

ОЦІНКА ФРАКЦІЙ АНТИГЕНІВ ДЕЗІНТЕГРАТА КЛІТИН ГРИБІВ *CANDIDA ALBICANS* І *CANDIDA TROPICALIS* У РАЗІ ПОПЕРЕДЖЕННЯ КАНДИДОМІКОЗІВ

Ключові слова: кандидомікоз, антиген, вакцина, імунітет, фракція

Кандидоз – одне із самих розповсюджених грибкових захворювань, з якими стикалося людство. Частіше за все воно виникає на фоні зниження імунітету. Саме в цей час гриби роду *Candida*, які живуть на зовнішніх та внутрішніх покровах у невеликій кількості, починають активно розмножуватися. Це призводить до розвитку грибкової інфекції, яка потребує особливого лікування. Етіологічними чинниками захворювання найчастіше виступають *Candida albicans* та *Candida tropicalis* [1, 2].

Використання вакцин у боротьбі з кандидозною інфекцією має багато переваг порівняно з антибіотиками, оскільки вакцини не пригнічують імунну систему, а, навпаки, забезпечують знищення збудника за рахунок посилення імунітету, який у подальшому зберігається [3, 4]. Для боротьби з кандидозною інфекцією в останні роки активно ведуться дослідження з розробки вакцин, як у країнах СНД, так і в країнах Європи та Америки [5–7]. Слід зазначити, що на цей момент в Україні не випускають жодної вітчизняної та не зареєстровано жодної імпортової вакцини для профілактики та лікування кандидомікозів. Виходячи з цього, розроблення вакцини проти кандидозної інфекції є нагальним питанням сучасної медицини та фармації.

Враховуючи вищезазначене, а також сучасні тенденції розроблення комбінованих субодиночних вакцин [7, 8], стає доцільним створення вакцини для попередження та лікування кандидозної інфекції на основі грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

Авторами на базі Національного фармацевтичного університету на кафедрі біотехнології та мікробіології, вірусології та імунології було розроблено метод дезінтеграції клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* із використанням ультразвуку. За даними літератури антигенні властивості мають біополімери клітин грибів *Candida* з молекулярною масою більш ніж 10 кД, тому доцільно перевірити фракції з молекулярною масою менше та більше 10 кД на ефективність у разі попередження та лікування кандидомікозу.

Завданням нашої роботи була експериментальна оцінка фракцій антигенів клітин грибів *C. albicans* і *C. tropicalis* у разі попередження та лікування кандидомікозу.

Матеріали та методи дослідження

Культивували клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* окремо у пробірках на агарі Сабуро за 25 ± 2 °C упродовж 48 год та змивали клітини грибів стерильним ізотонічним 0,9%-м розчином натрію хлориду. Перенесли одержані суспензії клітин грибів *C. albicans* і *C. tropicalis* окремо на матраси з агаром Сабуро, які інкубували за 25 ± 2 °C упродовж 6 діб та змивали клітини грибів стерильним ізотонічним 0,9%-м розчином натрію хлориду. Визначали мікробіологічну чистоту методом мікроскопування суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* та стандартизували їх за певним вмістом грибкових клітин в одиниці об'єму ізотонічного 0,9%-го розчину натрію хлориду підрахунком клітин грибів у камері Горяєва. Із одержаних клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* виділяли білки та полісахари-

риди за допомогою ультразвукового дезінтегратора за частоти коливань 22 кГц та експозиції 15 хв. Фільтрували через мембрану «Владіпор» МФА-МА № 3 (Росія), яка забезпечує відсікання біологічного матеріалу з розміром 10 кДа. Одержано дві фракції: перша – з розміром молекул менше 10 кДа та друга – з розміром молекул більше 10 кДа.

