

ВИЗНАЧЕННЯ ТЕРАПЕВТИЧНОЇ ДІЇ АСОЦІЙОВАНИХ ІНАКТИВОВАНИХ КЛІТИН ГРИБІВ *CANDIDA ALBICANS* ТА *CANDIDA TROPICALIS*

© М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, Л. С. Стрельников

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: досліджено терапевтичний ефект асоційованих інактивованих клітин *Candida albicans* та *Candida tropicalis*. За результатами досліджень встановлено, що одержана асоційована інактивована суспензія клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* забезпечує терапевтичний ефект у 84 % тварин при внутрішньом'язовому введенні в об'ємі 0,2 мл у концентрації (10+10) млн у 1 мл. Отже, одержана інактивована суспензія клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* проявляє протективну та терапевтичну активності.

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

Вступ. Кандидоз – мікотична інфекція, яку викликає дріжджоподібні гриби роду *Candida*, родини *Saccharomycetaceae* *Cryptococcaceae*. Клінічні прояви мікозів широко варіюють від поверхневих, слабовиражених уражень шкіри та слизових оболонок до тяжких інвазійних вісцеральних форм, які загрожують життю [5, 8, 9, 17]. Діагностика та терапія кандидозів дуже складна та потребує залучення спеціальних засобів та фахівців. Кількість хворих на поверхневій та глибокій форми кандидозу в останні десятиліття значно зросли у всіх країнах світу [8, 17]. Цей факт пов'язаний зі зниженням природної імунної реактогенності організму значної частини населення через використання глюкокортикоїдів, цитостатиків, антиметаболітів, антибіотиків широкого спектра дії, розповсюдженні ВІЛ-інфекції, ятрогенних імунодефіцитів, які виникають при хіміотерапії онкологічних хворих та інші [5, 8, 9, 17].

Рід *Candida* включає 163 види, але основну роль у патології людини відіграє обмежена кількість видів – *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. kefir*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* при значній перевазі *Candida albicans* та *Candida tropicalis* [4, 9]. Різні види грибів роду *Candida* ідентифікуються за морфологічними ознаками (макро- та мікроскопічна картина дріжджової фази, характер філаментативності та ферментативної активності). Для ідентифікації усіх видів грибів роду *Candida* потрібні додаткові тести: визначення асиміляції різних джерел живлення, уреазної активності, толерантності до 50 % глюкози, здатності рости на безвітамінних середовищах, розщеплення арбутину, забарвлення діазонієвим голубим В, асиміляції гідрохлориду ацетилглюкозаміну [9, 17].

Встановлено, що більшість штамів *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* чутливі до флуконазолу,

однак у ВІЛ-хворих та інших імунокомпрометованих хворих з інвазивним кандидозом можлива резистентність *C. albicans* до азольних сполук. Більшість штамів *C. krusei* і частина штамів *C. glabrata* проявляють стійкість до флуконазолу [3, 18].

Лікування може бути направлене на попередження гіперколонізації організму грибами роду *Candida* (при призначенні антимікотиків широкого спектра дії та імуносупресантів). Місцеві оральні антимікотики – полієни (ністатин, леворин, мікогептин) нерозчинні та майже не всмоктуються з шлунково-кишкового тракту, тому рідко можуть забезпечити елімінацію грибів роду *Candida*. Тому необхідні пероральні препарати системної дії (флуконазол, ітраконазол) або препарати для ін'єкцій: флюцитози, амфотерицин В, амбізом. Якщо амфотерицин В в наслідок його високої нефротоксичності призначається при кандидозі в добовій дозі 0,5 мг/кг маси тіла, амбізом в 10 раз та більше перевищує цю дозу та не має протипоказань до призначення. При лікуванні кандидозів шкіри та слизових оболонок часто використовують антимікотики для зовнішнього використання: полієни (леворин, ністатин, натаміцин), похідні імідазола (кетоконазол, оксиконазол, еконазол, тіокконазол, клотримазол, міконазол, ізокконазол, біфоназол, аміказол), тріазоли (терконазол), аліламіни (нафтифін, тербінафін), морфоліни (аморолфін), інші препарати (похідні унденциленової кислоти, анілінові барвники та інші) [1, 3, 6, 7, 18].

