

УДК 616.992.282:615.371:615.015.33

М. В. РИБАЛКІН, Н. І. ФІЛІМОНОВА, О. П. СТРИЛЕЦЬ, Л. С. СТРЕЛЬНИКОВ

Національний фармацевтичний університет

ВИЗНАЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ ІНАКТИВОВАНИХ КЛІТИН ГРИБІВ *CANDIDA ALBICANS* ТА *CANDIDA TROPICALIS* ОКРЕМО ФОРМУВАТИ ІМУНІТЕТ ПРОТИ КАНДИДОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Досліджені імуногенні властивості інактивованих клітин грибів Candida albicans та Candida tropicalis окремо. В результаті проведених досліджень встановлено, що імунізуюча доза, яка забезпечує напружений імунітет протягом 3 місяців, при внутрішньом'язовому введенні по 0,2 мл інактивованих клітин грибів Candida albicans містить 4 млн/мл, а інактивованих клітин грибів Candida tropicalis містить 5 млн/мл. Доведено, що внутрішньом'язовий шлях введення інактивованих клітин грибів Candida забезпечує краще формування імунітету проти кандидозної інфекції, ніж підшкірний шлях введення.

Ключові слова: кандидамікоз; антиген; вакцина; імунітет; інактивовані клітини

ВСТУП

Гриби роду *Candida* відомі з давніх часів. Сьогодні кандидози продовжують активно досліджуватися, так як з другої половини 20 століття відмічається постійне зростання захворюваності на ці мікози. Незважаючи на вдосконалення методів діагностики, появу ефективних антибіотиків, значимість кандидозу продовжує зростати. Цьому сприяє активне і не завжди обґрунтоване та правильне використання антибіотиків, вторинні імунодефіцити після лікування онкозахворювань, трансплантацій, зростання захворюваності ВІЛ-інфекції і на кінець висока пристосуваність даного збудника [4, 8, 14, 16].

Думки різних авторів з приводу носійства грибів цього роду на неушкодженій шкірі розходяться: частина вважає, що воно може бути тільки транзитним, і в нормі гриби повинні бути відсутні на шкірі, а інші – сягати 10 %. *Candida* є умовно-патогенним мікроорганізмом з високим рівнем носійства, частота якого постійно зростає: якщо в 20-ті роки ХХ ст. воно складало на слизовій ротової порожнини 10 %, то в 60-70-ті роки зросло до 46-52 %, а в наші дні досягла 60 % [4, 14, 16]. На слизовій оболонці вагіни невагітних жінок носійство досягає 11-12,7 %, але різко збільшується в останній триместр, що становить по різних даних 29,3-86 % [4, 8, 14].

Збудниками кандидозу є дріжджові гриби роду *Candida* родини *Cryptococcaceae*. На теперішній момент відомо близько 160 видів грибів роду *Candida* та лише близько 20 здатні викликати кандидоз у лю-

дини. При цьому найчастіше у хворих виділяють 8 видів: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefir*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*. Найчастіше збудником кандидозу є *Candida albicans*, який викликає 90 % поверхневих та 50-70 % глибоких форм. Другим за розповсюдженістю збудником кандидозу є *C. tropicalis* [1, 4, 16].

Захист організму від кандидозних уражень забезпечує ряд механізмів: неспецифічних та специфічних. До перших відносять несприятливе для грибів середовище організму (рН, температура), ціліність шкірних покривів та слизових оболонок, баланс десквамації і регенерації епітеліоцитів, нормальне функціонування миготливого епітелію, присутність мукополісахаридів слизу, конкуренція представників нормальної мікрофлори та тканин макроорганізму, адекватна перистальтика і нормальний стан кислотно-ферментних систем кишково-шлункового тракту. Також до цієї групи належить присутність достатнього рівня секреторного ІgА, лізоциму, трансферину, лактоферину, церулоплазміну, білків гострої фази, компонентів комплементу, мананозв'язуючого протеїну тощо. Однак головну роль у захисті організму відіграють специфічні фактори імунної системи: фагоцити, НК-клітини, Т-лімфоцити, антитіла, система комплементу. Головним ланцюгом, який позбавляє організм людини *Candida spp.*, є фагоцити-макрофаги і нейтрофіли. Відбувається це шляхом фагоцитозу, а також за рахунок регуляції імунної відповіді [4, 8, 14, 16].

