

## ОБГРУНТУВАННЯ ОПТИМАЛЬНОГО СПІВВІДНОШЕННЯ ФАЗ ПРИ ОДЕРЖАННІ ЕКСТРАКТУ ГРИБА *CANDIDA ALBICANS*

© М. В. Рибалкін

Національний фармацевтичний університет, Харків

**Резюме:** на основі біохімічного аналізу обґрунтовано співвідношення сировини – сухої біомаси гриба *Candida albicans* та екстрагента – 5,0 % розчину гідроксиду натрію 1:10 у поєднанні з дією ультразвуку при температурі  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ . На основі одержаного екстракту заплановано розроблення розчину алергену для імунодіагностики кандидозної інфекції.

**Ключові слова:** алерген, кандидамікози, екстракція, ультразвук, білок.

**Вступ.** З кожним роком зростає кількість хворих на кандидоз, який може перебігати як у легкій формі (поверхневий) та і в складній (генералізованій) [1, 12]. Сучасні методи аналізу факторів ризику недостатньо точні, щоб визначити вірогідність глибокоорганної інфекції у пацієнтів з вісцеральною формою кандидозу [6, 11]. Тому розробка та впровадження алергенів кандиди є нагальним питанням сучасної медицини, фармації та ветеринарії. Алергодіагностика – виявлення захворювання шляхом постановки шкірних проб з алергеном. У складі шкіри присутні клітини мастоцити, які виробляють антитіла. Ці антитіла вступають у реакцію з алергеном та беруть участь у синтезі гістаміну [9, 11]. На сьогодні в Україні не випускають жодного алергену для імунодіагностики кандидозної інфекції у пацієнтів з вісцеральною формою кандидозу, які потребують протигрибкової терапії [7]. Необхідно зазначити, що дослідження з розробки алергенів для діагностики інфекційних захворювань активно проводять у різних державах світу: Росії, США, Японії, Німеччині та інших державах [1, 5].

Проведено дослідження з розробки розчину алергену на основі грибів *Candida albicans* для імунодіагностики кандидозної інфекції. Визначено методи культивування грибів та одержання з них екстракту, на основі якого і заплановане розроблення алергодіагностикума. Оптимальним методом одержання екстракту грибів *Candida albicans* є фізико-хімічний, який поєднує дію 5,0 % розчину гідроксиду натрію при температурі  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$  та ультразвукової дезінтеграції [10]. Для подальших досліджень доцільно з'ясувати раціональне співвідношення біомаси грибів та екстрагента 5,0 % розчину гідроксиду натрію при ультразвуковій екстракції. Необхідно дослідити різні об'єми екстрагента з однако-

вою масою сировини. Встановити, в якому із них за рахунок більш сфокусованої дії ультразвуку вивільнення білка та полісахаридів буде відбуватися значно швидше та зменшить енергетичні витрати.

Мета роботи – експериментальне обґрунтування оптимального співвідношення сировини – сухої біомаси гриба *Candida albicans* та екстрагента – 5,0 % розчину гідроксиду натрію у поєднанні з дією ультразвуку при температурі  $(25 \pm 2) ^\circ\text{C}$ .

**Методи дослідження.** Для попередження контамінації усі маніпуляції проводили в ламінарному боксі та підтримували асептичні умови. Культуру гриба *Candida albicans* штаму ССМ 885-653 висівали у пробірки з агаром Сабуро та культивували у термостаті при температурі 28–30  $^\circ\text{C}$  протягом 48 годин. Одержану культуру змивали ізотонічним 0,9 % розчином натрію хлориду та висівали у матраци з агаром Сабуро. Далі проводили культивування у термостаті при температурі 28–30  $^\circ\text{C}$  протягом 12 діб. Одержану культуру змивали ізотонічним 0,9 % розчином натрію хлориду. Клітини гриба відділяли від розчину натрію хлориду центрифугуванням впродовж 30 хв при швидкості обертання 5000 об/хв. Осад висушували у термостаті при температурі 50–60  $^\circ\text{C}$  та подрібнювали у ступці.

