

УДК 616.992.282:616-097:615.371:615.015.33

М. В. РИБАЛКІН, Н. І. ФІЛІМОНОВА, Л. С. СТРЕЛЬНИКОВ

Національний фармацевтичний університет

ДОЦІЛЬНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ АНТИГЕНІВ ГРИБІВ CANDIDA ПРИ ЛІКУВАННІ КАНДИДАМІКОЗІВ

*Досліджений терапевтичний ефект антигенів клітин грибів *C. albicans* та окремо *C. tropicalis*. За результатами досліджень встановлено, що при двократному внутрішньом'язовому введенні з інтервалом 14 діб у об'ємі 0,2 мл антигени клітин грибів *C. albicans* забезпечують терапевтичний ефект у 100 % тварин у концентрації білка 3 мг/мл та *C. tropicalis* у 84 % тварин у концентрації білка 5 мг/мл. Можна зробити висновок, що антигени клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* активують захисні механізми організму.*

Ключові слова: кандидамікоз; антиген; вакцина; імунітет; терапія; доза

ВСТУП

Відомо, що гриби роду *Candida* сапрофітують на шкірі та слизових оболонках, не викликаючи захворювань, лише при ушкодженні зовнішніх покривів, зниженні імунітету вони можуть проникнути всередину, проходячи стадії адгезії, колонізації та інвазії [4, 6]. Кандидоз проявляється у різних формах, з яких найбільшу небезпеку представляють системний та вісцеральний кандидоз [8, 12, 13]. Вони характеризуються тривалим перебігом хвороби, мають різноманітні клінічні прояви та часті рецидиви. Такі форми кандидозу важко піддаються лікуванню сучасними медикаментозними засобами, у тому числі і протигрибковими антибіотиками [1, 11].

У зв'язку зі скрутною ситуацією з діагностикою і терапією кандидамікозів багато дослідників пропонує використовувати як альтернативу протигрибковим препаратам вакцини для попередження та лікування кандидозної інфекції [7, 10]. Подібні дослідження проводяться у багатьох країнах світу [9, 11, 15]. Слід зазначити, що в Україні на теперішній час не випускається жодної вітчизняної та не зареєстровано жодної імпортової вакцини проти кандидамікозів. Тому розробка вакцини проти кандидозної інфекції є актуальним питанням сучасної фармації та медицини.

Різні дослідники пропонують декілька варіантів вакцин, але єдиної думки серед них не існує. Одним з різновидів вакцин є суб'єдиничні вакцини [3]. Вони складаються з фрагментів антигенів, здатних забезпечувати адекватну імунну відповідь. Ці вакцини можуть бути представлені як частинками мікробів, так і одержані у лабораторних умовах з використанням генно-інженерних технологій [5]. Прикладами суб'єди-

ничних вакцин, в яких використовуються фрагменти мікроорганізмів, є вакцини проти *Streptococcus pneumoniae* і проти менінгокока типу А.

У попередніх дослідженнях був обґрунтований метод дезінтеграції окремо клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, який забезпечує вивільнення антигенів, які здатні при внутрішньом'язовому введенні здоровим мишам активувати захисні механізми проти кандидозної інфекції, тобто тварини не захворіли на кандидоз при їх зараженні інфектом грибів *Candida*. Тепер необхідно перевірити чи володіють антигени клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* терапевтичним ефектом, тобто чи здатні вони при внутрішньом'язовому введенні хворим на кандидоз мишам активувати захисні механізми проти кандидозної інфекції, що у подальшому забезпечить одужання хворих мишей.

Метою даної роботи є дослідження терапевтичного ефекту окремо антигенів клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі дослідження проводили у ламінарному боксі, підтримуючи асептичні умови. Для проведення інактивації клітин грибів *C. albicans* штам ССМ 335-867 та *C. tropicalis* штам АТТС 20336 їх попередньо окремо культивували за схемою у пробірках на агарі Сабуру при 25 ± 2 °С впродовж 48 годин та змивали клітини грибів 10 мл стерильного ізотонічного 0,9 % розчину натрію хлориду. Переносили окремо одержані суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* на матраси з агаром Сабуру, які інкубували при 25 ± 2 °С 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 мето-

ТЕРАПЕВТИЧНИЙ ЕФЕКТ АНТИГЕНІВ КЛІТИН ГРИБІВ *C. ALBICANS* ТА *C. TROPICALIS*

Тварини	Антигени				Інтактні тварини	
	<i>C. albicans</i> , 3 млн/мл		<i>C. tropicalis</i> , 5 млн/мл			
	Стан організму					
	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 хвороби, «+» – слабка форма хвороби, «++» – середня форма хвороби, «+++» – сильна форма хвороби.

