УДК 616.233:616-002.954

И.И. Ефременко

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АЛЛЕРГЕНА ТАРАКАНОВ BLATTELA GERMANICA И PERIPLANETA AMERICANA

В настоящей статье разработан метод получения аллергена из цельного таракана, фекалиев и хитинового покрова (сумок оотек и крыльев) Blattela germanica и Periplaneta americana. Аллерген представляет собой прозрачную жидкость темно-коричневого цвета (для хитинового покрова – светло-коричневого); он стерилен, не токсичен, pH в пределах 7,0±0,2. Срок годности аллергена зависит от состава экстрагирующей жидкости. При гель-хроматографии и при диск-электрофорезе в полиакриламидном геле зарегистрировано 2 фракции белковой природы, которые обладали специфической аллергенной активностью.

В результате проведенной работы получено, что оптимальные условия для проведения гель-фильтрации экстракта таракана обеспечивает экстрагирующая жидкость без фенола (с реактивом № 1) на колонке размером 1,5 × 80 см с использованием G-100, G-150.

Наибольшим содержанием белка обладает аллерген, приготовленный на экстрагирующей жидкости без фенола (с реактивом № 1) из цельного таракана; средней активностью – экстракт из фекалиев и малым содержанием белка – экстракт из сумок оотек и крыльев, то есть хитиновый покров.

Введение

В настоящее время в мире наблюдается рост заболеваемости бронхиальной астмой [1]. По эпидемиологическим данным, от нее страдают до 5% населения земного шара. От 20% (в возрасте старше 50 лет) до 40–70% (в детском и зрелом возрастах) больных бронхиальной астмой имеют атоническую форму болезни. Длительное время основным диагностическим и лечебным аллергеном была домашняя пыль [2]. Впоследствии стали появляться данные о том, что домашняя пыль является многокомпонентной системой, в состав которой входят различные виды аллергенов: пера подушек, продукты жизнедеятельности синантропов и т.д. [3]. Домашняя пыль определяет круглогодичное течение болезни, что связано, в частности, с постоянно присутствующими в жилище человека представителями насекомых и паукообразных. Последние являются определяющими для течения атопической бронхиальной астмы [4].

В последние годы стала появляться информация о важной роли насекомых в развитии круглогодичной атопической бронхиальной астмы (АБА). Обращено внимание на тараканов как насекомых, распространенных во всех уголках мира. И частицы тела тараканов, и продукты их жизнедеятельности обладают высокой аллергенной активностью [5]. В экстрактах тел тараканов определяется до 10 белковых фракций, обладающих в той или иной степени аллергенной активностью [6]. Тем не менее только 1–3 из них вызывают реакции у 100% больных, к оставшимся фракциям сенсибилизировано от 20 до 70% [7].

Частота сенсибилизации к аллергенам таракана высока. Так, по данным Э.А. Доценко [5], до 60% больных АБА, которые были сенсибилизированы к домашней пыли, имели одновременно и гиперчувствительность к таракану. Кроме того около 10% больных АБА имели изолированную сенсибилизацию к тараканам, что было подтверждено исследованиями in vitro и in vivo. Сходные данные приводятся многими зарубежными исследователями [8].

Целью настоящей работы является выделение аллергена из тараканов (Blattela germanica и Periplaneta americana), полученного из цельного таракана, фекалиев и хитинового покрова (сумок оотек и крыльев); выявление органолептических свойств аллер-

гена; изучение аллергена тараканов методами гель-фильтрации и диск-электрофореза; сравнение белковой активности аллергена двух видов синантропных тараканов: Blattela germanica и Periplaneta americana.

Материал и методы

За базисный способ экстракции аллергена таракана приняли метод Соса; аллерген также получали методом быстрого приготовления, методом длительного хранения и методом осаждения ацетоном (Н.В. Андрианова, С.М. Титова, 1970); определение белка проводили по методу Лоури, Бредфорда, Несслера (Практическая химия белка, 1989). Анализ физико-химических свойств экстракта проводили методами диск-электрофореза в 15%-ом полиакриламидном геле (ПААГ); гель-хроматографии на колонках размером 2 × 40 см и 1,5 × 80 см и сефадексами типов G-75, G-100, G-150.

