



М.В. Рибалкін

## ВИЗНАЧЕННЯ СПЕЦИФІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ТА АНОМАЛЬНОЇ ТОКСИЧНОСТІ РОЗЧИНУ АЛЕРГЕНУ ДЛЯ ІМУНОДІАГНОСТИКИ КАНДИДОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

**Ключові слова:** розчин алергену, специфічна активність, аномальна токсичність, кандидозна інфекція.

**Ключевые слова:** раствор аллергена, специфическая активность, аномальная токсичность, кандидозная инфекция.

**Key words:** soluble allergens, specific activity, abnormal toxicity, candida infection.

Проведено біологічні випробування розчину алергену, розробленого на основі біомаси грибів *Candida albicans*. Підтверджено специфічну активність на моделі гомологічного та гетерологічного генералізованого кандидамікозу у мурчаків і встановлено відсутність аномальної токсичності розробленого розчину алергену для імунодіагностики кандидозної інфекції.

Проведены биологические исследования аллергена, разработанного на основе биомассы гриба *Candida albicans*. Подтверждена специфическая активность на модели гомологического и гетерологического генерализованого кандидамикоза у морских свинок и установлено отсутствие аномальной токсичности разработанного раствора аллергена для иммунодиагностики кандидозной инфекции.

Conducted biological research allergen, based on the biomass of the fungus *Candida albicans*. Confirmed by specific activity on the model of homologous and heterologous general candidiasis in guinea pigs and found no abnormal toxicity developed allergen solution for immunodiagnosis of candida infection.

Кількість хворих на кандидоз з кожним роком збільшується, що пов'язано з погіршенням екології, зниженням імунітету та посиленням патогенності грибів. Своєчасне виявлення кандидозної інфекції має важливе значення для пацієнтів з прихованою формою кандидамікозу. Для об'єктивного та достовірного встановлення кандидозної інфекції необхідне комплексне лабораторне дослідження, що включає бактеріологічні, мікологічні, серологічні методи та імунодіагностику з алергенами [4,8,10,13]. Лише в такому випадку можна об'єктивно встановити прихований кандидамікоз. Однак на Україні та на всій території СНГ на сьогодні не випускається жодного алергену грибів кандиди [4,5,9].

На кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Національного фармацевтичного університету розроблено новий розчин алергену для імунодіагностики кандидозної інфекції [1] на основі біомаси гриба *Candida albicans* штаму ССМ 885-653 шляхом поєднання фізико-хімічних факторів: екстрагенту 5,0% розчину гідроксиду натрію з ультразвуком [7], нейтралізований, підданий стерилізуючій фільтрації, очищений методом гель-хроматографії на Сефадексі G-100 [6]. Готовий розчин алергену містить полісахариди та білки гриба *Candida albicans* з концентрацією 5 мкг/мл білка, фосфатний буферний розчин рН 7,2±0,2 та консервант фенол у концентрації 0,2%. Згідно вимогам ДФУ, отриманий розчин алергену повинен відповідати певним показникам якості, мати специфічну активність і витримувати випробування на аномальну токсичність.

### МЕТА РОБОТИ

Біологічні дослідження розчину алергену для імунодіагностики кандидозної інфекції, а саме визначення специфічної активності на моделі гомологічного та гетерологічного генералізованого кандидамікозу у мурчаків та дослідження аномальної токсичності.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Специфічну активність розчину алергену гриба *Candida albicans* досліджували на 10 піддослідних тваринах. Для досліджень були обрані мурчаки, які характеризуються специфічним імунитетом, що дозволяє досліджувати на цих тваринах специфічні імунологічні реакції, такі як постановка шкірних проб при вивченні алергостетів кандидозної інфекції. У досліді використовували гвінейських мурчаків середньою вагою 200–250 г. Перевірку специфічної активності розчину алергену гриба *Candida albicans* здійснювали шляхом його одноразового введення в об'ємі 0,1 мл з концентрацією білка 5 мкг/мл внутрішньошкірно у депільовану ділянку шкіри на боці тварин. Результати проб враховували у мм еритеми та папули, оцінювали за загальноприйнятою системою: слабо позитивна реакція (+) – почервоніння до 5 мм, позитивна (++) – почервоніння до 10 мм та (+++) – до 20 мм; різкопозитивна (++++) – почервоніння більше 20 мм, папула через 15–30 хв та через 24–48 год [8,12].

