

УДК [612.017.1+616-056.3]:[616.98:28]

## Экспериментальное изучение аллергенов из грибов рода *Candida*

В.М. Бержец, А.В. Васильева, С.В. Хлгатян, Е.А. Коренева, В.А. Акутина, О.В. Радикова  
ФГБУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова» РАМН, Москва, Россия

### Experimental study of *Candida* allergens

V.M. Berzhets, A.V. Vasilieva, S.V. Khlgatian, E.A. Koreneva, V.A. Akutina, O.V. Radikova  
Mechnikov Research Institute of Vaccine & Sera RAMS, Moscow, Russia

#### Аннотация

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* часто являются причиной различных аллергических реакций, которые могут утяжелять течение atopических заболеваний и кандидозов. В связи с этим своевременное выявление грибковой сенсибилизации является важным для оптимизации противогрибковой терапии. Таким образом становится весьма актуальным создание стандартных диагностических панелей аллергенов из грибов рода *Candida*.

#### Ключевые слова

Дрожжеподобные грибы, аллергены *Candida albicans*, мицогенная сенсибилизация, аллергия.

По данным литературы, аллергенными свойствами обладают свыше 300 видов микромицетов [1]. Плесневые и дрожжевые грибы широко распространены в среде обитания человека и являются одними из наиболее распространенных источников аллергенов. Дрожжевые грибы рода *Candida* часто выявляются в посевах у клинически здоровых людей, что обусловлено высокой частотой колонизации этими грибами слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы. В то же время, одновременно с инфекционно-воспалительным процессом, аллергены грибов рода *Candida*, обладая высокой сенсибилизирующей активностью, могут вызывать различные аллергические состояния, что оказывает отягчающее влияние на течение основного заболевания [2, 3, 4, 5, 6]. Это указывает на важность

#### Summary

*Candida albicans*, a yeast-like-fungi, often are at the bottom of allergic diseases and may aggravate clinical signs of atopic diseases and candidosis. It shows importance of timely identification of a mycogenic sensitization for therapy optimization. In this regard creation of standard diagnostic panels of *Candida* allergens is very actual.

#### Keywords

Yeast-like-fungi, *Candida albicans* allergens, mycogenic sensitization, allergy.

своевременного выявления грибковой сенсибилизации для оптимизации терапии [3].

Выявление грибковой сенсибилизации проводят методом определения содержания специфического IgE в сыворотке крови пациента или при помощи скарификационных кожных проб с диагностическими препаратами грибковых аллергенов. К сожалению, в настоящий момент в России промышленный выпуск грибковых аллергенов прекратился, а импортные диагностические препараты слишком дорогостоящие. Поэтому создание стандартных диагностических панелей аллергенов из грибов рода *Candida* весьма актуально.

Целью настоящего исследования является разработка технологии получения аллергенов из грибов рода *Candida* для создания отечественной диагностической панели.

### Материалы и методы исследования

В качестве сырья для приготовления экстрактов аллергенов использовали термально инактивированную биомассу штаммов *Candida albicans*, выделенных из клинического материала и эталонного коллекционного штамма. Культивирование проводили в минеральных (безбелковых) средах СС1 и МЛ в жидком и агаризованном вариантах с различными концентрациями глюкозы, а также в среде Сабуро.

В экспериментальных препаратах аллергенов определяли содержание белка, его фракционный состав, концентрации углеводов и нуклеиновых кислот, а также их специфическая активность.

Количественное содержание белка определяли методом Несслера и методом Бредфорд [7, 8]. Определение содержания нуклеиновых кислот проводили по методу Спирина, концентрацию углеводов - методом Дюбуа [9, 10]. Для изучения фракционного состава был использован метод разделения белков с помощью электрофореза в ПААГ.