Лише перераховані антикандидозні препарати вже свідчать про їх велику кількість та різний ступінь ефективності, пов'язаний з хімічною структурою та особливостями фармакокінетики.

Тому одним з перспективних напрямків у світовій практиці для боротьби з кандидомікозами є розробка вакцини для профілактики та ліку-

вання кандидозної інфекції [2, 11, 13, 15, 16]. Різні дослідники пропонують різні види вакцин, однак єдиної думки з цього приводу немає [10, 12, 14]. На даний момент в Україні не випускають та не зареєстровано жодної вакцини проти кандидозу. Тому розробка подібної вакцини є актуальним питанням сучасної медицини та фармації.

У попередніх дослідженнях встановлено, що асоційована суспензія інактивованих клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* у дозі (10+10) млн/мл клітин грибів здатна при внутрішньом'язовому введенні здоровим мишам стимулювати протективний ефект проти кандидозної інфекції, тобто після введення досліджуваного препарату тварини не захворіли на кандидоз при їх зараженні інфектом грибів *Candida*. Тепер необхідно перевірити чи має асоційована суспензія інактивованих клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* у дозі (10+10) млн/мл клітин грибів терапевтичний ефект, тобто чи здатна дана суспензія при внутрішньом'язовому введенні хворим на кандидоз мишам стимулювати терапевтичний ефект проти кандидозної інфекції, який у подальшому забезпечить одужання хворих мишей.

Мета роботи – дослідження терапевтичного ефекту асоційованої суспензії інактивованих клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis*.

Методи дослідження. Усі дослідження проводили у ламінарному боксі з дотриманням асептичних умов. Клітини грибів *Candida albicans* штам ССМ 335-867 та *Candida tropicalis* штам АТТС 20336 попередньо окремо культивували у пробірках на агарі Сабуро при $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ упродовж 48 год та змивали клітини грибів 10 мл стерильного ізотонічного 0,9 % розчину натрію хлориду. Переносили окремо одержані суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* на матраси з агаром Сабуро, які інкубували при $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ упродовж 6 діб та змивали клітини грибів 25 мл стерильного ізотонічного 0,9 % розчину натрію хлориду. Перевіряли 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 (10 млн/мл клітин грибів) та стандартизували суспензії шляхом підрахунку клітин грибів у камері Горяєва. Проводили змішування у реакторі стандартизованих суспензій клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* у співвідношенні 1:1 за допомогою мішалки зі швидкістю обертання 100 об/хв протягом 10 хв.

Комплексну інактивацію асоційовану суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* проводили послідовно, використовуючи спочатку фізичну обробку, а потім хімічну: інактивували температурою $(50 \pm 2)^\circ\text{C}$ протягом 1 год в 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, доводячи його кінцеву концентрацію у суспензіях до 40,0 %, перемішували електромішалкою зі швидкістю обертання 100 об/хв протягом 5 хв та залишали протягом доби при температурі $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$. Використання температури $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ виключає зниження імуногенності властивостей клітин грибів у подальшому. Температуру підтримували шляхом розташування ємностей з дослідними суспензіями грибів на водяній бані.

Терапевтичний ефект асоційованої інактивованої суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* у дозі у дозі (10+10) млн/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 внутрішньочеревно суспензією 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. Через 5 діб мишам внутрішньом'язово у верхню частину задньої правої лапи вводили асоційовану інактивовану суспензію клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* у дозі (10+10) млн/мл у об'ємі по 0,2 мл. Через 14 діб повторно в верхню частину задньої лівої лапи вводили асоційовану інактивовану суспензію клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* у дозі (10+10) млн/мл у об'ємі по 0,2 мл. Тваринам у контрольній групі вводили фізіологічний розчин. Через 14 діб визначали результати.

