



Н.І. Філімонова, І.Л. Дикий, М.В. Рибалкін

ДОСЛІДЖЕННЯ АЛЕРГЕННИХ БІОПОЛІМЕРІВ, ОДЕРЖАНИХ ШЛЯХОМ ПОЄДНАННЯ УЛЬТРАЗВУКОВОЇ ТА ХІМІЧНОЇ ОБРОБКИ БІОМАСИ ГРИБІВ РОДУ *CANDIDA ALBICANS*

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: алергени, ультразвук, полісахариди, білки, паперова хроматографія.

Ключевые слова: алергены, ультразвук, полисахариды, белки, бумажная хроматография.

Key words: allergens, ultrasound, polysaccharides, proteins, paper chromatography.

У статті розглянуто використання ультразвуку у поєднанні з хімічною екстракцією для одержання алергенів з біомаси грибів роду *Candida albicans*. Встановлено склад та вміст основних компонентів отриманих алергенів грибів *Candida*.

В статье рассмотрено использование ультразвука в сочетании с химической экстракцией для получения аллергенов грибов рода *Candida albicans*. Установлен состав и содержание основных компонентов полученных аллергенов грибов *Candida*.

The article discusses the use of ultrasound combined with chemical extraction for obtaining allergens from biomass, fungi of the genus *Candida albicans*. Structure and contents of major components of received allergens fungi *Candida* were established.

Прикута увага до алергенів патогенних грибів *Candida* значною мірою пов'язана з вирішенням питань раціональної діагностики мікозів. Більш широке виявлення глибоких мікозів різної етіології показало безперечну цінність імунологічних реакцій при цих формах ураження, де відсутність специфічної клінічної картини вісцерального мікозу виключає можливість постановки клінічного діагнозу, а важкість виділення культур грибу при цьому далеко не завжди дозволяє точно встановити етіологію захворювання [2,3,5,8,9].

Одним з напрямків у вирішенні проблеми імунодіагностики кандидомікозів визнано впровадження в клінічну медицину нових імунологічних препаратів для алергодіагностичних, одержаних з біомаси грибів роду *Candida*. Серед таких препаратів привертають увагу загальні екстракти зруйнованих дріжджеподібних клітин *Candida albicans* для діагностики кандидозу. Подібні препарати мають певні переваги перед тими, які були одержані з культурального середовища грибів *Candida*. Це пов'язано з тим що, в препаратах, виготовлених з культурального середовища, присутнє велике число різних інгредієнтів. Одні з них вивільнюються під час метаболізму грибу, інші – в наслідок лізису частини клітин, а деякі є складовою частиною поживного середовища. Тому якість таких препаратів не завжди може бути однаковою, що ускладнює їх використання та стандартизацію.

Для руйнування дріжджеподібних клітин *Candida albicans*, з метою вивільнення діючих речовин, було розроблено комбінований технологічний фізико-хімічний спосіб шляхом поєднання ультразвукової та хімічної обробки.

Біологічній дії ультразвуку присвячена велика кількість досліджень. Це пов'язано з тим, що при ультразвуковому опроміненні біооб'єктів виникають різні явища (диспергування, кавітація, термічна та окислювальна дія), які можуть зумовлювати вагомий вплив на живі організми [4,5]. Якщо врахувати, що в ультразвуковому полі частки середовища здійснюють інтенсивні коливальні рухи з великими прискореннями і що в опроміненій рідині на малих відстанях

(які дорівнюють половині довжини звукової хвилі) виникають різниці тисків в декілька атмосфер, то легко уявити наскільки перспективним є використання даного фізичного фактору в біології, мікробіології, особливо у виділенні з мікробних клітин антигенних комплексів для розробки нового класу вакцин, антигенних та алергенних препаратів з нативних клітинних компонентів [1]. Як правило, ультразвукове коливання приводять бактеріальні клітини до гибелі, при цьому мікробна суспензія не втрачає своїх імуногенних та антигенних властивостей [4].

Причини змін, які виникають в біологічних об'єктах під дією ультразвуку, можуть бути вторинні ефекти фізико-хімічного характеру. Так, під дією акустичних хвиль відбувається енергійне перемішування внутрішньоклітинних мікроструктур, а кавітація у середовищі призводить до розриву молекулярних зв'язків. Ультразвукові низькочастотні поля прискорюють процеси дифузії, підвищують проникність клітинних оболонок. У результаті збільшується вихід білків, що використовується для одержання пептидів [4].

Ступінь руйнуючої дії ультразвуку знаходиться в залежності від його потужності, частотного діапазону, експозиції, а також від морфологічних та функціональних особливостей опромінених мікроорганізмів.

