

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **234801**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **423697**

(22) Data zgłoszenia: **04.12.2017**

(51) Int.Cl.

A61K 35/56 (2015.01)

A61P 31/10 (2006.01)

(54) **Wysokocząsteczkowa frakcja płynu celomatycznego z dżdżownicy Dendrobaena veneta do leczenia grzybic spowodowanych drożdżakiem Candida albicans**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
17.06.2019 BUP 13/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.04.2020 WUP 04/20

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet
MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ, Lublin, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**MARTA FIOŁKA, Lublin, PL
JOLANTA KUTKOWSKA, Lublin, PL
TERESA URBANIK-SYPNIEWSKA, Lublin, PL
ROMAN PADUCH, Lublin, PL**

PL 234801 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest wysokocząsteczkowa frakcja białkowo-cukrowa płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta* znajdująca zastosowanie do leczenia grzybic spowodowanych drożdżakiem *Candida albicans*.

W zgłoszeniu patentowym P.411346 wskazano zastosowanie płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta* do zastosowania w leczeniu raka płuc. Płyn celomatyczny opisany w w/w zgłoszeniu nie wykazywał aktywności cytotoksycznej na komórki prawidłowe fibroblastów i dlatego został użyty do dalszych badań nad działaniem przeciwgrzybowym.

Z innych ujawnionych badań nad zastosowaniem płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, – praca magisterska M. Majczak (UMCS Lublin, 2016) pt. „Przeciwgrzybowe działanie płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*”, a także materiałów pokonferencyjnych autorstwa Miziak i inni, z Interdyscyplinarnej Konferencji Naukowej Tygiel 2017, Lublin, marzec, 2017 wynika, iż zmiany morfologiczne komórek *Candida albicans* po inkubacji z surowym płynem celomatycznym o stężeniu białka 100 µg/ml, niefrakcjonowanym i nie poddawany żadnej obróbce, zwłaszcza termicznej, charakteryzowały się głównie działaniem hamującym wzrost komórek grzyba, a jego działanie całkowicie niszczące wynosiło ok. 12%, przy czym płyn taki wykazywał silne toksyczne działanie na komórki fibroblastów człowieka, co wykluczało jego zastosowanie w medycynie. W leczeniu zakażeń wywołanych *Candida albicans* stosuje się kilka leków przeciwgrzybiczych, niestety, niewystarczająco efektywnych, ponieważ grzyb ten staje się coraz bardziej odporny na działanie dostępnych leków. Stosowane leki przeciwgrzybowe wykazują również wiele działań niepożądanych lub toksycznych. Przykładowo, *amfoterycyna B* wywiera silne działanie nefrotoksyczne, a działania niepożądane *nystatyny* podobnie jak *natamycyny*, dotyczą głównie przewodu pokarmowego i reakcji alergicznych. Stosowana do niedawna w leczeniach miejscowych grzybic *gryzeofulwina*, została wycofana z obrotu z uwagi na liczne niepożądane działania uboczne. Z kolei leki oparte na pochodnych azolowych np. flukonazol działają teratogennie, dlatego nie znajdują powszechnego zastosowania, a zwłaszcza w leczeniu grzybic układowych kobiet ciężarnych.

W świetle powyższych niedogodności, zasadnym było podjęcie próby otrzymania preparatu o efektywnym działaniu przeciwgrzybowym, nie wywołującym skutków ubocznych i nie wykazującym działania toksycznego na komórki prawidłowe człowieka. Nieoczekiwanie okazało się, że powyższe wymogi spełnia jedna z frakcji wyizolowana z podgrzanego płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*.

Istotą wynalazku jest wysokocząsteczkowa, o masie powyżej 14 kDa, frakcja białkowo-cukrowa wyizolowana z podgrzanego do 70°C płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta*, znajdująca zastosowanie do leczenia grzybic spowodowanych drożdżakiem *Candida albicans*. Frakcja płynu celomatycznego według wynalazku, wykazuje wysoką aktywność w kierunku niszczenia aktywnych metabolicznie komórek *Candida albicans* i pozbawiona jest cytotoksyczności na komórki prawidłowe skóry ludzkiej. Możliwość jej liofilizacji, ułatwia przechowywanie preparatu przez długi czas w temp. 0–5°C i użycie jako substancji czynnej, w każdej formie aplikacyjnej medykamentu mającego zastosowanie do leczenia grzybic. Jak wykazano w badaniach, przeżywalność komórek grzyba po inkubacji z frakcją płynu o stężeniu białka 200 µg/ml w porównaniu z działaniem surowego płynu celomatycznego o identycznym stężeniu białka, zmniejszała się ponad dziesięciokrotnie z 59% do 4,72%.

Wynalazek przedstawiono w następujących przykładach wykonania.

P r z y k ł a d 1. Otrzymywanie frakcji z płynu celomatycznego według wynalazku

Płyn celomatyczny pobrany z jamy ciała dżdżownic *Dendrobaena veneta* metodą szoku elektrycznego, wirowano przez 10 minut przy prędkości 5000 obr/min., przesączono przez sączki Millipore o średnicy porów 0,22 µm i rozlano po 1 ml do probówek, które ogrzewano w temp. 70°C przez 10 minut. Zebrany z kilku probówek płyn, poddano dializie w wodzie, w worku dializacyjnym o średnicy porów odcinających związki o masie powyżej 14 kDa. Dializę prowadzono przez 24 godziny w temp. 4°C. Płyn po dializie przeniesiono do probówek typu Falcon i poddano liofilizacji przez 24 godziny. Otrzymaną frakcję związków o masie powyżej 14 kDa w postaci białego proszku, poddano badaniom w celu identyfikacji składników białkowych i niebiałkowych, po czym używano do dalszych badań w kierunku działania na aktywne metabolicznie komórki *Candida albicans* oraz na prawidłowe komórki fibroblastów skóry ludzkiej.

