

УДК 66.067: 616-0974: 616.594.171.2
DOI: 10.15587/2519-4852.2017.93905

НАУКОВЕ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ ОЧИЩЕННЯ АНТИГЕНІВ ГРИБІВ *CANDIDA*

© М. В. Рибалкін, Л. С. Стрельников

З кожним роком кількість хворих на кандидоз зростає. Багато дослідників вважають, що створення вакцин проти кандидозу є перспективним напрямком у боротьбі з цим захворюванням. Автори обґрунтували технологію дезінтеграції клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* для одержання антигенів.

Метою даної роботи було обґрунтування технології очищення антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* від баластних речовин.

Матеріали і методи. Першим етапом необхідно було відділити незруйновані клітини та залишки зруйнованих клітин. Далі необхідно було провести очищення від дрібних механічних залишків у складі розчину антигенів грибів. Щоб попередити можливе зараження обладнання та персоналу, необхідно було провести стерилізацію одержаного розчину антигенів. Для проведення розділення речовин за молекулярними масами проаналізовано використання ультрафільтрації та гель-хроматографії. Визначення активності одержаних фракцій антигенів грибів при попередженні та терапії кандидомікозів проводили в дослідах на мишах.

Результати дослідження. За результатами досліджень було розроблено технологію очищення антигенів грибів, яка складається з послідовних процесів: центрифугування, попередньої, стерилізуючої та ультрафільтрації.

Висновки. Проведені дослідження на мишах свідчать, що розроблена технологія очищення антигенів *C. albicans* та *C. tropicalis* забезпечує необхідний результат при попередженні та терапії кандидозної інфекції

Ключові слова: антиген, вакцина, кандидоз, технологія, фільтрація, ультрафільтрація, центрифугування, терапія, профілактика, імунітет

1. Вступ

Кандидоз інфекційне захворювання викликане дріжджеподібними грибами роду *Candida*, які вражають нігті, шкіру, слизові оболонки та внутрішні органи. Гриби *Candida* входять до нормальної мікрофлори людини. З кожним роком кількість хворих на кандидоз зростає, що пов'язано з нераціональним використанням антибіотиків, гормонів та інших препаратів, а також погіршенням екології та послабленням імунітету в наслідок розвитку таких захворювань, як цукровий діабет, ВІЛ та інші [1, 2]. Виділяють наступні форми кандидозу: поверхневий, вісцеральний, хронічний, вторинний або алергійний.

2. Постановка проблеми у загальному вигляді, актуальність теми та її зв'язок із важливими науковими чи практичними питаннями

За даними ВООЗ кожна п'ята людина у світі хворіє на кандидоз. Дане твердження стосується і України, де кількість хворих на кандидоз можливо навіть більше. Для лікування кандидозів використовують місцеві та системні антимікотики такі, як флуконазол, амфотеріцин В, кетаназол та інші [3, 4]. В науковій літературі з'являються твердження, що багаторічне використання цих препаратів могло привести до втрати чутливості грибів *Candida* до них. У зв'язку з цим багато дослідників вважають, що створення вакцин проти кандидозу є перспективним напрямком у боротьбі з цим захворюванням.

3. Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми і на які спирається автор

Дослідження з розробки вакцин проти кандидозної інфекції зараз активно ведуться в США, де

дослідники вивчають різні за складом варіанти вакцин проти кандидозу. Більшість запропонованих кандидозних вакцин знаходяться на стадії доклінічних досліджень та незначна частина розроблених вакцин проти кандидозу перебувають у клінічних дослідженнях [5, 6].

4. Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми, якій присвячена стаття

В Україні на сьогоднішній день не випускається та незареєстрована жодна вітчизняна чи іноземна вакцина проти кандидозу. Тому розробка кандидозної вакцини є актуальним питанням сучасної фармації та медицини. На думку авторів перспективо створити комбіновану вакцину проти кандидозу на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, оскільки за даними літератури найчастіше кандидоз викликають саме ці два збудника одночасно.

