

ПОЛУЧЕНИЕ НАТИВНОЙ ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФРАКЦИИ ПОЛИСАХАРИДОВ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *SACCHAROMYCES* *CEREVISIAE*

Е.Л. Седёлкина, Г.Н. Бычко

Белорусский государственный медицинский университет

Терапевтический потенциал полисахаридов, история использования которых насчитывает более чем 80 лет, хорошо изучен [1]. Установлено, что полисахариды способны стимулировать неспецифическую резистентность организма животных и человека к

инфекциям, ингибировать рост злокачественных опухолей проявлять антикоагулянтную и гиполипидемическую активность [2].

Различные физико-химические способы получения полисахаридной фракции позволяют получать как растворимые, так и нерастворимые формы активного вещества, значительно отличающиеся по своим биологическим свойствам. В исследовании Qi C at all. действия дисперсионных и растворимых фракций β -глюкана дрожжей подробно описаны механизмы реализации эффектов каждого из них. Авторы пришли к выводу, что, помимо различного триггерного воздействия на онкологические и иммунокомпетентные клетки, разные формы β -глюкана отличаются механизмами передачи активирующего сигнала [3]. Эти данные подчеркивают ценность исследований биологических свойств различных фракций полисахаридов, как инструментов для прямой и непрямой модификации иммунитета человека.

Объектом наших исследований стали полисахариды клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae* (дрожжи пекарские), являющиеся наиболее безопасными объектами для использования в медицинских целях благодаря их низкой патогенности. Для разделения компонентов клеточной стенки использовали хроматографическое фракционирование на носителях типа сефадекс G-50 Fain. Метод колоночной гель-хроматографии позволяет отказаться от использования агрессивных химических веществ (щелочей, спиртов, ацетона) и сохранить нативную структуру биополимеров.

Фракционирование проводили на колонке размером 400,0x15 мм, в которую упаковывали сефадекс G-50 Fain и уравнивали элюирующим раствором (0,9% NaCl). Лизат клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae*, полученный механическим способом, в объеме 1,0 мл, предварительно уплотняли сахарозой до конечной концентрации 0,2% и наносили на стартовую границу геля. Фракции собирали и измеряли спектрофотометрически при длинах волн – 230 нм (пептидная связь), 255-260 нм (диапазон максимума поглощения полисахаридов) и 280 нм (ароматические аминокислоты).

Анализ спектрального распределения лизата *Saccharomyces cerevisiae* показал наличием двух, значительных по высоте, но не четко разделенных между собой пиков. Спектрофотометрически определили, что первый пик соответствует пептидной связи, а второй – имеет максимум поглощения полисахаридов.

После нанесения лизата на колонку провели детектирование собранных фракций при длинах волн 230 нм, 255 нм и 280 нм (рисунок 1). В образцах выявило присутствие двух узких, симметричных и четко разделенных между собой пиков. Для подтверждения присутствия в растворе искомого вещества для каждой фракции проводили качественную реакцию. Для полисахаридов – реакция с фенолом и серной кислотой с последующим измерением экстинкции при 570 нм, или антроном и фосфорной кислотой.

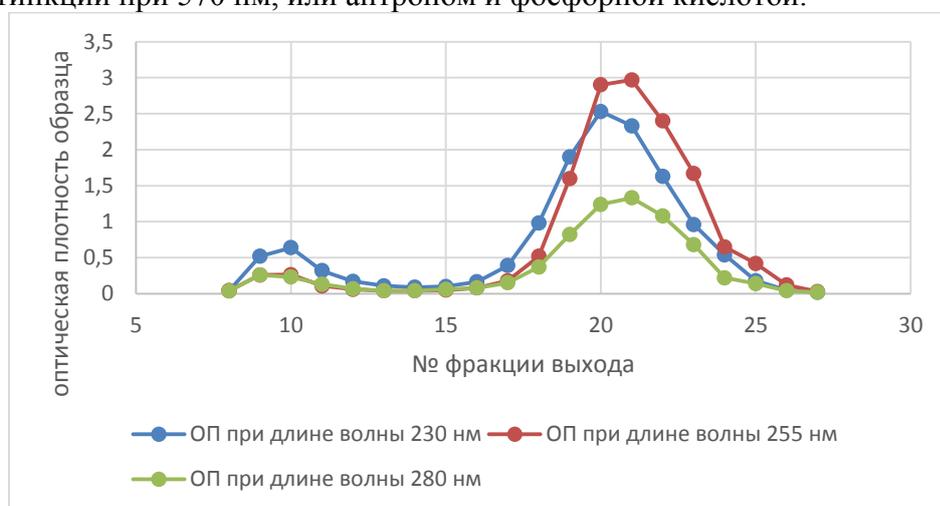


Рисунок 1. – Гель-хроматограмма препарата клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на сефадексе G-50 Fine

Выход первого, небольшого по высоте пика, компоненты которого поглощают при 230 нм, 255 и 280 нм, отмечался в зоне 9-10 фракции, что по молекулярно-массовому распределению совпадает с зоной элюирования маркера альбумина (68 000 Да).