Przykład 2. Identyfikacja otrzymanej frakcji płynu celomatycznego

Analizę białek frakcji wyodrębnionej z płynu celomatycznego, jak opisano w przykładzie 1, prowadzono metodą elektroforezy SDS/PAGE w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecyłu, w warunkach natywnych oraz w warunkach denaturujących. Barwienie otrzymanych żeli dowodzi obecności w preparacie licznych białek, a także kompleksów białkowo-cukrowych, czego potwierdzeniem jest obecność na obrazach żeli, w tych samych miejscach prążków pochodzących od białek barwionych barwnikiem Coomassie Brilliant Blue R-250 i od cukrów barwionych po utlenianiu nadjodanem sodu metodą z azotanem srebra.

Na rysunku, jako figura 1, przedstawiono wybarwione prążki białkowe:

A – po elektroforezie bez SDS, odpowiadające 1–10 μg białka i 2–40 μg białka

B – po elektroforezie z SDS, odpowiadające 1–20 μg białka, 2–30 μg białka i 3–40 μg białka wraz z prążkiem 4 odpowiadającym markerom masy, zaś jako figura 2, przedstawiono zabarwione prążki po elektroforezie SDS/PAGE w kierunku obecności cukrów i białek. Barwienie żeli po elektroforezie i nakładanie się sygnałów pochodzących od białek i od cukrów, co zaznaczono na figurze 2 strzałkami, dowodzi obecności we frakcji płynu związków białkowo-cukrowych. Ścieżka 1 oznacza barwienie żelu w kierunku identyfikacji cukrów, ścieżka 2 w kierunku identyfikacji białek, zaś ścieżka 3 obrazuje położenie wzorców białkowych masy.

W celu identyfikacji składników cukrowych we frakcji płynu celomatycznego o masie powyżej 14 kDa, zastosowano znaną metodę przeprowadzania takich składników w lotne octany alditoli.

Do 0,5 mg zliofilizowanej frakcji płynu celomatycznego dodano 0,5 ml 2M kwasu trifluorooctowego i poddano hydrolizie w temp. 120°C przez 2 godz. Kwas trifluorooctowy odparowano w strumieniu azotu, a pozostałość zalkalizowano 1M NH_4OH do pH=8,0. Otrzymany preparat redukowano w temp. 4°C dodając świeżo przygotowany roztwór 10% borodeuterku sodu w wodzie MQ, początkowo przez 3 godz. w temp. 22°C, a potem w ciągu 1 godz. w temp. 50°C. Nadmiar odczynnika redukującego usuwano dodając kroplami lodowaty kwas octowy, aż do zaniku wydzielania pęcherzyków deuteru. Próbkę suszono w strumieniu azotu, a nadmiar boranu sodu usuwano przez kilkukrotne odparowanie z 10% HCl w metanolu. Otrzymane alkohole cukrowe acetylowano dodając 0,5 ml mieszaniny bezwodnika octowego i pirydyny w stosunku objętościowym 1:1 przez 30 min. w temp. 95°C. Próbkę odparowywano do suchości najpierw w strumieniu azotu, a następnie z kilkoma porcjami po 100 ml wody MQ, aż do zaniku zapachu pirydyny. Próbkę octanów alditoli ekstrahowano z wody chloroformem, dodając dwukrotnie porcje chloroformu z wodą MQ w stosunku objętościowym jak 1:1. Ekstrakt chloroformowy suszono przepuszczając przez mini kolumnienki z bezwodnym siarczanem sodu.

Octany alditoli analizowano wprowadzając ekstrakt chloroformowy na kolumnę chromatograficzną kapilarną HP-5MS, 30 m x 0,25 mm, z helem jako gazem nośnym. Analizę próbek przeprowadzono przy użyciu chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem masowym, w następującym programie temperaturowym: początkowo w ciągu 5 min. w temp. 150°C, potem zwiększano temperaturę o 5°C w ciągu 1 min., aż do wartości końcowej 310°C, utrzymywanej co najmniej przez 10 min. Składniki cukrowe identyfikowano na podstawie porównania ich czasów retencji i widm masowych do czasów retencji i widm masowych standardów oraz podobieństwa widm masowych identyfikowanych składników cukrowych z widmami masowymi składników zamieszczonych w bazie danych NIST library. Na podstawie powyższej procedury, we frakcji płynu celomatycznego, zostały zidentyfikowane alkohole cukrowe i monosacharydy takie jak: glicerol, 4 stereoizomery inozytolu, mannoza, glukoza i galaktoza w następującym procentowym stosunku molowym: 37,3:53,7:0,4:6,4:2,1 względem całkowitej zawartości związków cukrowych.