На кафедрах біотехнології та мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету були обґрунтовані технології дезінтеграції клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* для одержання антигенів [7]. Одержана суміш антигенів містить діючі та баластні речовини. На основі одержаних антигенів планується розробити вакцину для попередження та лікування кандидозної інфекції. З даних літератури відомо, що перспективними антигенними властивостями володіють біополімери з молекулярною масою більше 10 кД [5].

5. Формулювання цілей (завдання) статті

Метою даної роботи було обґрунтування технології очищення антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* від баластних речовин.

6. Виклад основного матеріалу дослідження (методів та об'єктів) з обґрунтуванням отриманих результатів

Суспензії клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з концентрацією 8×10^8 – 8×10^9 у 1 мл окремо піддавали дії ультразвуку на апараті УЗУУ-21 при частоті 22 кГц, інтенсивності 5 Вт/см² та при температурі 25 ± 2 °С у продовж 15 хв. Одержана суміш містить незруйновані клітини грибів, зруйновані клітини грибів, діючі речовини, до яких відносять високомолекулярні білки та полісахариди, та баластні речовини, до яких відносять низькомолекулярні білки, пігменти та інші. Першим етапом необхідно відділити незруйновані клітини та залишки зруйнованих клітин. Для цього було вирішено використовувати центрифугування, яке забезпечує розділення не однорідних систем на фракції за густиною. Одержану суміш антигенів центрифугували при швидкості обертання 1000 об/хв протягом 15 хв та відділяли осад. Далі необхідно було провести очищення від дрібних механічних залишків у складі розчину антигенів грибів. В цьому випадку було використане фільтрування через мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Щоб попередити можливе зараження обладнання та персоналу, необхідно було провести стерилізацію одержаного розчину антигенів. Для цього існують різні методи. Аатоклавування – метод стерилізації з використанням вологого пару під тиском при температурі 110 °С. Тиндалізація – метод стерилізації, який полягає у дробовому нагріванні при температурі 100 °С розчину протягом 1 години від 3 до 5 разів з проміжками 24 години. Хімічна стерилізація – метод стерилізації з додаванням антисептиків 0,5 % фенолу, 0,5 % формаліну та інші. Стерилізуюча фільтрація – метод стерилізації з використанням мембранних фільтрів з діаметром пор 0,22 мкм. На нашу думку найперспективнішим методом стерилізації є стерилізуюча фільтрація, оскільки антигени є термолабільними речовинами і в цьому випадку не має потреби вводити додаткові речовини до складу антигенів або підводити тепло.

Для проведення розділення речовин за молекулярними масами можливо використовувати ультрафільтрацію та гель-хроматографію. Ультрафільтрація – процес розділення дослідного розчину на фракції при використанні мембранних фільтрів. Гель-хроматографія – процес розділення дослідного розчину на фракції оснований на використанні природних речовин та гелів окремих синтетичних продуктів (сефадекс та інші). Зважаючи на те, що ультрафільтрація протікає значно швидше, для подальших досліджень було обрано саме цей метод. Далі проводили ультрафільтрацію на мембранних фільтрах з відсіканням молекулярної маси 10 кД. В результаті чого було одержано дві фракції високо- та низькомолекулярну. Одержані фракції стандартизували за вмістом білку та досліджували їх активність в експерименті на тваринах.