Результаты исследований

Для выявления оптимальных условий экстракции нами были использованы различные варианты: во-первых, колонки двух размеров (первая размером 2 × 40 см, вторая – 1,5 × 80 см); во-вторых, разные виды сефадексов (G-75, G-100, G-150); в-третьих, для создания диссоциирующих условий использовали Tween-40; в-четвертых, использовали различные части тел таракана рыжего: тела, хитиновый покров (сумки оотек и крылья), фекалии – каждый в отдельности; в-пятых, два вида синантропных таракана: рыжего и американского; в-шестых, меняли состав экстрагирующей жидкости: с фенолом, с фенолом и Tween-40, без фенола (с реактивом № 1), без фенола (с реактивом № 1) и Tween-40, с дистиллированной водой, с дистиллированной водой и Tween-40 (таблица).

Экстракты тел и фекалиев таракана, приготовленные на экстрагирующей жидкости по методу Соса, представляли собой прозрачную жидкость темно-коричневого цвета без запаха (при условиях хранения +4°С – до 2-х лет). Экстракт из хитинового покрова на экстрагирующей жидкости (с фенолом) имел такие же свойства, как у цельного, но отличался по цвету: имел светло-коричневую окраску. При исключении из экстрагирующей жидкости реактива № 2 (фенола) экстракты из тел и частей таракана свои прежние свойства не утратили, изменился лишь срок хранения: при температуре +4°С не более 2-х месяцев. В противном случае меняется окраска на более темную и появляется специфический запах. При замене экстрагирующей жидкости на дистиллированную воду срок хранения экстракта из тел и частей таракана при температуре +4°С был не более 3 суток. При добавлении к экстрагирующей жидкости (с фенолом, без фенола, с дистиллированной водой) Tween-40 существенных изменений в физико-химических свойствах и сроках хранения не наблюдали.

Для разделения белковых групп в зависимости от молекулярного веса использовали метод гель-фильтрации с применением различных видов сефадекса и колонок разных размеров.

Колонку диаметром 2 см и длиной 40 см заполняли сефадексом G-75 на 70% высоты и проводили разделение белков экстракта цельного таракана, приготовленного на стандартной экстрагирующей жидкости методом гель-фильтрации. Элюцию проводили со скоростью 1 мл в минуту, после того как внесли 0,5 мл экстракта, предназначенного для фракционирования белков, и заканчивали после сбора 500 мл объема.

Колонку калибровали, используя очищенные белки различной молекулярной массы: иммуноглобулин человека (м.в. – 160 000 Д), бычий сывороточный альбумин (м.в. – 67 000 Д), овальбумин (м.в. – 45 000 Д), лактальбумин (м.в. – 18 000 Д) производства фирмы «Биотон». На основании полученных данных строили калибровочную кривую в координатах «объем выхода – молекулярный вес» с последующим расчетом

молекулярного веса фракций, полученных после разделения экстракта таракана. Из таблицы видно, что молекулярная масса белка, вышедшего в первом пике (объем – 35–60 мл), составляла 135–150 кД, а в объеме 70–120 мл она была в пределах 80–102 кД. Для гель-хроматографии использовали, с одной стороны, экстракт тараканов, приготовленный различными способами, а с другой – экстракты различных частей тела тараканов (таблица).

Нами было проведено более 60 опытов с меняющимися условиями эксперимента: выбирали оптимальный вариант экстрагирующей жидкости; размеры колонок и типы сефадексов; использовали два вида синантропных тараканов: рыжего и американского – и их составные части: фекалии, крылья и сумки оотек.

