

Розробка складу розчину алергену на основі гриба *Candida albicans* для виявлення кандидозної інфекції

М.В.Рибалкін, Н.І.Філімонова, Д.А.Спиридонов, Н.В.Дубініна

Національний фармацевтичний університет, кафедра мікробіології, вірусології та імунології
Харків, Україна

В статті обґрунтовано оптимальну лікарську форму алергену гриба *Candida albicans*. При розробці складу розчину алергену проведені дослідження з вивчення впливу на його активність допоміжних речовин: розчинників, консервантів та детергентів. Визначено склад нового алергену грибів *Candida albicans* для виявлення кандидамікозів.

Ключові слова: алерген, лікарська форма, склад, кандидамікоз.

ВСТУП

Досвід створення та використання алергенів у світовій практиці почався з моменту відкриття феномену Коха. Але, не дивлячись на це, наукові дослідження зі створення та вдосконалення імунологічних препаратів для алергодіагностики у вітчизняній та світовій практиці майже не відбуваються, при тому що алергени являються важливою складовою частиною комплексної діагностики [6]. Сьогодні в Україні не випускається жодного алергодіагностичного тесту для виявлення пацієнтів зі скритою формою кандидамікозу, які потребують протигрибкової терапії.

Тому розробка алергену для імунодіагностики кандидозної інфекції є нагальним питанням вітчизняної фармацевтичної технології ліків та біотехнології. Необхідно відзначити, що пошук специфічно активних речовин, обрання допоміжних речовин та розробка технології виробництва — ось головні напрямки у створенні та розширенні номенклатури вітчизняних алергодіагностичних препаратів. Важ-

ливе значення має вибір оптимального виду та складу лікарської форми для гарантування безпечності, високої терапевтичної ефективності [3]. А основна задача біофармації в технології ліків — максимальне підвищення терапевтичної ефективності діючих речовин та максимальне зниження можливої побічної дії [7].

З урахуванням вищевикладених технологічних вимог на кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету була одержана субстанція алергену гриба *Candida albicans* [4, 5]. Алерген гриба *Candida albicans* можливо випускати в заводських умовах як у ліофільній формі, так і у формі розчину. Ліофільна форма найдовше зберігає активність алергену [6], але вона має багато недоліків [9]. Необхідно зазначити, що кількість діючих речовин алергену дуже незначна — 5 мкг/мл, і в такому випадку в процесі ліофільної сушки необхідно вводити додаткові наповнювачі, які можуть значно впливати на імунну реакцію організму пацієнтів та хибити результати алерготесту [6, 8]. Ліофільний алерген легко розчиняється у воді та сольових розчинах, але частина алергену випадає в осад. Незалежно від концентрації діючих речовин алергену та тривалості зберігання кількість осаду складає приблизно 10%, незалежно від препарату, що також є недоліком ліофільної форми [6].

Враховуючи вищезазначені недоліки ліофільного препарату алергену, було вирішено розробити алерген гриба *Candida albicans* у формі розчину, який не має подібних недоліків та значно простіший при застосуванні споживачами, що надає цій лікарській формі певні переваги.

Метою дослідження було експериментальне обґрунтування складу алергену гриба *Candida albicans* у формі розчину для імунодіагностики кандидозної інфекції.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом досліджень були зразки субстанції алергену гриба *Candida albicans*, яку отримали за наступною схемою. Культуру гриба *Candida albicans* штаму ССМ 885-653 висівали в пробірки з агаром Сабуро та культивували в термостаті при температурі 28-30°C протягом 48 год. Отриману культуру змивали ізотонічним 0,9% розчином натрію хлориду та висівали в матриці з агаром Сабуро. Далі проводили культивування в термостаті при температурі 28-30°C протягом 12 діб. Одержану культуру змивали ізотонічним 0,9% розчином натрію хлориду. Клітини гриба відділяли від розчину натрію хлориду, центрифугуванням протягом 30 хв. при 5000 об./хв. Осад висушували в термостаті при температурі 50-60°C та подрібнювали у ступці. Подрібнену суху біомасу грибів відважували та проводили екстракцію 5% водним розчином гідроксиду натрію у співвідношенні 1:10 при температурі 28-30°C в поєднанні з ультразвуковою дезінтеграцією при частоті 20-24 кГц та інтенсивності 5-8 Вт/см² протягом 15 хв. Отриманий екстракт обробляли 0,25 М розчином соляної кислоти, поступово доводячи середовище до значення рН 7,2±0,2. Проводили стерилізуючу фільтрацію через мембранні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм та 0,22 мкм. Для очищення отриманого алергенного екстракту, дослідження фракційного складу та молекулярної маси його фракцій використовували широковідомий у біохімії метод гель-фільтраційної хроматографії на колонках з Сефадексом G-100 згідно з ДФУ.

