

УДК 616.992.282:615.371:615.015.33

М.В. РИБАЛКІН, к. фарм. н.; Н.І. ФІЛІМОНОВА, д. мед. н., професор; О.П. СТРЕЛЕЦЬ, к. фарм. н., доцент;
Л.С. СТРЕЛЬНИКОВ, д. фарм. н., професор
/Національний фармацевтичний університет/

Терапевтична дія інактивованих клітин грибів *C. Albicans* та *C. Tropicalis*

Резюме

У статті досліджений терапевтичний ефект інактивованих клітин грибів *C. albicans* та окремо *C. tropicalis*. У результаті досліджень встановлено, що при дворазовому внутрішньом'язовому введенні з інтервалом 5 діб в об'ємі 0,2 мл інактивовані клітини грибів *C. albicans* забезпечують терапевтичний ефект у 100% тварин у концентрації 4 млн/мл та *C. tropicalis* – у 84% тварин у концентрації 5 млн/мл. Можна зробити висновок, що інактивовані клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* активують захисні механізми організму.

Ключові слова: кандидомікоз, антигени, інактивовані клітини, вакцина, імунітет, терапія

Кандидоз – хвороба, яку спричиняють дріжджоподібні гриби роду *Candida*. Окрім відносно легкого кандидозу слизових оболонок та шкіри, можливі тяжкі вісцеральні форми мікозів, частіше з переважаючим ураженням шлунково-кишкового тракту та органів дихання [1, 9, 10]. Ці форми часто розвиваються у ВІЛ-інфікованих осіб [2, 9]. Збудниками найчастіше є наступні види: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guillierinondii*, *C. krusei* [5, 15]. Дріжджоподібні гриби роду *Candida* мешкають на шкірі та слизових оболонках і входять до складу нормальної мікрофлори людини. Вони також дуже поширені в природі: фруктах, овочах, в молочних продуктах тощо. Захворювання зазвичай розвивається у результаті ендогенного інфікування [1, 10], найчастіше воно обумовлено *C. albicans* або *C. tropicalis* [5, 15].

Виділення культури з мокрот, слизу зіву, випорожнень, мазків та зскрібків з уражених слизових оболонок, шкіри, нігтів не може слугувати доказом дисемінованого (вісцерального) кандидозу [1, 5, 14]. Діагностичне значення має виділення культури з крові, спинномозкової рідини, внутрішньосуглобової рідини та біоптатів тканин. При ураженні шкіри та слизових оболонок діагностичне значення має виявлення (при мікроскопії) великої кількості кандид у мокроті, слизі з зіву, а також виявлення високих титрів антитіл за результатами реакції зв'язування комплементу та реакції аглютинації зі специфічним антигеном. Позитивними вважають високі титри (1:160–1:1600) або наростання титрів антитіл у динаміці перебігу захворювання [2, 9, 14]. Однак ці дослідження можуть давати хибнопозитивний результат і достовірно виявити безсимптомний вісцеральний кандидоз внутрішніх органів дуже складно. У ВІЛ-інфікованих осіб серологічні реакції залишаються негативними, тому багато хворих або не отримують необхідного лікування, або приймають призначені лікарями традиційні препарати для терапії.

Основними при лікуванні кандидозів є наступні заходи. Усунення факторів, які сприяють виникненню кандидозу. Вживання вітамінів групи В та аскорбінової кислоти. При ураженнях шкіри використовують мазі з протимікозними препаратами, лікування

проводять відкритим способом. При ураженні слизових оболонок (оральний, вагінальний кандидоз) використовують місцево суспензію, яка містить ністатин. При ураженні слизових оболонок стравоходу використовують кетоконазол по 200–400 мг на добу (ефективність близько 50%), якщо симптоми ураження стравоходу не зникають протягом 5–10 днів, слід використовувати флуконазол у дозі 100 мг на добу протягом двох днів (ефективність близько 90%). У цих випадках можливе також внутрішньовенне введення амфотерицину В по 0,3 мг/кг. При кандидозному ураженні сечового міхура протягом 5 днів проводять інстиляції розчину амфотерицину В по 50 мкг/мл. При дисемінованому (системному вісцеральному) кандидозі використовують амфотерицин В, його призначають внутрішньовенно – 5% розчин у вигляді крапельних вливань з розрахунку 250 ОД/кг маси тіла (0,3 мг/кг), курс лікування може тривати кілька тижнів. Ефективним препаратом для лікування системного кандидозу є флуконазол, який призначають внутрішньо по 200 мг на добу протягом двох днів. Побічні реакції розвиваються відносно рідко (2–4%) у вигляді нудоти, діареї, головного болю [5, 13, 14].

