

A.İ. Qurbanov

Azərbaycan Tibb Universitetinin
mikrobiologiya və immunologiya kafedrası

ASKORBİN TURŞUSUNUN CANDIDA GÖBƏLƏKLƏRİNİN FAQOSİTOZUNA TƏSİRİ: MİKROORQANİZMİN ANTIOKSİDANT FERMENTLƏRİNİN ƏHƏMİYYƏTİ

Sərbəst radikalları neytrallaşdırmaq qabiliyyətinə malik olan antioksidantlar faqositoz prosesinə təsir edə biləcək ekzogen və endogen amillər içərisində mühüm əhəmiyyət kəsb edir [8,10]. Belə ki, faqositozun ən mühüm mikrobosid mexanizmi – oksigendən asılı mexanizm faqositlər tərəfindən sərbəst oksigen radikallarının hasilatı ilə müşayiət olunur. Bu nöqteyi nəzərdən antioksidantların mikroorqanizmlərin faqositozuna təsiri mühüm maraq doğurur. Əvvəlki tədqiqatlarda təbii antioksidantların nümayəndəsi olan askorbin turşusunun stafilokokların faqositozuna dozası zəifləşdirici təsiri aşkar edilmişdir [1]. Lakin mikroorqanizmlərin məxsusi antioksidant fermentlərinin antioksidantların faqositoza təsirindəki mümkün rolu indiyədək öyrənilməmişdir. Bunu nəzərə alaraq askorbin turşusunun (AT) faqositoza təsirində mikroorqanizmin antioksidant fermentlərinin (katalaza və superoksiddismutaza) əhəmiyyətini öyrənmək müəyyən maraq doğurur.

Material və metodlar.

Antioksidant fermentlərin miqdarına görə kəskin fərqlənən *Candida albicans* ştammlarının siçan makrofaqları tərəfindən faqositozuna AT offisinal preparatının təsiri öyrənilmişdir. *C. albicans* ştammlarında katalaza və superoksiddismutaza (SOD) fermentlərinin miqdarı ultrasəs dalğaları ilə parçalanmış göbələk hüceyrələrinin lizatunda spektrofotometrik üsulla təyin edilmişdir. Katalaza aktivliyi vahidi kimi 1 mkmol H_2O_2 1 dəqiqə ərzində parçalayan fermentin miqdarı qəbul edilmişdir. SOD aktivliyi vahidi kimi tetranitrotetrazol abısının reduksiyasını dəqiqədə 50% ingibisiya edən fermentin miqdarı götürülmüşdür [6, 7]. Müəyinə edilən *C. albicans* ştammları içərisində antioksidant fermentlərin miqdarı 1-ci ştammda minimum (katalaza - 18,1 vahid/mq, SOD - 198,4 vahid/mq), 4-ci ştammda isə maksimum səviyyədə (katalaza - 43,5 vahid/mq, SOD - 384,2 vahid/mq) olduğundan, məhz bu ştammların faqositozuna askorbin turşusunun təsiri müqayisəli qiymətləndirilmişdir.

Faqositoz təcrübəsi üçün ağ siçanlardan peritoneal makrofaqların alınması yüngül efir narkozu altında dekapitasiya ilə öldürüldükdən sonra periton boşluğunu Xenks məhlulu ilə yumaqla əldə edilmişdir. Periton mayesi sentrifugalasdırılmış, çöküntüüstü maye atıldıqdan sonra çöküntü Xenks məhlulunda həll edilmiş və Qoryayev

kamerasında makrofaqlar sayılmış, Xenks məhlulu ilə 1 ml-də 5×10^6 makrofaq olmaq şərtilə standartlaşdırılmışdır.

C. albicans laborator ştammlarının ət-pepton aqarında inkişaf edən iki günlük kulturasından buferləşdirilmiş fizioloji məhlulda hazırlanmış suspenziya 4000 dövr/dəq. sürətilə 10 dəq. sentrifugalasdırılmış, çöküntüüstü maye atıldıqdan sonra 20 %-li normal siçan qan zərdabı əlavə edib, 30 dəq 37° C-də inkubasiya etməklə opsonizasiya edilmişdir. Bundan sonra qarışıq yenidən sentrifuqadan keçirilmiş, alınmış çöküntü fizioloji məhlulda həll edilməklə standartlaşdırılmışdır.