Второй, значительно более высокий пик, регистрировался при всех длинах волн детектирования в области выхода 15-25 фракции. По своему расположению он занимает промежуточное место между выходом маркеров альбумина и витамина В₁₂, т.е. молекулярная масса компонентов составляющих этот пик находится в диапазоне Мг от 68 000 – 1000 Да. Это очень большой разброс значений, поэтому мы провели дополнительную калибровку колонки веществами с известной молекулярной массой для более точного установления величин Мг применительно к анализируемому образцу.

В результате повторного анализа второго образца (15-25 фракции) был получен симметричный пик с узкой зоной выхода, который свидетельствует об однородности и гомогенности веществ, составляющих его. Они характерно поглощают при 260 нм. Это позволяет отнести их к веществам полисахаридной природы с включенными в их состав белковыми группами, на что указывает наличие максимумов в спектре поглощения пиковых хроматографических фракций при 230 и 255 нм, (рисунок 2).

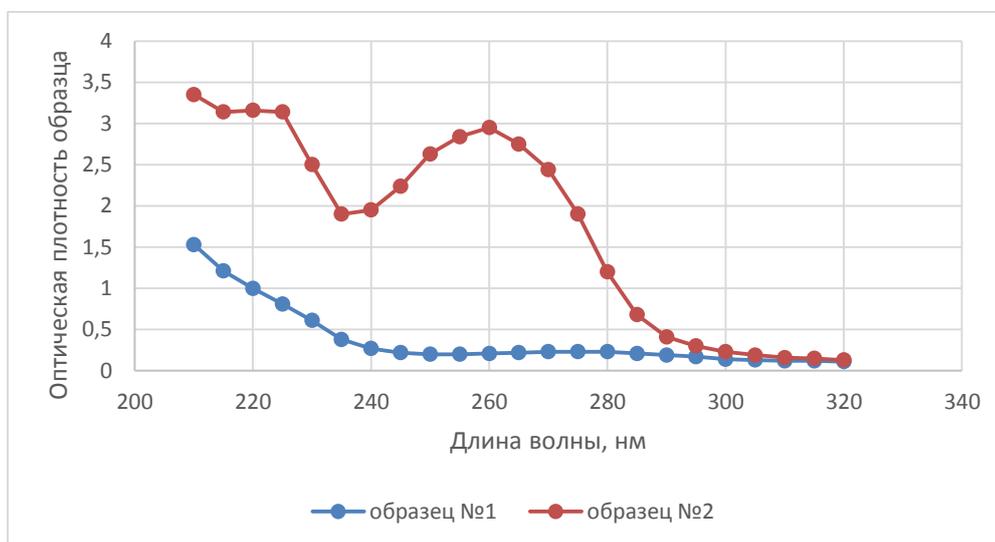


Рисунок 2. – Спектры пиковых фракций препарата клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* после гель-хроматографии на сефадексе G-50 Fine

Таким образом, нам удалось получить нативную водорастворимую фракцию полисахаридов клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae*. Особенностью полученной нами фракции является растворимость в воде и других биологических жидкостях. Это обеспечивает пригодность составляющих компонентов к химической иммобилизации на жесткий носитель (гемосовместимую матрицу), а также решает проблему таких побочных эффектов, как образование гранул, микроэмболизации, воспаления и боли в области введения активатора при его порентеральном применении (Maeda et al., 1988). Антигенные свойства полученной фракции должно обеспечить наличие в составе доступных тирозиновых остатков, способных образовывать комплексы с иммунокомпетентными клетками, обеспечивая их активацию.

Список использованных источников

1. Tzianabos, A.O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: Structural aspects and biologic function / Clin. Microbiol. Rev. – 2000. – №13. – P.523–533;
2. Yin, M. Advances in research on immunoregulation of macrophages by plant polysaccharides / Zhang, Y.; Li, H. // Front. Immunol. 2019. – 10. – P. 145.

3. Qi, C. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived β -glucans / Cai Y, Gunn L, Ding C, Li B, Kloecker G, Qian K, Vasilakos J, Saijo S, Iwakura Y, Yannelli JR, Yan J. // *Blood*. – 2011. – 117(25) – P. 6825–6836.