

УДК 616.992.282:616-097:615.371:615.015.33

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

## Перспектива асоційованого поєднання інактивованих клітин грибів *C. Albicans* та *C. Tropicalis* для профілактики кандидамікозів

### Резюме

У даній статті досліджені властивості асоційованої суспензії інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. В результаті проведених досліджень встановлено, що доза асоційованої інактивованої суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* у співвідношенні 10 + 10 (млн.кл./мл) забезпечує активацію захисних механізмів організму у 84% мишей протягом 3 місяців при внутрішньому язовому введенні в дозі 0,2 мл. Тобто дана суспензія клітин грибів може бути використана для створення асоційованої вакцини для профілактики кандидамікозів.

**Ключові слова:** кандидамікоз, антиген, вакцина, імунітет, інактивовані клітини, доза

На сьогоднішній день за даними, в основному, закордонних дослідників, гриби роду *Candida* змагаються з бактеріями за перше місце серед збудників внутрішньолікарняних інфекцій. Наприклад, в США наводяться дані, що гриби роду *Candida* займають 4 місце серед мікроорганізмів, що виділяються з крові [1, 3, 8]. При цьому для них характерна найвища смертність серед усіх септичних внутрішньолікарняних станів [3, 15].

Як у розвинутих державах, так і в Україні існують труднощі діагностики та лікування кандидозів. Серед пацієнтів з летальним результатом, які не отримали адекватного лікування, одне з перших місць займають кандидози [1, 3, 8, 15]. Діагностика інфекційної патології в більшості випадків в Україні продовжує проводитись шляхом висівів на поживні середовища навіть без ідентифікації виду (викняток становлять деякі гінекологічні лікарні), що не завжди відповідає захворюванню, не дозволяє визначити етіологію захворювання, особливо на ранніх стадіях [3, 4, 8]. Це питання надзвичайно важливе, адже специфічних клінічних ознак кандидемії та дисемінованого кандидозу на ранніх етапах не описано, а враховуючи здатність кандидозу до маскування, лабораторна діагностика, особливо у нашій державі, не завжди своєчасна та ефективна. Лікарям доводиться робити призначення для лікування кандидамікозів емпірично. Терапевтичні проблеми при лікуванні кандидозу також не рідкість [1, 3, 4, 8, 15]. Через активне використання флуконазолу в останні роки гриби роду *Candida* часто виявляються нечутливими до нього. Друга проблема в усьому світі – все більша розповсюдженість різних видів грибів роду *Candida* (non-albicans), частина з яких з самого початку нечутливі до азолів, з яких у нас прийнято починати лікування [1, 3, 4, 8].

Багато дослідників вважають, що використання препаратів, які здатні стимулювати захисні імунні реакції проти кандидозної інфекції, тобто вакцин, є перспективним напрямком у боротьбі з кандидозом [5, 6, 9, 10, 14, 16] та альтернативою протигрибковим препаратам. Необхідно зазначити, що на сьогоднішній день існує декілька класифікацій вакцин в залежності від способу одержан-

ня та складових. Однак, єдиної думки серед дослідників і досі немає – яка ж з них є найперспективнішою. Одним з видів вакцин, які дослідниками використовуються у боротьбі з кандидозом, є інактивовані вакцини. Інактивовані вакцини займають важливе місце у профілактиці різних інфекцій [2, 6, 11, 13, 14, 16], для їх виготовлення використовують мікроорганізми-збудники. Мікроорганізм піддається такій обробці, яка приводить до необхідної втрати здатності до відтворення (реплікація, розмноження), але при цьому зберігає антигенні та імуногенні властивості.

У попередніх дослідженнях автором була розглянута інактивована вакцина на основі грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* окремо, обґрунтований метод інактивації клітин грибів, доведені імуностимулювальні властивості досліджуваних клітин грибів.

Слід зазначити, що в останні роки багатьма авторами відмічається перспективність використання асоційованих, комбінованих або полівалентних вакцин для одночасної імунізації проти ряду інфекцій [2, 5, 6, 11, 13, 14, 16]. Вони можуть включати як однорідні антигени (наприклад, анатоксин), так і антигени різної природи (корпускулярні та молекулярні, живі та вбиті). Прикладом асоційованої вакцини першого типу може слугувати секстанатоксин проти правця, газовой гангрени та ботулізму типу В, АКДП вакцина, до складу якої входять правцевий, дифтерійний анатоксини та кашлюкова корпускулярна вакцина. В живу полівалентну асоційовану поліомієлітну вакцину входять живі вакцини штаму вірусу поліомієліту I, II, III типів. В асоційовану вакцину включаються антигени у дозах, які не викликають взаємної конкуренції, щоб імунітет формувався до всіх антигенів, які входять до складу вакцини.