Визначення активності одержаних антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при попередженні та терапії кандидамікозів проводили в досліді на здо-

рових білих мишах двохмісячного віку масою 18–22 г по 6 тварин у контрольній та дослідній групах. Перед дослідженнями тварини проходили акліматизацію в умовах експериментальної кімнати. З метою попередження кандидозу мишам двократно з інтервалом 14 діб внутрішньом'язово у верхню частину задньої правої лапи окремо вводили по 0,2 мл досліджуваних фракцій з концентрацією білку для *C. albicans* 3 мг/мл та *C. tropicalis* 5 мг/мл. Концентрації білків були визначені у попередніх дослідженнях [8, 9]. Тваринам у контрольній групі вводили фізіологічний розчин. Через 14 діб визначали результати. Дані дослідження проводили на базі Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. Мечнікова». Також встановлювали титри антитіл при попередженні кандидозу. З мишами проводили вище зазначену маніпуляцію. Через 14 діб після другої ін'єкції визначали захисні функції організму тварин за титром специфічних антитіл *C. albicans* при проведенні імуноферментного аналізу. Для цього використовували набір реагентів для імуноферментного виявлення антитіл класу G до *C. albicans* за допомогою тест-системи ІФА «Вектор-Бест». У зв'язку з відсутністю наборів реагентів для імуноферментного виявлення антитіл класу G до *C. tropicalis*, проводили виявлення лише антитіл класу G до *C. albicans*.

При терапії кандидозу мишей попередньо заражали внутрішньочеревно суспензією грибів *C. albicans* у кількості 20 млн. клітин та *C. tropicalis* у кількості 60 млн. клітин в об'ємі 1 мл. Через 5 днів після зараження мишам двократно з інтервалом 14 діб внутрішньом'язово у верхню частину задньої правої лапи окремо вводили по 0,2 мл досліджуваних фракцій з концентрацією білку для *C. albicans* 3 мг/мл та *C. tropicalis* 5 мг/мл. Тваринам у контрольній групі вводили фізіологічний розчин. Після чого через 14 діб проводили огляд тварин та визначали результати [10]. Також проводили дослідження титрів антитіл при попередженні кандидозу. З мишами проводили вище зазначену маніпуляцію. Через 14 діб після другої ін'єкції проводили визначення захисних функцій організму тварин за титром специфічних антитіл *C. albicans* при проведенні імуноферментного аналізу.

Згідно результатів проведених досліджень встановлено, що при введенні антигенів клітин грибів *C. albicans* з концентрацією білку 3 мг/мл високомолекулярної фракції 100 % тварин залишалися стійкими до зараження. Антигени клітин грибів *C. albicans* з концентрацією білку 3 мг/мл низькомолекулярної фракції захищала від зараження 67 % білих тварин. У 23 % хворих дослідних тварин були виявлені ознаки інфікування, що відповідає легкій формі хвороби: неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, порушення функцій вивідних органів. Результати дослідження наведені в табл. 1.

Встановлено, що антигени клітин грибів *C. tropicalis* з концентрацією білку 5 мг/мл високомолекулярної фракції захищала від зараження 100 % тварин. Антигени клітин грибів *C. albicans* з концентрацією білку 5 мг/мл низькомолекулярної фракції захищала від зараження 50 % білих тварин. У 50 %

хворих дослідних тварин були виявлені ознаки інфікування, що відповідає легкій формі хвороби: неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння ваги тіла, порушення функції вивідних органів.

Таблиця 1
Дослідження фракцій антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при попередженні кандидозу

Дослідні зразки	Збудник	Дослідні тварини Здорові/Хворі/Загиблі, %
		Попередження
Високомолекулярна фракція	<i>C. albicans</i>	100/0/0
Низькомолекулярна фракція		67/33/0
Високомолекулярна фракція	<i>C. tropicalis</i>	100/0/0
Низькомолекулярна фракція		50/50/0
Контроль		0/0/100

Тварини контрольної групи виявляли ознаки сильної форми захворювання: адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння ваги тіла, контрактури шийних м'язів, параліч кінцівок, судоми, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів та загибель. 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, печені та інших, виділення ретрокультур грибів з органів тварин.

