние мембран сперматозоидов, нарушение структурно-функциональных свойств которых подтверждено использованием методов электронной микроскопии и атомно-силовой спектроскопии.

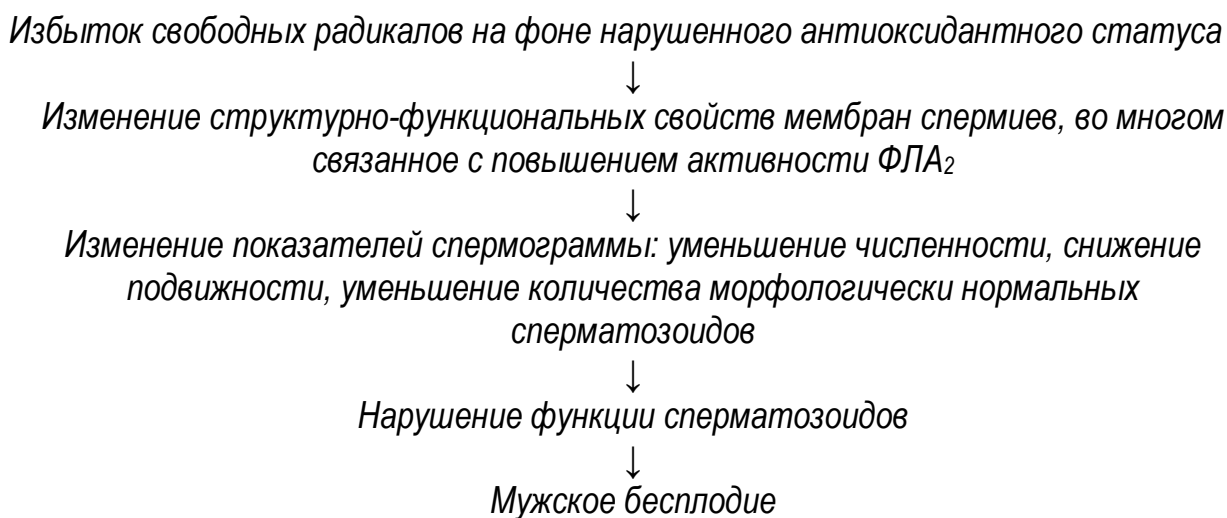


Рисунок 1. – Механизм влияния факторов оксидативного стресса на проявление фертильных свойств эякулята

Судя по представленному на рисунке 1 механизму развития инфертильности, использование методов оценки содержания либо активности ФЛА₂ позволяет повысить эффективность диагностики суб- и инфертильности у мужчин.

В ходе исследования проведена оценка способности спермоплазмы и сыворотки крови к осуществлению защитного, антиоксидантного эффекта в ответ на воздействие фактора, вызывающего состояние оксидативного стресса. При этом выявлена тесная зависимость между изменением (в сторону увеличения) общей активности ФЛА₂ и изменением про-/антиоксидантного статуса.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при нарушении мужской фертильности имеют место параллельно происходящие сдвиги как в ответной реакции ФЛА₂ на фотооблучение, так и в характере изменения уровня содержания первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов, общей антиокислительной активности.

Проведенное исследование состояния антиоксидантного статуса у пациентов с поражениями *гепато-панкреато-билиарной системы* (n=20) с использованием традиционно применяемых методов анализа и предложенного нами метода исследования, основанного на регистрации ответной реакции ФЛА₂ биологического объекта (сыворотки крови) на воздействие фактора инициации оксидативного стресса (коротковолнового монохроматического светового излучения) в стандартных условиях проведения фотометрического исследования, показало, что у пациентов с поражением органов желудочно-кишечного тракта наблюдается повышение активности ФЛА₂ ($7,0 \pm 4,40$ МЕ/л) по сравнению с аналогичными значениями у практически здоровых лиц ($1,92 \pm 0,18$ МЕ/л), что, как мы полагаем,

отражает увеличение при данной форме патологии объема образования окисленных фосфолипидов. При этом антиоксидантный потенциал сыворотки крови пациентов с данной формой патологии, оцениваемый по соотношению показателей общей антиокислительной активности и содержания первичных продуктов ПОЛ (АОА/ДК₂₃₃), оказался значительно ниже такового в группе контроля – контингента практически здоровых лиц, что позволило сделать заключение о большей подверженности липидов анализируемой сыворотки крови пациентов с гепато-панкреато-билиарной патологией свободнорадикальному окислению под влиянием фактора инициации оксидативного стресса.

На фоне отмеченных изменений выявлен более выраженный отклик активности ФЛА₂ сыворотки крови пациентов с указанной формой патологией в ответ на фотооблучение в сторону увеличения ее активности – 2,01 МЕ/л по сравнению с аналогичными сдвигами в группе контроля (1,83 МЕ/л).