Слід зазначити, що в останні роки спостерігають втрату чутливості грибів роду *Candida* до протигрибкових засобів. Це пов'язано з багаторічним використанням традиційних протигрибкових препаратів та зі зростанням частки різних патогенних видів грибів *Candida*, які мають різну чутливість до традиційних медикаментозних препаратів [9, 13]. Тому необхідні пошуки нових методів лікування кандидозу.

У багатьох країнах світу активно працюють над розробкою вакцини для профілактики та лікування кандидозної інфекції [10, 11, 12, 15]. Необхідно зазначити, що в Україні на сьогодні не випускається та не зареєстровано жодної вакцини проти кандидозу. Тому розробка такої вакцини є актуальним завданням сучасної медицини та фармації.

У попередніх дослідженнях було з'ясовано, що інактивовані клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* окремо при внутрішньо-

м'язовому введенні здоровим мишам стимулюють утворення імунітету проти кандидозної інфекції, тобто після імунізації у тварин не виникло захворювання на кандидоз при їх зараженні інфектом грибів *Candida*. Тепер необхідно перевірити, чи мають інактивовані клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* окремо терапевтичний ефект, тобто чи здатні вони при внутрішньом'язовому введенні хворим на кандидоз мишам стимулювати утворення імунітету проти кандидозної інфекції, який у подальшому забезпечить одужання хворих мишей.

Метою роботи є дослідження терапевтичної дії окремо суспензії інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

Матеріали та методи дослідження

Усі дослідження проводили в ламінарному боксі у асептичних умовах. Клітини грибів *C. albicans* штам ССМ 335–867 та *C. tropicalis* штам АТТС 20336 попередньо окремо культивували у пробірках на агарі Сабуро при температурі $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ впродовж 48 годин та змивали клітини грибів 10 мл стерильного ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду. Перенесли окремо одержані суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* на матраси з агаром Сабуро, інкубування яких проводилось при температурі $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ впродовж 6 діб та змивали клітини грибів 25 мл стерильного ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду. Визначали мікробіологічну чистоту суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* візуально та методом мікроскопії. Далі проводили центрифугування при швидкості 3000 об/хв протягом 10 хвилин. Одержаний осад клітин грибів доводили стерильним ізотонічним 0,9% розчином натрію хлориду до необхідної кількості та стандартизували суспензії шляхом підрахунку кількості клітин грибів у камері Горяєва [6].

Комплексну інактивацію суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* проводили послідовно, використовуючи спочатку фізичну обробку, а потім хімічну: інактивували під дією температури $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ протягом 1 години в об'ємі 100 мл при постійному перемішуванні електрозмішувачем зі швидкістю 100 об/хв, що забезпечувало рівномірну інактивацію клітин грибів у всіх шарах суспензії. Після цього до кожної суспензії грибів додавали формалін у концентрації 40%, доводячи його кінцеву концентрацію в суспензії до 0,5%, перемішували електрозмішувачем зі швидкістю обертання 100 об/хв протягом 5 хвилин та залишали протягом доби при температурі $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$. Використання температури вище $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ виключає зниження імуногенних властивостей клітин грибів у подальшому. Температуру підтримували шляхом розташування ємностей з дослідними суспензіями грибів на водяній бані.

Терапевтичний ефект інактивованих клітин грибів *C. albicans* штам ССМ 335–867 у дозі 4 млн клітин грибів в 1 мл та клітин грибів *C. tropicalis* штам АТТС 20336 окремо у дозі 5 млн клітин грибів в 1 мл вивчали на здорових білих мишах двомісячного віку масою 18–22 г по 6 тварин у контрольних та дослідних групах, яких утримували в однакових умовах на стандартному раціоні [6, 7]. Перед дослідженнями тварини проходили акліматизацію в умовах експериментальної кімнати. Тварин заражали внутрішньочеревно суспензією грибів *C. albicans* штам ССМ 335–867 у кількості 20 млн клітин та *C. tropicalis* штам АТТС 20336 у кількості 60 млн клітин в 1 мл. Через 5 днів мишам внутрішньом'язово у верхню частину задньої правої лапи вводили інактивовані клітини грибів *Candida* в об'ємі 0,2 мл. Через 14 днів повторно у верхню частину задньої лівої лапи вводили інактивовані клітини грибів *Candida* в об'ємі 0,2 мл. Тваринам контрольної групи вводили стерильний

ізотонічний 0,9% розчин натрію хлориду. Після цього через 14 діб проводили огляд тварин та визначали результати.

