

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК *CANDIDA TROPICALIS***И.С. Черней, В.Т. Чещевик***Полесский государственный университет, Пинск, semitcko.i@yandex.ru*

Введение. Виды *Candida* относятся к числу наиболее распространенных условно-патогенных микроорганизмов, вызывающих грибковые инфекции человека. В последние годы с постоянно растущим применением антибиотиков, глюкокортикоидов, иммунодепрессантов, а также интервенционных и хирургических процедур с использованием различных катетеров резко возросла частота оппортунистических инфекций [1]. Среди видов *Candida*, не включая в статистику вид *Candida albicans*, наиболее распространенным в некоторых развивающихся странах и связанный с самым высоким уровнем смертности является *Candida tropicalis*, также данный вид обладает устойчивостью к широко используемым противогрибковым препаратам, в частности к азолам [2].

В связи с этим перспективным направлением исследований является поиск природных поликомпонентных соединений способных подавлять рост грибковых клеток, а также замедлять или полностью подавлять их метаболическую активность. В качестве таких потенциальных соединений могут выступать эфирные масла *Humulus lupulus* и *Artemisia absintium*, обладающие широким спектром биологической активности. Благодаря своей многокомпонентной структуре и гидрофобной природе, они могут проникать в клетку, преодолевая барьер биопленки в отличие от других лекарственных препаратов [3].

В контексте данной работы предпосылкой жизнеспособности культуры является измеримая ферментативная активность. Среди многочисленных методов, связывающих уровень ферментативной активности с состоянием микробной популяции, большую популярность получили анализы, основанные на биотрансформации соли тетразолия. На протяжении многих лет соли тетразо-

лия использовались в различных экспериментальных протоколах, таких как измерение активности оксидоредуктазы, субклеточная локализация оксидоредуктаз, обнаружение супероксидных радикалов, скрининг микоплазмы и, прежде всего, оценка метаболической активности, жизнеспособности и роста микробов. Одним из наиболее распространенных примеров солей тетразолия, используемых в биоанализах, является 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) [4].

Материалы и методы. В работе использовано сухое сырье хмеля, выращиваемое ООО «Белхмельагро» (Малоритский район, Брестская область). Предприятием было предоставлено 7 сортов хмеля (Магнум, Перле, Геркулес, Сладек, Норден Бревер, Шпальтер Селект, Традиционный), собранных и заготовленных в августе – сентябре 2021 г. Также использовали сухое сырье полыни горькой собранное и заготовленное в августе 2021 г.

Получение эфирного масла проводили методом гидродистилляции с использованием аппарата Клевенджера. Отбор эфирного масла осуществляли с использованием шприца с длинной иглой. Во избежание погрешностей гидродистилляция проводилась в трехкратном повторении для каждого исследуемого образца.

Качественный и количественный состав эфирных масел определяли с помощью газового хромато-масс-спектрометра Shimadzu QP2010 посредством электронной ионизации с детектором ионизации MSFID splitter с использованием неполярной капиллярной колонки (30 м × 0,32 мм × 0,5 мкм, активная фаза Rtx-1MS Restek). Анализ был выполнен при следующем температурном режиме: начальная температура 50°C на протяжении 3 мин, далее температура повышалась на 4 °C/мин до 310°C. Газ-носитель – гелий с постоянным давлением 49,5 кПа, режим инъекции – с расщеплением потока 1/3. Пробоподготовка: эфирное масло объемом 10 мкл смешивали с 1,5 мл дихлорметана. Объем пробы эфирного масла, вносимый в газовый хроматограф, составил 1 мкл. Идентификацию компонентов полученных эфирных масел определяли путем сравнения их масс-спектров со спектрами базы данных Wiley и по индексу удержания в колонке [5].

Культивирование клеток *C. tropicalis*. В жидкую питательную среду YPD объемом 80 мл внесли 20 мкл клеточной суспензии *C. tropicalis* (концентрации клеток – $1 \cdot 10^7$), при условиях 30 °C с постоянным помещением 180 об/мин. на протяжении 8 часов для достижения логарифмической фазы роста ($OD_{600 \text{ нм}} = 0,5 \pm 0,05$).