З метою обґрунтування допоміжних речовин для тривалого збереження імунологічної активності алергену гриба *Candida albicans* з концентрацією діючих речовин 5 мкг/мл були проведені дослідження з впливу допоміжних речовин на активність алергену.

Нами був вивчений вплив на активність алергену гриба *Candida albicans* досліджуваних розчинників: 50% розчину гліцерину з рН 7,2, ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду з рН

ТАБЛИЦЯ 1
Вплив досліджуваних розчинників
на активність алергену гриба *Candida albicans*

Розчинники	Активність алергену, %
50% розчин гліцерину	++++
Ізотонічний 0,9% розчин натрію хлориду	++++
Фосфатний буферний розчин	++++

7,2 та фосфатного буферного розчину з рН 7,2. Були отримані експериментальні зразки, що склалися з алергену та розчинників, що вивчалися. Після отримання зразків була вивчена їх активність шляхом постановки шкірних проб на тваринах [6, 8].

На стадії розробки лікарської форми треба довести, що антимікробна активність самого лікарського засобу або при необхідності лікарського засобу з додаванням відповідного консерванта забезпечує належний захист від небажаних ефектів, які можуть бути результатом мікробного забруднення лікарського засобу або розмноження в ньому мікроорганізмів у процесі зберігання й використання [3, 6].

Нами були досліджені наступні консерванти: метилпарагідроксибензоат (ніпагін), пропілпарагідроксибензоат (ніпазол), фенол, кислота сорбінова, кислота бензойна, спирт бензиловий. При виборі консерванта враховували вимоги, які ставляться до цієї групи речовин: активність відносно широкого спектра мікроорганізмів, повільне формування резистентних варіантів мікроорганізмів, прояв антимікробних властивостей у широкому діапазоні рН, відсутність специфічного запаху, кольору та смаку, сумісність з основними компонентами лікарської форми, безпечність.

Дані наукової літератури свідчать, що багато консервантів є агресивними речовинами по відношенню до біологічних об'єктів [3, 7], тому перед їх використанням необхідно перевірити вплив консервантів на активність алергену. Для виявлення впливу консерванта на активність алергену *Candida albicans* нами були отримані

ТАБЛИЦЯ 2
Вплив досліджуваних консервантів
на активність алергену гриба *Candida albicans*

Назва консерванту	Вміст консерванту, %	Розчинну алергену, %	Активність алергену, %
Ніпагін	0,4	99,6	++++
Ніпазол	0,4	99,6	++++
Фенол	0,4	99,6	++++
Спирт бензиловий	0,01	99,99	+++
Кислота сорбінова	0,6	99,4	+++
Кислота бензойна	0,5	99,5	+++
Розчинну алергену (контроль)	-	100	++++

Примітка: контроль – фосфатний буферний розчин алергену гриба *Candida albicans*.

експериментальні зразки, які склалися з розчину алергену та консервантів, що вивчалися, у максимально допустимій концентрації.

Обґрунтування концентрації обраних консервантів здійснювали згідно з методикою ДФУ (5.1.3. *Ефективність антимікробних консервантів*). Дослідні зразки інокулювали тест-мікроорганізмами *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *C.albicans*, *A.niger* та проводили дослідження щодо вивчення кількості життєздатних мікроорганізмів протягом 28 діб.

