

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ЭКЗОГЕННОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ A₂, ПРОДУЦИРУЕМОЙ МИЦЕЛИЕМ ГРИБА *PAECILOMYCES VIRIDIS*.

М.Ф. ЮЛАЕВ, А.М. АХУНОВА

ЦНИЛ Самаркандского государственного медицинского института, г. Самарканд.

Республика Узбекистан

Исследована липолитическая активность экстракта из мицелия и культуральной жидкости гриба *Paecilomyces viridis* и их белковых фракций. Установлено, что мицелий гриба *Paecilomyces viridis* является слабым продуцентом экзогенной фосфолипазы A₂, обладающей гемолитической активностью. Оптимум действия грибной фосфолипазы A₂ проявлялся в диапазоне pH 8,5-9,0, что совпадает с оптимумом действия фосфолипаз A₂ из ядов змей и насекомых.

Ключевые слова: *Paecilomyces viridis*, фосфолипаза A₂, гемолитическая активность

ВВЕДЕНИЕ. Грибы рода *Paecilomyces* повсеместно распространены в природе. До недавнего времени их относили к обычным загрязнителям воздуха лабораторий и жилых помещений [1]. Первое сообщение об инфекции человека грибом рода *Paecilomyces* вида *Paecilomyces variotii* Bainier (1907) было сделано в 1963 г. кардиохирургами из ЮАР [2]. К настоящему времени накопилось достаточно сведений, раскрывающих широкий спектр патогенных свойств грибов рода *Paecilomyces* [3-5], однако биохимические механизмы, лежащие в основе их патогенеза остаются слабо изученными.

Объектом исследования служили культуры гриба *Paecilomyces viridis*, как возбудителя инфекции, наиболее часто выделяемой из крови и мокроты больных бронхиальной астмой, пневмонией и анемией [6].

МЕТОДИКА. Гриб культивировали на агаризованной среде Чапека при комнатной температуре в течении 1-1,5 месяца и жидкой среде Сабуро при температуре 37° С в течении 1 месяца. Объем питательной среды в колбах составил 500 мл.

Мицелий гриба вместе с агаризованной средой взвешивали, затем измельчали скальпелем и заливали 100 мл 0,85% раствора NaCl. Экстракцию проводили при комнатной температуре в течении 120 минут при непрерывном перемешивании после чего частицы мицелия удаляли центрифугированием при 2000 g в течение 20 минут.

Экстракт отфильтровывали через воронку с пористым фильтром ПФ-40 и выделяли белковую фракцию путем осаждения 70% ацетоном. После удаления ацетона белковый осадок растворяли в дистиллированной воде из расчета 1 мл на 40 мл экстракта. Белковую фракцию из культуральной жидкости гриба *P. viridis* выделяли аналогичным способом.

Активность фосфолипазы A₂ определяли методом обратного потенциометрического титрования на pH-метре [7]. В качестве субстрата использовали 1% раствор яичного желтка или 0,2% эмульсию фосфатидилхолина в 0,05% растворе тритона X-100 в дистиллированной воде. Инкубационный раствор получали путем

смешивания 20 мл субстратного раствора, 0,05% мл 1,0 М CaCl_2 и 0,1 мл раствора фермента. Реакцию проводили при 30°C, pH-8,5, 10 минут при непрерывном перемешивании. Титрование осуществляли 0,01 М раствором NaOH. Активность фосфолипазы A_2 выражали в микромолях жирных кислот, образующихся за 1 минуту при гидролизе фосфолипидов на 1 мл раствора фермента. В качестве контроля использовали яд гюрзы, содержащий фосфолипазу A_2 с удельной активностью 40 ед/мг. Состав липидов после гидролиза субстрата (фосфатидилхолина) определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинах "Силуфол" [8].

Гемолитические свойства фосфолипазы A_2 из мицелия и культуральной жидкости гриба *P. viridis* определяли на эритроцитах донорской крови, суспензию которых предварительно отмывали 0,85% раствором NaCl, центрифугировали и ресуспензировали в 10-ти кратном объеме глицин - NaOH буфере (0,01 М, pH-7,8), содержащего NaCl (0,85 грамм на 100 мл буфера). К 2,5 мл суспензии отмытых эритроцитов добавляли по 0,5 мл испытуемых образцов, содержащих фосфолипазу A_2 , встряхивали и инкубировали при температуре 37°C в термостате в течение 18 часов. В контрольную пробу добавляли 0,5 мл физиологического раствора. После инкубации пробирки с содержимым встряхивали и центрифугировали при 2000 g 20 минут.