Спочатку розчин алергену гриба *Candida albicans* вводили групі здорових тварин і визначали результати. Потім у інших тварин викликали гомологічний і гетерологічний генералізований кандидамікоз. За об'ємом доза інфекту, використана для зараження піддослідних тварин становила 1 мл 48-годинних змивів агарових культур гриба *Candida albicans* і гриба *Candida tropicalis*. Перед інфікуванням мікробну завись стандартизували за оптичним стандартом мутності на 10 ОД (враховуючи, що розмір клітин гриба *Candida* приблизно в 10 разів менший за бактеріальні клітини). Попередньо перед зараженням мурчакам перорально вводили кортикостероїдний препарат Дексаметазон у дозі 0,32 мг/кг за 2 прийоми протягом 5 діб, що сприяв генералізації кандидозної інфекції та обтяжував перебіг експериментального кандидамікозу [6].



Після розвитку генералізованого кандидозу тваринам вводили розчин алергену гриба *Candida albicans* в об'ємі 0,1 мл внутрішньошкірно у депільовану ділянку шкіри на боці й визначали результати.

Тест на аномальну токсичність проводили згідно з ДФУ 2.6.9. Аномальну токсичність розчину алергену вивчали на 2 видах тварин: мишах і мурчаках. Перед дослідженнями тварини проходили акліматизацію в умовах експериментальної кімнати [2]. 0,1 мл розчину алергену з концентрацією 5 мкг/мл білка внутрішньоочередово вводили 5 білим мишам масою 17–22 г та 2 мурчакам масою 200–250 г, вирощених на стандартному раціоні. Спостереження за тваринами проводили протягом 7 діб.

Аналіз результатів проводили методами, зазначеними у ДФУ статті 5.3. «Статистичний аналіз результатів біологічних випробувань і кількісних визначень».

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати постановки внутрішньошкірних проб в групі здорових тварин наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

#### Постановка шкірних проб з розчином алергену

Тварини	Інтенсивність реакції у мм діаметр еритеми через 24–72 години після введення розчину алергену «Кандидасін»			
	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida tropicalis</i>	
	Здорові	Заражені	Здорові	Заражені
1	3,1	20,2; 11,4 п	3,3	10,2
2	3,2	19,1; 7,5 п	3,1	17,1
3	2,4	20,2; 8,6 п	2,6	15,2
4	4,3	22,3; 11,2 п	2,3	9,3
5	3,7	18,5; 6,1 п	2,7	18,5; 6,1 п
6	3,2	20,2; 10 п	4,2	4,2
7	2,5	20,8; 9,4 п	2,3	6,8
8	4,2	19,6; 8,2 п	3,1	19,4; 7,3 п
9	3,6	21,4; 9,3 п	2,5	12,4
10	3,1	19,1; 7,3 п	4,2	9,1

Примітка: п – папула.

При внутрішньошкірному введенні алергену гриба *Candida albicans* у здорових тварин результати були негативні, а у заражених кандидозним інфектом тварин при розвитку гомологічного генералізованого кандидозу при внутрішньошкірному введенні алергену результати ставили позитивними: значне подразнення шкіри з розміром еритеми 18–22 мм та папули 5–10 мм, що з'являлись через 24 год і зберігались протягом 24–48 год. Згідно отриманих результатів, розчин алергену виявляє специфічну активність.

Профіль антигену розчину алергену для імунодіагностики кандидозної інфекції визначали на мурчаках згідно вимогам ДФУ: за якісним показником (поява еритеми та папули) та кількісним (розміри еритеми 18–22 мм та папули 5–10 мм), згідно попередньо отриманих результатів.

При постановці шкірних проб на моделі гетерологічного генералізованого кандидозу у мурчаків через 24–48 год зафіксовано позитивний результат у 20% тварин: еритеми 18–22 мм та папули 5–10 мм, що зберігались протягом 24–48 годин.

Результати аномальної токсичності показали, що після одноразового внутрішньоочередового введення тваринам алергену у дозі 5 мкг/мл протягом 7 діб ознак інтоксикації не виявлено (табл. 2).

Таблиця 2

#### Дослідження аномальної токсичності розчину алергену

Концентрація білка, мкг/кг	Загибель тварин/кількість тварин	
	Миші	Мурчаки
5	0/5	0/2

Тварини були охайними, активними, мали задовільний апетит, реагували на звукові й світлові подразники, процеси сечовиділення й дефекації були в нормі, порушення дихання й судоми не спостерігались. Рефлекторна збудливість у тварин була в нормі. Шкіра тварин також була у нормі. Усі тварини до кінця експерименту залишались активними. Загибелі тварин не було.

Для оцінки токсичного впливу розчину алергену для імунодіагностики кандидозної інфекції на організм тварин проводили дослідження динаміки їх маси тіла. Отримані результати порівнювали з динамікою маси тіла інтактної групи, тварини якої не отримували досліджуваній алерген і були аналогічного віку (табл. 3).