Przykład 3. Sprawdzanie obecności endotoksyn we frakcji płynu celomatycznego według wynalazku

Przedmiotem badań opisanych w poniższym przykładzie było zbadanie we frakcji płynu celomatycznego obecności endotoksyn – lipopolisacharydowych składników ścian komórkowych bakterii Gramujemnych, odpowiedzialnych za szok endotoksyczny organizmu gospodarza zakażonego tymi bakteriami. Stężenie endotoksyn we frakcji płynu celomatycznego, oznaczano metodą chromogenną punktu końcowego, przy użyciu testu LAL, posługując się zestawem do kwantyfikacji p-nitroaniliny uwalnianej z białkowych kompleksów p-nitroaniliny w wyniku reakcji enzymatycznej zachodzącej w amebocytach kraba *Limulus polyphemus* pod wpływem endotoksyny. W celu określenia zawartości endotoksyny w jednostkach EU, wykonano krzywą wzorcową dla standardowego preparatu lipopolisacharydu *Escherichia coli* szczep O11LB4. Preparat wzorcowy LPS *E. coli* został rozpuszczony w pozbawionej endo-

toksyn wodzie, zgodnie z instrukcją producenta, do wyjściowego stężenia 20 EU/ml, które potem posłużyło do wykonania serii rozcieńczeń o wartościach: 1,0; 0,5; 0,25 i 0,1 EU/ml. Następnie przygotowano próbki z frakcją płynu celomatycznego, sporządzając roztwór w apirogennej wodzie o stężeniu początkowym 2×10^{-1} mg/ml, po czym wykonano serię rozcieńczeń, aż do stężenia końcowego 2×10^{-5} . Próbkę preparatu z frakcją płynu celomatycznego umieszczono w 96 dołkowych płytkach mikrotitracyjnych i po dodaniu odczynnika LAL w stosunku v/v 1:1, inkubowano przez 10 min. w temp. 37°C. W końcowym etapie badań, do każdej próbki z frakcjami płynu celomatycznego, próbek wzorcowych oraz próbek kontrolnych w postaci apirogennej jałowej wody, dodano chromogennego substratu – białkowej pochodnej p-nitroaniliny i kontynuowano inkubację przez 6 min., po czym wszystkie procesy inkubacji zatrzymywano dodając 25% kwas octowy.

Każde stężenie wzorcowego preparatu endotoksyny i preparatów zawierających frakcje płynu celomatycznego oznaczano w trzech powtórzeniach. Absorbancję badanych roztworów frakcji płynu i wzorcowych endotoksyn mierzono przy długości fali 405 nm wobec próby kontrolnej jaką była woda pozbawiona endotoksyn. Zawartość endotoksyn w badanych roztworach frakcji płynu według wynalazku, wynosiła 0,09 EU/ml, co jest wartością znacznie niższą niż dopuszczalne według Farmakopei USA stężenie endotoksyn w wodzie do iniekcji, wynoszące 0,25 EU/ml. Negatywne wyniki testu LAL w badanych próbkach frakcji płynu celomatycznego, zostały potwierdzone analizą chromatograficzną w kierunku obecności 3-hydroksylowych kwasów tłuszczowych, będących charakterystycznymi składnikami LPS. Zamieszczona na rysunku figura 3 przedstawia:

- zdjęcie A – wzorcowe widmo masowe estru metyloвого trimetylosililowego eteru kwasu 3-hydroksymirystynowego pochodzącego z LPS *E. coli*, z uwidocznionym pikiem dla jonu m/z 175 świadczącym o obecności endotoksyny,

- zdjęcie B – jonogram selektywny frakcji płynu celomatycznego według wynalazku, na którym uwidocznione są jedynie piki pochodzące od zanieczyszczeń z nośnika kolumny chromatograficznej i membrany, i brak sygnału dla jonu m/z 175 charakterystycznego dla 3-hydroksykwasów.

P r z y k ł a d 4. Działanie frakcji białkowo-cukrowej z płynu celomatycznego według wynalazku na komórki *Candida albicans*

Do określania aktywności metabolicznej komórek *C. albicans* pod wpływem frakcji białkowo-cukrowej otrzymanej według przykładu 1, użyto zestawu LIVE/DEAD Yeast Viability Kit F-7030. Zarówno komórki hodowli kontrolnej *C. albicans* jak i komórki hodowli inkubowanej z frakcją płynu celomatycznego przez 48 godz., odwirowano przez 5 min. przy 10 000 obr./min. Supernatant obu hodowli odciągnięto i osad mieszało z roztworem 30 μ l roztworu GH. Zawiesinę drożdży w GH i wymieszano z mieszaniną barwnika FUN1 i GH w proporcji 1:1. Przygotowane hodowle: kontrolną i hodowlę poddaną działaniu frakcji płynu celomatycznego inkubowano przez 30 min. w temp. 37°C, po czym 2 μ l każdej hodowli nakładano na szkiełko mikroskopowe i obrazowano w mikroskopie fluorescencyjnym.

Tylko aktywne metabolicznie komórki zawierały wyraźne oznaczone fluorescencyjne czerwone struktury wewnątrzkomórkowe. Martwe komórki wykazywały wyjątkowo jasną, rozproszoną, zielono-żółtą fluorescencję. Komórki nieaktywne metabolicznie świeciły na zielono. Zliczano komórki żywe, martwe i nieaktywne metabolicznie po działaniu frakcji płynu celomatycznego, porównując ich liczbę z próbą hodowli kontrolnej. Przeżywalność komórek *C. albicans* w procentach, po 48 godz. inkubacji z frakcją płynu celomatycznego o różnych stężeniach białka, takich jak: 12,5; 25; 50; 100 i 200 μ g/ml, przedstawia wykres zamieszczony na rysunku jako figura 4. Wynika z niego, że wraz ze wzrostem stężenia białka we frakcji płynu celomatycznego zmniejsza się przeżywalność aktywnie metabolicznych komórek grzyba *C. albicans*.