На думку багатьох дослідників активація даних імунологічних механізмів шляхом введення вакцин на основі антигенів [2, 3, 6, 12] забезпечує кращу ре-

© Рибалкін М. В., Філімонова Н. І., Стрилець О. П., Стрельников Л. С., 2014

Таблиця 1

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІНАКТИВОВАНИХ
КЛІТИН ГРИБІВ CANDIDA ALBICANS
НА ЗДАТНІСТЬ ВИКЛИКАТИ ІМУНІТЕТ
ПРИ ВНУТРІШНЬОМ'ЯЗОВОМУ ВВЕДЕННІ**

Інактивовані клітини грибів Candida albicans, млн					Контроль
1 млн	2 млн	3 млн	4 млн	5 млн	
Внутрішньом'язове введення					
Результати через 1 місяць					
++	+	-	-	-	++
++	++	-	-	-	+++
+	-	-	-	-	+++
++	+	+	+	-	+++
+	+	-	-	+	+++
++	+	+	-	-	++
Результати через 3 місяці					
++	+	-	-	-	++
++	+	+	+	-	+++
+	+	-	-	-	++
++	+	-	-	-	+++
+	++	+	-	-	+++
++	-	-	-	+	+++

Примітка: «-» – відсутність хвороби; «+» – слабка форма хвороби; «++» – середня форма хвороби; «+++» – сильна форма хвороби.

зультативність при профілактиці і лікуванні кандидозної інфекції у порівнянні з використанням традиційних протигрибкових препаратів, до яких у багатьох грибів роду *Candida* виробилася стійкість [4, 8, 9]. Таким чином, перспективна розробка вакцини для профілактики та лікування кандидозної інфекції на основі грибів роду *Candida*, а саме *Candida albicans* та *Candida tropicalis*, які є основними збудниками кандидозів [1, 11, 13]. Подібні дослідження активно проводяться за кордоном [7, 10, 13, 16].

У попередніх дослідженнях був обґрунтований метод інактивації клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* шляхом поєднання фізичних та хімічних чинників. Тепер необхідно дослідити імуногенні властивості клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* проти кандидомікозів.

Метою даної роботи було дослідження здатності інактивованих клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* формувати імунітет проти кандидозної інфекції.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Усі дослідження проводили у ламінарному боксі, підтримуючи асептичні умови. Клітини грибів *Candida albicans* штам ССМ 335-867 та *Candida tropicalis* штам АТТС 20336 попередньо окремо культивували у пробірках на агарі Сабуро при 25±2 °С упродовж 48 годин та змивали клітини грибів 10 мл стерильного ізотонічного 0,9 % розчину натрію хлориду. Перено-

Таблиця 2

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІНАКТИВОВАНИХ
КЛІТИН ГРИБІВ CANDIDA ALBICANS
НА ЗДАТНІСТЬ ВИКЛИКАТИ ІМУНІТЕТ
ПРИ ПІДШКІРНОМУ ВВЕДЕННІ**

Інактивовані клітини грибів Candida albicans, млн					Контроль
1 млн	2 млн	3 млн	4 млн	5 млн	
Підшкірне введення					
Результати через 1 місяць					
++	+	-	-	-	+++
++	++	+	-	+	++
+	-	-	+	-	+++
++	+	-	-	-	+++
++	+	-	-	-	++
+	+	+	-	-	+++
Результати через 3 місяці					
+	+	-	-	-	+++
++	+	+	-	-	+++
++	+	+	-	-	+++
+	+	-	+	-	+++
++	++	++	-	+	+++
++	-	+	-	-	++

Примітка: «-» – відсутність хвороби; «+» – слабка форма хвороби; «++» – середня форма хвороби; «+++» – сильна форма хвороби.

сили окремо одержані суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* на матраси з агаром Сабуро, які інкубували при 25±2 °С упродовж 6 діб та змивали клітини грибів 50 мл стерильного ізотонічного 0,9 % розчину натрію хлориду. Визначали мікробіологічну чистоту суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* візуально та методом 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 необхідної кількості та стандартизували суспензії шляхом підрахунку клітин грибів у камері Горяєва [5].