Специфическую активность препаратов определяли методом непрямой дегрануляции тучных клеток (НДТК) [7]. Для изучения специфической активности полученных препаратов ал-

лергенов использовали коллекцию сывороток пациентов с сенсibilизацией к грибковым аллергенам, обратившихся в Консультативно-поликлиническое отделение ФГБУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН. Сыворотки были проверены методом *RIDA AllergyScreen*, *R-Biopharm*, Германия.

### Результаты и обсуждение

Изучение физико-химических свойств полученных препаратов выявило, что полученные аллергенные экстракты варьировали по содержанию белкового азота от 1500 до 14000 PNU, углеводов от 0,003 до 0,068 мг/мл, что вероятно связано с различным составом сред и условий культивирования (табл. 1).

Для определения фракционного состава исследовали 5 серий аллергенных экстрактов, полученных из грибов *C. albicans*. Электрофорез аллергенов показал, что белок имеет молекулярный вес от 32 до 97 kDa, что согласуется с литературными данными [11]. С помощью аффинной хроматографии были получены два полипептида 97,4 и 35 kDa. В литературе известно, что белок с молекулярной массой 35 kDa является 1.3 - бета гликозилтрансферазой Vgl2p. По данным другого литературного ис-

**Таблица 1. Изучение биохимического состава аллергенов *C. albicans*.**

Серия	Штамм	Белок, PNU	Углеводы, мг/мл	Нуклеиновые кислоты, мг/мл
109	110	8256	0,006	0,039
209	110	2112	0,0245	0,019
309	110	72	0,003	0,021
409	110	312	0,006	0,524
509	110	78	0,002	0,018
609	110	312	0,007	0,498
709	Штамм ATCC885	816	0,003	0,008
809	110	768	0,003	0,011
909	110	312	0,001	0,006
1009	110	624	0,002	0,007
1	110	9600	0,017	0,04
2	110	3600	0,02	0,07
3	110	18900	0,068	2,846
4	Штамм ATCC885	14100	0,0795	2,412
5	110	14100	0,0595	2,871
6	110	10000	0,051	2,799
14	Штамм 110№1	1800	0,033	0,024
15	Штамм 110№2	1850	0,02	0,03

точника [12] стенки клеток *Candida albicans* состоят из маннопротеинов, связанных с полимерами глюкозы.

Была также проведена дополнительная очистка серии *Candida albicans* на колонке с сорбентом Ni - Shelating Sepharose. Аффинная хроматография на Ni – активированной сепарозе аллергена *Candida albicans* показала, что во фракциях: смыв 60 мМ имидазола и смыв 0,3 М имидазола содержится белок. Электрофорез в полиакриламидном геле аллергена *Candida albicans* показал, что белок имеет молекулярную массу около 97 кД, концентрация белка в исходном супернатанте и в смывах очень низкая.

С помощью метода НДТК изучалась специфическая активность 18 исследуемых препаратов аллергенов. Тучные клетки крыс сенсибилизировали данными сериями препаратов аллергенов и сыворотками пациентов, обратившихся в Консультативно-поликлиническое отделение ФГБУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, высоко сенсибилизированных к грибковым аллергенам.

Исследуемые препараты аллергенов показали различную аллергенную активность, которая варьировала от спонтанной (3%) до 52% дегрануляции. Следует отметить, что наиболее высокой специфической активностью обладают се-

рии №№109, 209, 1, 2, 14 и 15. Максимальная специфическая активность среди них была выявлена в серии №209, содержание белка в данной серии соответствовало 2112 PNU. Подобная высокая активность была выявлена в серии №109, а содержание белка в данной серии соответствовало 8256 PNU. Из этого можно предположить, что не все белки, входящие в состав экстракта аллергена, обладают высокой аллергенной активностью.

Наибольшей специфической активностью обладали серии, культивированные на среде МЛ с последующим высушиванием, и экстрагированные на боратном буфере, что можно будет учитывать в дальнейшем, для разработки технологии получения аллергенных препаратов из грибов *Candida albicans*.