Innym sposobem wykazania wpływu frakcji według wynalazku na aktywność metaboliczną komórek *C. albicans*, było obrazowanie za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej. W tym celu zarówno komórki hodowli kontrolnej *C. albicans* jak i hodowli inkubowanej frakcją płynu celomatycznego o różnych stężeniach, poddano odpowiedniej preparatyce. Po wymieszanii zawiesiny drożdży z 4% aldehydem glutarowym w 0,1 M buforze fosforanowym o pH 7,0, komórki inkubowano roztworem OsO₄ przez 30 minut, po czym odwadniano je stopniowo w wodnych roztworach 15%, 30%, 60%, 90% i 100% acetonu, a następnie nakładano na szkiełka przymocowane do stolików i suszono w eksykatorze. Po 24 godzinach napyłono złotem i poddano obrazowaniu używając skaningowego mikroskopu elektronowego.

Obrazy mikroskopowe deformacji i zniszczenia komórek tego grzyba, przedstawia zamieszczona na rysunku figura 5, przy czym:

A1 i A2 to komórki hodowli kontrolnej grzyba *C. albicans*,

B1 i B2 – komórki hodowli grzyba *C. albicans* po inkubacji frakcją płynu celomatycznego o stężeniu białka 25 µg/ml,

C1 i C2 – komórki hodowli grzyba *C. albicans* po inkubacji z frakcją płynu celomatycznego o stężeniu białka 50 µg/ml,

D1 i D2 – komórki hodowli grzyba *C. albicans* po inkubacji z frakcją płynu celomatycznego o stężeniu białka 100 µg/ml.

P r z y k ł a d 5. Określanie sposobów śmierci komórek grzyba *C. albicans*, pod wpływem frakcji białkowo-cukrowej według wynalazku.

Analizy przeprowadzano przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej. Komórki hodowli kontrolnej *C. albicans* i hodowli po inkubacji z frakcjami płynu celomatycznego o różnym stężeniu białka, barwiono mieszaniną barwników fluorescencyjnych Hoechst 33342 i jodku propidyny, dodając odpowiednio do hodowli z komórkami *C. albicans* w objętości 2,5 µl/ml, po czym inkubowano przez 5 minut w 37°C w ciemności. Komórki, które uległy apoptozie charakteryzowały się na obrazie mikroskopowym, niebieskim silnie fluoryzującym pofragmentowanym jądrem, zaś komórki wykazujące różowe zabarwienie były interpretowane jako komórki nekrotyczne, co wskazuje na fakt, iż po inkubacji z frakcją płynu celomatycznego w różnym zakresie stężenia białek, komórki *C. albicans*, ginęły zarówno na drodze nekrozy jak i apoptozy – zmiany apoptotyczne zaznaczone strzałkami, co obrazowano na rysunku jako figura 6, gdzie:

A1 i A2 to komórki hodowli kontrolnej *C. albicans*,

B1 i B2 – komórki hodowli grzyba *C. albicans* po inkubacji z frakcją płynu celomatycznego o stężeniu białka 25 µg/ml,

C1 i C2 – komórki hodowli grzyba *C. albicans* po inkubacji z frakcją płynu celomatycznego o stężeniu białka 50 µg/ml,

D1 i D2 – komórki hodowli grzyba *C. albicans* po inkubacji z frakcją płynu celomatycznego o stężeniu białka 100 µg/ml.

P r z y k ł a d 6. Działanie frakcji białkowo-cukrowej z płynu celomatycznego otrzymanego według wynalazku na ludzkie prawidłowe komórki fibroblastów skóry HSF.

Badania wpływu frakcji płynu celomatycznego według wynalazku w różnych stężeniach na ludzkie fibroblasty skóry wykonano metodą opartą na reakcji redukcji bromku 3[4,5-dwumetylotiazolo-2-yl]-2,5-dwufenyltetrazolu – MTT do formazanu przez dehydrogenazę mitochondrialną; enzym funkcjonalny tylko w żywych komórkach. Reakcja pozytywna manifestuje się zmianą zabarwienia komórek z żółtego na purpurowy.

Hodowlę fibroblastów ludzkiej skóry – HSF, o gęstości 1×10^5 komórek/ml, prowadzono w mieszaninie 1:1 (v/v) płynów do hodowli komórkowych *in vitro* (RPMI 1640 i DMEM) zmieszanych w stosunku objętościowym jak 1:1, z dodatkiem 10% FCS – płodowej surowicy cielęcej oraz antybiotyków: penicyliny (100 U/ml) i streptomycyny (100 µg/ml). Inkubację komórek HSF z frakcją płynu celomatycznego o stężeniach białka: 12,5 µg/ml; 25 µg/ml; 50 µg/ml; 100 µg/ml i 200 µg/ml prowadzono w warunkach standardowych w temp. 37°C i atmosferze przepływu mieszaniny 95% powietrza i 5% CO₂ przez 48 godz. Po tym czasie wykonano spektrofotometryczną analizę z odczytnikiem MTT.