Комплексну інактивацію суспензій клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* проводили послідовно, використовуючи спочатку фізичну обробку, а потім хімічну: інактивували температурою 50±2 °С протягом 1 години у об'ємі 100 мл при постійному перемішуванні електромішалкою зі швидкістю обертання 100 об/хв, що забезпечувало рівномірну інактивацію клітин грибів в усіх шарах суспензії, після чого до кожної суспензії грибів додавали формалін у концентрації 40 %, доводячи його кінцеву концентрацію у суспензіях до 0,5 %, перемішували електромішалкою зі швидкістю обертання 100 об/хв протягом 5 хв та залишали протягом доби при температурі 25±2 °С. Використання температури 25±2 °С виключає зниження імуногенності

Таблиця 3

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІНАКТИВОВАНИХ
КЛІТИН ГРИБІВ *CANDIDA TROPICALIS*
НА ЗДАТНІСТЬ ВИКЛИКАТИ ІМУНІТЕТ
ПРИ ВНУТРІШНЬОМ'ЯЗОВОМУ ВВЕДЕННІ**

Інактивовані клітини грибів <i>Candida tropicalis</i> , млн					Контроль
1 млн	2 млн	3 млн	4 млн	5 млн	
Внутрішньом'язове введення					
Результати через 1 місяць					
++	+	+	+	-	++
++	++	+	-	-	+++
+	+	++	-	-	++
++	+	-	+	+	++
++	++	+	-	-	+++
+	+	+	-	-	+++
Результати через 3 місяці					
++	+	+	-	-	+++
++	+	+	-	+	+++
++	++	++	-	-	+++
+	+	+	+	-	++
++	++	+	-	-	+++
+	+	-	+	-	++

Примітка: «-» – відсутність хвороби; «+» – слабка форма хвороби; «+ +» – середня форма хвороби; «+ + +» – сильна форма хвороби.

властивостей клітин грибів у подальшому. Температуру підтримували шляхом розташування ємкостей з дослідними суспензіями грибів на водяній бані.

Для оцінки здатності інактивованих клітин грибів *Candida albicans* штам ССМ 335-867 та клітин грибів *Candida tropicalis* штам АТТС 20336 окремо з різним вмістом клітин грибів 1, 2, 3, 4, 5 млн викликати імунітет проводили дослідження 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 [8, 10]. Перед дослідженнями тварини проходили акліматизацію в умовах експериментальної кімнати. Мишам внутрішньом'язово у верхню частину задньої правої лапи та окремо підшкірно у верхню частину задньої правої лапи вводили інактивовані клітини грибів *Candida* у об'ємі по 0,2 мл. Через 14 днів повторно у верхню частину задньої лівої лапи та окремо підшкірно у верхню частину задньої лівої лапи вводили інактивовані клітини грибів *Candida* об'ємом по 0,2 мл [11, 12, 18, 19, 23]. Тваринам контрольної групи вводили фізіологічний розчин. Через 1 місяць для однієї групи піддослідних тварин та через 3 місяці для другої групи піддослідних тварин після імунізації проводили внутрішньоочеревинне зараження. Для цього використовували суспензію грибів *Candida albicans* штам ССМ 335-867 у кількості 20 млн клітин та *Candida tropicalis* штам АТТС 20336 у кількості 60 млн клітин в об'ємі 5 мл [9, 21], після чого

Таблиця 4

**ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ІНАКТИВОВАНИХ
КЛІТИН ГРИБІВ *CANDIDA TROPICALIS*
НА ЗДАТНІСТЬ ВИКЛИКАТИ ІМУНІТЕТ
ПРИ ПІДШКІРНОМУ ВВЕДЕННІ**

Інактивовані клітини грибів <i>Candida tropicalis</i> , млн					Контроль
1 млн	2 млн	3 млн	4 млн	5 млн	
Підшкірне введення					
Результати через 1 місяць					
++	++	++	-	-	++
+	+	+	+	-	++
++	+	+	+	-	+++
++	++	+	-	+	++
++	+	-	+	-	+++
+	+	+	-	-	+++
Результати через 3 місяці					
++	++	+	-	-	++
++	+	+	+	-	+++
+	++	+	-	+	++
++	+	-	+	+	+++
++	++	+	+	-	+++
++	+	++	+	-	+++

Примітка: «-» – відсутність хвороби; «+» – слабка форма хвороби; «+ +» – середня форма хвороби; «+ + +» – сильна форма хвороби.

через 14 діб проводили огляд тварин та визначали результати.