З метою визначення оптимального співвідношення біосировини та екстрагента використовували співвідношення: 1:10, 1:50 та 1:100. Вказані співвідношення обрано згідно з науковою літературою [5, 9, 11]. Для проведення екстракції алергенного матеріалу найчастіше використовують співвідношення 1:100, тому що у багатьох випадках одержаний екстракт можна використовувати без додаткового розведення або концентрування. Однак таке положення не завжди діє. Тому було вирішено провести дослідження

з використанням співвідношення 1:50, яке також часто використовують дослідники. Також використано співвідношення 1:10, яке передбачає подальше розведення одержаного екстракту, але можливо забезпечить більший вихід діючих речовин за менший час – а це є значною перевагою. Використання співвідношення менш ніж 1:10 нераціональне, оскільки у такому незначному об'ємі екстрагенту ультразвукове випромінювання буде неефективне [8, 14]. А співвідношення близько до 1:10 такі, як 1:11 або 1:15 не є принциповими у даному випадку, оскільки не буде спостерігатися значних відмінностей у результатах. Подрібнену суху біомасу гриба *Candida albicans* відважували та обробляли 5,0 % розчином гідроксиду натрію при температурі ( $25 \pm 2$ ) °C у поєднанні з ультразвуковою дезінтеграцією при частоті 22 кГц та інтенсивності 5 Вт/см<sup>2</sup> [8, 13, 18]. Ультразвукові коливання в біотехнології широко застосовують різні дослідники вже багато років [14, 15, 16, 17, 19, 20]. Одержаний екстракт обробляли 5,0 % розчином кислоти хлористоводневої, поступово доводячи середовище до значення рН  $7,2 \pm 0,2$ . Проводили попереднє фільтрування на мембранних фільтрах з діаметром пор 0,45 мкм та стерилізуюче фільтрування на мембранних фільтрах з діаметром пор 0,22 мкм.

Для приведення умов екстракцій до однакових параметрів так, як саме в такому випадку можливо порівняти результати, екстракти, одержані при співвідношенні біомаси гриба та екстрагенту 1 до 10, розводили в десять разів, а екстракти, одержані при співвідношенні – 1 до 50, розводили в два рази, щоб порівняти їх за вмістом білка з екстрактом одержаним при співвідношенні біомаси гриба та екстрагенту – 1 до 100. Для визначення часу, необхідного для вивільнення діючих речовин з біомаси гриба *C. albicans*, при всіх співвідношеннях сировини та екстрагенту, через певні проміжки часу (15, 30, 45, 60, 75 та 90 хв) в одержаних екстрактах проводили визначення вмісту білка згідно з ДФУ за методом Лоурі [2]. Для підрахунку результатів використовували статистичні методи в медико-біологічних дослідженнях із застосуванням програми Excel [3]. Згідно з попередніми дослідженнями вивільнення білка та полісахаридів відбувається синхронно [10], тому достатньо визначити вміст лише білка.

Якісне визначення білкового алергенного матеріалу проводили згідно з вимогами ДФУ 2.5.16. Вміст контейнера з розчином алергену «Кандидасін» кількісно переносили у мірну колбу об'ємом 200 мл та доводили об'єм розчину водою до позначки. 1 мл одержаного розчину поміщали у скляну пробірку і додавали 0,15 мл

розчину 400 г/л трихлороцтової кислоти. Струшували, витримували протягом 15 хв, центрифугували впродовж 10 хв зі швидкістю обертання 5000 об/хв і видаляли надосадову рідину. До осаду додавали 0,4 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду. У пробірку додавали 2 мл мідно-тартратного розчину, струшували і витримували протягом 10 хв. Потім у пробірку додавали 0,2 мл суміші: фосфорно-вольфрамового реактиву (1:1), приготовленого безпосередньо перед використанням. Закривали пробірку корком, перемішували вміст, струшуючи пробірку, і витримували у темному місці впродовж 30 хв. Розчин забарвлювався в синій колір, був стійким протягом 60 хв, що свідчить про наявність білка у розробленому розчині алергену.

Кількісне визначення білкового алергенного матеріалу проводили згідно з вимогами ДФУ 2.5.16. Вміст контейнера з розчином алергену «Кандидасін» кількісно переносили у мірну колбу об'ємом 10 мл та доводили об'єм розчину водою до позначки. 1 мл отриманого розчину поміщали у скляну пробірку і додавали 0,15 мл розчину 400 г/л кислоти трихлороцтової. Струшували, витримували протягом 15 хв, центрифугували впродовж 10 хв зі швидкістю обертання 5000 об/хв і видаляли надосадову рідину. До осаду додавали 0,4 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду. Готували стандартний розчин: 0,100 г альбуміну бичачого розчиняли у 100 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду (основний розчин, що містить 1 г/л білка). 1 мл основного розчину розводили до 20 мл 0,1 М розчином натрію гідроксиду (робочий розчин 1; 50 мг/л білка). 1 мл основного розчину розводили до 4 мл 0,1 М розчином натрію гідроксиду (робочий розчин 2; 250 мг/л білка). У шість скляних пробірок поміщали 0,10 мл, 0,20 мл і 0,40 мл робочого розчину 1 і 0,15 мл, 0,20 мл і 0,25 мл робочого розчину 2. Об'єм розчину в кожній пробірці доводили 0,1 М розчином натрію гідроксиду до 0,40 мл. Готували холостий розчин з використанням 0,40 мл 0,1 М розчину натрію гідроксиду. У кожну пробірку додавали по 2 мл мідно-тартратного розчину, струшували і витримували протягом 10 хв. У кожну пробірку додавали по 0,2 мл суміші: фосфорно-вольфрамового реактиву (1:1), приготовленого безпосередньо перед використанням. Закривали пробірки корками, перемішували вміст, струшуючи пробірки, і витримували у темному місці протягом 30 хв. Розчини забарвлюються в синій колір, стійкий впродовж 60 хв. Якщо необхідно, центрифугували для одержання прозорих розчинів. Вимірювали оптичну густину (ДФУ 2.2.25) кожного розчину при довжині хвилі 760 нм, використовуючи як компенсаційний холостий розчин. Будували каліб-