Faqositoz təcrübəsi dibi dar olan sentrifuqa şüşələrində mikrohəcmərdə aparılmışdır. Bunun üçün 0.1 ml Xenks məhlulundakı makrofaq suspenziyası (5×10^5 makrofaq) üzərinə 1 ml-də $2,5 \times 10^8$ mikrob hüceyrəsi olan suspenziyadan 0,02 ml əlavə edib qarışdırılmış və 37° C-də inkubasiya edilmişdir. Beləliklə, faqositoz prosesinin getdiyi mühit makrofaq və opsonizasiya edilmiş mikroorqanizmlərin Xenks məhlulundakı qarışıqından ibarət olmuş və bu qarışıqda makrofaqların sayının mikroorqanizmlərə nisbəti təqribən 1:10 nisbəti kimi olmuşdur. Inkubasiyadan 60 və 120 dəq. sonra bu qarışıqdan yaxmalar hazırlanmış və Romanovski-Gimza üsulu ilə boyadılmışdır. Mikroskop altında ($\times 1000$) saymaq yolu ilə faqositar aktivlik – mikroorqanizmləri udmuş makrofaqların onların ümumi sayına nisbətən faizi və faqositar göstərici – bir makrofaq tərəfindən udulmuş mikroorqanizmlərin orta sayı hesablanmışdır. Faqositoz prosesində makrofaqların udduqları bakteriya hüceyrələrini öldürmək – killing qabiliyyəti makrofaqlarla göbələk hüceyrələri arasındakı qarşılıqlı təsirdən müəyyən müddət sonra göbələk hüceyrələrinin sayının azalmasına əsasən təyin edilmişdir [5]. Bunun üçün inkubasiyadan 120 dəq. sonra faqositar qarışıqdan 0,01ml götürüb müvafiq həddə qədər durulaşdırılmış və Petri kasalarındakı Saburo aqarının səthinə əkilmişdir. Kontrol kimi təcrübə qarışığına identik, lakin makrofaqsız qarışıqdan istifadə edilmişdir. 2 sutka 37°C-də inkubasiya etdikdən sonra kontrol və təcrübə Petri kasalarında bitmiş koloniyalar (koloniyaməmələgətirən vahid - KÖV) sayılmışdır. Təcrübə nümunələrindən bitmiş koloniyaların sayının kontrola nisbətən azalma dərəcəsi faizlə təyin edilmiş və bu killing göstəricisi hesab edilmişdir.

Askorbin turşusunun faqositoza təsirini öyrənilərkən onun 0,01; 0,05 və 0,1 mq/ml konsentrasiyaları tətbiq edilmişdir. Təcrübə kamerasına AT göstərilən konsentrasiyaları əlavə edilmiş, kontrol kameralara isə AT əvəzinə buferləşdirilmiş steril fizioloji məhlul əlavə edilmişdir.

Alınmış nəticələrin statistik işlənilməsi Styudentin etibarlılıq əmsalının təyini ilə aparılmışdır [2].

Nəticələr və müzakirə.

Müəyyən olunmuşdur ki, askorbin turşusu 0,01 mq/ml konsentrasiyada *Candida* göbələklərinin antioksidant fermentlərin miqdarına görə kəskin fərqlənən hər iki ştammların makrofaqlarla faqositozuna nəzərəcarpan təsir göstərmir (cədvəl 1).

Cədvəl 1.