Таблица – Виды экстракции и характеристика аллергена таракана Blattela germanica

№ серии	Вид экстракции	Размер колоки, см	Источник аллергена	Органолептические свойства аллергена таракана	Вид геля	Число фракций белка	Объем выхода белка, мл	Молекулярная масса белка, кД	Число фракций (э/форез)
1	Экстрагирующая жидкость с фенолом	2×40	Цельный	Темно-корич. цвет, прозрач., без запаха, срок хр. – до 2-х лет	G-75	1,2	нд	нд	нд
					G-100	1 2	50 105	135 92	2
			Фекалии	Темно-корич. цвет, прозрач., без запаха, срок хр. – до 2-х лет	G-75	1,2	нд	нд	нд
					G-100	1 2	40 95	144 80	2
			Хитиновый покров	Светло-корич. цвет, прозрач., без запаха, срок хр. – до 2-х лет	G-75	1,2	нд	нд	нд
					G-100	1 2	нд	нд	нд
2	Экстрагирующая жидкость без фенола (с реак. № 1)	1,5×80	Цельный	Темно-корич. цвет, прозрач. жидк. без запаха, срок хр. – до 2-х мес.	G-100	1 2	45 120	144 80	2
			Фекалии	Темно-корич. цвета, прозрач. жидк. без запаха, срок хр. – до 2-х месяцев	G-100	1 2	40 110	148 88	2
3	Экстрагирующая жидк. с фенолом + Tween-40	1,5×80	Цельный	Темно-корич. цвет, прозрач. без запаха жидкость, срок хр. – до 2-х лет	G-100	1 2	45 120	144 80	2
					G-150	1 2	55 130	147 84	2
			Фекалии	Темно-корич. цвет, прозрач. без запаха жидкость, срок хр. – до 2-х лет	G-100	1 2	40 100	148 94	2
					G-150	1 2	нд	нд	нд
4	Экстрагирующая жидк. без фенола (с реак. № 1) + Tween-40	1,5×80	Цельный	Темно-корич. цвет, прозрач. без запаха, срок хр. – до 2-х мес.	G-100	1 2	45 110	144 88	2
					G-150	1 2	55 120	147 92	2

Продолжение таблицы

			Фекалии	Темно-корич. цвет, прозрач. без запаха, срок хр. – до 2-х мес.	G-100	1 2	45 100	146 94	2
					G-150	1 2	нд	нд	нд
5	С дистиллированной водой	1,5×80	Цельный	Корич. прозрач. жидкость без запаха, срок хр. – до 3-х суток	G-100	1 2	45 95	144 102	2
6	С дистиллированной водой + Tween-40	1,5×80	Цельный	Коричн. прозрач. жидкость без запаха, срок хр. – до 3-х суток	G-100	1 2	35 100	150 94	2
7	Экстрагирующая жидкость без фенола (с реак. № 1)	1,5×80	Цельный американский таракан	Темно-корич. цвет, прозрач. жидкость без запаха, срок хр. – до 2-х месяцев	G-100	1 2	55 115	148 94	2

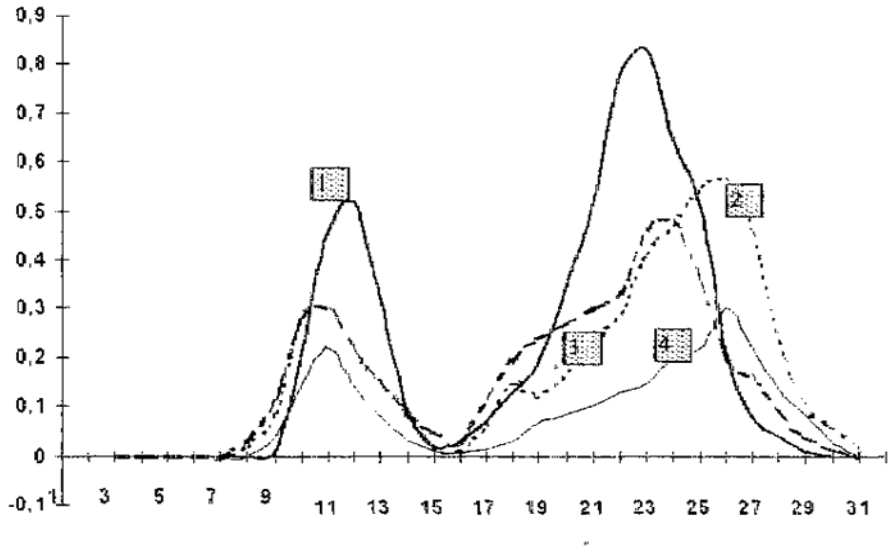
Примечание – нд – не делали.

При гель-хроматографии и при диск-электрофорезе в полиакриламидном геле нам удалось зарегистрировать только две фракции белковой природы, которые обладали специфической аллергенной активностью. Первая фракция независимо от условий проведения выходила в объеме 35–60 мл, а максимального значения она достигала в 40–60 мл. Вторая фракция наблюдалась в объеме 70–115 мл, достигая пика в 90–105 мл.