Одержані фракції оцінювали за ефективністю у разі попередження кандидомікозів у дослідках на здорових білих мишах двомісячного віку масою 18–22 г (по 6 тварин у контрольній та дослідних групах), які утримували в однакових умовах на стандартному раціоні. Перед дослідженнями тварини проходили акліматизацію в умовах експериментальної кімнати. Мишам внутрішньом'язово у верхню частину задньої правої лапи окремо вводили 0,2 мл досліджуваних фракцій з концентрацією білка для *S. albicans* – 3 мг/мл та для *S. tropicalis* – 5 мг/мл. Такі концентрації було визначено у попередніх дослідженнях для фракції з розміром молекул більше 10 кДа. Таку саму концентрацію було використано для фракції з розміром молекул менше 10 кД. Через 14 діб, повторно, в верхню частину задньої лівої лапи вводили 0,2 мл досліджуваних фракцій. Тваринам у контрольній групі вводили ізотонічний 0,9%-й розчин натрію хлориду. Через 1 міс для однієї групи та через 3 міс для другої групи дослідних тварин після другої ін'єкції здійснювали внутрішньоочеревинне зараження тварин. Для цього використовували суспензію грибів *S. albicans* у кількості 20 млн. клітин та *S. tropicalis* у кількості 60 млн. клітин в об'ємі 1 мл, які вводили з інтервалом 1 год. Через 14 діб робили огляд тварин та визначали результати.

Результати проб ураховували за кількістю різних проявів хвороби та оцінювали за такою системою:

«–» – відсутність проявів захворювання;

«+» – слабка форма захворювання – неохайний вигляд, відмова від їжі, зменшення маси тіла, порушення функції вивідних органів;

«+ +» – середня форма захворювання – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, зменшення маси тіла, контрактури шийних м'язів, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, під час дослідження слизових оболонок природних отворів було виявлено ознаки патологічних процесів, висівання грибів з фекалій тварин;

«+ + +» – розвинута форма захворювання – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, зменшення маси тіла, контрактури шийних м'язів, параліч кінцівок, судоми, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, під час розтину на слизових оболонках природних отворів, внутрішніх органів тварин було виявлено ознаки патологічних процесів: мікроабсцеси у корковому шарі нирок, у легенях, селезінці, печінці та інших, виділення ретрокультур грибів з органів тварин. Цю методику було розроблено авторами.

Результати дослідження та обговорення

Фракція дезінтеграта клітин грибів *S. albicans* з розміром молекул менше 10 кДа через 1 міс після повторного введення захищає від зараження 83% тварин, через 3 місяці – 67% тварин. У хворих дослідних тварин виявлено ознаки інфікування, які відповідають легкій формі хвороби: неохайний вигляд, відмова від їжі, зменшення маси тіла, порушення функції вивідних органів. Фракція дезінтеграта клітин грибів *S. albicans* з розміром молекул більше 10 кДа через 1 та 3 місяці після повторного введення захищала від зараження 100% тварин. У контрольній групі було зафіксовано ознаки хвороби, що відповідали середній та сильній формі хвороби (табл. 1).

Дослідження фракцій дезінтеграта клітин грибів *C. albicans*

Дослідні зразки	Дослідні тварини					
	1	2	3	4	5	6
	Результати через 1 міс					
1 фракція	–	–	–	–	–	–
2 фракція	+	–	–	–	–	–
Контроль	+++	++	+++	+++	+++	++
	Результати через 3 міс					
1 фракція	–	–	–	–	–	–
2 фракція	–	–	+	–	+	–
Контроль	++	+++	+++	+++	+++	+++

П р и м і т к и: а) 1 фракція – дезінтеграт клітин грибів *C. albicans* з розміром молекул більше 10 кДа; 2 фракція – дезінтеграт клітин грибів *C. albicans* з розміром молекул менше 10 кДа; б) «–» – відсутність захворювання; «+» – слабка форма захворювання; «+ +» – середня форма захворювання; «+ + +» – розвинута форма захворювання.

Фракція дезінтеграта клітин грибів *C. tropicalis* з розміром молекул менше 10 кДа через 1 міс після повторного введення захищає від зараження 67% тварин, через 3 місяці – 50% тварин. У хворих дослідних тварин було виявлено ознаки інфікування, які відповідають легкій формі хвороби: неохайний вигляд, відмова від їжі, зменшення маси тіла, порушення функції вивідних органів. Фракція дезінтеграта клітин грибів *C. tropicalis* з розміром молекул більше 10 кДа через 1 та 3 місяці після повторного введення захищала від зараження 100% тварин. У контрольній групі зафіксовано ознаки хвороби, що відповідали середній та сильній формі хвороби (табл. 2).