Ефективність консервантів у готовому засобі вважали задовільною, якщо в умовах випробування при зберіганні інокульованих зразків при заданій температурі протягом зазначених проміжків часу спостерігалось значне зменшення. Згідно з вимогами ДФУ, препарати повинні відповідати критеріям А або критеріям В для парантеральних лікарських засобів, якщо це є обґрунтованим.

Враховуючи те, що скло адсорбує на поверхні продукти алергенної природи, а алерген містять невисокі концентрації активного початку, необхідно переконатися, що алерген зберігає свою активність, або забезпечити стабілізацію специфічної активності алергену гриба *Candida albicans* за допомогою детергентів. Згідно з літературни-

ми даними, для стабілізації алергенів використовують пропіленгліколь, твін-80 та гліцерин [6]. Перед використанням цих детергентів ми перевірили їх вплив на активність алергену шляхом постановки шкірних проб. Ефективність детергентів у готовому засобі вважали задовільною, якщо в умовах випробування при зберіганні інокульованих зразків при заданій температурі 3-8°C протягом 24 місяців не спостерігалось значне зменшення активності алергену.

Вивчення активності досліджуваних препаратів проведено з дозволу комісії з біоетики НФаУ в умовах *in vivo* на моделі генералізованого кандидозу. У досліді використовували гвінейських мурчаків середньою вагою 250-350 г по 10 тварин у групі. Перевірку активності алергену гриба *Candida albicans* у поєднанні з допоміжними речовинами здійснювали шляхом одноразового введення алергену в об'ємі 0,1 мл внутрішньошкірно в депільовану ділянку шкіри на боці тварин [6, 8]. Результати проб розраховували в мм еритеми, папули та оцінювали за загальноприйнятою системою: слабо позитивна реакція (+) – почервоніння до 5 мм, позитивна (++) – почервоніння до 10 мм та (+++) – до 20 мм, різкопозитивна (++++) – почервоніння вище 20 мм та папула.

ТАБЛИЦЯ 3

Ефективність антимікробної консервувальної дії ніпазолу та фенолу в концентрації 0,2%, 0,25% у розчинах алергену гриба *Candida albicans*

Тест-мікроорганізми	Консервант/концентрація в розчині, %	Lg зменшення числа життєздатних мікроорганізмів				
		6 год.	24 год.	7 діб	14 діб	28 діб
Експозиція		6 год.	24 год.	7 діб	14 діб	28 діб
Критерій ДФА А/В	Бактерії	2/-	3/1	-/3	-/-	НВ*/НЗ
Критерій ДФА А/В	Гриби	-/-	-/-	2/-	-/1	НЗ
<i>S.aureus</i>	Фенол/0,2%	1,75	2,87	1,38	НВ	НВ
	Ніпазол/0,2%	1,35	1,67	1,33	НВ	НВ
	Фенол/0,25%	2,14	3,52	НВ	НВ	НВ
	Ніпазол/0,25%	1,47	НВ	НВ	НВ	НВ
<i>P.aeruginosa</i>	Фенол/0,2%	1,89	2,55	НВ	НВ	НВ
	Ніпазол/0,2%	1,22	2,32	1,14	НВ	НВ
	Фенол/0,25%	2,45	3,18	НВ	НВ	НВ
	Ніпазол/0,25%	1,78	2,45	НВ	НВ	НВ
<i>C.albicans</i>	Фенол/0,2%	2,43	3,25	НВ	НВ	НВ
	Ніпазол/0,2%	3,43	4,32	3,55	НВ	НВ
	Фенол/0,25%	4,12	5,72	НВ	НВ	НВ
	Ніпазол/0,25%	2,6	1,3	0,5	НВ	НВ
<i>A.niger</i>	Фенол/0,2%	0,37	1,86	2,67	2,08	5,14
	Ніпазол/0,2%	0,82	2,65	3,43	НВ	НВ
	Фенол/0,25%	4,51	НВ	НВ	НВ	НВ
	Ніпазол/0,25%	0,52	4,12	НВ	НВ	НВ

Примітка: НВ – життєздатні клітини тест-мікроорганізмів не виявлені; НЗ – число життєздатних клітин не повинно збільшуватись.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для виявлення впливу розчинників на активність алергену гриба *Candida albicans* нами були отримані експериментальні зразки, які склалися з алергену гриба та розчинників, що вивчалися. Після отримання зразків була вивчена їх активність шляхом постановки шкірних проб на тваринах (табл. 1).