На основі одержаних даних з літератури можна припустити про успішне виділення алергенів з клітин грибів роду *Candida albicans* за допомоги фізико-хімічних методів. Це пов'язано з будовою клітини грибу *Candida*, перед усім оболонки, яка суттєво відрізняється від оболонки бактерій, а також з особливостями його хімічного складу. Для одержання алергенів біомасу клітин грибу піддають ультразвуковій дезинтеграції у поєднанні з хімічним агентом. Використання цієї комбінованої технології дозволяє прогнозувати одержання алергенів, які мають низьку реактогенність та відрізняються високою активністю.

Перспективність результату цього технологічного методу у відношенні одержання кандидозних алергенів можливо оцінити тільки після визначення, які клітинні

комплекси виділяються за хімічною структурою, та в якому співвідношенні вони знаходяться за біологічними властивостями з аналогічними фракціями, виділеними за допомогою хімічних методів.

МЕТА РОБОТИ: виділення алергенних біополімерів грибів *Candida* за допомогою ультразвуку у поєднанні з хімічною обробкою біомаси умовно-патогенного грибу роду *Candida albicans*, кількісна і якісна характеристика одержаних алергенних біополімерів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження були екстракти культури умовно-патогенних грибів *Candida albicans* штаму ССМ 885-653. Для культивування *Candida albicans* використовували агар Сабуро з подальшою витримкою у термостаті при температурі 28°C протягом 2 діб. Одержану культуру штаму змивали розчином натрію хлориду та висівали в матраці з зазначеним агаром. Після 10–18 діб культивування в термостаті при температурі 28°C, одержану культуру змивали розчином натрію хлориду. Клітини грибу відділяли від розчину натрію хлориду центрифугуванням протягом 30 хвилин при 5000 об/хв. Одержаний осад висушували у термостаті при 37°C та розділяли на рівні вагові частини по 1. Одну частину піддавали екстракції у 5% розчині гідроксиду натрію об'ємом 100мл при постійному нагріванні на водяній бані при температурі 70–80°C з подальшим центрифугуванням протягом 30 хвилин при 5000 об/хв, другу частину екстрагували у 5% розчині гідроксиду натрію при температурі 30°C у поєднанні з ультразвуковою обробкою. Вплив дезінтегратора здійснювали при довжині хвилі 20кГц при інтенсивності 5-20Вт/см², питоме навантаження сировини на поверхню випромінювача складає 1г/см². Для визначення часу, необхідного для повного вивільнення діючих речовин з мікробної маси, при використанні ультразвуку та гідроксиду натрію, експозиції тривали 15, 30, 45, 60, 75 та 90 хвилин, а при використанні лише гідроксиду натрію, екстракція тривала від 4 годин, з подальшим збільшенням часу на 1 годину. Екстракти, одержані за допомогою луку, обробляли 0,25М соляною кислотою. Звільнення від зруйнованих та незруйнованих вегетативних та спорових клітин здійснювали центрифугування протягом 30 хвилин при 5000 об/хв, а надосадову рідину стерилізували шляхом тендалізації. Отриманий осад піддавали повторній обробці при тих же умовах для визначення повноти вивільнення діючих речовин. Відфільтрований дезінтеграт містить алергени. З кожного фільтрату виділяли діючі речовини осадженням за допомогою 95% етанолу. До 1 об'єму фільтрату додавали 5 об'ємів спирту. Осад, який випадав у результаті осадження спиртом, відділяли центрифугуванням та визначали його вагову частку, за якою визначали повноту екстрагування.

Гідроліз одержаних полісахаридів (наважки по 0,1г) проводили 1М або 10% розчином H₂SO₄ (по 5мл на кожену наважку) протягом 4 годин на кип'ячій водяній бані з повітряним холодильником. Гідролізат нейтралізували твердим ВаСО₃, за універсальним індикаторним папером визначали нейтральність реакції. Осад відфільтровували

центрифугуванням протягом 30 хвилин при 5000 об/хв. та промивали водою до загального об'єму 20 мл. Одержаний фільтрат упарювали до 1мл та наносили на хроматографічний папір.

Нисхідну хроматографію моносахаридів виконували на хроматографічному папері Filtrak FN-12, в системі розчинників використовували систему: ацетон – н-бутанол – вода (7:3:1). Хроматограми обробляли анілінгідрофтальматом та сушили при температурі 105–110°C протягом 15 хвилин, при цьому альдогексози проявлялися у вигляді темно-коричневих, а альдопентози – червоно-коричневих плям.

Вміст полісахаридів визначали фенол-сірчанним методом. Склад полісахаридів визначали за допомогою паперової хроматографії згідно ДФУ. Вміст білку визначали біуретовою реакцією та паралельно за методом К'єльдаля, а вміст нуклеотидів – за методом Спірина [2].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведеної роботи було з'ясовано, що час, необхідний для повного вивільнення діючих речовин з біологічної маси грибів, для хімічних та фізико-хімічних методів був різним. Значно швидше відбувалося вивільнення діючих речовин з біологічної маси грибів при екстракції 5% розчину гідроксиду натрію в поєднанні з ультразвуковою обробкою, яка тривала протягом 15–90 хвилин, повільніше – при екстракції 5,0% розчину гідроксиду натрію, яка тривала 6–8 годин.