При проведении гель-хроматографии аллергена тел таракана на экстрагирующей жидкости с фенолом (G-100) наблюдали первый пик в объеме 20–40 мл; второй – в 65–120 мл (рисунок 1–1).

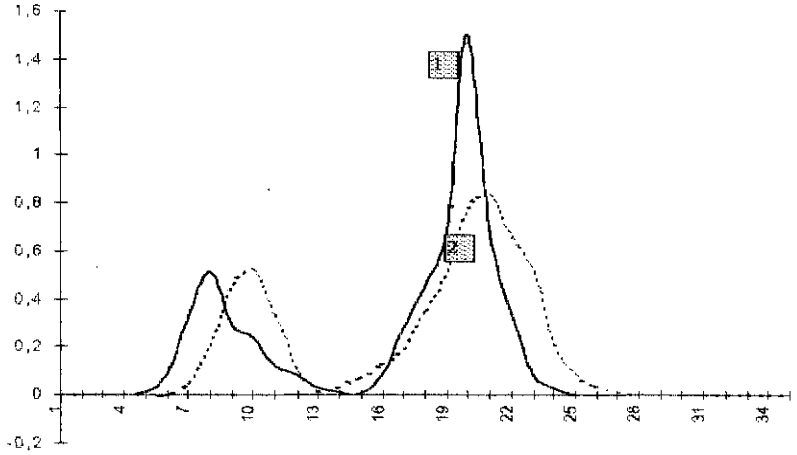
При использовании экстрагирующей жидкости без фенола (с реактивом № 1) наблюдали уменьшение значения результатов: первая фракция наблюдалась в 30–70 мл; вторая фракция – в 75–130 мл (рисунок 1–2). Это можно объяснить тем, что одновременно с фракцией № 2 выходил фенол, находящийся в экстрагирующей жидкости. Он-то и увеличивал значения результатов. При элюции одного раствора фенола мы получили следующую картину: выходит один пик, который начинается в объеме 70 мл, максимального значения он достигает в 100–105 мл и падает в объеме 115–125 мл.

При добавлении в экстрагирующую жидкость Tween-40 (для разрыва водородных связей) мы получили также две фракции белковой природы, но пики немного «растягиваются»; значение результатов практически не изменилось и осталось схожим, как и при использовании экстрагирующей жидкости без фенола (с реактивом № 1): первый пик наблюдали в объеме 30–60 мл, второй пик – в 65–130 мл (рисунок 1–2).



По оси абсцисс – номера фракций, по оси ординат – оптическая плотность (Я = 280 нм). 1 – экстрагирующая жидкость с фенолом; 2 – экстрагирующая жидкость без фенола (с реактивом № 1); 3 – экстрагирующая жидкость с фенолом и Tween-40; 4 – экстрагирующая жидкость без фенола (с реактивом № 1) и Tween-40.

Рисунок 1 – Экстракция аллергена таракана на различных видах экстрагирующей жидкости (сефадекс G-100, колонка 1,5 × 80)



(По оси абсцисс – номера фракций, по оси ординат – оптическая плотность (λ = 280 нм). 1 – экстракция на колонке 2 × 40 см; 2 – экстракция на колонке 1,5 × 80 см.

Рисунок 2 – Экстракция цельного аллергена таракана на колонках различных размеров (сефадекс G-100)

Мы меняли экстрагирующую жидкость на дистиллированную воду и, проведя серию опытов с ней, добавляли в дистиллированную воду 0,1 мл 0,001%.

При гель-хроматографии и при диск-электрофорезе в полиакриламидном геле нам удалось зарегистрировать только две фракции белковой природы, которые обладали специфической аллергенной активностью.