При шкірному тестуванні ізотонічного 0,9% розчину натрію хлориду, фосфатного буферного розчину та 50% розчину гліцерину активність алергену зберігалась. Необхідно зазначити, що фосфатний буферний розчин зберігає постійне значення рН. У зв'язку з цим фосфатно буферний розчин було обрано для подальших досліджень.

Для виявлення впливу консервантів на активність алергену гриба *Candida albicans* нами були отримані експериментальні зразки, які склалися з розчину алергену та консервантів, що вивчалися, у максимально допустимій концентрації. Після отримання зразків була вивчена їх активність шляхом постановки шкірних проб на тваринах. Склад та активність дослідних зразків наведені в табл. 2.

Результати вивчення активності зразків свідчать, що кислота сорбінова, спирт бензиловий та кислота бензойна знижують активність алергену гриба *Candida albicans*, а ніпазол, ніпагін та фенол зберігають активність алергену. Враховуючи те, що фенол є пірогенною речовиною, для подальших досліджень було обрано ніпазол і ніпагін.

Нами було проведено дослідження ефективності антимікробної консервувальної дії консервантів ніпазолу в концентраціях 0,2%, 0,25% та фенолу у концентраціях 0,2%, 0,25% у розчинах алергену гриба *Candida albicans*. Результати досліджень наведені в табл. 3.

У результаті встановлено, що за ефективністю консервувальної дії критерію А ДФУ

ТАБЛИЦЯ 4

Вплив детергентів на активність алергену гриба *Candida albicans* при постановці шкірних проб

Детергенти	Вміст детергенту, %	Розчину алергену, %	Активність алергену, %
Твін-80	0,0001	99,9999	+++
Гліцерин	10	90,0	++++
Пропіленгліколь	0,1	99,9	+++
Контроль	-	100	++++

Примітка: контроль — фосфатний буферний розчин алергену гриба *Candida albicans*

відповідав консервант фенол в концентрації 0,25%. Фенол у концентрації 0,2% та ніпазол у концентраціях 0,2%, 0,25% не відповідали вимогам ДФУ. Нами як консервант був обраний фенол у концентрації 0,25%.

Для виявлення впливу різних детергентів на активність алергену гриба *Candida albicans* нами були отримані експериментальні зразки, які склалися з розчину алергену та детергентів, що вивчалися: пропіленгліколю, твіну-80 та гліцерину. Після отримання зразків була вивчена їх активність шляхом постановки шкірних проб на тваринах (табл. 4).

При шкірному тестуванні фосфатний буферний розчин алергену гриба *Candida albicans* з гліцерином зберігав активність алергену, а в присутності твіну-80 та пропіленгліколю активність алергену дещо зменшувалася. Це стало підставою для використання гліцерину в подальшому.

Нами були проведені дослідження з вивчення ефективності стабілізаційної дії детергенту гліцерину в концентрації 5%, 10% на фосфатно буферний розчин алергену *Candida albicans* з консервантом фенолу в концентрації 0,25% протягом 24 місяців зберігання. Результати досліджень наведені в табл. 5.

Результати досліджень свідчать, що фосфатно буферний розчин алергену гриба *Candida albicans* з консервантом фенолом у концентрації 0,25% протягом 24 місяців без детергенту зберігає таку ж активність, як і в присутності

ТАБЛИЦЯ 5

Визначення ефективності детергенту гліцерину в концентрації 5% та 10% у розчинах алергену гриба *Candida albicans*

Термін зберігання, місяці	Активність алергену, %		
	Гліцерин 5%	Гліцерин 10%	Контроль
1	++++	++++	++++
3	++++	++++	++++
5	++++	++++	++++
7	++++	++++	++++
9	++++	++++	++++
11	++++	++++	++++
13	++++	++++	++++
15	++++	++++	++++
17	++++	++++	++++
19	++++	++++	++++
21	++++	++++	++++

Примітка: контроль — фосфатний буферний розчин алергену гриба *Candida albicans* з консервантом фенолом у концентрації 0,25%.

