



М. В. Рибалкін

Визначення оптимального методу дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* та *Candida tropicalis*

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: кандидамікоз, антиген, білки, полісахариди, дезінтеграція.

Кількість хворих на кандидоз за останні роки стрімко зросла, тому розробка препаратів на основі генного матеріалу грибів роду *Candida* для запобігання та лікування кандидамікозів є актуальним питанням сучасної фармації та медицини. З метою обґрунтування оптимального методу дезінтеграції (дія ультразвуку, розтирання з абразивним матеріалом і заморожування-розморожування) клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* у кожному випадку по 6 разів здійснено визначення білка, полісахаридів у моносахаридів за методичними рекомендаціями Державної фармакопеї України. Встановили, що метод ультразвукової дезінтеграції забезпечує максимальне виділення полісахаридів, моносахаридів і білків. Це свідчить про перспективність використання методу ультразвукової дезінтеграції.

Определение оптимального метода дезинтеграции клеток грибов *Candida albicans* и *Candida tropicalis*

Н. В. Рыбалкин

Количество больных кандидозом за последние годы резко возросло, поэтому разработка препаратов на основе генного материала грибов рода *Candida* для предупреждения и лечения кандидамикозов является актуальным вопросом современной фармации и медицины. С целью обоснования оптимального метода дезинтеграции (действие ультразвука, растирание с абразивным материалом и замораживание-размораживание) клеток грибов *Candida albicans* и *Candida tropicalis* в каждом случае по 6 раз проведено определение белка, полисахаридов и моносахаридов согласно методическим рекомендациям Государственной фармакопеи Украины. Установлено, что метод ультразвуковой дезинтеграции обеспечивает максимальное выделение полисахаридов, моносахаридов и белков. Это свидетельствует о перспективности использования метода ультразвуковой дезинтеграции.

Ключевые слова: кандидамикоз, антиген, белки, полисахариды, дезинтеграция.

Актуальные вопросы фармацевтической и медицинской науки и практики. – 2014. – № 2 (15). – С. 71–75

The determination of optimal cells disintegration method of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungals

M. V. Rybalkyn

Aim. The number of patients with candidiasis in recent years has increased sharply, so the development of drugs based on genetic material of *Candida* for the prevention and treatment of candidiasis is a key issue of modern pharmacy and medicine.

Methods and results. In order to justify the optimal method of disintegration of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi cells (the action of ultrasound, rubbing with abrasive material and freeze-thaw), the determination of protein, polysaccharides and monosaccharides in each case has been carried out six times according to the guidelines of the State Pharmacopoeia of Ukraine.

Conclusion. It has been established that the ultrasonic disintegration method provides maximum isolation of polysaccharides, monosaccharides and proteins. This testifies the prospect of using the method of ultrasonic disintegration.

Key words: Candidiasis; Antigen, Protein, Polysaccharides, Disintegration.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2014; № 2 (15): 71–75

Кандидоз – опортуністичний мікоз, перебіг якого характеризується ураженням слизових оболонок і шкірних покривів. У хворих із важкими імунodefіцитними станами можливі дисеміновані форми, частіше з ураженням легенів і органів шлунково-кишкового тракту [1,2].

Хоча *Candida albicans* і залишається найчастішим патогеном при кандидозі, але інші види *Candida* стають усе частішою проблемою при інвазійному кандидозі [3]. Ця проблема важлива для хворих із гострим небезпечним для життя інвазійними кандидозними інфекціями. Якщо відомий вид грибу, то його чутливість до протигрибкових препаратів може бути передбачувана, однак окремі ізоляти можуть не відповідати загальним правилам.

У зв'язку з цим багато дослідників вважають перспективним напрямом у боротьбі з кандидозом розробку вакцин для профілактики та лікування кандидозної

інфекції. Подібні дослідження активно здійснюються у багатьох державах світу: Росії, США, Японії тощо [4–7]. Однак нині в Україні не випускається жодної вітчизняної вакцини та не зареєстровано жодної іноземної вакцини проти кандидозу.

Субодиничні вакцини складаються з фрагментів мікроорганізму, що здатні забезпечувати адекватну імунну відповідь [8–10]. Основними речовинами у складі клітин грибів роду *Candida*, які характеризуються антигенними властивостями, є білки та полісахариди [4,5,7].