Для проведения ряда опытов мы использовали два вида колонок: диаметром 2 см, высотой 40 см и диаметром 1,5 см, высотой 80 см – и сефадексы типа G-75, G-100,

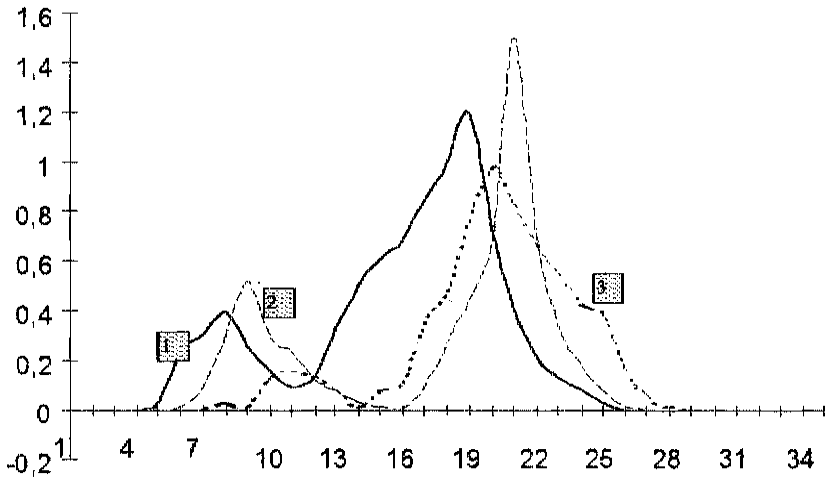
G-150. Большинство опытов (более 40) проводили на колонке диаметром 1,5 см, высотой 80 см с использованием сефадексов типа G-100, G-150. При проведении разделения белка цельного таракана с реактивом № 1 зафиксировали две фракции белковой природы. Первый пик растет с объема 40–50 мл, максимального значения он достигает в объеме 50–65 мл, падает в 70 мл. Второй пик растет с 70–75 мл объема, максимального значения он достигает в 100–130 мл и падает в объеме 140–160 мл (рисунок 2).

Для более точного определения молекулярной массы исследуемых белков нами использовались сефадексы типа G-100 и G-150. Как известно, G-100 отделяет вещество с молекулярным весом более 100 000, а G-150 – с молекулярным весом более 150 000, от веществ, имеющих меньший молекулярный вес.

При замене колонки высотой 40 см на большую размером во всех последующих опытах наблюдали смещение полученных фракций, т.к. изменялся свободный объем колонки (был 20 мл, стал 30 мл) и создавались лучшие условия для разделения белковых фракций (рисунок 3).

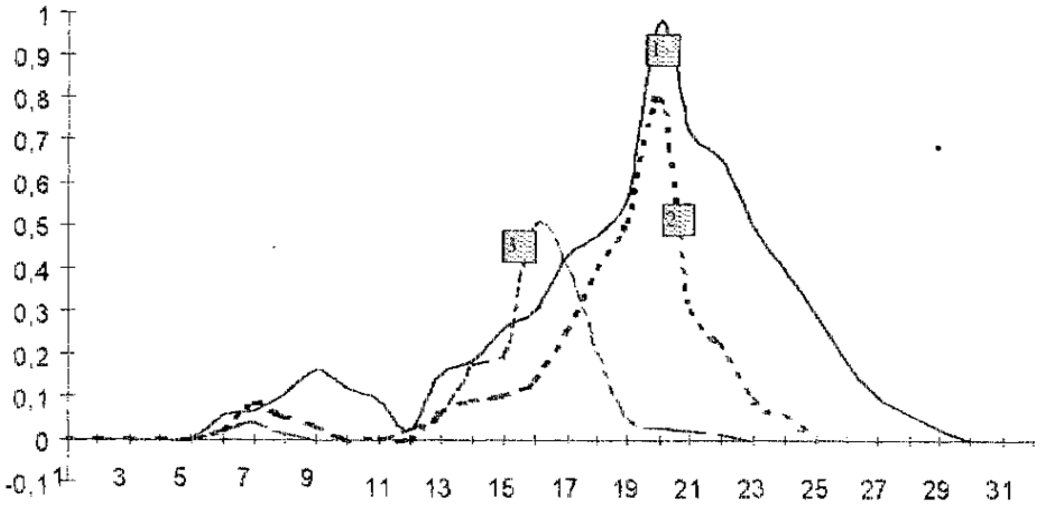
На основании вышесказанного можно сделать вывод, что самые оптимальные условия для проведения гель-фильтрации экстракта таракана обеспечивает экстрагирующая жидкость с реактивом № 1 (без фенола) на колонке длиной 80 см и диаметром 1,5 см с использованием сефадекса типа G-100, G-150.