Таблиця 3

#### Динаміка маси тіла тварин при вивченні аномальної токсичності розчину алергену

Вид та стать тварини	Групи тварин	Динаміка маси тіла, г		
		Вихідні дані	3 доби	7 діб
Миші (самиці)	Дослідна група	22,41±0,52	22,78±0,48	24,53±1,14
	Інтактний контроль	21,38±0,51	22,42±0,67	23,98±0,85
Мурчаки (самиці)	Дослідна група	238,63±7,73	239,27±8,12	241,35±9,23
	Інтактний контроль	236,43±7,54	237,32±8,47	240,28±9,71

Примітка: миші n=5, мурчаки n=2.

Дослідження маси тіла в динаміці показало, що в групах тварин після внутрішньоочередового введення розчину алергену для імунодіагностики кандидозної інфекції протягом терміну спостереження відбувається незначне коливання маси тіла. Проте ці показники не мають статистично значущих відмінностей від групи тварин інтактного контролю.

Згідно даних спеціальної літератури, полісахариди *Candida albicans* дійсно нетоксичні, тоді як білки мають дещо більшу токсичність. Вірогідно, отримані результати можна пояснити детоксуючою дією ультразвуку, про яку відомо за результатами інших досліджень [3,8,11,14].

**ВИСНОВКИ**

Отже, досліджуваний розчин алергену гриба *Candida albicans* для імунодіагностики кандидозної інфекції виявляє специфічну активність в експериментах на моделі гомологічного та гетерологічного генералізованого кандидамікозу у мурчаків та не виявляє аномальну токсичність.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Біотехнологічне обґрунтування актуальності розробки нового імунодіагностичного препарату на основі біомаси гриба *Candida albicans* / М.В. Рибалкін, Н.І. Філімонова, Н.Ю. Шевельова, Д.В. Гаман // Український біофармацевтичний журнал. – 2010. – Т. 11, №6. – С. 75–82.
2. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів / В.М. Коваленко, О.В. Стефанов, Ю.М. Максимов, І.М. Трахтенберг // Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рек. / За ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова – К.: Авіцена, 2001. – С. 74–97.
3. Исаенко Е.Ю. Применение ультразвука для дезинтеграции микробных клеток / Е.Ю. Исаенко // Annals of Mechnicov Institute. – 2008. – №1. – С. 5–9.
4. Новые диагностические и лечебные аллергены / В.М. Бержец, Е.А. Коренева, О.В. Радикова и др. // Аллергология и иммунология. – 2007. – Т. 8, №1. – С. 56–56.
5. Пухлик Б.М. Аллергены Украины. Состояние дел, нерешенные проблемы и перспективы / Б.М. Пухлик, В.Б. Русанова // Иммунология та алергологія. – 1999. – №3. – С. 3–9.
6. Фракційне розділення та імунодіагностичні скринінгові дослідження алергенів грибів *Candida* / М.В. Рибалкін, Н.І. Філімонова, І.Л. Дикий, О.А. Шакурн // Український біофармацевтичний журнал – 2010. – Т. 9, №4. – С. 68–72.
7. 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 // Запоріжський медичний журнал. – 2010. – Т. 12, №3. – С. 123–125.
8. Фрадкин В.А. Диагностические и лечебные аллергены / В.А. Фрадкин – М.: Медицина, 1990. – 256 с.
9. Царев С.В. Аллергены грибов / С.В. Царев, М.П. Хаитов // Доктор. Ру. – 2009. – №2. – С. 57–68.
10. Brunet J.L. Diagnosis of normal and abnormal delayed hypersensitivity to *Candida albicans*. Importance of evaluating lymphocyte activation by flow cytometry / J.L. Brunet, D. Peyramond, G.J. Cozon // Allerg. Immunol. – 2001. – Vol. 33, №3. – P. 115–119.
11. Daan J.A. Crommelin Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications, Third Edition / J.A. Daan Crommelin, R.D. Sindelar, M. Bernd – L.: Informa Healthcare Edition: 3rd Edition, 2007. – 496 p.
12. Dreborg S. Allergen standardization and skin tests. EAACI position paper / Dreborg S., Frew A. // Allergy. – 1993. – №48. – P. 49–75.
13. Immunodiagnosis of *Candida*-infections. I. Sensitivity of the antigens / A. Tomíková, J.V. Zavázal, L. Masler, D. Nováková // Mycopathologia. – 2004. – Vol. 71, №2. – P. 103–111.
14. Lehrbuch der pharmazeutischen Technologie: mit einer Einführung in die Biopharmazie / Kurth. Bauer. – 7., Aufl. – Stuttgart: Wiss. Verl. – Ges., 2002 – 496 s.

**Відомості про автора:**

Рибалкін М.В., аспірант каф. мікробіології, вірусології та імунології НФаУ.

**Адреса для листування:**

Рибалкін Микола Вікторович. 61032, м. Харків, пр. Московський, д. 296, кв. 20.

Т.: (057) 779 11 11, (099) 794 13 43.

E-mail: Ribalkin.Nikolay@mail.ru