В надосадочной жидкости определяли концентрацию свободного гемоглобина. С этой целью 0,5 мл надосадочной жидкости смешивали с 3,5 мл 0,04% раствора NH_4OH и исследовали на ФЭКе при длине волны 540 нм [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Фосфолипазную активность изучали в экстрактах из мицелия культур гриба *P. viridis* и их белковых фракциях. В таблице 1 представлены данные фосфолипазной активности экстрактов и их белковых фракций, полученных из мицелия культур гриба *P. viridis* (№1-5), выращенных на агаризованной среде Чапека. Фосфолипазная активность данных экстрактов, колебалась от 0,010 до 0,020 ед/мл и составила в среднем $0,017 \pm 0,004$ ед/мл, что в пересчете на массу мицелия равнялось $0,19 \pm 0,06$ ед/г. Липолитическая активность их белковых фракций колебалась от 0,40 до 0,78 ед/мл и равнялась в среднем $0,65 \pm 0,12$ ед/мл. Наблюдаемая разница в активности фермента экстракта и его белковой фракции, по-видимому, обусловлена денатурацией белка при осаждении 70% ацетоном.

Таблица 1. Ферментативная активность фосфолипазы A_2 , выделенной из мицелия гриба *P. viridis*.

№ культуры	Штамм	Возраст культуры, мес.	Удельная активность		
			Белковой фракции ед/мл	Экстракта ед/мл	Мицелия ед/гр
1	Б-1	1	0,78	0,020	0,12
2	Б-1	1,5	0,40	0,010	0,22
3	Б-2	1,0	0,60	0,018	0,20
4	Б-2	1,5	0,78	0,020	0,14
5	Б-3	1	0,70	0,017	0,27
x	-	-	$0,65 \pm 0,12$	$0,017 \pm 0,004$	$0,19 \pm 0,06$

В таблице 2 представлена фосфолипазная активность культуральной жидкости и ее белковой фракции культур гриба *P. viridis* (№6-7), которая проявила меньшую удельную ферментативную активность. Возможно, здесь сыграло роль большое разведение фермента в общей массе питательной среды (500 мл).

Анализ липидного состава субстрата после ферментативного гидролиза в отсутствие глицерофосфохолина и фосфатидной кислоты выявил наличие лизофосфатидилхолина и свободной жирной кислоты. Это позволяет считать, что

активность экстракта мицелия и его белковой фракции гриба *P. viridis* обусловлена присутствием в них экзогенной фосфолипазы A_2 . Оптимум действия грибной фосфолипазы A_2 проявляли в диапазоне pH 8,0-9,0 (рис.1), что совпадает с диапазоном pH-фосфолипаз A_2 , выделенных из ядов змей и насекомых [9].

Таблица 2. Ферментативная активность фосфолипазы A_2 , выделенной из культуральной жидкости гриба *P. viridis*.

№ культуры	Штамм	Возраст культуры, мес.	Удельная активность	
			Культуральной жидкости ед/мл	Белковой фракции ед/мл
6	Б-1	1	0,0080	0,21
7	Б-2	1	0,0096	0,24

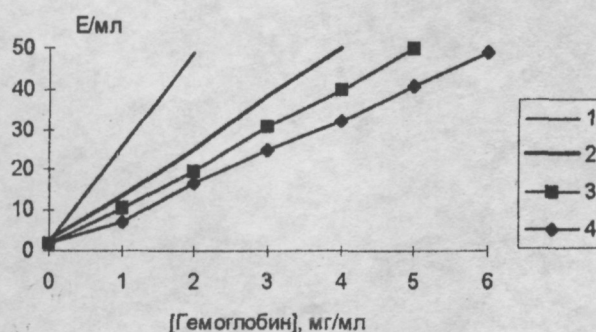


Рисунок 1.