Для руйнування (дезінтеграції) клітин використовують набір методів, що належать до трьох груп: фізико-механічні, хімічні та ензиматичні (ферментні). Усі процедури мають бути достатньо жорсткими, аби зруйнувати клітинну стінку, але водночас достатньо м'якими, аби виключити денатурацію або руйнування цільового продукту. Більшість тваринних клітин руйнується порівняно

легко, однак під час руйнування рослинних і бактеріальних клітин часто виникають певні ускладнення, що пов'язані з наявністю клітинної стінки, а оскільки вони у різних мікроорганізмів складаються з різних полімерів, то немає універсального методу їхнього руйнування [11–12].

Фізико-механічні методи руйнування клітин більш економічні, ніж хімічні та хіміко-ферментативні. Їх застосування не потребує дорогих і дефіцитних реактивів і ферментних препаратів. Однак для цих методів руйнування клітин характерна певна не вибірковість: обробка може негативно впливати на якість необхідної речовини. При тонкому регулюванні умов руйнування клітин деякі з фізичних методів дають змогу виділити одну фракцію внутрішньоклітинного вмісту.

Розтирання клітин із твердими матеріалами. У сучасній модифікації цей метод полягає у розтиранні клітин із піском або абразивним порошком у ступці за допомогою товчача. Нині завдяки виникненню більш м'яких методів руйнування клітин цей метод використовують для руйнування тваринних клітин доволі рідко, однак його використовують для руйнування рослинних і бактеріальних клітин. Бажано, щоб абразивні частини були якомога гострішими та мали такий же розмір, як клітини, що руйнуються.

Гарні результати дає продавлювання клітин, що змішані з абразивними частинами, через прес Хьюза. Вологі клітини з абразивними частинами поміщають у трубку при температурі -5°C , а потім ударом по поршню, який утворює стрімку зміну тиску, проштовхують клітинну масу через вузький отвір діаметром 0,25 мм.

Клітини можна руйнувати також шляхом механічного струшування суспензії часток з абразивним порошком із частотою 300–3000 коливань на хвилину за допомогою струшувала Мікля, у який додають дрібні скляні бусинки діаметром від 50 до 500 мкм. Однак сильна вібрація, що виникає під час струшування, часто викликає руйнування клітинних органел.

Руйнування клітин у рідких середовищах. Руйнування клітин, які знаходяться в суспензії, відбувається або при обертанні лопатей чи поршня (блендери), або при поступальному рухові вгору і вниз поршня або шарів (гомогенізатори).

Руйнування клітин за допомогою високого тиску. Метод використовується переважно для руйнування мікробних клітин. Для цього використовують спеціальні преси, наприклад френч-прес (French Pressure), в якому утворюється тиск до 104–107 Па.

Руйнування за допомогою ультразвуку. Клітини можна руйнувати також за допомогою високочастотних ультразвукових коливань. Механізм такого руйнування остаточно нез'ясований. Однак встановили, що при обробці клітинних суспензій ультразвуком у середовищі утворюється високочастотна зміна тиску. Основний недолік методу – у процесі обробки ультразвуком вивільнюється значна кількість тепла, тому аби не допустити

розігрівання ємність із суспензією поміщають у кригу.

Обережне та вибіркоче руйнування клітинної стінки можливе при використанні хімічних і хіміко-ферментативних методів.

Клітини бактерій обробляють лізоцимом (гідролітичним ферментом, що діє на пептидоглікан клітинної стінки) за наявності етилендіамінтетраоцтової кислоти, а клітини дріжджів – зимолазою равліка або ферментами грибів актиноміцетів.

Руйнування клітинних стінок мікроорганізмів зумовлює обробка толуолом або бутанолом.

Ефективний лізис клітин викликають антибіотики (поліміксини, тіроцидіни, новобіоцин, ністатин тощо), окремі поверхнево-активні речовини, а також гліцин.

Можна використовувати автоліз клітин при лімітованому за певним субстратом ростом чи їх лізис при зараженні бактеріофагами. Останній варіант пов'язаний із певним ризиком неконтрольованого розповсюдження у промислових установках, і тому не використовується у промислових умовах.

У результаті обробки клітинної біомаси одним із методів руйнування клітин отримують гомогенат, який містить незруйновані клітини, оболонки зруйнованих клітин, частини мембран, різноманітні клітинні структури, що можуть бути відокремлені шляхом фільтрування. При цьому більша частина речовин-ендометаболітів переходить у культуральне середовище або розчин екстрагента [11–12].