Кроме того, для определения фракционного состава частей тела таракана использовали экстракты цельного таракана, сумки оотек и крылья таракана и фекалии (рисунок 4). При разделении белка экстракта из фекалиев таракана рыжего методом гель-фильтрации были получены следующие результаты: выделили две фракции белковой природы. Первая фракция проявляется в объеме 45–54 мл, вторая фракция – в 65–120 мл (рисунок 4–2). При разделении белка из крыльев и сумок оотек таракана рыжего мы получили две фракции, обладающие аллергенной активностью. Первая фракция проявилась в объеме 30–40 мл, вторая – в 65–115 мл (рисунок 4–3).



По оси абсцисс – номера фракции, по оси ординат – оптическая плотность (λ = 280 нм).
1 – на сефадексе G-75; 2 – на сефадексе G-100; 3 – на сефадексе G-150.

Рисунок 3 – Экстракция аллергена цельного таракана с использованием различных видов сефадекса (колонка 1,5 × 80 см)



По оси абсцисс – номера фракций, по оси ординат – оптическая плотность (λ =280 нм).
1 – экстракция цельного таракана; 2 – экстракция фекалиев;
3 – экстракция хитинового покрова (крыльев и сумок оотек).

Рисунок 4 – Экстракция аллергена из различных частей таракана
(сефадекс G-100, колонка 1,5 × 80 см)

Если взять экстракт цельного таракана и провести разделение белковых групп методом гель-хроматографии, мы получим следующую картину: две фракции белковой природы. Первый пик растет в объеме 30–60 мл; второй пик – в объеме в 65–135 мл (рисунок 4–1).

По этим усредненным данным, можно сделать вывод, что наибольшим содержанием белка обладает аллерген, приготовленный на экстрагирующей жидкости с реактивом № 1 из цельного таракана; средним содержанием обладает экстракт из фекалиев, и малым содержанием белка – экстракт из сумок оотек и крыльев, т.е. хитиновый покров (рисунок 4).

Кроме таракана рыжего из других синантропных видов нами использовался американский таракан, экстракт тела которого приготавливался на экстрагирующей жидкости № 1. И при гель-хроматографии нам удалось зарегистрировать тоже две фракции белковой природы. Первый пик имеет место в объеме 40–60 мл, второй пик регистрируется в 75–140 мл.

Усредненные данные из серии опытов свидетельствуют о том, что американский таракан и таракан рыжий обладают сходной белковой активностью.

С отдельными образцами полученных аллергенов проведены электрофоретические исследования. Для этого использовали экстракт цельного аллергена тараканов, а также фракции после гель-хроматографии на сефадексе G-100, соответствующие минимальному выходу белка (2 пика).

Анализ электрофореграмм показывает, что в препарате присутствует ряд белковых фракций. Во-первых, это фракция с небольшой молекулярной массой: белок мигрирует в области альбумина, что свидетельствует о близости молекулярных весов полученного белка и альбумина. Обращает на себя внимание наличие широкой («смазанной») полосы на старте. По всей видимости, она соответствует белку с более высокой молекулярной массой, которая двигается медленнее.

Фактически эти 2 полосы и определяют основную массу белка в препарате. Тем не менее в ряде экспериментов мы выявили наличие следовых полос между двумя основными. По нашему мнению, полученные результаты не поддаются однозначной трактовке. С одной стороны, трудно представить, что при экстракции цельных тел в водную фазу переходит только 2 белка; с другой – между ними имеются слабовыраженные полосы, которые могут указывать на присутствие минорных белков, которые гель-хроматографически могут не обнаруживаться. В принципе подтверждением этому служат работы R.P. Stankus [7], где авторы описывают до девяти аллергенных компонентов в экстракте тел тараканов с молекулярной массой от 26 до 120 кД. Т.е. это принципиально тот интервал, в котором мы зарегистрировали «смазанные» полосы.

Заключение

Аллерген из тел тараканов – Allergenum ex Blattela germanica – представляет собой прозрачную темно-коричневую жидкость, обладающую следующими медико-биологическими и физико-химическими свойствами: он специфичен, отсутствуют неспецифические свойства, pH=7,2±0,2; содержание фенола в пределах 0,2–0,4%; при температуре хранения +4°С срок годности 2 года. Аллергены из фекалиев и хитинового покрова отличаются лишь по цвету (темно-коричневый и светло-коричневый соответственно).