Результати проб урахували за кількістю різних проявів хвороби та оцінювали за такою системою: (–) – відсутність проявів захворювання; слабка форма захворювання (+) – неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння маси тіла, порушення функції вивідних органів; середня форма захворювання (+ +) – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння маси тіла, контрактури шийних м'язів, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, під час розтину при дослідженні слизових оболонок природних отворів виявлено ознаки патологічних процесів, висівання грибів з фекалій тварин; розвинута форма захворювання (+ + +) – адинамія, неохайний вигляд,

відмова від їжі, падіння 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 патологічних процесів: мікроабсцеси у корковому шарі нирок, у легенях, селезінці, печінці та інших, виділення ретрокультур грибів з органів тварин.

Результати та обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що терапевтичний ефект асоційованої інактивованої суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* у дозі (10+10) млн/мл при внутрішньом'язовому введенні 0,2 мл забезпечував одужування 84 % тварин. Терапевтичний ефект почав проявлятися через 8 – 14 діб після першої ін'єкції вакцини, а через 8 – 14 діб після другої ін'єкції вакцини наступало повне одужання тварин. У 16 % тварин були виявлені ознаки слабкої форми захворювання (+) – неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння маси тіла, порушення функції вивідних органів. Результати досліджень наведено в таблиці 1.

У тварин контрольної групи ознаки хвороби відповідали середній формі захворювання

(+ +) та розвинутій формі захворювання (+ + +) – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння 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 виявлено ознаки патологічних процесів: мікроабсцеси у корковому шарі нирок, у легенях, селезінці, печені та інших, виділення ретрокультур грибів з органів тварин.

Таким чином, асоційована інактивована суспензія клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* має терапевтичну активність, як і окремі інактивовані суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis*. Однак у випадку асоційованої інактивованої суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* ми вводимо лише одну суспензію, а діємо одразу проти двох видів грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis*. Тобто асоційована інактивована суспензія клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* перспективніша, ніж окремі інактивовані суспензії клітин цих грибів.

Таблиця 1. Дослідження терапевтичного ефекту асоційованої інактивованої суспензії клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis*

№ з/п	Асоційована інактивована суспензія клітин грибів <i>Candida albicans</i> та <i>Candida tropicalis</i> , (10+10) млн/мл			Контроль 14 днів після другої ін'єкції
	5 діб після зараження	14 діб після першої ін'єкції	14 діб після другої ін'єкції	
1	++	+	-	++
2	+	+	-	++
3	+	-	-	+++
4	++	+	+	++
5	++	+	-	++
6	+	-	-	++

Примітка. – відсутність хвороби; + – слабка форма хвороби; ++ середня форма хвороби; +++ – тяжка форма хвороби.

Висновки. За результатами досліджень встановлено, що одержана асоційована інактивована суспензія клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* забезпечує терапевтичний ефект у 84 % тварин при внутрішньом'язовому

введенні у об'ємі 0,2 мл у концентрації (10+10) млн у 1 мл.

Таким чином, одержана інактивована суспензія клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* має протективну та терапевтичну активності.

Література

1. Листопад А. Н. Украинский рынок противогрибковых препаратов / А. Н. Листопад // Провизор. – 1999. – № 10. – С. 23–27.
2. Мальй В. П. Вакцинопрофилактика: общие и частные вопросы, проблемы и перспективы / В. П. Мальй // Клиническая иммунология. Алергология. Инсектология. – 2009. – Т. 23, № 23. – С. 5–22.

3. Арзумян В. Г. Чувствительность дрожжей рода *Candida*, выделенных от больных аллергическими заболеваниями, к противогрибковым препаратам / В. Г. Арзумян, Б. Ф. Семенов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2001. – Т. 131, № 4. – С. 411–415.
4. Капустина О. А. Видовой состав и биологические свойства грибов рода *Candida*, выделенных из раз-