В одержаних розчинах були виявлені наступні речовини: полісахариди, поліпептиди та нуклеотиди. Відносний вміст цих речовин у різних екстрактах був не однаковий. У екстракті 5% розчину гідроксиду натрію полісахариди містилися в кількості 35–45% сухої ваги, вміст поліпептидів був 14–20% сухої ваги та вміст нуклеотидів склав 8–11%. Деяко більша кількість полісахаридів містилася в екстракті одержаному при дії ультразвуку та 5% розчину гідроксиду натрію – до 40–60% сухої ваги, а також поліпептидів – до 30–45% сухої ваги та нуклеотидів 8–10%.

Клітинні полісахариди обох екстрактів, одержаних різними технологічними методами, майже не відрізнялися за складом та були представлені складними полісахаридними комплексами, які містили декілька моносахаридів, кількісне співвідношення між якими було приблизно однакове (порівняння проводили за інтенсивністю забарвлення плям). В одержаних фракціях була виявлена маноза, у меншій кількості – глюкоза, були виявлені сліди галактози, уронових кислот та ксилози.

Отже, технологічний метод, який полягає у дії ультразвуку та хімічного агенту на біомасу грибів роду *Candida albicans*, дозволяє за значно менший час одержувати алергени, які мають майже такий самий склад та вихід полісахаридної та білкової детермінанти алергену *Candida*, як і алергени, одержані за допомогою хімічного методу. Окрім того, даний метод не потребує значних затрат енергії, оскільки процес триває при температурі 30°C, що є важливим позитивним аспектом при впровадженні даного методу одержання грибкових алергенів на фармацевтичних та біотехнологічних підприємствах.



ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що при застосуванні ультразвукової та хімічної обробки біологічної маси грибів роду *Candida albicans* час, необхідний для повного вивільнення діючих речовин, складає 30–90 хвилин.

2. Визначено, що кількісний та якісний вміст полісахаридів та поліпептидів в екстрактах, одержаних хімічним та фізико-хімічним методом, майже не відрізнявся.

3. Одержані результати свідчать про перспективність запропонованого способу одержання алергенів грибів *Candida*.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Агольцев В.А.* Кандидоз, аспергелез и мукарроз животных (диагностика и меры борьбы): Автореф. дис. докт. ветер. наук. – Н. Новгород, ФГОУ ВПО. Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина (МГАВМиБ). – 2006. – 51 с.
2. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методические указания. – М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. – 128 с.
3. *Сова В.В.* Выделение и очистка белков. Методические пособия по курсу «Химия и биохимия белков и ферментов». Методические указания к практическим занятиям по очистки белка. / *В.В. Сова, М.И. Кусайкин* – В.: Дальневосток, 2006. – 42 с.
4. *Сорока С.А.* Влияние акустических колебаний на биологические объекты. / *Сорока С.А.* – Вибрация в технике и технологии, 2005. – №1. – С. 39-41.
5. *Шнахаев Э.Г.* Основы биотехнологии. Дезинтеграция микробных клеток / *Шнахаев Э.Г., Цыренов В.Ж., Чебунина Е.И.* – Улан-Уде, 2005. – С. 53-65.
6. *Anane S.* Biological diagnosis of systemic candidiasis: difficulties and future prospects / *S. Anane, F. Khalfallah* – Pathologie Biologie. – 2007, – Vol. 55, № 5, – P. 262–272.
7. *Zakharova N.S. et al.* An cellular pertussis vaccine based on the natural complex of antigens isolated from the supernatant of a synthetic culture medium. / *Zakharova N.S.* – Zh Mikrobiol Epidemiol., 1997 May – Jun; (3): 67-70.
8. *Haugland R. A.* Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis / *Haugland R. A., Brinkman N., Vesper S. J.* – J. Microbiol. Methods. 2002. – № 50. – P. 319-323.
9. *Ozcengiz E.* Rapid purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation – exchange chromatography. / [*Ozcengiz E., Kilinic K., Buyuktanir O., Gunalp A.*]. – Vaccine, 2004. – Vol. 22 (11-12), – P. 1570-1575.

Відомості про авторів:

Філімонова Н.І., д. мед. н., професор, зав. кафедри вірусології та мікробіології Національного фармацевтичного університету.

Дикий Г.Л., д. мед. н., професор.

Рибалкін М.В., аспірант каф. мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету.

Адреса для переписки:

Рибалкін Микола Вікторович, 61032, м. Харків, пр. Московський, д. 296, кв. 20.

Тел. дом.: (057)7791111, моб.: 0638509382, 0997941343.

E-mail: Ribalkin.Nikolay@mail.ru