Antioksidant fermentlərin miqdarına görə kəskin fərqlənən *Candida albicans* ştammlarının makrofaqlarla faqositozuna askorbin turşusunun təsiri

Ştammların №-si	Askorbin turşusunun miqdarı (mq/ml)	Faqositar aktivlik (%)		Faqositar göstərici		Killing (%)
		60 dəq. sonra	120 dəq. sonra	60 dəq. sonra	120 dəq. sonra	120 dəq. sonra
Ştamm №1	—	44,3±6	50±4,7	2,2 ± 0,3	2,6 ± 0,3	24,2± 2,7
	0,01	49± 6,4	55,7±4,6	2,5 ± 0,3	2,8 ± 0,4	27,5± 2,3
	0,05	28±2,6*	33,3±2,7*	1,2 ± 0,2*	1,6 ± 0,2*	17,1± 4,2
	0,1	26,7±2,9*	30,6±4,3*	1,1 ± 0,2*	1,4 ± 0,2*	12,7± 3*
Ştamm №4	—	41,3± 4,7	51,7±4,4	2,4 ± 0,4	2,7 ± 0,4	14,9± 2,3
	0,01	45± 4,9	53±4,5	2,7 ± 0,4	3,2 ± 0,3	18± 2,3
	0,05	27,3±1,8*	34,7±3,8*	1,1±0,3*	1,4 ± 0,3*	5,7± 1*
	0,1	25,7±2,3*	30,3±2,6*	0,9 ± 0,2*	1,2±0,2*	5,2± 1,4*

Qeyd: * Kontrolla müqayisədə fərq statistik cəhətdən etibarlıdır ($p < 0,05$)

AT 0,05 və 0,1 mq/ml konsentrasiyalarda *Candida* göbələklərinin hər iki ştamminin makrofaqlarla faqositozunu zəiflətməmişdir. Göründüyü kimi AT təsirindən makrofaqların hər iki göbələk ştammina qarşı faqositar aktivliyi və faqositar göstərici dozaasılı zəifləmişdir. Bu zəifləmə AT xüsusən 0,1 mq/ml konsentrasiyasında daha nəzərəçarpanır. AT göbələklərin makrofaqlarla killingini də dozaasılı zəiflətməmişdir. Belə ki, hər iki ştammin makrofaqlarla öldürülmə intensivliyinin azalması preparatın konsentrasiyası artdıqca daha aydın müşahidə olunur. Lakin antioksidant fermentlərin miqdarına görə fərqlənən ştammların makrofaqlarla killing göstəricilərini müqayisə etdikdə, AT təsirindən antioksidant fermentlərin miqdarı minimum olan *C. albicans* ştamminin (№1) makrofaqlarla öldürülməsinin əhəmiyyətsiz zəifləməsi müşahidə olunmuşdur. Belə ki, preparatın 0,05 mq/ml konsentrasiyası təsirindən bu ştammin makrofaqlarla killingi 17,1± 4,2 % olduğu halda, kontrollda bu göstərici 24,2± 0,3 % təşkil etmişdir ($p > 0,05$). Antioksidant fermentlərin miqdarı maksimum olan *C. albicans* ştamminin (№4) makrofaqlarla killingi isə AT təsirindən kifayət qədər zəifləmişdir. Belə

ki, preparatın 0,05 mq/ml konsentrasiyası təsirindən bu ştammin makrofaqlarla killingi 5,7± 1% olduğu halda, kontrollda bu göstərici 14,9± 2,3% olmuşdur ($p < 0,05$).

Beləliklə, bu göstəricilərə əsasən belə mühakimə yürütmək olar ki, AT təsirindən antioksidant fermentlərin miqdarı artıq olan *C. albicans* ştamminin makrofaqlarla killingi, antioksidant fermentlərin miqdarı az olan ştammla müqayisədə daha çox zəifləyir. Belə təsirin mexanizmini mikroorqanizmlərin katalaza və SOD fermentlərinin faqositozdakı rolu ilə əlaqələndirmək olar. Məlumdur ki, faqositoz prosesində mikroorqanizmlərin faqosom daxilindəki oksigendən asılı killingi prosesində sərbəst radikallardan müdafiədə onların antioksidant fermentləri mühüm əhəmiyyət kəsb edir. Belə ki, mikroorqanizmlərin antioksidant fermentlərinin miqdarı artdıq olduqca onların faqosit daxilindəki killingi zəifləyir [3,4]. Faqositoz prosesi ekzogen antioksidant olan AT iştirakı ilə getdikdə faqosom formalaşarkən onun tərkibinə faqositləri əhatə edən mikroəhatənin daxil olması [9] hesabına askorbin turşusunun da faqosom daxilinə keçməsi labüddür. Beləliklə, mikroorqanizmlərin antioksidant fermentləri ilə xaricdən əlavə edilən antioksidant (askorbin turşusu) faqosom daxilindəki sərbəst radikalları neytrallaşdırmaq üçün müştərəkləşir. Bu müştərək münasibətdə həm birincilərin, həm də ikincilərin və ya onların birlikdə miqdarının artıq olması mikroorqanizmlərin faqosom daxilində killinginin daha çox zəifləməsinə səbəb olur.