При выборе оптимальных условий экстракции меняли состав экстрагирующей жидкости, размеры колонок, типы сефадексов. Наиболее оптимальными условиями для проведения гель-фильтрации экстракта таракана являются: экстрагирующая жидкость без фенола (с реактивом № 1), колонка размером 1,5 × 80 см и использование сефадексов типа G-100, G-150.

При гель-хроматографии экстракт тел тараканов содержал 2 белковые фракции, обладающие аллергенной активностью. Экстракты хитинового покрова, фекалиев содержат аналогичные белковые фракции, что позволяет приписать им аллергенные свойства. Содержание белка в указанных фракциях для экстрактов хитинового покрова, фекалиев было ниже, чем для экстракта тел тараканов.

При сравнении двух видов синантропных тараканов: рыжего и американского – выявлено, что они обладают сходной белковой активностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богова, А.В. Аллергические заболевания / А.В. Богова // Эпидемиология неинфекционных заболеваний / под ред. А.М. Вихерта. – М., 1996. – С. 130.

2. Федосеева, В.Н. Аллергия к домашней пыли и внутрижилищные инсектные аллергены / В.Н. Федосеева [и др.]. – Interh. J. Immunorehabilitation. – Sept. 1997. – № 7. – P. 153.

3. Федоскова, Т.Г. Сенсибилизация к аллергенам тараканов у больных атонической БА с гиперчувствительностъю к домашней пыли : автореф. дис. … канд. мед. наук / Т.Г. Федоскова. – М., 1996.

4. Желтикова, Т.М. Разработка метода получения и изучение свойств экстракта аллергенов из клещей амбарно-зернового комплекса / Т.М. Желтикова, А.М. Мокроносова, В.Б. Гервазиева // ЖМЭИ. – 1994. – № 7. – С. 44–47.

5. Доценко, Э.А. Роль экологических факторов в развитии бронхиальной астмы : автореф. дис. ... докт. мед. наук / Э.А. Доценко. – Витебск, 1996.

6. Chii-Huci Wu, PhP, and Joung-Liarg Lan, MD. Cockroach hypcrscnsitivity: Gsolation and partial characterizftion of major allergens // Allergy and Clinical Smmunology. – 1988. – Vol. 82, № 5. – P. 727–735.

7. Richman P., Ph.D., Hadayat A., Khau, МюD. Floyd. J. Malvcaux, M.D. and Harald Baer, Ph.D. // Jhe importaut sources of German cockroach allergens as determined by RAST analyses // Allergy and Clinical Immunology. – 1984. – Vol. 73, № 5. – P. 590–595.

8. Morris, E.C. Cockroach is a significant allergen for inner city children (Abstract) / E.C. Morris, T.E. Smith, Z.B. Kelly // J. Allergy Clin. Immunol. – 1986. – P. 206.

9. Stankus, R.P. Identification and characterization of important cocroach allergens / R.P. Stankus, E. Homer, S.B. Lehrer // J. Allergy Clin. Immunol. – 1990. – Vol. 86, № 5. – P. 781–786.

Yefremenko I.I. **Physical and Chemical Characteristics of Blattela Germanica and Periplaneta Americana Cockroach Allergen**

The article elaborates the method of obtaining allergen from a whole cockroach, faeces and chitin coating (ootek bags and wings) of Blattela germanica and Periplaneta americana. The allergen is dark brown clear liquid (for chitin coating it is light brown); it is sterile, non-toxic, pH within 7,0±0,2. Expiration term of the allergen depends on the composition of extracting liquid. At gel chromatography and disk electrophoresis in poly acrele amid gel 2 fractions of albumen nature were registered which had specific allergen activity.

As a result of our work we stated that optimal condition for gel filtration of cockroach extract is extracting liquid without phenol (with reactive № 1) at 1,5 × 80 cm column with the use of G-100, G-150.

The allergen obtained with extracting liquid without phenol (with reactive № 1) from a whole cockroach possesses the biggest amount of albumen; faeces extract possesses medium activity and ootek bags and wing extract or chitin coating extract possesses small quantity of albumen.

Рукапіс паступіў у рэдкалегію 02.12.2011