Дослідження фракцій дезінтеграта клітин грибів *C. tropicalis*

Дослідні зразки	Дослідні тварини					
	1	2	3	4	5	6
	Результати через 1 міс					
1 фракція	–	–	–	–	–	–
2 фракція	+	–	–	–	+	–
Контроль	+++	++	+++	+++	+++	++
	Результати через 3 міс					
1 фракція	–	–	–	–	–	–
2 фракція	–	–	+	–	+	+
Контроль	++	+++	+++	+++	+++	+++

П р и м і т к и: а) 1 фракція – дезінтеграт клітин грибів *C. tropicalis* з розміром молекул більше 10 кДа; 2 фракція – дезінтеграт клітин грибів *C. tropicalis* з розміром молекул менше 10 кДа; б) «–» – відсутність захворювання; «+» – слабка форма захворювання; «+ +» – середня форма захворювання; «+ + +» – розвинута форма захворювання.

Перспективою дослідження є розроблення вакцини для попередження та лікування кандидозної інфекції на основі фракції дезінтеграта клітин грибів *C. albicans* і *C. tropicalis* з розміром молекул більше 10 кДа.

В и с н о в о к

Досліджено фракції дезінтеграта клітин грибів *C. albicans* і *C. tropicalis* з розміром молекул більше та менше 10 кДа та встановлено, що фракція дезінтеграта клітин грибів *C. albicans* і *C. tropicalis* з розміром молекул більше 10 кДа при двократному внутрішньому язевому введенні по 0,2 мл забезпечує 100%-ву ефективність у разі попередження кандидозної інфекції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Голубка О. В. Поширення кандидозів, загальна характеристика збудника, особливості лабораторної діагностики // *Annals of Mechnikov Institute*. – 2011. – N 2. – P. 51–59.
2. Diekema D., Arbefeville S., Boyken L. et al. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2012. – N 73. – P. 45–48.
3. Carvalho A., Cunha C., Iannitti R. G. et al. Host defense pathways against fungi: the basis for vaccines and immunotherapy // *Front. Microbiol.* – 2012. – V. 3. – P. 1–9.
4. Han Y., Rhew K. Y. Comparison of two *Candida* mannan vaccines: the role of complement in protection against disseminated candidiasis // *Arch. Pharm. Res.* – 2012. – N 35. – P. 2021–2027.
5. Агольцов В. А. Получение противокандидозной вакцины и изучение ее иммуногенных и биохимических свойств // *Вестн. СГАУ им. Н. И. Вавилова*. – 2005. – № 1. – С. 3–5.
6. Cassone A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer // *Nature Rev. Microbiol.* – 2013. – V. 11. – P. 884–891.
7. Петров Р. В., Хаитов Р. М. Иммуногены и вакцины нового поколения. – М.: ГЭОСТАР-Медицина, 2011. – 608 с.
8. Жукова Н. В., Кривошеева И. М. Современные вакцины: характеристика и классификация // *Крымский терапевт. журн.* – 2013. – № 2. – С. 99–104.

Надійшла до редакції 06. 11. 2014.

Н. В. Рыбалкин, Н. И. Филлимонова, О. П. Стрилец, Л. С. Стрельников

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

ОЦЕНКА ФРАКЦИЙ АНТИГЕНОВ ДЕЗИНТЕГРАТА КЛЕТОК ГРИБОВ *CANDIDA ALBICANS* И *CANDIDA TROPICALIS* ПРИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИИ КАНДИДОМИКОЗОВ

Ключевые слова: кандидомикоз, антиген, вакцина, иммунитет, фракция

АННОТАЦИЯ

Кандидоз – одно из самых распространенных грибковых заболеваний, с которыми сталкивалось человечество. Этиологическими факторами заболевания чаще всего выступают *Candida albicans* и *Candida tropicalis*. Для борьбы с кандидозной инфекцией последние годы активно ведутся исследования по разработке вакцин, как в странах СНГ, так и в странах Европы и Америки. В разрезе этого направления исследований отмечаются тенденции разработки комбинированных субъединичных вакцин на основе грибов *Candida*. Разработан метод дезинтеграции клеток грибов *C. albicans* и *C. tropicalis* при использовании ультразвука.