Зависимость количества свободного гемоглобина, выделившегося при лизисе эритроцитов от активности фосфолипазы A_2 . 1-культура №3; 2- культура №6; 3-культура №7; 4-Фосфолипаза A_2 из яда гюрзы. По оси ординат: удельная активность фосфолипазы A_2 . По оси абсцисс: концентрация свободного гемоглобина.

Таким образом, результаты исследования указывают, что мицелий гриба *P. viridis* обладает малой, но ярко выраженной фосфолипазой активностью. При сравнении фосфолипазной активности мицелия гриба *P. viridis* с фосфолипазой активности яда гюрзы, последний был активнее в 200000 раз. То же самое можно сказать и о гемолитических свойствах грибной фосфолипазы A_2 . Как видно из представленных на рисунке 2, данных при одинаковой исходной удельной активности гемолитическая активность грибной фосфолипазы A_2 была гораздо слабее гемолитической активности фосфолипазы A_2 из яда гюрзы.

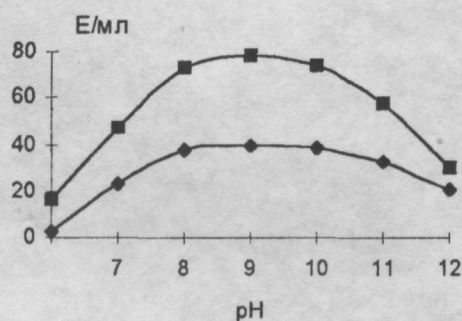


Рисунок 2.

pH-зависимость активности фосфолипазы A_2 , выделенной из мицелия гриба. 1.- культура №1, 2- культура №2 По оси ординат: удельная активность фосфолипазы A_2 . По оси абсцисс - pH

Сопоставление гемолитической активности фосфолипаз A_2 , выделяемых из мицелия и культуральной жидкости культур гриба *P. viridis* показало, что наибольшей гемолитической активностью обладала фосфолипаза A_2 , выделенная из культуральной жидкости.

Таким образом, полученные нами результаты исследования свидетельствуют, что мицелий гриба *P. viridis* является слабым продуцентом экзогенной фосфолипазы A_2 , обладающей ферментативной и гемолитической активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ахунова А.М. (1991) Лабор. дело, №4, 55-58.
2. Ахунова А.М. (1991) Тер. Архив, №10, 19-24
3. Кейтс М. (1975) Техника липидологии. М. Мир.
5. Туйчибаев М.У., Якубов И.Т., Рахимов М.М., Ташмухамедов Б.А. (1984) Биохимия, 49. 1546-1555.
6. Bonants P.J., Fitters P.F., Thijs H; den Beider E; Waalwijk C; Henfling J.M. (1995) Microbiology, 141 (Pt4), 775-784.
7. Gucalp R.; Carlisle P.; Gialanella P.; et al (1996) Clin. Infect. Dis., 23 (2); 391-393.
8. Nicole Martin-Moutot, Herve Rochat (1979) Toxicon., 17, 127-136.
9. Samson R.A. (1974) Paecilomyces and some allied hyphomycetes. Studies in micology №6. Centrabureau voor Schimmelcultuur, Baarn, the Netherland.
10. Uys C.J., Don P.A., Jchrire V., Barnard C.H. (1963) S. Afr. Med. J. 37, 1267-1280.

Поступила 12.05.98.

SOME PROPERTIES OF EXOGENIC PHOSPOLIPASE A_2 PRODUCING BY FUNGUS PAECILOMYCES VIRIDIS

YULAEV M.F., AHUNOVA A.M.

The Central Research Laboratory of Samarkand Medical Institute, Samarkand,
703000, tel (3662) 33 37 88 Republic of Uzbekistan

The lipolytic activity of extract of mycelium and cultural fluid of fungus *Paecilomyces viridis* and their protein fraction was investigated. The micelium of fungus *Paecilomyces viridis* is a weak producent of exogenic phospolipase A_2 , possessing the hemolytic activity. The optimum of zungal phospolipase A_2 activity was whithin a range of pH 8.5-9.0 which coincides with the optimum of activity of phospolipase A_2 from venoms of snakes and insects.

Key word: *Paecilomyces viridis*, phospolipase A