При терапії кандидозу високомолекулярна фракція антигенів грибів *C. albicans* з концентрацією білку 3 мг/мл забезпечувала одужання 100 % 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 100 % тварин. При терапії кандидозу низькомолекулярна фракція антигенів грибів *C. albicans* з концентрацією білку 3 мг/мл забезпечувала одужання 67 % тварин. У 23 % хворих дослідних тварин були виявлені ознаки інфікування, що відповідає легкій формі хвороби: неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння ваги тіла, порушення функції вивідних органів. Результати дослідження наведені в табл. 2.

За результатами досліджень при терапії кандидозу встановлено, що високомолекулярна фракція антигенів грибів *C. tropicalis* з концентрацією білку 5 мг/мл 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. Антигени клітин грибів *C. albicans* з концентрацією білку 5 мг/мл низькомо-

лекулярної фракції захищала від зараження 50 % тварин. У 50 % тварин залишалися ознаки хвороби, які відповідали слабкій формі захворювання: неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння ваги тіла, порушення функції вивідних органів.

Таблиця 2
Дослідження фракцій антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при терапії кандидозу

Дослідні зразки	Збудник	Дослідні тварини Здорові/Хворі/Загиблі, %
		Терапія
Високомолекулярна фракція	<i>C. albicans</i>	100/0/0
Низькомолекулярна фракція		67/23/0
Високомолекулярна фракція	<i>C. tropicalis</i>	84/16/0
Низькомолекулярна фракція		50/50/0
Контроль		0/0/100

Тварини контрольної групи виявляли ознаки сильної форми захворювання: адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння ваги тіла, контрактури шийних м'язів, параліч кінцівок, судоми, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів та загибель. 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, печені та інших, виділення ретрокультур грибів з органів тварин.

Результати досліджень показали, що до ін'єкції титри антитіл здорових тварин були у діапазоні 1:200–1:500. Це можна пояснити можливим контактом з грибом роду *Candida* в процесі життєдіяльності мишей або можливим носійством даного виду грибів, оскільки вони входять до складу нормальної мікрофлори тварин. Після двократної ін'єкції антигенами клітин грибів *C. albicans* з концентрацією білку 3 мг/мл з інтервалом 14 діб відбувається підвищення титру антитіл, що знаходиться в діапазоні 1:600–1:4000. Титр антитіл хворих тварин були в діапазоні 1:400–1:1000. Для одержання достовірних результатів дослідження всі отримані показники були статистично оброблені. Результати дослідження наведені в табл. 3. Порівнюючи результати, отримані в експериментальній і контрольній групі, можна з упевненістю стверджувати, що введення антигенів клітин гриба *C. albicans* стимулює утворення антитіл, які відповідають за гуморальний імунітет.

За результатами досліджень було визначено, що запропонована технологія очищення антигенів *C. albicans* та *C. tropicalis* забезпечує збереження активності антигенів при попередженні та терапії кандидозної інфекції. Розроблена технологія очищення антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* зображена на рис 1.

Таблиця 3

Дослідження імуноотропної дії фракцій антигенів грибів *C. albicans*

Тварини	Здорові тварини	Хворі тварини	Хворі після 1-ї ін'єкції	Хворі після 2-ї ін'єкції
	Титри АТ в ІФА для <i>C. albicans</i>			
Попередження				
<i>C. albicans</i> »10	1:500±95	1:1000±192	1:2000±352	1:4000±851
<i>C. albicans</i> «10	1:350±83	1:700±162	1:1400±321	1:2800±673
Терапія				
<i>C. albicans</i> »10	1:400±91	1:800±182	1:1600±332	1:3200±712
<i>C. albicans</i> »10	1:200±94	1:400±152	1:800±345	1:1600±735

Примітка: n=6, P<0,5

Технологія очищення антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*Клітини грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*

↓ Дезінтеграція (ультразвук)

Загальний розчин антигенів

↓ Центрифугування

Центрифугат

↓ Попередня фільтрація

Нестерильний розчин антигенів

↓ Стерилізуюча фільтрація

Стерильний розчин антигенів

↓ Ультрафільтрація

Фракційований розчин антигенів

Рис. 1. Технологія очищення антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis***7. Висновки з проведеного дослідження і перспективи подальшого розвитку даного напрямку**

1. В результаті проведених досліджень була розроблена технологія очищення антигенів *C. albicans* та *C. tropicalis* від баластних речовин, яка складається з послідовних технологічних процесів: центрифугування, попередньої та стерелізуючої фільтрації на мембранних фільтрах з діаметром пор 0,45 мкм та 0,22 мкм, ультрафільтрації з відсіканням молекулярної маси 10 кД.