MTT rozcieńczano w PBS do stężenia 5 mg/ml. Do hodowli komórek na 96-dółkowej płytce dodawano po 25 µl roztworu MTT/dółek, a po 3 godzinach inkubacji w temp. 37°C komórki lizowano przez dodanie mieszaniny 10% SDS – siarczanu dodecylu sodu w 0,01M HCl w ilości 100 µl/dółek. Po 24 godzinnej inkubacji w temp. 37°C mierzono gęstość optyczną OD w automatycznym czytniku mikro-płytek przy długości fali 570 nm.

Uzyskana wartość absorbancji dla każdej hodowli była wprost proporcjonalna do stężenia zredukowanej przez żywe komórki pochodnej barwnika MTT, a tym samym aktywności metabolicznej komórek.

Barwienie ludzkich prawidłowych komórek skóry wykonano metodą AgNORs określającą liczbę i wielkość regionów jąderkotwórczych odzwierciedlających aktywność proliferacyjną komórek.

Komórki o gęstości 1×10^5 komórek/ml inkubowano w 4-dółkowych płytkach Lab-Tek II przez 48 godz. z frakcją płynu celomatycznego według wynalazku, o stężeniach białka: 12,5; 25,0; 50; 100 µg/ml i 200 µg/ml. Po tym czasie hodowlę przepłukano roztworem soli fizjologicznej i utrwalano w ciągu 10 min. mieszaniną 1:1 (v/v) etanolu z kwasem octowym. Dla barwienia tak przygotowanych komórek, sporządzono roztwór zawierający dwa wodne roztwory: roztwór 2% żelatyny w 1% kwasie mrówkowym oraz 30% roztwór azotanu srebra, przygotowanych w stosunku objętościowym, odpowiednio 1:2. Komórki barwiono w ciągu 5 min. w temp. 37°C, a następnie, przepłukiwano wodą dejonizowaną

i wysuszono. Ocenę organizacji jąderk wykonano w mikroskopie świetlnym Olympus BX51. Zdjęcia mikroskopowe wykonane przy powiększeniu 200x, obrazujące hodowle czystych komórek HSF przedstawiono na rysunku jako figura 7, zaś figury 8, 9 i 10 obrazują hodowle HSF po 48 godzinnej inkubacji z frakcją płynu celomatycznego według wynalazku, o stężeniach białka odpowiednio: 50, 100 i 200 µg/ml.

Porównanie obrazów hodowli czystych komórek HSF z obrazami hodowli HSF po inkubacji z frakcją płynu celomatycznego, nie wykazują zmian morfologicznych komórek, co wskazuje na brak toksycznego działania frakcji płynu celomatycznego według wynalazku na ludzkie komórki HSF.

Zastrzeżenia patentowe

1. Wysokocząsteczkowa frakcja płynu celomatycznego z dżdżownicy *Dendrobaena veneta* do zastosowania w leczeniu grzybic spowodowanych drożdżakiem *Candida albicans*.
2. Frakcja jak określono w zastrzeżeniu 1, **znamienna tym**, że została wyizolowana z płynu celomatycznego podgrzanego do temperatury 70°C.
3. Frakcja jak określono w zastrzeżeniu 1, **znamienna tym**, że tworzące ją cząsteczki białko-cukrowe mają masę powyżej 14 kDa.