Можно полагать, что большая степень повышения активности ФЛА₂ в пробах сыворотки крови пациентов с патологией гепато-панкреато-билиарной системы вызвана более активным процессом окисления фосфолипидов. Возрастание активности ФЛА₂ носит, по всей вероятности, компенсаторный характер.

В сыворотке крови пациентов контрольной и исследуемых групп с **ревматоидным артритом** были определены содержание первичных (ДК₂₃₃), вторичных (МДА) продуктов ПОЛ, ОАА и активность ФЛА₂. Для группы пациентов с ревматоидным артритом оказалось характерным значительное (по отношению к группе практически здоровых людей) увеличение активности ФЛА₂ сыворотки крови (в 2,35 раза), происходящее на фоне выраженного дисбаланса в про-/антиоксидантном статусе организма, обусловленном снижением уровня ОАА сыворотки крови и при 2-х – 4-х кратном нарастании содержания продуктов ПОЛ – ДК₂₃₃, ДК₂₇₈, МДА.

Полученные данные позволяют судить о том, что у пациентов с ревматоидным артритом на фоне снижения общей антиокислительной активности сыворотки крови и значительного возрастания содержания первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов происходит резкое (более чем двукратное) увеличение активности ФЛА₂.

При оценке реакции активности фосфолипазы А₂ проб сыворотки крови пациентов с ревматоидным артритом на фотооблучение установлено, что на фоне возрастания активности фосфолипазы в пробах сыворотки крови, подвергнутых фотооблучению, происходит снижение про-/антиоксидантного потенциала, отражаемое коэффициентами отношений ДК₂₃₃/ОАА и МДА/ОАА.

Результатами клинико-лабораторного исследования общей активности фосфолипазы A_2 при осложненном течении *ишемической болезни сердца* подтверждена состоятельность научной гипотезы о весьма важной роли патохимически тесно связанных между собой процессов свободно-радикального окисления (СРО) и фосфолиполиза в нарушении структурно-функциональных свойств клеточных мембран, а также в дестабилизации покрышки атеросклеротических бляшек, что обуславливает осложненное течение ИБС. Известно, что в 35-40% случаев атерогенные нарушения при ишемической болезни сердца (ИБС) развиваются по липоперекисному механизму, при котором активация СРО липидов на фоне снижения АОЗ организма приводит к «наработке» большого количества окисленных ФЛ. Деструктивный характер воздействия на сосудистую стенку дополняется и усугубляется сочетанным влиянием на белковый «каркас» мембраны ФЛА₂ и ММП. В результате происходит дестабилизация оболочки атеросклеротических бляшек, создающая опасность тромбоэмболии.

При осложненном течении ИБС, связанном, в том числе, с формированием острого коронарного синдрома (ОКС), происходят сдвиг в системе «прооксиданты/антиоксиданты» со смещением в сторону накопления прооксидантов, что вызывает активацию ФЛА₂ вследствие накопления окисленных фосфолипидов, а также повышенное образование продуктов ферментативного расщепления фосфолипидов – лизофосфатидилхолинов.

ФЛА₂ в последние годы привлекает к себе все большее внимание как провоспалительный фермент васкулярной системы, специфичный в отношении индикации сосудистого воспаления. Весьма важным оказалось то, что фермент содержится не только в артериальной стенке, но и в атеросклеротических бляшках. Тем самым, уровень сывороточной ФЛА₂ отражает как степень внутрисосудистого воспаления, так и нестабильность бляшки, в силу чего тест определения ее активности рассматривается как перспективный маркер нестабильности атеросклеротических бляшек [15]. Новизна такого методологического подхода отражена в материалах патента на изобретение: «Способ прогнозирования развития острого инфаркта миокарда у пациентов с острым коронарным синдромом в раннем госпитальном периоде», авторы Камышников В.С., Яковлев-Малых Н.Н (заявка № а 20170521 от 29.12.2017, решение о выдаче патента от 19 ноября 2019 г.).

На основании полученных новых сведений проведены исследования по определению активности ФЛА₂ в сыворотке крови в группе пациентов с осложненным течением ишемической болезни сердца по предложенной, новой методике определения активности фосфолипазы A_2 : до и после

облучения анализируемого объекта – сыворотки крови монохроматическим коротковолновым световым потоком.

При проведении исследования констатирован двукратный сдвиг в сторону увеличения активности ФЛА₂ после фотооблучения анализируемой сыворотки крови.