- ных 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. Елинов Н. П. Candidaspecies и кандидемии. Состояние и проблемы / Н. П. Елинов // Проблемы медицинской микологии. – 2001. – № 1. – С. 3–13.
6. Навашин Н. С. Антифунгальная химиотерапия: успех и проблемы / Н. С. Навашин // Антибиотики и химиотерапия. – 1998. – № 8. – С. 3–6.
7. Проект рекомендаций по лечению кандидоза / Н. Н. Климов, Н. В. Васильева, В. Б. Антонов [и др.] // Проблемы медицинской микологии. – 2001. – Т. 3, № 3. – С. 12–25.
8. Участие candida spp. в формировании воспалительных заболеваний различной локализации / А. П. Годовалов, Г. П. Ожигбесов, Л. П. Быкова, Е. А. Никулина // Проблемы медицинской микологии. – 2008. – Т. 10, № 2. – С. 34–36.
9. Miceli E. M. H. Emerging opportunistic yeast infections / M. H. Miceli, J. A. Diaz, S. A. Lee // The Lancet Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 11, № 2. – P. 142–151.
10. 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. – Vol. 5. – P. 13–28.
11. David A. D'Argenio A decade of vaccines: integrating immunology and vaccinology for rational vaccine design / A. D'Argenio David, B. Wilson Christopher // Immunity. – 2010. – Vol. 33, № 4. – P. 437–440.
12. Effectiveness of a vaccine composed of heat-killed *Candida albicans* and a novel mucosal adjuvant, LT(R192G), against systemic Candidiasis / Lucia Cardenas-Freytag, Elly Cheng, Patricia Mayeux, Judith E. Domer, John D. Clements // Infection and Immunity. – 1999. – Vol. 67, № 2. – P. 826–833.
13. Bromuro C. Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine / C. Bromuro // Infect. Immun. – 2002. – № 70. – P. 5462–5470.
14. Sega E. Fungal vaccines and immunotherapy / E. Sega, D. Elad // Mycolog. Med. – 2006. – Vol. 16. – P. 134–151.
15. Wack A. Vaccinology at the beginning of the 21 st century / A. Wack, R. Rappuo // Curr. Opin. Immunol. – 2005. – № 17. – P. 411–418.
16. Nabel G. J. Designing Tomorrow's Vaccines / G. J. Nabel // N. Eng. J. Med. – 2013. – Vol. 6, № 368. – P. 551–560.
17. Pfaller M. A. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem / M. A. Pfaller and D. J. Diekema // Clinical Microbiology Reviews. – 2007. – Vol. 20, № 1. – P. 133–163.
18. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* / M. A. Pfaller, D. J. Diekema, L. Steele-Moore [et al.] // Clinical Microbiology and Infection. – 2004. – Vol. 10, supplement 1. – P. 11–23.

ИЗУЧЕНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АССОЦИИРОВАННОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ СУСПЕНЗИИ КЛЕТОК ГРИБОВ *CANDIDA ALBICANS* И *CANDIDA TROPICALIS*

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

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: в данной статье изучен терапевтический эффект инактивированных клеток грибов *Candida albicans* и *Candida tropicalis*. Согласно результатов исследований установлено, что полученная ассоциированная инактивированная суспензия клеток грибов *Candida albicans* и *Candida tropicalis* обеспечивают терапевтический эффект у 84 % животных при внутримышечном введении в объеме 0,2 мл в концентрации (10+10) млн у 1 мл. Таким образом, полученная инактивированная суспензия клеток грибов *Candida albicans* и *Candida tropicalis* обладает протективным и терапевтическим эффектами.

Ключевые слова: кандидамикоз, антигены, инактивированные клетки, терапия, вакцина.

STUDY OF THERAPEUTIC ACTIONS ASSOCIATED INACTIVATED CELL SUSPENSION *CANDIDA ALBICANS* MUSHROOMS AND *CANDIDA TROPICALIS*

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

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: this article studied the therapeutic effect of inactivated fungal cells of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. According to the results of studies it was found that the resulting cell suspension is inactivated associated fungi *Candida albicans* and *Candida tropicalis* provide a therapeutic effect in 84 % of animals when administered intramuscularly in obemy 0.2 ml at a concentration of (10+10) million in 1 ml. The thus obtained cell suspension was inactivated fungi *Candida albicans* and *Candida tropicalis* has a protective and therapeutic effect.

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

Отримано 28.04.2014