Rysunki

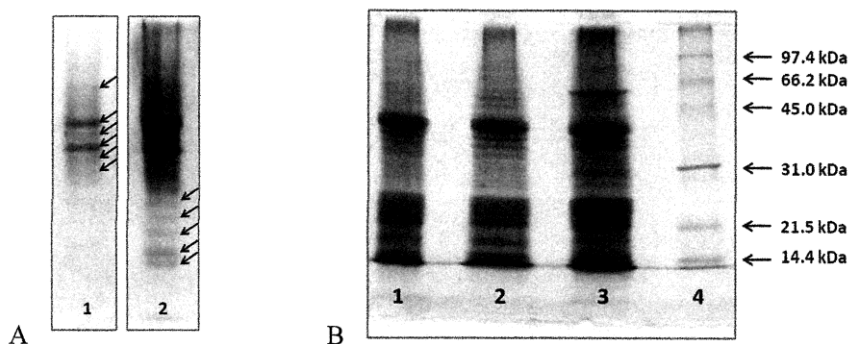


Fig.1

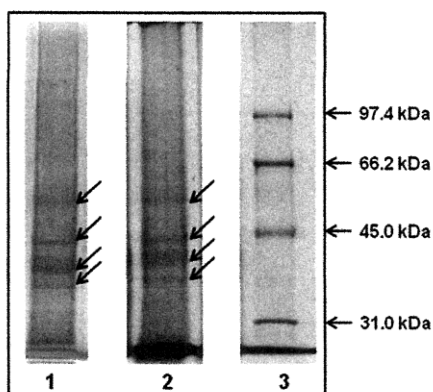


Fig.2

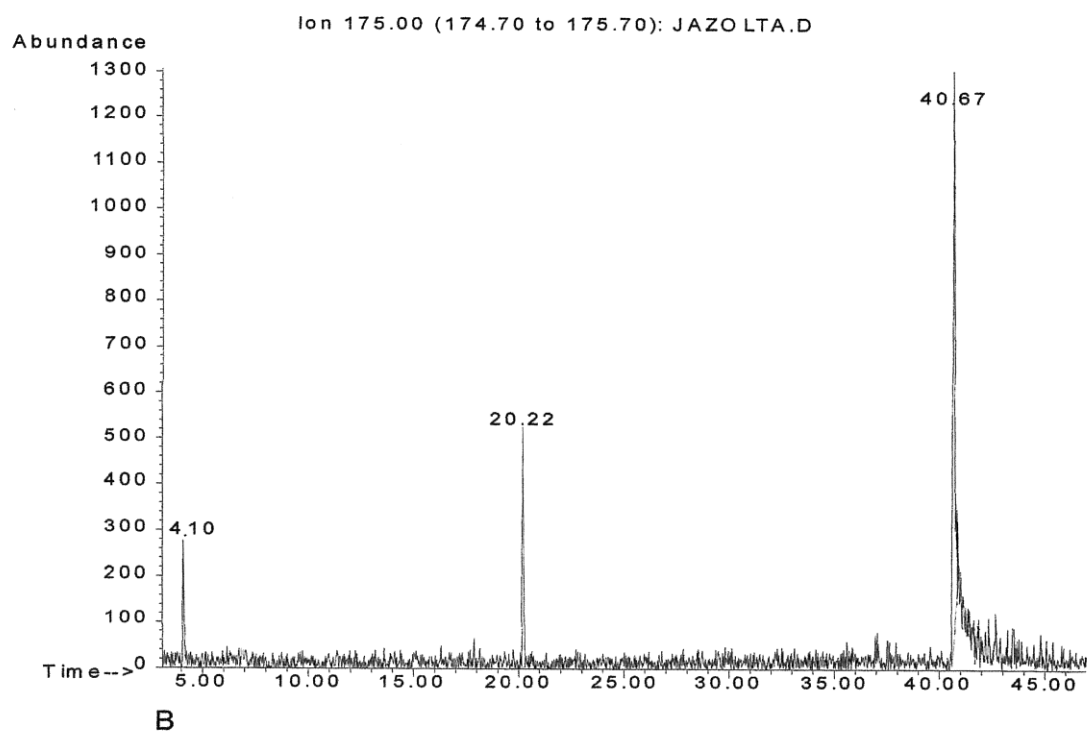
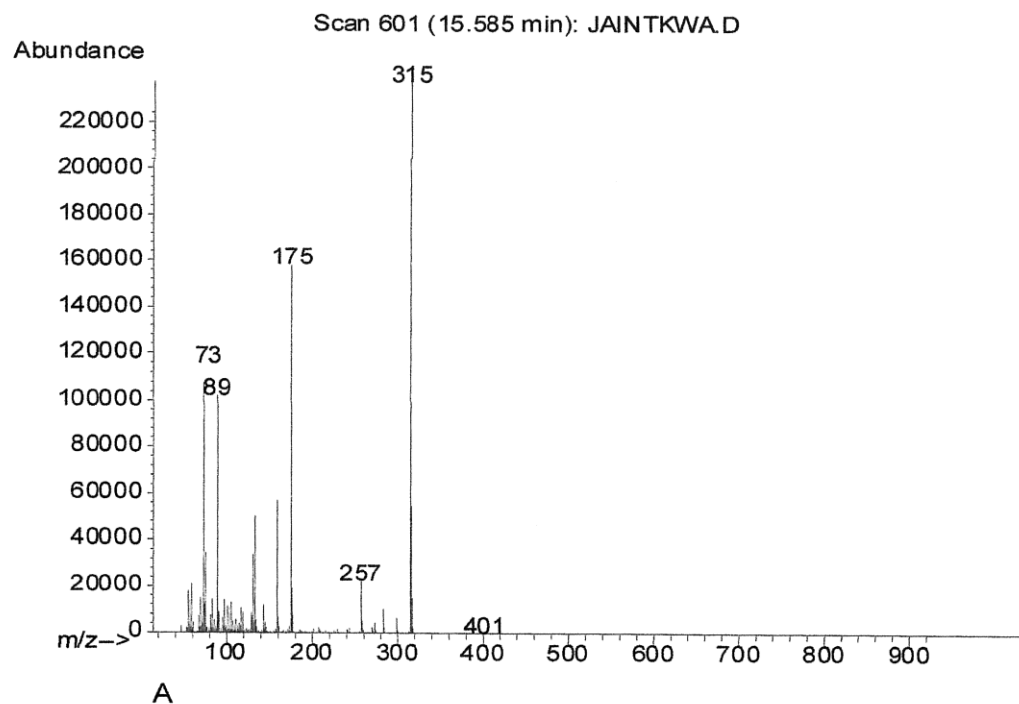


Fig.3.