Таким образом, с применением данного метода, основывающегося на регистрации изменения активности ФЛА₂ в сыворотке крови после и до облучения оказывается возможным оценить состояние антиоксидантной защиты биологического материала от свободно-радикального окисления липидов, что во многом определяется не только присутствием антиоксидантов, но и исходными структурно-функциональными свойствами липидных комплексов, тогда как все известные способы оценки про-/антиоксидантного статуса базируются основываются на определении соотношения между содержанием первичных, вторичных продуктов СРО липидов (с одной стороны) и отдельных антиоксидантов либо общей антиокислительной активности (с другой).

Выявленная зависимость отражает сопряженность изменения показателей, характеризующих состояние антиоксидантной защиты липидной фазы мембран от свободно-радикального окисления по уровню сдвига в общей активности ФЛА₂, увеличение которой способно вызвать существенные нарушения состава и структурно-функциональных свойств мембран, а также метаболических процессов в клетках жизненно важных органов.

Заключение

1. На основании представленных в материалах учебного пособия современных сведений о роли отдельных представителей семейства фосфолипаз A_2 в формировании клинических проявлений мембранной патологии показана значимость определения липопротеин-ассоциированной и секреторных фосфолипаз A_2 в качестве биомаркеров сосудистого воспаления и деструктивно-дистрофических процессов клеточных структур тканей жизненно важных органов.

2. Научно обоснована возможность использования тест-системы «ФЛА2-ФОА» (ТУ ВУ 100185093074-2015, учреждение-разработчик – ИБОХ НАН Беларуси) по новому назначению – для определения общей активности фосфолипазы A_2 сыворотки крови: путем исключения преаналитического этапа исследования, сводящегося к прогреванию анализируемой пробы биологической жидкости (сыворотки крови, спермоплазмы) при 60°C в течение 45 мин (как это принято выполнять в случае определения активности панкреатической фосфолипазы A_2).

3. Научно обоснован и разработан метод определения защитной, антиоксидантной способности нативных липидсодержащих структур сыворотки крови и спермоплазмы по реакции, содержащейся в биологических жидкостях фосфолипазы A_2 на влияние фактора инициации оксидативного стресса (коротковолнового монохроматического светового потока).

4. Осуществлена валидация и клиническая апробация разработанного метода оценки способности биологических жидкостей к осуществлению защитного, антиоксидантного эффекта в ответ на воздействие фактора, вызывающего состояние оксидативного стресса: показана целесообразность и возможность его использования в клинико-лабораторной практике для исследования пациентов с патологией сердечно-сосудистой, репродуктивной, гепато-панкреато-билиарной системы, с ревматоидным артритом и другими заболеваниями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Активность эндогенной системы антиоксидантной защиты в процессе жизнедеятельности организма / М.А. Луцкий, Т.В. Куксова, М.А. Смелянец, Ю.П. Лушникова // Успехи современного естествознания, 2014. – № 12-1. – С. 20–23.

2. Активные формы кислорода и репродуктивная функция мужчин: фундаментальные и клинические аспекты (обзор литературы) / В.А. Божедомов, М.В. Торопцева, И.В. Ушакова, Е.А. Спориш, Н.А. Ловыгина, Н.А. Липатова // Андрология и генит. хирургия, 2011. – Т. 12. – № 3. – С. 10–16.

3. Значимость исследования активности фосфолипазы А2 как биомаркера процессов деструкции поджелудочной железы при остром некротизирующем панкреатите / В.А. Воробей, Н.М. Литвинко, В.С. Камышников, Ю.И. Вижинис, Т.М. Юрага, Н.Н. Кохнович, Л.А. Скоростецкая, Т.Г. Гудко, М.М. Тимохова // Лабораторная диагностика. Восточная Европа, 2015. – № 3/4. – С. 104–113.

4. 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.

5. Клиническое значение липид-ассоциированной фосфолипазы А2 / С.В. Миклишанская, А.А. Лякишев, В.В. Кухарчук // Кардиология, 2013. – Т. 53. – № 3. – С. 59–70.

6. Липопротеин-ассоциированная и секторная фосфолипазы А2: особенности метаболического влияния и клиническая значимость исследования / В.С. Камышников, Н.М. Литвинко, Н.В. Пехтерева, Н.Н. Яковлев-Малых, Т.М. Юрага // Лабораторная диагностика. Восточная Европа, 2017. – № 2. – С. 196–206.

7. Литвинко, Н.М. Активность фосфолипаз А2 и С при биохимическом моделировании : монография / Нац. акад. наук Беларуси, Гос. науч. учреждение "Ин-т биоорг. химии." – Минск : Технопринт, 2002. – 350 с.