дом мікроскопування. Далі проводили центрифугування при швидкості обертання 3000 об/хв протягом 10 хв. Одержаний осад клітин грибів доводили стерильним ізотонічним 0,9 % розчином натрію хлориду до $(8,5-9) \times 10^8$ у 1 мл і стандартизували суспензії шляхом підрахунку клітин грибів у камері Горяєва.

Одержані суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* в об'ємі 10 мл піддавали дії ультразвуку для руйнування клітин грибів на апараті УЗУУ-21 при частоті 22 кГц, інтенсивності 5 Вт/см² та при температурі 25 ± 2 °C впродовж 15 хв. Температуру 25 ± 2 °C увесь час контролювали при озвучуванні суспензій клітин та підтримували шляхом додавання в оточуючу ємність холодної води. Далі проводили фільтрацію через мембрану «Владіпор» МФА – МА № 3, яка забезпечує відсікання біологічного матеріалу з розміром 10 кД та його концентрування. Одержаний фільтрат представлений сумішшю білків та полісахаридів. У кожному випадку проводили визначення вмісту білка згідно з ДФУ [2], враховуючи той факт, що до складу екстракту клітин грибів *Candida* входять білки і полісахариди, які володіють антигенними властивостями. У такому випадку згідно з вимогами ДФУ визначення діючої речовини проводять за тією речовиною, яка володіє більш вираженими властивостями, тобто за білком. Далі проводили попередню фільтрацію за допомогою фільтрів з діаметром пор 0,45 мкм та стерилізуючу фільтрацію за допомогою фільтрів з діаметром пор 0,22 мкм. Терапевтичний ефект окремо антигенів клітин грибів *C. albicans* у дозі 3 мг/мл та білків клітин грибів *C. tropicalis* у дозі 5 мг/мл досліджували на здорових білих мишах двомісячного віку масою 18-22 г по 6 тварин у контрольних та дослідних групах, які утримувалися в однакових умовах на стандартному раціоні.

Перед дослідженнями тварини проходили акліматизацію в умовах експериментальної кімнати. Тварин заражали внутрішньоочеревинно 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 об'ємі 1 мл. Через 5 днів мишам внут-

рішньом'язово у верхню частину задньої правої лапи вводили білки клітини грибів *Candida* в об'ємі по 0,2 мл. Через 14 днів повторно в верхню частину задньої лівої лапи вводили білки клітини грибів *Candida* в об'ємі по 0,2 мл. Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин.

Результати проб урахували за кількістю різних проявів хвороби та оцінювали за наступною системою: (-) – відсутність проявів захворювання; слабка форма захворювання (+) – неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння ваги тіла, порушення функції вивідних органів; середня форма захворювання (++) – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння ваги тіла, контрактури шийних м'язів, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, при дослідженні слизових оболонок природних отворів були виявлені ознаки патологічних процесів, висівання грибів з фекалій тварин; розвинута форма захворювання (+++) – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння ваги тіла, контрактури шийних м'язів, параліч кінцівок, судоми, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, під час розтину при дослідженні слизових оболонок природних отворів, внутрішніх органів тварин були виявлені ознаки патологічних процесів: мікроабсцеси у корковому шарі нирок, у легенях, селезінці, печінці та інших, виділення ретрокультур грибів з органів тварин. Згідно з вимогами ДФУ вакцини повинні забезпечувати активізацію імунних реакцій у 80-100 %.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень встановлено, що терапевтична доза антигенів клітин грибів *C. albicans* при внутрішньом'язовому введенні 0,2 мл суспензії, що містить в 1 мл 3 мг білка, забезпечувала одужання 100 % тварин. Терапевтичний ефект почав проявлятися через 8-12 діб після першої ін'єкції, а через 6-10 діб після другої ін'єкції вакцини наступало повне одужання тварин.

Терапевтична доза антигенів клітин грибів *C. tropicalis* при внутрішньом'язовому введенні 0,2 мл су-

спензії, що містить в 1 мл 5 мг білка, забезпечувала одужання 84 % тварин. Терапевтичний ефект почав проявлятися через 10-14 діб після першої ін'єкції, а через 8-12 діб після другої ін'єкції наступало повне одужання 84 % тварин. У 16 % тварин залишалися ознаки хвороби, які відповідали слабкій формі захворювання: неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння ваги тіла, порушення функції вивідних органів. Результати досліджень наведені у таблиці.

ВИСНОВОК

За результатами досліджень встановлено, що окремо одержані антигени клітини грибів *C. albicans* забезпечують терапевтичний ефект у 100 % тварин при внутрішньом'язовому введенні в об'ємі 0,2 мл у концентрації 3 млн/мл та *C. tropicalis* забезпечують терапевтичний ефект у 84 % тварин при внутрішньом'язовому введенні в об'ємі 0,2 мл у концентрації 5 млн/мл.