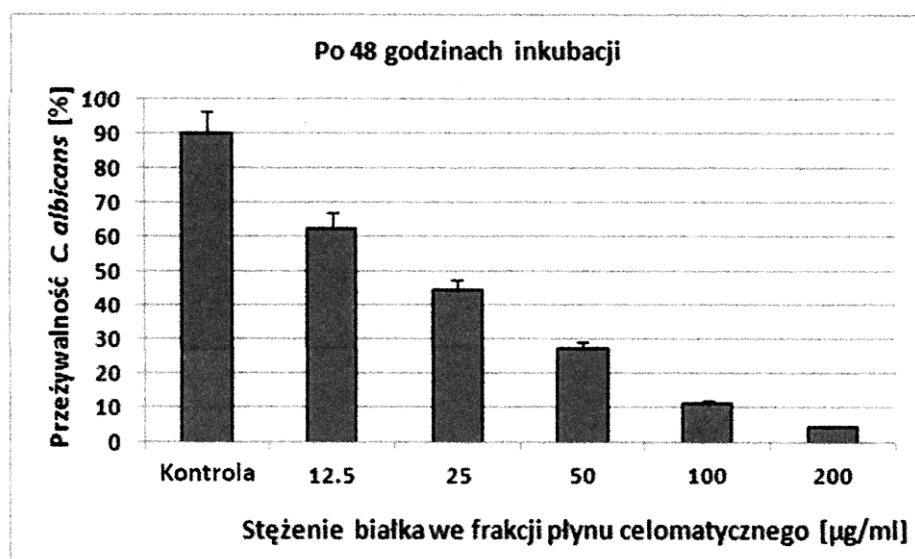


Fig.4

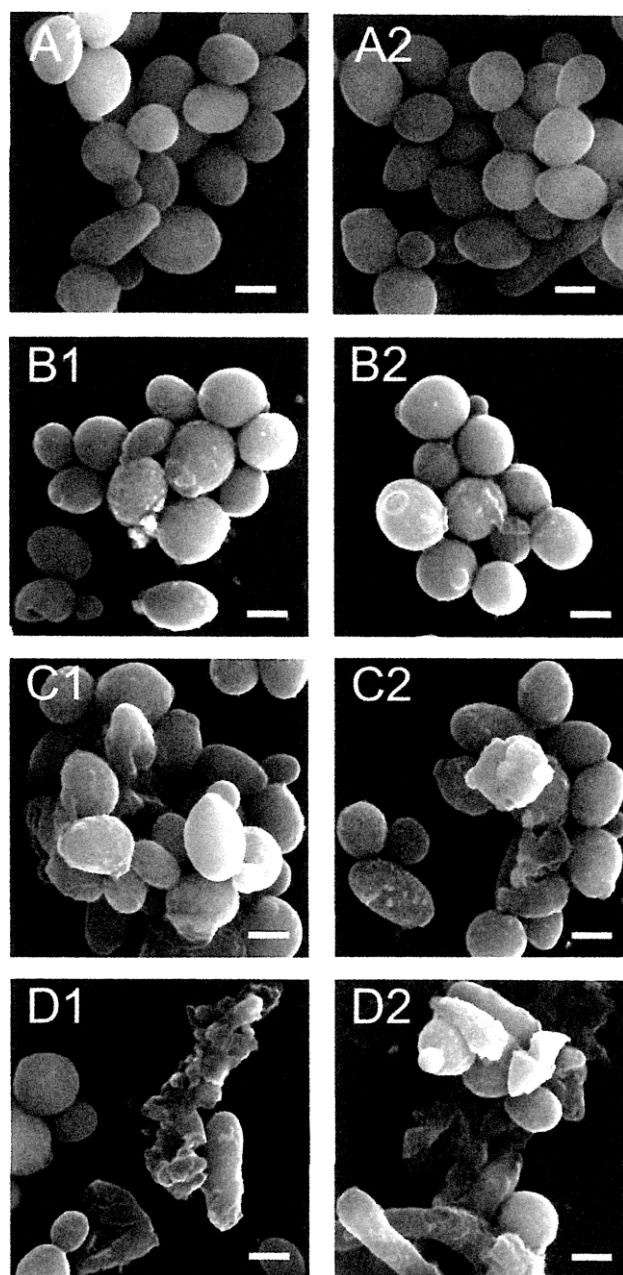


Fig.5

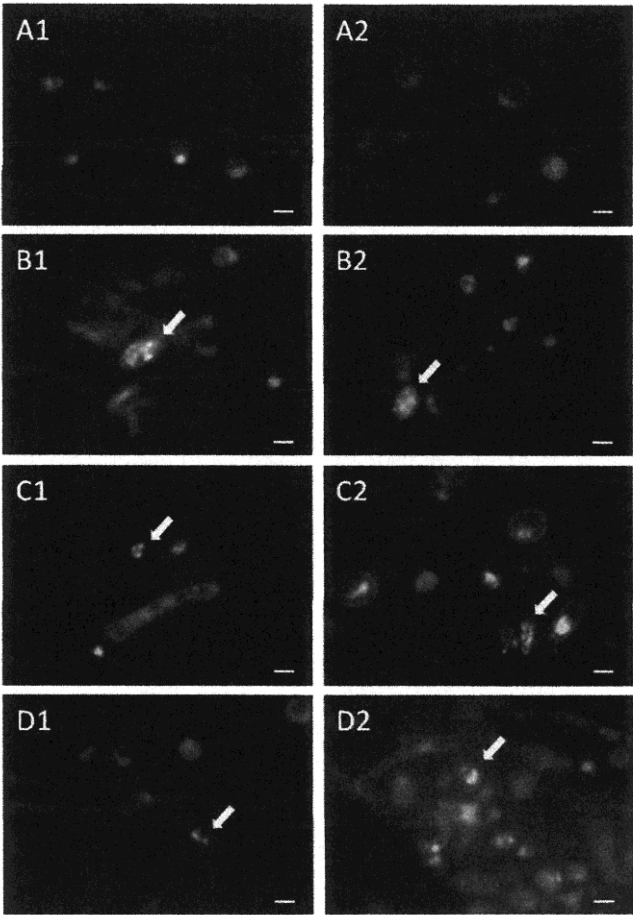


Fig.6

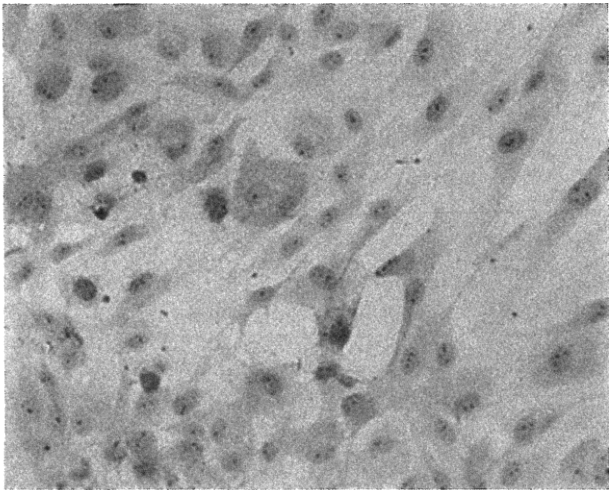