8. Набор реагентов "ФЛА2-ФОА" для определения активности панкреатической фосфолипазы А2 в крови человека методом фотометрического анализа / Н.М. Литвинко, В.С. Камышников, А.В. Воробей, Ю.И. Вижинис, Т.М. Юрага, Л.А. Скоростецкая // Материалы VIII Съезда врачей клиничко-лабораторной службы Министерства здравоохранения Республики Беларусь : Минск, 10-11 нояб. 2016 г. – Минск, 2016. – С. 121. – [Опубл. в журн.] Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2016.

9. Оценка защитной реакции липидных структур сыворотки крови и спермоплазмы на воздействие фактора, инициирующего состояние оксидативного стресса / Н.В. Пехтерева, В.С. Камышников, А.И. Хоровец, Т.А. Жуковец // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2020. – Т. 9. № 1-2. – С. 116–134.

10. Папино, Д.С. Диффузия фосфолипазы A_2 в желточно-солевой агар как экспресс-метод для диагностики заболеваний репродуктивной системы / Д.С. Папино, Н.М. Литвинко, Д.О. Герловский // Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнологии микроорганизмов», г. Минск, 27-29 ноября 2019. – С. 379–381.

11. Роль окислительного стресса в патогенезе мужского бесплодия / И.В. Баженов, Е.С. Филиппова // Эффективная фармакотерапия, 2018. – № 29. – С. 50–58.

12. Роль секреторной фосфолипазы A_2 в развитии атеросклероза / А.И. Каминный, Т.О. Павлунина, Ю.А. Шувалова, А.А. Коротаева // Атеросклероз и дислипидемии, 2012. – № 4. – С. 63–67.

13. Стабилизирующее влияние липидов на наноструктуру биомембран / Р.М. Халиков, И.М. Борисов, В.А. Егоров // Вестник Башкирского гос. пед. университета им. М. Акмуллы, 2010. – Т. 20. – № 1. – С. 66–73.

14. Супрамолекулярный комплекс жирной кислоты с гемоглобином как индикатор фосфолиполиза для выявления экспериментального панкреатита / Н.М. Литвинко, Л.А. Скоростецкая, Т.Г. Гудко, М.М. Тимохова, В.С. Камышников, Е.И. Вижинис, В.А. Воробей // Доклады Национальной академии наук Беларуси, 2016. – Т. 60. – № 4. – С. 82–88.

15. Трансляционная лабораторная медицина: прогнозирование осложненного течения острого коронарного синдрома с использованием инновационных технологий оценки сопряжения процессов антиоксидантной защиты, протео- и фосфолиполиза / В.С. Камышников, Н.Н. Яковлев-Малых, Н.М. Литвинко, О.В. Свиридов, Л.В. Дубовская, Т.М. Юрага, Т.Д. Борисенко // Лабораторная диагностика. Восточная Европа, 2020. – Т. 9. № 1-2. – С. 98–115.

16. Фосфолипаза A_2 IV – новый индикатор оценки про-антиоксидантного статуса организма / Н.М. Литвинко, Л.А. Скоростецкая, Д.О. Герловский // Доклады Национальной академии наук Беларуси, 2017. – Т. 61. – № 4. – С. 60–68.

Учебное издание

Камышников Владимир Семенович
Литвинко Наталья Михайловна
Пехтерева Наталья Валерьевна
Юрага Тамара Михайловна
Яковлев-Малых Николай Николаевич
Герловский Денис Олегович
Скоростецкая Лидия Адамовна

КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ
ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБЩЕЙ АКТИВНОСТИ
ФОСФОЛИПАЗЫ А2 ПРИ ФОРМАХ МЕМБРАННОЙ ПАТОЛОГИИ,
СОПРОВОЖДАЮЩИХСЯ РАЗВИТИЕМ ВОСПАЛИТЕЛЬНО-
ДЕСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ
В ОРГАНИЗМЕ

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции

Подписано в печать 22.03.2021. Формат 60x84/16. Бумага «Discovery».
Печать ризография. Гарнитура «Times New Roman».
Печ. л. 1,88. Уч.- изд. л. 1,43. Тираж 70 экз. Заказ 54.
Издатель и полиграфическое исполнение –
государственное учреждение образования
«Белорусская медицинская академия последипломного образования».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/136 от 08.01.2014.
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 3/1275 от 23.05.2016.
220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3, кор.3.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

Кафедра клинической лабораторной диагностики

**КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ
ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБЩЕЙ АКТИВНОСТИ
ФОСФОЛИПАЗЫ А₂ ПРИ ФОРМАХ МЕМБРАННОЙ
ПАТОЛОГИИ, СОПРОВОЖДАЮЩИХСЯ РАЗВИТИЕМ
ВОСПАЛИТЕЛЬНО-ДЕСТРУКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ
В ОРГАНИЗМЕ**

Минск БелМАПО

2021