рувальну криву залежності величин оптичної густини шести стандартних розчинів від вмісту в них білка і за калібрувальною кривою визначали вміст білка у випробовуваному розчині. Дослідження кожного зі зразків проводили по п'ять разів з метою визначення відносного стандартного відхилення.

У результаті проведеної роботи було з'ясовано, що час ультразвукової експозиції, необхідний для вивільнення білка з біомаси гриба *Candida albicans* для різних співвідношень сировини та екстрагента, був різним. Екстракції при

співвідношенні біосировини та екстрагента 1:100 та 1:50 є неперспективними, оскільки в цих випадках час, необхідний для вивільнення білка, більший, ніж час, необхідний для вивільнення такої ж кількості білка з біомаси грибів при співвідношенні біосировини та екстрагенту 1:10. Результати досліджень екстрагування білка наведено в таблиці 1.

**Результати й обговорення.** Отже, для подальших досліджень ми обрали співвідношення біомаси гриба *C. albicans* та 5,0 % розчину гідроксиду натрію — 1:10.

**Таблиця 1.** Динаміка накопичення білка в екстрактах

Час, хв	Концентрація білка, мг/мл		
	екстракція з ультразвуком при температурі (25 ± 2) °С при співвідношенні біомаси гриба <i>Candida albicans</i> та 5,0 % розчину гідроксиду натрію		
	1:10	1:50	1:100
0	0	0	0
15	0,34	0,14	0,08
30	0,35	0,25	0,17
45	0,36	0,34	0,25
60	0,36	0,37	0,3
75	0,36	0,37	0,33
90	0,36	0,37	0,38

Примітка. n=10, P<0,5.

**Висновки.** Таким чином, тривалість ультразвукової дії для екстрагування максимальної кількості алергенного матеріалу, була найменша при співвідношенні біомаси гриба *Candida albicans* та 5,0 % розчину гідроксиду натрію (екстрагенту) 1:10 при температурі (25 ± 2) °С. Відповідно найбільш раціональним є дане співвідношення фаз для одержання екстраген-

ту, на основі якого заплановано розроблення розчинну алергену для імунодіагностики кандидозної інфекції.

Необхідно зазначити, що подальші дослідження з розробки та вдосконалення розчину алергену гриба *Candida albicans* є перспективними для сучасної медицини та фармації.

#### Література

1. Агольцов. В. А. Изготовление и изучение аллергенных препаратов для диагностики микозов / В. А. Агольцов, Е. Ф. Федотова, А. А. Парфенов // Материалы науч.-практич. конф. ин.-та вет. медицины и биотехнологии СГАУ им. Н.И. Вавилова. – Саратов, 2000. – Вып.1. – С. 19–20.
2. Державна Фармакопея України. / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., Допов. 2. – Х. : РИПЕГ, 2008. – 620 с.
3. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXCEL / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К. : МОРИОН, 2000. – 320 с.
4. Новые диагностические и лечебные аллергены / В. М. Бержец, Е. А. Коренева, О. В. Радикова и др. // Аллергология и иммунология. – 2007. – Т. 8, № 1. – С. 56– 56.
5. Пат. 2245721 Российская Федерация, МПК<sup>7</sup> А 61 В