Для отримання антигенів клітин грибів відхилені методи, котрі базувались на обробці біомаси грибів хімічними речовинами (екстракція, гідроліз). Це пов'язано із тим, що хімічні речовини під час контакту з антигенами значно послаблюють імунологічну активність вакцин. Необхідно відзначити, що багато механічних пристроїв, які руйнують клітини мікроорганізмів, дуже дорогі, а тому мало доступні у звичайних умовах чи не підходять для обробки необхідної кількості матеріалу, бо використовується надто мала кількість клітин мікроорганізмів. Крім того, методи, що потребують тривалої інкубації, або методи, котрі включають багато складних етапів, нерідко дають поганий вихід або призводять до втрати активності білків. Отже, фізичні методи руйнування клітин більш економічні, ніж хімічні та хіміко-ферментативні, не потребують використання дорогих і дефіцитних реактивів і ферментних препаратів.

Для руйнування клітин грибів обрали найдоступніші ефективні та недорогі фізичні методи руйнування клітин: ультразвуком, розтирання клітин із твердими матеріалами та шляхом заморожування-відтавання. У попередніх дослідженнях обґрунтували умови культивування клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* при температурі $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ на матрасі протягом 6 дб.

Мета роботи

Експериментальне обґрунтування методу руйнування клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis*.

Матеріали і методи дослідження

Усі дослідження виконали у ламінарному боксі, підтримуючи асептичні умови. Клітини грибів *Candida albicans* штам ССМ 335-867 та *Candida tropicalis* штам АТТС 20336 окремо культивували за схемою у пробірках на агарі Сабуро при $25\pm 2^\circ\text{C}$ протягом 48 годин, клітини грибів змивали 10 мл стерильного ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду. Переносили окремо суспензії клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* на матраси з агаром Сабуро, які інкубували при $25\pm 2^\circ\text{C}$ протягом 6 діб, клітини грибів змивали 25 мл стерильного ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду. Визначали мікробіологічну чистоту суспензії клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* візуально та методом мікроскопування. Далі змиви центрифугували при швидкості обертання 3000 об/хв протягом 10 хв. Осад клітин грибів доводили стерильним ізотонічним 0,9% розчином натрію хлориду до $(8,5-9)\times 10^8$ в 1 мл, суспензії стандартизували шляхом підрахунку клітин грибів у камері Горяєва.

Для визначення оптимального методу для дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* та вивільнення білків і полісахаридів провели дезінтеграцію паралельно з використанням кількох методів, що базуються на різних принципах дії, враховуючи усі технологічні аспекти; надалі аналізували склад речовин, які отримали. Для кожного дослідження брали однакову кількість суспензії клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* – по 10 мл.

Ультразвукова дезінтеграція. Високочастотна вібрація наконечника товкача викликає кавітацію, тобто утворення мікроскопічних бульбашок газу, які рухаються з великою швидкістю поблизу наконечника. Ці бульбашки забезпечують утворення гідродинамічної сили, котра призводить до руйнування клітин. Такий метод руйнування має багато переваг, оскільки є недорогим та ефективним. Біомасу клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* окремо в об'ємі 10 мл стерильного ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду піддавали дії ультразвуку для руйнування клітин грибів на апараті УЗУУ-21 із попередньо визначеними параметрами при частоті 22 кГц, інтенсивності 5 Вт/см² та температурі $25\pm 2^\circ\text{C}$ протягом 15 хв. Температуру $25\pm 2^\circ\text{C}$ весь час контролювали при озвучуванні суспензій клітин і підтримували шляхом додавання в оточуючу сміть холодної води.

Розтирання з твердими матеріалами. У сучасній модифікації цей метод полягає у розтиранні клітин із піском або абразивним порошком у ступці за допомогою товкача. Бажано, аби абразивні частини були якомога гострішими та мали такий самий розмір, як клітини, що руйнуються. Біомасу клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* 10 мл окремо розтирали товкачем у ступці із кварцовим піском протягом 15 хв при температурі $25\pm 2^\circ\text{C}$, пісок додавали до біомаси грибів у співвідношенні 1:1.