Враховуючи, що кандидоз частіше за все викликають гриби *C. albicans* та *C. tropicalis* [1, 3, 4, 5, 8, 15], доцільно визначити імуногенні властивості асоційованих інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*. Подібні дослідження активно проводяться за кордоном [5, 7, 9, 10, 12], однак в Україні на сьогодні не випускається жодної вакцини та не зареєстровано жодної іноземної вакцини для лікування та профілактики кандидамікозів.

**Мета роботи** – дослідити здатність інактивованих клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* разом формувати імунітет проти кандидозної інфекції.

## Матеріали та методи дослідження

Усі дослідження проводили у ламінарному боксі, підтримуючи асептичні умови. 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. Переносили окремо одержані суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* на матраси з агаром Сабуро, які інкубували 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 суспензій клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* візуально та методом мікроскопування. Далі проводили центрифугування при швидкості обертання 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 клітин грибів у камері Горяєва. Проводили змішування у реакторі стандартизованих суспензій клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* у відповідному співвідношенні за допомогою змішувача зі швидкістю обертання 100 об/хв протягом 10 хвилин.

Комплексну інактивацію асоційованої суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* проводили послідовно, використовуючи спочатку фізичну обробку, а потім хімічну: інактивували температурою  $50 \pm 2^\circ\text{C}$  протягом 1 години в об'ємі 100 мл при постійному перемішуванні електромішувачем зі швидкістю обертання 100 об/хв, що забезпечувало рівномірну інактивацію клітин грибів в усіх шарах суспензії. Після чого до суспензії грибів додавали формалін в концентрації 40%, доводячи його кінцеву концентрацію у суспензії до 0,5%, перемішували електромішувачем 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 емностей з досліджуваними суспензіями грибів на водяній бані.

Для обґрунтування оптимального складу асоційованої інактивованої суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* було виготовлено 11 варіантів суспензій з різним вмістом клітин цих штамів (млн.кл./мл): 2,5 + 2,5; 5 + 5; 4 + 6; 6 + 4; 10 + 10; 8 + 12; 12 + 8; 15 + 15; 12 + 18; 18 + 12; 20 + 20. Однак варіанти асоційованої інактивованої суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* (млн.кл./мл) 15 + 15; 12 + 18; 18 + 12; 20 + 20 не пройшли випробування на нешкідливість при дослідженні на мишах. Тому у подальших дослідженнях використовували наступні співвідношення інактивованої суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* (млн.кл./мл): 2,5 + 2,5; 5 + 5; 4 + 6; 6 + 4; 10 + 10; 8 + 12; 12 + 8.

Для оцінки здатності асоційованої інактивованої суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з різним вмістом клітин грибів викликати імунітет, проводили дослідження на здорових білих мишах двомісячного віку масою 18–22 г по 6 тварин у контрольних та досліджуваних групах, які утримувалися в однакових умовах на стандартному раціоні. Перед дослідженнями тварини проходили акліматизацію в умовах експериментальної кімнати. Мишам внутрішньом'язово у верхню частину задньої правої лапи вводили інактивовані клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* у об'ємі 0,2 мл. Через 14 днів, повторно, в верхню частину задньої лівої лапи вво-

дили інактивовані клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* у об'ємі 0,2 мл. Тваринам контрольної групи вводили стерильний ізотонічний 0,9% розчин натрію хлориду. Через 1 місяць для однієї групи піддослідних тварин та через 3 місяці для другої групи піддослідних тварин після введення інактивованих клітин гибів *Candida* проводили внутрішньочеревне зараження. Для цього використовували суспензію 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, які вводили з інтервалом 1 година [10, 17, 20]. 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; слабка форма захворювання (+) – неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, порушення функції вивідних органів; середня форма захворювання (+ +) – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, контрактури шийних м'язів, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, при дослідженні слизових оболонок природних отворів були виявлені ознаки патологічного процесу, висівання грибів з фекалій тварин; розвинута форма захворювання (+ + +) – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, різке зниження маси 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 патологічного процесу: мікроабсцеси у корковому шарі нирок, легенях, селезінці, печінці та інших, виділення ретрокультур грибів з органів тварин. Всі результати досліджень статистично оброблялися [5].