Fig.7

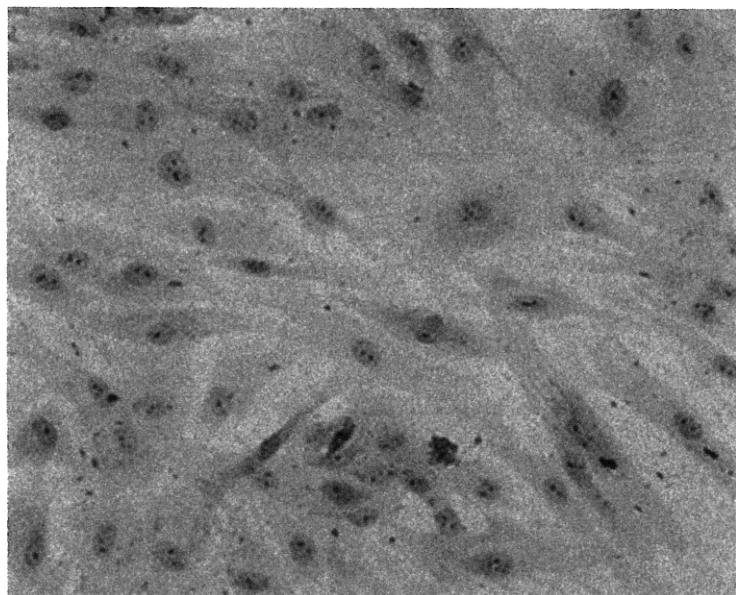


Fig. 8

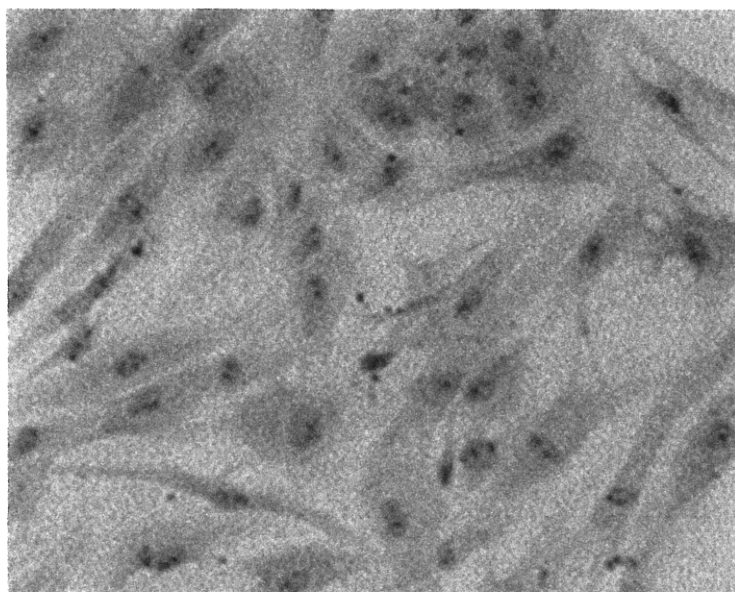


Fig. 9

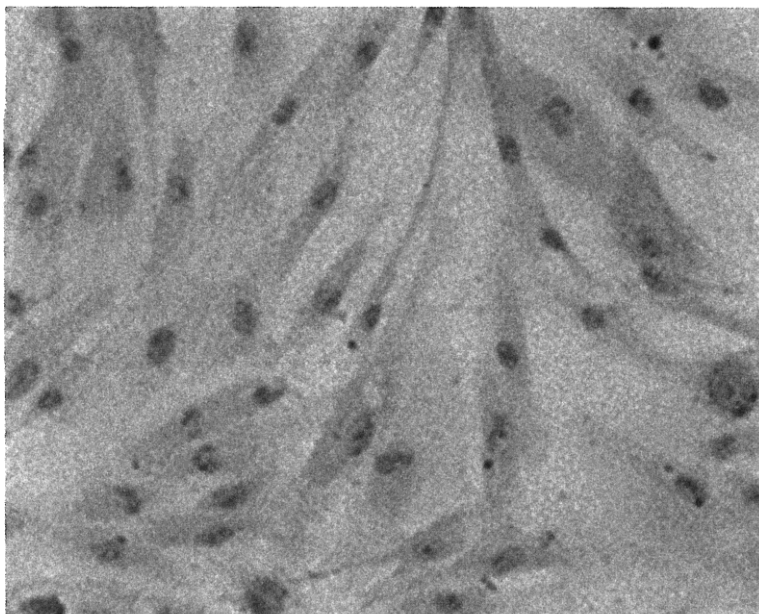


Fig. 10