Заморожування та розморожування. Багато дослідників вважають, що існує оптимальна швидкість охоло-

дження невеликих проб клітин до низької температури. При перевищенні цієї швидкості частина клітин після віддавання руйнується. Деякі дослідники вважають, що клітини руйнуються у результаті утворення внутрішньоклітинних кристалів при перевищенні критичної швидкості охолодження. На думку інших, структурні зміни й ушкодження клітин відбуваються при дуже швидкому охолодженні до температури нижче ніж 0°C . Біомасу клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* окремо у 10 мл стерильного ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду у чашці Петрі піддавали екстракції з п'ятиразовим циклом заморожування до температури $-25\pm 2^\circ\text{C}$ і розморожування до температури $25\pm 2^\circ\text{C}$ [11,12].

Після завершення всіх процесів руйнування для відокремлення незруйнованих клітин і клітинних стінок проводили центрифугування при швидкості обертання 3000 об/хв протягом 10 хв, потім здійснили попереднє фільтрування на мембранних фільтрах із діаметром пор 0,8 мкм та стерилізуюче фільтрування на мембранних фільтрах із діаметром пор 0,22 мкм. У кожному випадку визначали вміст полісахаридів і білка.

Білок визначали згідно з Державною фармакопеею України (ДФУ). Методика визначення полісахаридів: реакція з фенолом і сірчаною кислотою, групова реакція на полісахариди, моно-, оліго- і полісахариди з розчином фенолу. Реакція перебігає з утворенням забарвлених у червоно-коричневий колір сполук. 1,0 мл розчину полісахаридів переносили у пробірку та додавали послідовно 1,0 мл 5,0 % розчину фенолу та 5,0 мл концентрованої сірчаної кислоти. Реакційний розчин розігрівали, через кілька секунд з'являлось червоно-коричнє забарвлення. За наявності манози та глюкози максимум кривої поглинання світла лежить у ділянці 490 нм. Хроматографічно моносахариди досліджували за методом паперової хроматографії згідно з ДФУ.

Для підрахунку результатів використовували статистичні методи, що призначені для медико-біологічних досліджень, а також Excel.

Результати та їх обговорення

В екстракті, який отримали при дії ультразвуку на клітини грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis*, виявили найбільшу кількість речовин, що досліджували. Екстракти є сумішшю білків і полісахаридів. Імовірно, що саме цей метод забезпечує виділення чинних речовин з усіх шарів клітин грибів *Candida*. У таблиці 1 наведено кількісний склад екстрактів грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis*.

Екстракти, що отримали під час розтирання у ступці та при заморожуванні-розморожуванні біомаси клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis*, містили меншу кількість полісахаридів і білків.

Клітинні полісахариди грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* представлені декількома моносахаридами. Якісне визначення та кількісне порівняння моносахаридів проводили за інтенсивністю забарвлення плям під час паперової хроматографії.

Склад екстрактів гриба *Candida albicans* та *Candida tropicalis*

Екстракти	Час, хв	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida tropicalis</i>	
		Білки, мг/мл	Полісахариди, мг/мл	Білки, мг/мл	Полісахариди, мг/мл
1*	15	0,33±0,07*	1,14±0,34*	0,31±0,06*	1,12±0,28*
2	15	0,24±0,05	1,02±0,30	0,23±0,04	1,01±0,23
3	15	0,17±0,03	0,85±0,25	0,15±0,03	0,81±0,19

Примітки: 1 – екстракт, який отримали при дії ультразвуку, 2 – екстракт, який отримали розтиранням, 3 – екстракт, який отримали при заморожуванні-розморожуванні; n = 6, P < 0,5; * – статистичними розрахунками доведено вірогідність переваги кількісного вмісту речовин, що діють, у першому екстракті, що свідчить про перспективність руйнування клітин шляхом ультразвукової обробки.

Полісахариди екстракту, який отримали при дії ультразвуку на клітини грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis*, представлені манозою, глюкозою та двома неідентифікованими моносахарами. Полісахариди екстрактів, які отримали методом розтирання та заморожування-розморожування клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis*, представлені таким самим спектром моносахаридів, але плями були менш насиченими, що свідчить про меншу кількість моносахаридів у цих екстрактах.

У результаті досліджень визначили, що всі запропоновані методи дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* забезпечують вивільнення білків і полісахаридів, які мають однаковий моносахаридний склад. Але найбільшу кількість білків і полісахаридів отримали при використанні ультразвуку.