Результати проб враховували 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, під час розтину 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 органах, виділення ретрокультур грибів з органів тварин. Результати досліджень оброблялися статистично.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В результаті проведених досліджень встановлено, що доза інактивованих клітин грибів *Candida al-*

bicans як при внутрішньом'язовому, так і при підшкірному введенні 0,2 мл суспензії, що містить в 1 мл 4 млн та 5 млн клітин грибів, через 1 та 3 місяці після ревакцинації захищала від зараження 84% тварин. З огляду на те, що доза 4 млн клітин грибів *Candida albicans* в 1 мл містить меншу кількість клітин грибів, більш доцільним для подальших досліджень ми вважаємо саме цю дозу. Результати досліджень наведені у табл. 1.

Доза інактивованих клітин грибів *Candida albicans*, що містить в 1 мл 3 млн клітин грибів, через 1 місяць після ревакцинації захищала від зараження 67 % білих мишей як при внутрішньом'язовому, так і при підшкірному введенні, а через 3 місяці – також 67 % білих мишей при внутрішньом'язовому введенні та 34 % білих мишей при підшкірному введенні. При цьому у тварин, які захворіли у результаті експериментального зараження, відмічалось лише незначне пригнічення, потім мимовільне одужання, тоді як невакциновані тварини тяжко хворіли. Легкий перебіг хвороби зазначався також у мишей, імунізованих у дозі 2 млн клітин гриба, однак у цій групі відсоток тварин, яких зовсім не вдалося заразити, був дуже низьким. Результати досліджень наведені у табл. 2.

За результатами проведених досліджень встановлено, що доза інактивованих клітин грибів *Candida tropicalis* при внутрішньом'язовому введенні 0,2 мл суспензії, що містить в 1 мл 5 млн клітин грибів, через 1 та 3 місяці після ревакцинації захищала від зараження 84 % тварин. Доза інактивованих клітин грибів *Candida tropicalis* при підшкірному введенні 0,2 мл суспензії, що містить в 1 мл 5 млн клітин грибів, через 1 місяць після ревакцинації захищала від зараження 84 % та через 3 місяці після ревакцинації захищала від зараження 67 % тварин. Результати досліджень наведені у табл. 3.

Доза інактивованих клітин грибів *Candida tropicalis*, яка містить в 1 мл 4 млн клітин грибів, через 1 місяць після ревакцинації захищала від зараження 67 % білих мишей при внутрішньом'язовому введенні, а при підшкірному – 50 % тварин. Через 3 місяці – також 67 % білих мишей при внутрішньом'язовому введенні та 34 % білих мишей при підшкірному введенні. При цьому у тварин, які захворіли у результаті експериментального зараження, відмічалось лише незначне пригнічення, потім мимовільне одужання, тоді як невакциновані тварини тяжко хворіли. Легкий перебіг хвороби відмічався також у мишей, імунізованих у дозі 3 млн клітин гриба, однак у цій групі відсоток тварин, яких зовсім не вдалося заразити, був дуже низьким. Результати досліджень наведені у табл. 4.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень встановлено, що імунізуюча доза, яка забезпечує напружений імунітет протягом 3 місяців, при внутрішньом'язовому

введенні по 0,2 мл інактивованих клітин грибів *Candida albicans* та інактивованих клітин грибів *Candida tropicalis* містить відповідно 4 млн/мл і 5 млн/мл. Згідно з результатами досліджень можна зробити висновки, що внутрішньом'язовий шлях введення інактивованих клітин грибів *Candida* забезпечує краще формування імунітету проти кандидозної інфекції, ніж підшкірний шлях введення. Саме тому для подальших досліджень було обрано внутрішньом'язове введення інактивованих клітин грибів *Candida*.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Апанасенко Н. А. Видовой состав возбудителей поверхностного кандидоза плотоядных животных / Н. А. Апанасенко, А. М. Литвинов // Иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2010. – № 1. – С. 146.
2. Еликова Н. Н. Антигенная активность и иммуногенность клеток *Candida albicans*, обработанных периодатом натрия / Н. Н. Еликова, Г. А. Витовская // Микол. и фитопатол. – 1991. – Т. 25, № 5. – С. 308-403.
3. Жукова Н. В. Теоретические основы иммунопрофилактики / Н. В. Жукова, И. М. Кривошеева, Н. В. Мирошниченко // ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского». – 2012. – С. 31-34.
4. Зеленова Е. Г. Кандиды: экология, морфофункциональные особенности и факторы патогенности / Е. Г. Зеленова, М. И. Заславская, Т. В. Махрова // Нижегородский мед. журн. – 2002. – № 1. – С. 73-84.
5. Першин Г. Н. Методы экспериментальной химиотерапии. 2-е изд. – М.: Медицина, 1971. – 539 с.
6. Чоп'як В. В. Специфічна імунопрофілактика сьгодні і завтра: [навч. посіб.] / В. В. Чоп'як, Г. О. Потьомкина. – Львів, 2011. – 88 с.
7. Шарафутдинов А. М. Технология получения протективного антигена гриба *Candida albicans* и возможность его практического применения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. – Ульяновская гос. с.-х. акад. – Ульяновск, 2001. – 23 с.
8. Anaul Kabir M. Candida infections and their prevention / M. Anaul Kabir, Zulfiqar Ahmad // ISRN Preventive Medicine. – 2013. – P. 1-13.
9. Antifungal agents: mode of action in yeast cells / A. J. Carrillo-Muñoz, G. Giusiano, P. A. Ezkurra, G. Quindós // Revista Espanola de Quimioterapia. – 2006. – Vol. 19, № 2. – P. 130-139.
10. 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.
11. Brown-Thomsen I. Reserve variations between *Candida albicans* and *Candida tropicalis* / I. Brown-