Задачей нашей работы была экспериментальная оценка фракций антигенов клеток грибов *C. albicans* и *C. tropicalis* при предупреждении и лечении кандидомикоза.

Из клеток грибов *C. albicans* и *C. tropicalis* выделяли белки и полисахариды с помощью ультразвукового дезинтегратора при частоте колебаний 22 кГц и экспозиции 15 мин. Фильтровали через мембрану «Владипор» МФА-МА № 3, которая обеспечивает отсечение биологического материала с размером 10 кДа.

Объектом исследования стали фракции дезинтеграта клеток грибов *C. albicans* и *C. tropicalis* с размером молекул больше и меньше 10 кДа. Мышам внутримышечно двукратно с интервалом 14 суток вводили в верхнюю часть задней правой лапы отдельно по 0,2 мл исследуемых фракций с концентрацией белка для *C. Albicans* – 3 мг/мл и для *C. tropicalis* – 5 мг/мл. Через 1 месяц для одной группы и через 3 месяца для второй группы опытных животных после второй инъекции осуществляли внутрибрюшинное заражение животных. Через 14 суток проводили осмотр животных и определяли результаты.

В результате исследований установлено, что фракция дезинтеграта клеток грибов *C. albicans* и *C. tropicalis* с размером молекул более 10 кДа при двукратном внутримышечном введении по 0,2 мл обеспечивает 100%-ю эффективность при предупреждении кандидозной инфекции.

M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, O. P. Strilets, L. S. Strelnikov
National University of Pharmacy, Kharkiv

EVALUATION OF FRACTIONS ANTIGENS DISINTEGRATION FUNGAL CELLS *CANDIDA ALBICANS*
AND *CANDIDA TROPICALIS* IF ADVISED CANDIDIASIS

Key words: candidiasis, antigen, vaccine, immunity, fraction

ABSTRACT

Candidiasis – one of the most common fungal diseases humanity has ever faced. Etiological factors of the disease are most often *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. To fight *Candida* infection has been actively conducting research on vaccine development, as in the CIS countries and in the countries of Europe and America. In the context of this research have shown trends of development of combined subunit vaccines based on the fungi *Candida*. Authors at the National University of Pharmacy at the Department of Biotechnology and Microbiology, Virology and Immunology developed a method of disintegration of cells of fungi *C. albicans* and *C. tropicalis* using ultrasound.

The objective of our work was the experimental evaluation of fungal cell antigen fractions *C. albicans* and *C. tropicalis* in the prevention and treatment of candidiasis.

Fungal cells from *C. albicans* and *C. tropicalis* were isolated proteins and polysaccharides using an ultrasonic disintegrator when extending wave of 22 kHz and 15 min exposure. Filtered through a membrane «Vladipor» IPA-MA № 3, which provides shutoff of the biological material with a size of 10 kDa. Object of study were fractions disintegrated fungal cell *C. albicans* and *C. tropicalis* molecular size and greater than 10 kDa. Mice were intramuscularly twice at an interval of 14 days were injected into the upper portion of the right hind paw of 0.2 ml of separately investigated fractions at a protein concentration for *C. albicans* 3 mg/ml for *C. tropicalis* 5 mg/ml. After 1 month, for one group, and after 3 months for a second group of test animals after the second injection, the animals carried abdominal infection. After 14 days the animals were carried out inspection and measured results

The studies found that the fraction of cells disintegrated fungi *C. albicans* and *C. tropicalis* with a molecular size of 10 kDa at double intramuscular injection of 0.2 ml provides 100% efficacy in the prevention of *Candida* infections.

Електронна адреса для листування з авторами: ribalkin.nikolay@mail.ru

УТОЧНЕННЯ

Повідомляємо, що в № 1 «Фармацевтичного журналу» за 2015 рік вкралася помилка. У змісті журналу в рубриці «Організація і управління фармацією» прізвище першого автора статті «Аналіз фармакотерапії хворих на глаукому з використанням комплексного частотного/ABC/VEN-аналізу» слід читати **Котвіцька А. А.**

Редакція «Фармацевтичного журналу»