Измерение оптической плотности клеток *C. tropicalis* проводили на длине волны 600 нм (спектрофотометр Cary Varian 50, Австралия). В качестве пробы сравнения использовали стерильную жидкую питательную среду, на которой проводили культивирование клеток дрожжей. Оптическую плотность клеток дрожжей вычисляли по следующей формуле (1):

$$\Delta D_{600} = D_{к600} - D_{ср600}, \quad (1)$$

где ΔD_{600} – оптическая плотность клеток дрожжей;

$D_{к600}$ – оптическая плотность бульонной культуры клеток дрожжей;

$D_{ср600}$ – оптическая плотность стерильной среды.

Стандартизация клеточной суспензии *C. tropicalis*. Культуру центрифугировали в пробирках при условиях: 15 мин, 3550 об/мин, 5 мл, отбирали надосадочную жидкость и добавляли буфер PBS с глюкозой 1% в объеме 1000 мкл и центрифугировали, надосадочную жидкость отбирали и к осадку добавляли 150 мкл буфера PBS с глюкозой 1%, ресуспендировали и подсчитывали количество клеток до концентрации их $1 \cdot 10^7$. Подготовленную культуру разливали по лункам микропланшета в объеме 99 мкл и вносили 1 мкл исследуемого эфирного масла, аккуратно пипетировали и ставили на инкубацию (условия: 37°C, 10 мин, 80 об/мин). После инкубации в лунки вносили 10 мкл МТТ (концентрация 0,5 мг/мл) и инкубировали в темноте (условия: 37°C, 60 мин, 80 об/мин). Затем добавляли 150 мкл изопропанола аккуратно пипетируя до растворения кристаллов формаза-на и инкубировали в темноте 10 мин при тех же условиях. После центрифугировали микропланшеты для осаждения клеток при условиях 5 мин и 200 об/мин, и надосадочную жидкость объемом 150 мкл переносили в новый микропланшет и измеряли на длине волны 545 нм.

Статистическую обработку результатов и вычисление значений IC50 осуществляли с использованием программы статистического анализа GraphPad Prism9.

Результаты и их обсуждения. Основными компонентами эфирного масла полыни горькой, произрастающей в климатогеографических условиях Беларуси, являются β -гуйон (24,43%), α -гуйон (19,76%), геранил пропионат (16,21%), 2,4-гуйондинен (13,16%) [6].

В эфирном масле исследуемых сортов хмеля наблюдается высокое содержание гумулена (18,1–45,15%), мирцена (25,07–48,97%) и кариофиллена (7,23–13,36%). Также в каждом эфирном масле

хмеля в среднем процентном отношении присутствуют следующие компоненты: β -пинен (0,78%), α -кадинен (0,69%), δ -кадинен (1,25%) и гумулен оксид (1,89%). Содержание данных компонентов также наблюдается в сортах хмеля, культивируемых в иных климатогеографических условиях. Подробные результаты исследований качественного и количественного состава эфирного масла хмеля и полыни горькой представлены в предыдущих наших работах [5,6].

Результаты исследования метаболической активности клеток *Candida tropicalis* при воздействии исследуемых эфирных масел *Humulus lupulus* и *Artemisia absintium* в виде концентраций полумаксимального ингибирования представлены на рисунке.