2. Згідно одержаних результатів дослідження встановлено, що розроблена технологія очищення антигенів *C. albicans* та *C. tropicalis* забезпечує ефективність при попередженні та терапії кандидозної інфекції.

Література

- Antinori, S. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review [Text] / S. Antinori, L. Milazzo, S. Sollima, M. Galli, M. Corbellino // European Journal of Internal Medicine. – 2016. – Vol. 34. – P. 21–28. doi: 10.1016/j.ejim.2016.06.029
- Campion, E. W. Invasive Candidiasis [Text] / E. W. Campion, B. J. Kullberg, M. C. Arendrup // New England Journal of Medicine. – 2015. – Vol. 373, Issue 15. – P. 1445–1456. doi: 10.1056/nejmra1315399
- Pappas, P. G. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America [Text] / P. G. Pappas, C. A. Kauffman, D. R. Andes, C. J. Clancy, K. A. Marr, L. Ostrosky-Zeichner et. al. // Clinical Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 62, Issue 4. – P. e1–e50. doi: 10.1093/cid/civ933
- Тихонов, О. І. Маркетингові дослідження ринку протигрибкових лікарських засобів для місцевого застосування [Текст] / О. І. Тихонов, О. Є. Фролова, О. П. Гудзенко, С. В. Барнатович // Соціальна фармація в охороні здоров'я. – 2016. – Т. 2, № 2. – С. 77–81.
- Wang, X. Vaccines in the treatment of invasive candidiasis [Text] / X. Wang, X. Sui, L. Yan, Y. Wang, Y. Cao, Y. Jiang // Virulence. – 2015. – Vol. 6, Issue 4. – P. 309–315. doi: 10.4161/21505594.2014.983015
- Rybalkin, M. V. Biotechnological description of technologies for obtaining of antigens of Candida genus fungi [Text] / M. V. Rybalkin // Annals of Mechnikov's Institute. – 2014. – Issue 2. – P. 20–24.
- Рибалкін, М. В. Визначення оптимального методу дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis* [Текст] / М. В. Рибалкін // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2014. – № 2. – С. 71–75.
- Рыбалкин, Н. В. Оценка антигенов клеток грибов *Candida albicans* [Текст] / Н. В. Рыбалкин, Н. И. Филимонова, О. П. Стрелец, Л. С. Стрельников // Фармація Казахстану. – 2014. – Т. 161, № 10. – С. 40–42.
- Рибалкін, М. В. Оцінка фракцій антигенів дезінтеграту клітин грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при попередженні кандидозів [Текст] / М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрелець, Л. С. Стрельников // Фармацевтичний журнал. – 2015. – № 2. – С. 100–104.
- Рибалкін, М. В. Доцільність використання антигенів грибів *Candida* при лікуванні кандидозів [Текст] / М. В. Рибалкіна, Н. І. Філімонова, Л. С. Стрельников // Український біофармацевтичний журнал. – 2014. – № 3. – С. 17–19.

Дата надходження рукопису 17.01.2017

Рибалкін Микола Вікторович, кандидат фармацевтичних наук, асистент, кафедра біотехнології, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, Україна, 61002
E-mail: ribalkin.nikolay@mail.ru

Стрельников Леонід Семенович, доктор фармацевтичних наук, професор, кафедра біотехнології, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, Україна, 61002
E-mail: biotech@nuph.edu.ua