Для обґрунтування оптимального методу дезінтеграції, крім порівняння виходу діючих речовин, у кожному випадку необхідно проаналізувати технологічні аспекти кожного методу. Метод дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* шляхом розтирання характеризується важкістю та тривалістю виконання. Крім того, цей метод є морально застарілим для сучасного виробництва ліків, а для здійснення дезінтеграції у сучасних умовах шляхом розтирання потрібне дороге обладнання. Але оскільки при розтиранні і з використанням ступки та товчача, і сучасного обладнання використовується принцип дії дезінтеграції, який забезпечить аналогічний вихід діючих речовин, лише у випадку автоматизації виробництва це відбуватиметься швидше.

Щодо методу дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* шляхом заморожування-розморожування можна зробити висновок, що він також не є раціональним, оскільки тривалий у виконанні, потребує значних маніпуляцій і спеціального обладнання для здійснення у промислових умовах.

Метод дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* під час дії ультразвуку характеризується високою швидкістю та автоматизацією перебігу процесу. До основних позитивних особливостей ультразвукового дезінтегруючого впливу на мікробні

клітини належать зручність і відносна легкість організації. Енергонапруженість і продуктивність процесу можуть варіюватись у доволі широких межах, а прилади та установки можуть бути розраховані на створення ультразвукових полів практично будь-яких необхідних конфігурацій, розмірів, у широкому діапазоні об'ємів, із прийнятними частотами й амплітудами коливань, із найрізноманітнішими складами рідкого і газорідного робочого середовища тощо. Для процесу дезінтеграції потрібний лише ультразвуковий апарат, вартість якого значно менша, ніж ціна обладнання для попередніх методів дезінтеграції.

На основі аналізу технологічних аспектів досліджуваних методів дезінтеграції і виходу діючих речовин, зокрема білків і полісахаридів, можна зробити висновок: оптимальним методом дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* є ультразвукова обробка, оскільки цей метод відповідає сучасним вимогам виробництва.

Висновки

1. Експериментально обґрунтували оптимальний метод дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis* шляхом обробки ультразвуком.

2. Найбільшу кількість білків і полісахаридів отримали при використанні ультразвукового методу дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis*.

3. Шляхом статистичного опрацювання даних довели вірогідність переваги кількісного вмісту діючих речовин у екстракті, що отримали шляхом ультразвукової обробки.

4. Моносахаридний склад полісахаридів, які отримали усіма досліджуваними методами, представлений глюкозою, манозою та неідентифікованими моносахаридами, однак найбільшу кількість моносахаридів виявили в полісахаридах, що отримали за допомогою ультразвуку.

5. Доведено раціональність використання ультразвуку для дезінтеграції клітин грибів *Candida albicans* і *Candida tropicalis*.

6. Надалі планується перевірити отримані полісахариди та білки на імуногенні та терапевтичні властивості при кандидамікозах.