Результати проб враховували за кількістю різних проявів захворювання та оцінювали за наступною системою: (–) – відсутність проявів захворювання; слабкі прояви захворювання (+): неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, порушення функції органів виділення; середні прояви захворювання (+ +): адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, контрактура шийних м'язів, бокове розташування тіла, порушення функції органів виділення, при дослідженні слизових оболонок природних отворів були виявлені ознаки патологічного процесу, висівання грибів з фекалій тварин; виражені прояви захворювання (+ + +): адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, контрактура шийних м'язів, параліч кінцівок, судоми, бокове розташування тіла, порушення функції органів виділення, під час розтину при дослідженні слизових оболонок природних отворів, внутрішніх органів тварин були виявлені ознаки патологічного процесу: мікробабсцеси у кірковому шарі нирок, легенях, селезінці, печінці та інших органах, була виділена ретрокультура грибів з органів тварин.

Результати та їх обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що терапевтична доза інактивованих клітин грибів *C. albicans* при внутрішньом'язовому введенні 0,2 мл суспензії, що містить в 1 мл 4 млн клітин грибів, забезпечувала одужання 100% тварин. Прояви терапевтичного ефекту почали з'являтися через 5–10 діб після першої ін'єкції вакцини, а через 7–12 діб після другої ін'єкції вакцини наставало повне одужання тварин.

Терапевтична доза інактивованих клітин грибів *C. tropicalis* при внутрішньом'язовому введенні 0,2 мл суспензії, що містить в 1 мл 5 млн клітин грибів, забезпечувала одужання 84% тварин. Прояви терапевтичного ефекту почали з'являтися через 5–10 діб після першої ін'єкції вакцини, а через 7–12 діб після другої ін'єкції вакцини наставало повне одужання 84% тварин, а у 16% залишалися незначні ознаки захворювання: неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, порушення функції органів виділення. Згідно з вимогами ДФУ, вакцини повинні забезпечувати активізацію імунних реакцій у 80–100% тварин. Результати досліджень наведені у таблиці.

Таблиця. Терапевтична дія інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. Tropicalis* окремо

Тварини	Інактивовані клітини грибів				Контроль	
	<i>C. albicans</i> , 4 млн/мл		<i>C. tropicalis</i> , 5 млн/мл			
	Після зараження	Після другої ін'єкції	Після зараження	Після другої ін'єкції	Після зараження	Після другої ін'єкції
1	++	-	++	-	+	++
2	++	-	+	-	++	+++
3	+	-	++	-	+	++
4	++	-	+	+	++	+++
5	+	-	++	-	+	+++
6	+++	-	++	-	++	+++

Примітка: – відсутність захворювання, + – слабкі прояви захворювання, ++ – середні прояви захворювання, +++ – виражені прояви захворювання.

Висновки

У результаті досліджень встановлено, що одержані інактивовані клітини грибів *C. albicans* забезпечують терапевтичний ефект у 100% тварин при внутрішньом'язовому введенні у об'ємі 0,2 мл в концентрації 4 млн/мл та *C. tropicalis* забезпечують терапевтичний ефект у 84% тварин при внутрішньом'язовому введенні у об'ємі 0,2 мл в концентрації 5 млн/мл.

Ці результати підтверджують, що інактивовані клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* активують захисні механізми організму.