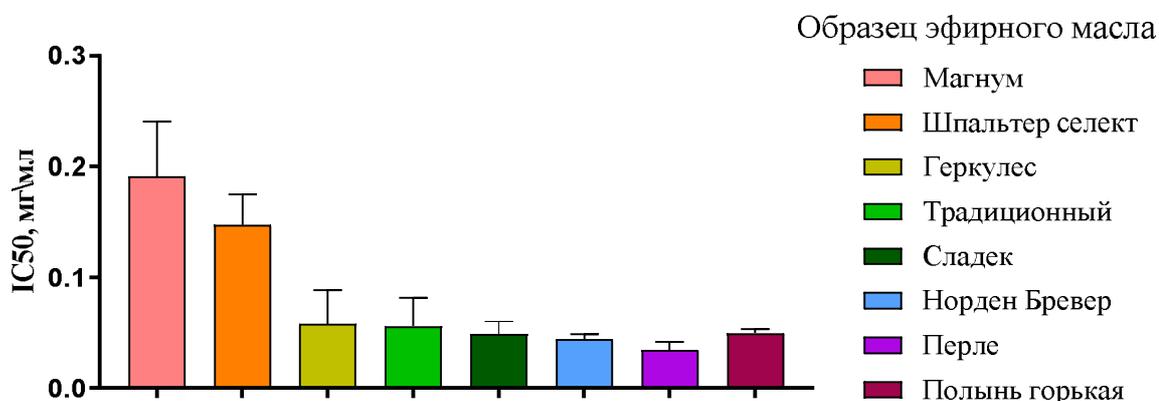


Рисунок – Метаболической активности клеток *Candida tropicalis* при воздействии исследуемых эфирных масел *Humulus lupulus* и *Artemisia absintium*

При оценке противогрибковых свойств исследуемых эфирных масел в отношении планктонных форм *Candida tropicalis* эфирное масло хмеля сорта хмеля из сортов Геркулес, Традиционный, Сладек, Норден бревнер и Перле, а также эфирное масло полыни горькой. Эфирное масло хмеля сорта Перле обладает большей степенью снижения метаболической активности клеток *C. tropicalis*. Данная закономерность может быть связана с содержанием минорных соединений, в исследуемом эфирном масле хмеля разных сортов.

Снижению метаболической активности может быть связано с меньшим числом живых (метаболически активных) клеток, способных расщеплять мембран проницаемую желтую соль тетразолия МТТ с образованием кристаллов формазана синего или фиолетового цвета.

Таким образом, исследуемое эфирное масло способно в разной степени подавлять метаболическую активность клеток *Candida tropicalis* и это напрямую зависит от компонентного состава.

Список использованных источников

1. Pierce CG, Lopez-Ribot JL. Candidiasis drug discovery and development: new approaches targeting virulence for discovering and identifying new drugs. *Expert Opin Drug Discov.* 2013;8(9):1117–26.
2. Sasani, E., Khodavaissy, S., Rezaie, S., Salehi, M., & Yadegari, M. H. (2021). The relationship between biofilm formation and mortality in patients with *Candida tropicalis* candidemia. *Microbial Pathogenesis*, 155, 104889. doi:10.1016/j.micpath.2021.104889
3. Семитко И.С. Влияние эфирных масел *Artemisia absinthium* и *Humulus lupulus* на динамику митохондриального мембранного потенциала клеток *S.cerevisiae* // И.С. Семитко, Anastasiia Bekhter, В.Т. Чещевик, Krzysztof Śmigielski / Сборник научных трудов, – М., ФГБНУ ВИЛАР, 2021. – с. 465-473. DOI: 10.52101/9785870191003_2021_465
4. Bernas T, Dobrucki JW. The role of plasma membrane in bioreduction of two tetrazolium salts, МТТ, and СТС. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Aug 1;380(1):108-16. doi: 10.1006/abbi.2000.1907.
5. Черней И. С., Чещевик В. Т., Орлов И. М. Труды БГТУ Компонентный состав эфирного масла различных сортов *Humulus lupulus*, культивируемых в Беларуси // Сер. 2, Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. 2023. № 2 (271). С.65-72. DOI:10.52065/2520-2669-2023-271-2-7.
6. Черней И.С. Антиоксидантная активность эфирного масла *Artemisia absintium* / И.С. Черней, В.Т. Чещевик // Пинские чтения, Пинск, 15-16 сентября 2022 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.] ; редкол.: В.И. Дунай [и др.]. – Пинск: ПолесГУ, 2022. с.265-268