Alınmış nəticələr mikroorqanizmlərin məxsusi antioksidant fermentlərinin faqositozdakı rolunu bir daha təsdiq edir. Tədqiqatın nəticələri antioksidantların infeksiyon patologiyada elmi əsaslandırılmış tətbiqi üçün əhəmiyyətli ola bilər.

РЕЗЮМЕ

ВЛИЯНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ФАГОЦИТОЗ ГРИБА
CANDIDA ALBICANS: ЗНАЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ
ФЕРМЕНТОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

А.И.Гурбанов

Кафедра медицинской микробиологии и иммунологии
Азербайджанского медицинского университета

Изучено влияние разных концентраций аскорбиновой кислоты (АК) на фагоцитоз штаммов *Candida albicans*, отличающихся по содержанию антиоксидантных ферментов – каталазы и супероксиддисмутазы (СОД). Установлено дозозависимое угнетающее действие АК на фагоцитоз *C. albicans* перитонеальными макрофагами белых мышей in vitro. Также установлено, что при действии АК киллинг штамма, обладающего относительно высоким содержанием антиоксидантных ферментов, угнетается более интенсивно.

SUMMARY

THE EFFECT OF ASCORBIC ACID ON PHAGOCYTOSIS OF CANDIDA ALBICANS BY MACROPHAGES: THE ROLE OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM OF MICROORGANISMS

A.I.Qurbanov

Department of microbiology and immunology of Azerbaijan Medical University, Baku

The effect of different concentrations of ascorbic acid on phagocytosis *Candida albicans* by mouse macrophages in vitro was studied. Ascorbic acid has decreased phagocytic activity and the killing of *Candida albicans*. For different strain having less of antioxidant ferments as catalase and superoxide dismutase decreasing activity of ascorbic acid falls. Thus decreasing activity of ascorbic acid on the killing depends on condition of the antioxidant system of microorganisms.

ƏDƏBİYYAT

1. Qurbanov A.I., Ağayeva N.A., Hacıyeva S.V., İbrahimova S.A. Askorbin turşusunun stafilokokların makrofaqlarla fagositozuna təsiri. Odlar Yurdu Universitetinin elmi və pedagoji xəbərləri, 2005, №14, səh. 185-187.
2. Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов –Л., 1975, 76 с.
3. Курбанов А.И. Внутриклеточные антиоксидантные ферменты *C.albicans* при фагоцитозе макрофагами. Материалы VIII Научно-практической конференции по медицинской микологии, Санкт-Петербург, 2005. В журн. Проблемы медицинской микологии, 2005, т.7, 2, с.105-106
4. Курбанов А.И., Караев З.О. Роль каталазы и супероксиддисмутазы микроорганизмов при их фагоцитозе макрофагальными клетками Биомедицина, 2005, №3, с.44-45.
5. Иммунологические методы / под.ред. Г.Фримеля, пер. с нем..., - М., 1987.
6. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. Лаб.дело, 1985, №11, с.678-681
7. Catalase. Biochemical information. Germany, 1975, vol. 2, p.45-47
8. Gutteridge J.M., Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Ann. Acad. Sci. 2000, 899:136-147.
9. Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood. 1998, vol.92, №9, p.3007-3017.
10. Knight J.A. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. Ann Clin Lab. Sci. 2000, 30(2):145-58.