- 39/00, С 12 Р 21/00, 19/04, С 08 В 37/00, С 07 К 2/00, С 12 N 1/16/(С 12 N 1/16, С 12 R 1:725), (С 12 Р 21/00, С 12 R 1:645), (С 12 Р 19/04, С 12 R 1:645). Антигенные препараты / Дитер Фарнов, Йоахим Карле, Игорь Д. Поляков, Людмила Г. Иванова; заявитель и патентообладатель БЕРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ ВЕТМЕДИКА ГмбХ. – № 98104502/15, заяв. 09.08.1996; опубл. 10.02.2005, Бюл. № 4.
6. Перечень основных методов и критериев диагностики микозов / Н. Н. Клишко, Н. В. Васильева, Н. П. Елинов и др. – СПб. : Спб МАПО, 2001. – 24 с.
7. Пухлик Б. М. Аллергены Украины. Состояние дел, нерешенные проблемы и перспективы / Б. М. Пухлик, В. Б. Русанова // Імунологія та алергологія. – 1999. – № 3. – С. 3–9.
8. Сорока С. А. Влияние акустических колебаний на биообъекты / С. А. Сорока // Вибрация в технике и технологии. – 2005. – № 1. – С. 39–41.

9. Фрадкин В. А. Диагностические и лечебные аллергены / В. А. Фрадкин – М. : Медицина, 1990. – 256 с.
10. Філімонова Н. І. Дослідження алергенних біополімерів одержаних шляхом поєднання ультразвукової та хімічної обробки біомаси грибів роду *Candida albicans* / Н. І. Філімонова, І. Л. Дикий, М. В. Рибалкін // Запорозький мед. жур. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 123-125.
11. Царев С. В. Аллергены грибов / С. В. Царев, М. Р. Хаитов // Доктор. Ру. – 2009. – № 2. – С. 57–68.
12. Шабашов Н. В. Современные представления об иммунопатогенезе микозов / Н. В. Шабанова // Проблемы медицинской микологии. – 2001. – Т. 3, № 2. – С. 43–44.
13. Шпахаев Э. Г. Дезинтеграция клеток в биотехнологии : учебное пособие / Э. Г. Шпахаев, В. Ж. Цыренов, Е. И. Чебунина. – Улан-Удэ, 2001. – 94 с.
14. Bar. R. Ultrasound Enhanced Bioprocesses / Bar, R. // Biotechnology and Engineering – 1987. – Vol. 32, P. – 655–663.
15. Bauer K. Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie: mit einer Einführung in die Biopharmazie / Kurth Bauer. – 7., Auflage. – Stuttgart: Wissensch. Verlag. – Ges., 2002. – 496 S.
16. J. A. Daan Crommelin Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications, Third Edition / Daan J. A. Crommelin, Robert D. Sindelar, Bernd Meibohm. // Third. – 2007. – 496 p.
17. Kimmel Eitan Cavitation bioeffects / Eitan Kimmel // Critical Reviews in Biomedical Engineering. – 2006. – Vol. 4, № 2. – P. 105–161.
18. Sinisterra J. V. Application of ultrasound to biotechnology: an overview / J. V. Sinisterra // Ultrasonics. – 1992. – Vol. 30, № 3. – P. 180–185.
19. Leighton G. Timothy What is ultrasound? / Timothy G. Leighton // Progress in Biophysics and Molecular Biology. – 2007. – Vol. 93, № 1-3. – P. 3–83.
20. O'Brien D William Ultrasound-biophysics mechanisms / William D O'Brien // Progress in Biophysics and Molecular Biology. – 2006. – Vol. 93, № 1-3. – P. 212–255.

## ОБОСНОВАНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО СООТНОШЕНИЯ ФАЗ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ ЭКСТРАКТА ГРИБА *CANDIDA ALBICANS*

**Н. В. Рыбалкин**

*Национальный фармацевтический университет, Харьков*

**Резюме:** на основании биохимического анализа обосновано соотношение сырья – сухой биомассы гриба *Candida albicans* и экстрагента – 5,0 % раствора гидроксида натрия 1:10 в сочетании с действием ультразвука при температуре  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ . На основании полученного экстракта запланирована разработка раствора аллергена для иммунодиагностики кандидозной инфекции.

**Ключевые слова:** аллерген, кандидамикоз, экстракция, ультразвук, белок.

## RATIONALE FOR OPTIMUM RATIO IN PHASES TO OBTAIN THE EXTRACT OF THE FUNGUS *CANDIDA ALBICANS*

**M. V. Rybalkin**

*National Pharmaceutical University, Kharkiv*

**Summary:** on the basis of biochemical analysis, ratio of materials was justified – dry biomass and fungus *Candida albicans* extractant - 5.0 % sodium hydroxide solution 1:10, combined with the action of ultrasound at a temperature of  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . Based on the obtained solution ekstrarkta planned development of allergen immunoassay for *Candida* infection.

**Key words:** allergen, candidiasis, extraction, ultrasound, protein.

Отримано 02.10.13