Таким чином, можна зробити висновок, що досліджені антигени клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* активують захисні реакції організму.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ

ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Борщ С. К. Комбіноване застосування протигрибкових засобів і пробіотиків у комбустіології для лікування та профілактики кандидозів і синдрому подразненого кишечника / С. К. Борщ, Т. Р. Масляк // Сучасна гастроентерол. – 2011. – № 4. – С. 30-39.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид., 2. доп. – Х.: РІРЕГ, 2008. – 620 с.
3. Жукова Н. В. Современные вакцины: характеристика и классификация / Н. В. Жукова, И. М. Кривошеева // Кримський терапевт. журн. – 2013. – № 2. – С. 99-104.
4. Лисовская А. М. Изучение биологических свойств *Candida spp.*, выделенных из различных локалов у амбулаторных больных / А. М. Лисовская, А. В. Алешукина // Проблемы мед. микол. – 2006. – Т. 8, № 2. – С. 57.
5. Петров Р. В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов. – М.: ГЭОТАР-Медицина, 2011. – 608 с.
6. Anaul Kabir M. Candida infections and their prevention / M. Anaul Kabir, Zulfiqar Ahmad // ISRN Preventive Medicine. – 2013. – P. 1-13.
7. Cassone A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer / A. Cassone // Nature Rev. Microbiol. – 2013. – Vol. 11. – P. 884-891.
8. Diekema D. The changing epidemiology of health-care-associated candidemia over three decades / [D. Diekema, S. Arbefeville, L. Boyken et al.] // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2012. – № 73. – P. 45-48.
9. Edwards J. E. Fungal cell wall vaccines: an update / J. E. Edwards // Med. Microbiol. – 2012. – № 61. – P. 895-903.
10. Grover A. *Candida albicans* vaccines / A. Grover, B. S. Bhandari, N. Rai, P. C. Lakhera // Biotechnol. International. – 2010. – Vol. 3, № 1. – P. 4-17.
11. Han Y. Comparison of two *Candida mannan* vaccines: the role of complement in protection against disseminated candidiasis / Y. Han, K. Y. Rhew // Arch. Pharm. Res. – 2012. – № 35. – P. 2021-2027.
12. Leibund Gut-Landman S. Immunity to fungi / S. Leibund Gut-Landman, M. Wutrich & T. Hohl // Curr. Opin. Immunol. – 2012. – № 24. – P. 1-10.
13. Pappas P. G. Invasive candidiasis / P. G. Pappas // Infect. Dis. Clin. North Am. – 2006. – № 20. – P. 485-506.
14. Saigal S. Identification of *Candida albicans* by using different culture medias and its association in potentially malignant and malignant lesions // S. Saigal, A. Bhargava, S. K. Mehra, F. Dakwala / Contemp. Clin. Dent. – 2011. – Vol. 2, № 3. – P. 188-193.
15. Xin H. Synthetic glycopeptide vaccines combining β -mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis / H. Xin, S. Dziadek, D. R. Bundle, J. E. Cutler // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 2008. – № 105. – P. 13526-13531.

УДК 616.992.282:616-097:615.371:615.015.33**Н. В. Рыбалкин, Н. И. Филимонова, Л. С. Стрельников****ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИГЕНОВ ГРИБОВ CANDIDA ПРИ ЛЕЧЕНИИ КАНДИДАМИКОЗОВ**

В данной статье был исследован терапевтический эффект антигенов клеток грибов *C. albicans* и отдельно *C. tropicalis*. Согласно результатам исследований установлено, что при внутримышечном введении с интервалом 14 суток в объеме 0,2 мл антигены клеток грибов *C. albicans* обеспечивают терапевтический эффект у 100 % животных в концентрации 3 мг/мл и *C. tropicalis* – у 84 % животных в концентрации 5 мг/мл. Можно сделать вывод, что антигены клеток грибов *C. albicans* и *C. tropicalis* активируют защитные механизмы организма.

Ключевые слова: кандидамикоз; антигены; вакцина; иммунитет; терапия; доза

UDC 616.992.282:616-097:615.371:615.015.33**M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, L. S. Strelnikov****FEASIBILITY OF USING ANTIGENS IN THE TREATMENT OF CANDIDA FUNGI CANDIDIASIS**

It has been studied the therapeutic effect of antigens cells of fungi *C. albicans* and separately *C. tropicalis*. According to the results of study it has been shown that when administration intramuscularly at intervals of 14 days in a volume of 0.2 ml of antigens fungi *C. albicans* cells provide a therapeutic effect in 100 % of the animals in a concentration protein of 3 mg/ml and *C. tropicalis* – 84 % of the animals in a concentration protein of 5 mg/ml. It can be concluded that the fungal cells antigens *C. albicans* and *C. tropicalis* activate the protective mechanisms of organism.

Key words: candidiasis; antigens; vaccine; immunity; therapy; dose

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.
Тел. (057) 706-47-87.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 08.04.2014 р.