- Thomsen // Actapathol. Etnicrobiol. Scand. – 1966. – Vol. 66, № 1. – P. 143-144.
12. Cutler J. E. Advances in combating fungal diseases: vaccines on the threshold / J. E. Cutler, G. S. Deepe, B. S. Klein // Nat. Rev. Microbiol. – 2007. – № 5. – P. 13-28.
13. Giger D. K. Experimental murine candidiasis: pathological and immune responses to cutaneous inoculation with *Candida albicans* / D. K. Giger, J. E. Doemer, J. T. McQuitty // Infect. Immunol. – 1978. – № 19. – P. 496-509.
14. Pfaller M. A. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends / M. A. Pfaller, P. G. Pappas, J. R. Wingard // Clin. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 43, № 1. – P. 3-14.
15. Segal E. Fungal vaccines and immunotherapy / E. Segal, D. Elad // Mycol. Med. – 2006. – № 16. – P. 134-151.
16. Sims C.R. Invasive candidiasis in immunocompromised hospitalized patients / C. R. Sims, L. Ostrosky-Zeichner, J. H. Rex // Arch. Med. Res. – 2005. – № 36. – P. 660-71.

УДК 616.992.282:615.371:615.015.33

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ИНАКТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ГРИБОВ *CANDIDA ALBICANS* И *CANDIDA TROPICALIS* ОТДЕЛЬНО ФОРМИРОВАТЬ ИММУНИТЕТ ПРОТИВ КАНДИДОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

В данной статье изучены иммуногенные свойства инактивированных клеток грибов *Candida albicans* та *Candida tropicalis* отдельно. В результате проведенных исследований установлено, что иммунизирующая доза, которая обеспечивает напряженный иммунитет на протяжении 3 месяцев, при внутримышечном введении по 0,2 мл инактивированных клеток грибов *Candida albicans* и инактивированных клеток грибов *Candida tropicalis* содержит соответственно 4 млн/мл и 5 млн/мл. Установлено, что внутримышечный способ введения инактивированных клеток грибов *Candida* более эффективно обеспечивает формирование иммунитета против кандидозной инфекции, чем подкожный метод введения.

Ключевые слова: кандидамикоз; антиген; вакцина; иммунитет; инактивированные клетки

UDC 616.992.282:615.371:615.015.33

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

DETERMINING THE ABILITY OF THE INACTIVATED CELLS OF FUNGAL *CANDIDA ALBICANS* AND *CANDIDA TROPICALIS* AWAY FORM IMMUNITY AGAINST *CANDIDA* INFECTION

The immunogenic properties of inactivated fungal cells of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* have been studied separately. The studies found that immunizing dose that provides the immunity among 3 months after intramuscular administration of 0,2 ml of inactivated *Candida albicans* fungal cells contain 4 mln/ml and cells inactivated fungi *Candida tropicalis* contain 5 mln/ml. It has been established that the intramuscular administration of inactivated cells of *Candida* provides more efficient formation of immunity against *Candida* infections than the subcutaneous method of administration.

Key words: candidiasis; antigen; vaccine; immunity inactivated cells

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.
Тел. (057) 706-30-99.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції:
05.03.2014 р.