## Результати та їх обговорення

У результаті проведених досліджень встановлено, що асоційована інактивована суспензія клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, яка містить (млн.кл./мл) 10 + 10; 8 + 12 та 12 + 8 через 1 та 3 місяці після повторного введення захищала від зараження 84% тварин, тоді, як у 16% тварин спостерігалися незначні прояви захворювання: неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, порушення функції вивідних органів. З огляду на те, що асоційована інактивована суспензія клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, що містить 10 + 10 (млн.кл./мл) готується дещо легше, ніж інші співвідношення, та у подальшому спрощує розрахунки, більш доцільною для подальших досліджень була обрана саме ця доза.

Доза асоційованої інактивованої суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, що містить (млн.кл./мл) 5 + 5; 4 + 6; 6 + 4, через 1 та 3 місяці після повторного введення захищала від зараження 67% білих мишей. При цьому у тварин, які захворіли в результаті експериментального зараження, відмічалось лише незначне пригнічення: неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, порушення функції вивідних органів. Через 1 місяць легкий перебіг захворювання визначався також у мишей, яким вводили інактивовані клітини грибів *Candida* в дозі 2,5 + 2,5 (млн.кл./мл), однак у цій групі відсоток тварин, яких зовсім не вдалося заразити, був дуже низьким. А через 3 місяці в даній групі у 16% тварин спостерігалося посилення проявів захворювання: адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, контрактура шийних м'язів, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, при дослідженні слизових оболонок природних отворів були виявлені ознаки патологічного процесу, висівання грибів з фекалій тварин.

У тварин, яким вводили фізіологічний розчин, виявляли ознаки середньої та розгорнутої форм захворювання: адинамія, нео-

**Таблиця.** Дія асоційованої інактивованої суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* на активацію захисних механізмів організму

Антигени <i>C. albicans</i> та <i>C. tropicalis</i> , млн.кл./мл	Дослідні тварини					
	1	2	3	4	5	6
<b>Результати через 1 місяць</b>						
2,5 + 2,5	+	-	+	+	+	+
5 + 5	-	+	-	-	+	-
4 + 6	+	-	+	-	-	+
6 + 4	-	+	-	+	-	-
10 + 10	-	-	+	-	-	-
8 + 12	-	+	-	-	-	-
12 + 8	-	-	-	+	-	-
Контроль	++	+++	++	+++	++	+++
<b>Результати через 3 місяці</b>						
2,5 + 2,5	+	+	-	++	+	+
5 + 5	-	+	-	-	+	-
4 + 6	+	-	+	-	-	-
6 + 4	-	+	-	-	-	+
10 + 10	-	-	-	+	-	-
8 + 12	-	-	+	-	-	-
12 + 8	-	-	-	-	+	-
Контроль	++	+++	+++	+++	++	+++

**Примітка:** «-» – відсутність захворювання, «+» – легка форма захворювання, «++» – середньої тяжкості форма захворювання, «+++» – тяжка форма захворювання.

хайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, контрактура 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 патологічного процесу: мікроабсцеси у корковому шарі нирок, легенях, селезінці, печінці та інших, виділення ретрокультур грибів з органів тварин (таблиця).

## Висновки

В результаті проведених досліджень встановлено, що доза асоційованої інактивованої суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* у співвідношенні 10 + 10 (млн.кл./мл) забезпечує активацію захисних механізмів організму у 84% мишей протягом 3 місяців при внутрішньом'язовому введенні в дозі 0,2 мл. Таким чином, дана доза (співвідношення) суспензії клітин грибів може бути використана для створення асоційованої вакцини з метою профілактики кандидамікозів.

## Список використаної літератури

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 гастроентерологія. – 2011. – № 4. – С. 30–39.
2. Джавадов Э.Д. Опыт применения поливалентной инактивированной вакцины «Авикрон» для молодняка домашней птицы / Э.Д. Джавадов, А.С. Дубовой, Ф.И. Полежаев // Матер. конф. по птицеводству. – Зеленоград, 2003. – С. 208–216.
3. Елинов Н.П. Особенности иммунитета при грибковых инфекциях. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / под ред. Л.Б. Борисова, А.М. Смирновой. – М.: Медицина, 1994. – С. 219–220, 441–446.