Список використаної літератури

1. Амирова В.Р. Характер колонизации грибами рода *Candida* и их лекарственная устойчивость у новорожденных в акушерском стационаре / В.Р. Амирова, Э.Н. Ахмадеева, Т.А. Малиевская // Российский педиатрический журнал. – 2001. – № 6. – С. 8–10.
2. Лебедева Т.Н. Некоторые показатели гуморального иммунного ответа при кандидозе / Т.Н. Лебедева, Р.М. Чернопятова // Проблемы медицинской микологии. – 2002. – Т. 4, № 2. – С. 58.
3. Ляшенко В.А. Молекулярные основы иммуногенности антигенов / В.А. Ляшенко, А.А. Воробьев. – М.: Медицина, 1982. – 271 с.
4. Малый В.П. Вакцинопрофилактика: общие и частные вопросы, проблемы и перспективы / В.П. Малый // Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія. – 2009. – Т. 23, № 4. – С. 5–22.
5. Мікробіологія: підруч. для студ. вищих навчальних закладів / І.Л. Дикий, І.Ю. Холуп'як, Н.Ю. Шевельова [та ін.] ; за ред. І.Л. Дикого. – Х.: Вид-во НФаУ; Оригінал, 2006. – 432 с.
6. Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии. – 2-е изд. – М.: Медицина, 1971. – 539 с.
7. Стефанова О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рек. / О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 354 с.
8. Хаитов Р.М. Вакцины нового поколения и проблемы биобезопасности / Р.М. Хаитов // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 70–75.
9. Casadevall A. Antibody Immunity and invasive fungal infections / A. Casadevall // Infection and immunity. – 1995. – № 63. – P. 4211–4218.
10. Cassone A. Fungal vaccines: real progress from real challenges / A. Cassone // Lancet infect dis. – 2008. – № 8. – P. 114–124.
11. Effectiveness of a vaccine composed of heat-killed *Candida albicans* and a novel mucosal adjuvant, LT(R192G), against systemic candidiasis / L. Cardenas-Freitag, E. Cheng, P. Mayeux, J.E. Domer, J.D. Clemens // Infect. Immun. – 1999. – № 67. – P. 826–833.
12. Giger D.K. Experimental murine candidiasis: pathological and immune responses to cutaneous inoculation with *Candida albicans* / D.K. Giger, J.E. Domer, J.T. McQuitty // Infect. Immun. – 1978. – № 19. – P. 496–509.
13. Sheehan D.J. Current and emerging azole antifungal agents / D.J. Sheehan, C.A. Hitchcock, C.M. Sibley // Clinical Microbiology Reviews. – 1999. – Vol. 12, № 1. – P. 40–79.
14. Superficial fungal infections. Epidemiologic, clinical and mycologic study over a three year period / D. Euch, F. Ben Ammar, M. Ben Sassi [et al.] // Tunis Med. – 2006. – V. 84, № 7. – P. 407–410.
15. The anti-candida vaccine based on recombinant N-terminal domain of Als1p is broadly active against disseminated candidiasis / A.S Ibrahim, B.J. Spellberg, V. Avanesian [et al.] // Infect Immun. – 2006. – Vol. 74. – P. 3039–3041.

Резюме

Терапевтическое действие инактивированных клеток грибов *C. Albicans* и *C. Tropicalis*

М.В. Рибалкин, Н.И. Филимонова, О.П. Стрелец, Л.С. Стрельников

В статье приведены результаты исследования терапевтического эффекта инактивированных клеток грибов *C. albicans* и отдельно *C. tropicalis*. В результате исследований установлено, что при внутримышечном введении с интервалом 5 суток в объеме 0,2 мл инактивированные клетки грибов *C. albicans* обеспечивают терапевтический эффект у 100% животных в концентрации 4 млн/мл и *C. tropicalis* – у 84% животных в концентрации 5 млн/мл. Можно сделать вывод, что инактивированные клетки грибов *C. albicans* и *C. tropicalis* активируют защитные механизмы организма.

Ключевые слова: кандидомикоз, антигены, инактивированные клетки, вакцина, иммунитет, терапия

Summary

Therapeutic Effect of Inactivated Fungal Cells *C. Albicans* and Separately *C. Tropicalis*

M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, O. P. Strilets, L. S. Strelnikov

This article has been studied the therapeutic effect of inactivated cells of fungi *C. albicans* and separately *C. tropicalis*. According to the results of studies have shown that when administered intramuscularly at intervals of 5 days in a volume of 0.2 ml of inactivated fungi *C. albicans* cells provide a therapeutic effect in 100% of the animals in a concentration of 4 mln/ml and *C. tropicalis* – 84% of the animals in a concentration of 5 mln/ml. It can be concluded that the fungal cells inactivated *C. albicans* *C. tropicalis* that activates the protective mechanisms of the organism.

Key words: candidiasis, antigens, inactivated cells, vaccine, immunity, therapy