детергенту гліцерину в концентрації 5% та 10%. Отже, за результатами досліджень у даному випадку немає необхідності введення детергенту до складу розчину алергену гриба *Candida albicans*.

ВИСНОВКИ

Таким чином, було експериментально обґрунтовано склад розчину алергену на основі біомаси гриба *Candida albicans* для імунодіагностики кандидомікозів. На підставі проведених досліджень був запропонований наступний склад розчину алергену з концентрацією діючих речовин 5 мкг/мл: очищений алерген гриба *Candida albicans*, розчинник — фосфатно-буферний розчин з рН 7,2, консервант — фенол у концентрації 0,25%.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием EXEL / С.Н.Лапач, А.В.Чубенко, П.Н.Бабиц. — К.: МОРИОН, 2000. — 320 с.
2. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М.Кожемякін, О.С.Хромов, М.О.Філоненко, Г.А.Сайфетдінова. — К.: Авіценна, 2002. — 156 с.
3. Промислова технологія ліків / В.І.Чуєшов, М.Ю.Чернов, Л.М.Хохлові [та ін.]. — Підруч. у 2-х т. — Х.: Основа; Видавництво УкрФА, 1999. — Т.2. — 702 с.
4. Фракційне розділення та імунодіагностичні скринінгові дослідження алергенів грибів *Candida* / М.В.Рибалкін, Н.І.Філімонова, О.М.Дика, О.А.Шакун // Український біофармацевтичний журнал. — 2010. — Т.9. — №4. — С. 68-72.
5. Філімонова Н.І. Дослідження алергенних біополімерів, одержаних шляхом поєднання ультразвукової та хімічної обробки біомаси грибів роду *Candida albicans* / Н.І.Філімонова, І.Л.Дикий, М.В.Рибалкін // Запорозький медичний журнал. — 2010. — Т.12. — №3. — С. 123-125.
6. Фрадкин В.А. Диагностические и лечебные аллергены / В.А.Фрадкин. — М.: Медицина, 1990. — 256 с.
7. Crommelin Daan J.A. Crommelin pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications: Third Edition / Daan J.A. Crommelin, Robert D. Sindelar, Bernd Meibohm. — 2007. — 496 p.
8. Dreborg S. Allergen standardization and skin tests. EAACI position paper / S.Dreborg, A.Frew // Allergy. — 1993. — №48. — P. 49-75.
9. Rey L. Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products / L.Rey, J.C.May. — 2004. — 640 p.
10. Chow Shein-Chung. chow statistical design and analysis of stability studies / Shein-Chung Chow. — Chapman & Hall/CRC, 2007. — 330 p.

Н.В.Рыбалкин, Н.И.Филимонова, Д.А.Спиридонов, Н.В.Дубинина. Разработка состава раствора аллергена на основе гриба *Candida albicans* для выявления кандидозной инфекции. Харьков, Украина.

Ключевые слова: аллерген, лекарственная форма, состав, кандидамикоз.

*В статье обоснована лекарственная форма аллергена гриба *Candida albicans*. При разработке состава раствора аллергена исследовано влияние на активность аллергена вспомогательных веществ: растворителей, консервантов и детергентов. Установлен оптимальный состав нового аллергена грибов *Candida albicans* для выявления кандидамикозов.*

N.V.Rybalkin, N.I.Filimonova, D.A.Spiridonov, N.V.Dubinina. Development of allergen solution on basis of fungus *Candida albicans* for diagnostics of the *Candida* infection. Kharkiv, Ukraine.

Key words: allergen, medicinal form, composition, candidiasis.

*The article substantiates the medicinal form of allergen of fungi *Candida albicans*. During development of the composition of allergen solution the influence on allergen activity of auxiliary substances: solvents, preservatives and detergents are investigated. The optimum composition of the new allergen of the fungi *Candida albicans* to identify candidiasis was established.*

Надійшла до редакції 01.10.2010 р.