4. Капустина О.А. Видовой состав и биологические свойства грибов рода *Candida*, выделенных из разных биотопов тела человека / О.А. Капустина, Л.Е. Логачева, О. Л. Карташова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2009. – Т. 4, № 24. – С. 179–181.
5. Пат. 2445109 Российская Федерация, МПК7А 61 К 36/062, А 61 К 47/02, С 12 N 1/14. Ассоциированная вакцина против кожного кандидоза плотоядных, способ изготовления ассоциированной вакцины против кожного кандидоза плотоядных, способ профилактики и терапии кожного кандидоза плотоядных / Литвинов А. М., Апанасенко Н. А. (РФ). – 2010127796/10; заяв. 07.07.2010; опубл. 07.07.2010.
6. Петров Р.В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов. – М.: ГЭОСТАР-Медицина, 2011. – 608 с.
7. Пономаренко В.А. Влияние микотоксинов на течение экспериментального кандидоза у мышей / В.А. Пономаренко, К.Н. Кашкин, Н.А. Никифорова // Вопросы микологии. – 1981. – Вып. 17. – С. 127–129.
8. Сергеев А.Ю. Иммуитет при кандидозе и подходы к иммунокоррекции / А.Ю. Сергеев, С.А. Бурова // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – Т. 45, №12. – С. 30–31.
9. Banerjee U. Effect of immunization with formalin killed cells in complete Freund's adjuvant in experimental candidosis / U. Banerjee, L.N. Mohapatra, R. Kumar // Med. Res. – 1985. – Vol. 81. – P. 454–458.
10. Cassone A. Opportunistic fungi and fungal infections: the challenge of a single, general antifungal vaccine / A. Cassone, A. Torosantucci // Expert. Rev. Vaccines. – 2006. – № 5. – P. 859–87.
11. Combination vaccines // A.G. Skibinski David, C. Barbara Baudner, Singh Manmohan, T.O.'Hagan Derek / Glob. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 63–72.
12. Domer J.E. Experimental murine candidiasis: cell-mediated immunity after cutaneous challenge / J.E. Domer, S.A. Moser // Infect. Immun. – 1978. – №20. – P. 88–98.
13. Falk L.A. Manufacturing issues with combining different antigens: a regulatory perspective / L.A. Falk, J. Arciniega, L. McVittie // Clinical Infectious Diseases. – 2001. – №33. – P. 351–355.
14. Kurstac E. Modern vaccinology // Plenum Medical book company. – New York and London. – 1993. – 397с.
15. Pfaller M.A. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem / M.A. Pfaller, D.J. Diekema // Clinical Microbiology Reviews. – 2007. – Vol. 20, №1. – P. 133–163.
16. The impact of the standards for pediatric immunization practices on vaccination coverage levels / Pierce C., Goldstein M., Suozzi K. [et al.] // JAMA. – 1996. – Vol. 276. – P. 626–630.

## Резюме

### Перспектива асоційованого сочетання інактивованих кліток грибів *C. Albicans* і *C. Tropicalis* для профілактики кандидамікозів

Н.В. Рыбалкин, Н.И. Филимонова, Л.С. Стрельников

В данной статье исследованы свойства ассоциированной суспензии инактивированных клеток грибков *C. albicans* и *C. tropicalis*. В результате проведенных исследований установлено, что доза ассоциированной инактивированной суспензии клеток грибков *C. albicans* и *C. tropicalis* в соотношении 10+10 (млн.кл./мл), обеспечивает активацию защитных механизмов организма у 84% мышей в течение 3 месяцев при внутримышечном введении дозы 0,2 мл. Таким образом, данная суспензия клеток грибков может быть использована для создания ассоциированной вакцины для профилактики кандидамикоза.

**Ключевые слова:** кандидамикоз, антиген, вакцина, иммунитет, инактивированные клетки, доза

## Summary

### Perspective of Associated Combination Inactivated Fungal Cells *C. Albicans* and *C. Tropicalis* for Candidiasis Prevention

M.V. Rybalkin, N.I. Filimonova, L.S. Strelnikov

In this article the properties of the associated suspension of inactivated fungal cells *C. albicans* and *C. tropicalis* investigated. The results of research established that the dose of associated inactivated fungal cell suspension of *C. albicans* and *C. tropicalis* in a ratio of 10 + 10 (mln. cell/ml) provides the activation of defense mechanisms in 84% of the mice during 3 months after intramuscular administration of 0,2 ml. Thus, the suspension of fungal cells can be used for creation of vaccine for the prevention of associated candidiasis.

**Key words:** candidiasis, antigen, vaccine, immunity, inactivated cells, dose