Список літератури

- Leibund Gut-Landman S. Immunity to fungi / S. Leibund Gut-Landman, M. Wutrich, T. Hohl // *Curr. Opin. Immunol.* – 2012. – № 24. – P. 1–10.
- Kabir M.A. *Candida* infections and their prevention / M.A. Kabir, Z. Ahmad // *ISRN Preventive Medicine.* – 2013. – P. 1–13.
- 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.
- Пат. 2445109 Российская Федерация, МПК А 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 / А.М. Литвинов, Н.А. Апанасенко (РФ). – 2010127796/10; заяв. 07.07.2010; опубл. 20.03.2012.
5. Candida albicans vaccines / [A. Grover, B.S. Bhandari, N. Rai, P.C. Lakhera] // *Biotechnology International*. – 2010. – Vol. 3. – № 1. – P. 4–17.
 6. Cassone A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer / A. Cassone // *Nature Reviews Microbiology*. – 2013. – Vol. 11. – P. 884–891.
 7. 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.
 8. Жукова Н.В. Современные вакцины: характеристика и классификация / Н.В. Жукова, И.М. Кривошеева // *Крымский терапевтический журнал*. – 2013. – № 2. – С. 99–104.
 9. Петров Р.В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов. – М.: ГЭОСТАР-Медицина, 2011. – 608 с.
 10. Nabel G.J. Designing Tomorrow's Vaccines / G.J. Nabel // *N Engl J Med.* – 2013. – Vol. 6. – № 368. – P. 551–560.
 11. Методы выделения и очистки продуктов биотехнологических производств / [В.К. Османов, О.В. Бирюкова, А.В. Борисов и др.]. – Н. Новгород: Нижегородской государственной медицинской академии, 2005. – 27 с.
 12. Шапхаев Э.Г. Основы биотехнологии. Дезинтеграция клеток в биотехнологии / Э.Г. Шапхаев, В.Ж. Цыренов, Е.И. Чебунина. – Улан-Удэ.: ВСГТУ, 2005. – 94 с.
- References**
1. Leibund Gut-Landman, S., Wutrich, M., & Hohl, T. (2012) Immunity to fungi. *Curr. Opin. Immunol.*, 24, 1–10.
 2. Kabir, M. A., & Ahmad, Z. (2013). *Candida* Infections and Their Prevention. *ISRN Preventive Medicine*, 2013, 1–13.
 3. Kapustina, O. A., Logacheva, L. Y., Kartashova, O. L. (2009) Vydovoj sostav i biologicheskie svoystva gribov roda *Candida*, vydelenykh iz raznykh biotopov tela cheloveka [Species Structure and Biological Characteristics of *Candida* Fungi Isolated from Different Biotopes of the Human Body]. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2(24), 179–181 [in Russian].
 4. Lytvynov, A. M., & Apanasenko, N. A. *Assotsyrovannaya vaksyna protyv kozhnoho kandidoza plotoiydnykh, sposob yzgotovleniy assotsyrovanoi vaksyny protyv kozhnoho kandidoza plotoiydnykh, sposob profylaktyky i terapyi kozhnoho kandidoza plotoiydnykh, sposob prevention and treatment of cutaneous candidiasis carnivores, a method of manufacturing associated vaccine against cutaneous candidiasis carnivorous method of prevention and treatment of cutaneous candidiasis carnivores*. Pat. 2445109 Rosyiskaia Federatsiya, MPK⁷ A 61 K 36/062, A 61 K 47/02,С 12 N 1/14. 2010127796/10; zaizv. 07.07.2010; opubl. 07.07.2010 [in Russian].
 5. Grover, A., Bhandari, B. S., Rai, N., & Lakhera, P. C. (2010) *Candida albicans* vaccines. *Biotechnology International*, 3(1), 4–17.
 6. Cassone, A. (2013) Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 884–891. doi: 10.1038/nrmicro3156.
 7. Han, Y., & Rhew, K. Y. (2012) Comparison of two *Candida* mannan vaccines: the role of complement in protection against disseminated candidiasis. *Arch. Pharm. Res.*, (35), 2021–2027. doi: 10.1007/s12272-012-1120-9.
 8. Zhukova, N. V., & Kryvosheeva, I. M. (2013) *Sovremennye vakcyny: kharakteristika i klassifikaciya* [Modern vaccines: characterization and classification]. *Krymskiy terapevtichnyi zhurnal*, 2, 99–104. [in Ukrainian].
 9. Petrov, R. V., Khaitov, R. M. (2011) *Immunogeny i vakcyny novogo pokoleniya* [Immunogens and new generation vaccine]. Moscow: GEOSTAP-Medytsyna [in Russian].
 10. Nabel, G. J. (2013) Designing Tomorrow's Vaccines. *J Med.*, 6(368), 551–560. doi: 10.1056/NEJMra1204186.
 11. Osmanov, V. K., Biryukova, O. V., Borisov, A. V., Borisova, G. N. & Maculevich, Zh. V. (2005) *Metody vydeleniya i ochistki produktov biotekhnologicheskikh proizvodstv* [Methods of isolation and purification of the products of biotechnological industry]. Nizhnyj Novgorod: Nizhegorodskaya gosudarstvennaya medicinskaya akademiya [in Russian].
 12. Shaphaev, Je. G., Cyrenov, V. Zh., Chebunina, E. I. (2005) *Osnovy biotehnologii. Dezintegraciya kletok v biotehnologii* [Fundamentals of Biotechnology. Disintegration of cells in biotechnology]. Ulan-Ude: Izd-vo VSGTU [in Russian].

Відомості про автора:

Рибалкін М.В., к. фарм. н., асистент каф. біотехнології, Національний фармацевтичний університет,
E-mail: Ribalkin.Nikolay@mail.ru.

Надійшла в редакцію 19.05.2014 р.