При изучении химического состава и специфической активности серий №№3, 4, 5, 6, культивированных на средах СС1 и Сабура и экстрагированных с помощью буфера Эванс Кока выявлено очень высокое содержание белка – от 10000 до 18900 PNU, нуклеиновых кислот – от 2,4 до 2,8 мг/мл и углеводов от 0,051 до 0,068 мг/мл. Специфической активности в данных сериях выявлено не было – 11, 4, 3 и 3 процентов дегрануляции в опытах НДТК соответственно, что свидетельствует о низкой аллергенной активности данных серий препаратов (табл. 2).

**Таблица 2. Изучение специфической активности аллергенов *C. albicans***

Серия	Штамм	Специфическая активность, %
109	110	45
209	110	52
309	110	10
409	110	8
509	110	20
609	110	6
709	ATCC885	8
809	110	26
909	110	13
1009	110	15
1	110	26
2	110	32
3	110	11
4	ATCC885	4
5	110	4
6	110	3
14	110	28
15	110	29

## Заключение

Исследование биохимического состава показало, что соотношение концентрации белков, углеводов и нуклеиновых кислот зависит от способа приготовления биомассы грибов.

При изучении аллергенной активности оказалось, что наиболее высокой специфической активностью обладают серии, культивированные на среде МЛ с последующим высушиванием, и экстрагированные на бо-ратном буфере. На основании полученных результатов, для дальнейших исследований по созданию диагностических аллергенов

из грибов *Candida albicans* нами отобрано 8 серий препаратов. С помощью аффинной хроматографии на Ni – активированной сефарозе и электрофореза в полиакриламидном геле было показано, что белки с молекулярной массой 35 и 97 кД обладают специфической активностью.

Исходя из наших результатов, можно сделать заключение, что предложенная нами технология получения аллергенных препаратов из грибов *Candida albicans* может в дальнейшем явиться основой для разработки диагностических препаратов микоаллергенов.

## Литература

1. Simon-Nobbe B, Denk U, Püll V, Rid R, Breitenbach M. The spectrum of fungal allergy. *Int Arch Allergy Immunol.* 2008; 145: 1:58-86.
2. Лебедева Т.Н. Патогенез аллергии к *Candida species*. Проблемы медицинской микологии, 2004, том.6, №1, с.3-8
3. Елинов Н.П. Микоаллергены. В кн.: Аллергология. Под ред. Г.Б. Федосеева. С.-Пт., 2001: 98-113.
4. Соболев А.В., Васильева Н.В. Микогенная аллергия (этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение и профилактика). Аллергология. Частная аллергология. Под ред. Г.Б.Федосеева. - СПб.: Нордмедиздат, 2001. - Том 2. - С. 200 – 211.
5. Nittner-Marszalska M., Wojcicka-Kustrzeba I., Bogacka E., and oths. Skin prick test response to enzyme enolase of the baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in diagnosis of respiratory allergy. *Med. Sci. Monit.* - 2001.- Vol.7, №1.- P.121-4.
6. Романюк Ф.П. Микозы у детей, вызываемые условно-патогенными грибами: Автореф. дис... докт. мед. наук. - Л., 1998. – 44 с.
7. Фрадкин В.А., Диагностические и лечебные аллергены. М., 1990::2-33.
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein using the principal of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 1976, V.72:248-254.
9. Спиринов А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. *Биохимия.* 1958. Т. 23, № 4. С. 656.
10. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* - 1956. - Vol. 28. - P. 350-356.
11. Jeng HW, Holmes AR, Cannon RD Department of Oral Sciences, School of Dentistry, University of Otago, Dunedin, New Zeland. *New Mycol* 2005 May 43(3)209-17
12. Boisrame A, Gaillardin C, Laboratoire Microbiologie et Genetique Moleculaire, France. *Mol Cell Probes* 2004 Jun 18(3) 171-5.

Поступила 17.10.2012 г.