

УДК 616.992.282:616-097:615.371

**БІОФАРМАЦЕВТИЧНЕ ОБГРУНТУВАННЯ  
РОЗЧИННИКА У СКЛАДІ  
ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ  
ПОПЕРЕДЖЕННЯ ТА ЛІКУВАННЯ  
КАНДИДАМІКОЗІВ**

**Рибалкін М. В., Стрілець О. П., Стрельников Л. С.,  
Калюжна О. С.**

**Національний фармацевтичний університет**

У даній статті були дослідженні різні розчинники (вода для ін'єкцій, ізотонічний 0,9 % розчин натрію хлориду, фосфатний буферний розчин) у складі імунобіологічного препарату для попередження та лікування кандидозної інфекції. В результаті досліджень встановлено, що усі розчинники забезпечують протективний та терапевтичний ефект, однак лише фосфатно-буферний розчин забезпечує постійне значення рН середовища. Тому саме цей розчинник було обрано для введення до складу запропонованого імунобіологічного препарату.

**Ключові слова:** кандидамікоз; антиген; вакцина; імунітет; розчинник

Сьогодні все більше значення набувають захворювання, які викликаються умовно патогенними мікроорганізмами. Це явище пов'язано із зростанням сили впливу оточуючого середовища: хімічні забруднення, радіація, нераціональне використання антибіотиків та гормональної терапії, що призводить до зниження імунної відповіді та неспецифічної резистентності людини. Одним з показників збільшення за останні роки неспроможності імунного захисту організму людини є хронічні та локальні кандидози, які викликають умовнопатогенні гриби роду Кандіда [1].

Розповсюдженість та небезпека кандидозних інфекцій обумовлює необхідність пошуку нових препаратів, які володіють високою ефективністю та безпекою для людини. У багатьох країнах світу активно ведуться розробки вакцини для профілактики та лікування кандидозної інфекції [2-4]. Необхідно зазначити, що в Україні на сьогодні не випускається та не зареєстровано жодної вакцини проти кандидозу. Тому розробка подібної вакцини є актуальним питанням сучасної медицини та фармації.

У попередніх дослідженнях було з'ясовано, що імунобіологічний препарат на основі антигенів грибів *C. albicans* з концентрацією білка 3 мг/мл та *C. tropicalis* з концентрацією білка 5 мг/мл у співвідношенні 1:1 проявляє протективний та терапевтичний ефект. На даному етапі досліджень необхідно обгрунтувати розчинник у складі імунобіологічного препарату [5, 6].

Для дослідження було обрано наступні розчинники: вода для ін'єкцій з рН  $7,2 \pm 0,2$ , яка добре переноситься при введенні в організм, ізотонічний 0,9 % розчин натрію хлориду з рН  $7,2 \pm$

$0,2$ , який не викликає подразнення при введенні в організм та широко використовується в медичній практиці, та фосфатний буферний розчин з рН  $7,2 \pm 0,2$ , який не викликає подразнення при введенні в організм та забезпечує стабільне значення рН протягом тривалого часу зберігання [7-9]. За даними літератури для виробництва вакцин рекомендується використовувати фосфатний буферний розчин, який на відміну від інших буферних розчинів найкраще переноситься організмом та не впливає на активність антигенів [3, 5, 9].

**Метою даної роботи** є експериментальне обгрунтування розчинника у складі імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*.

**Матеріали та методи**

Для виявлення впливу розчинників на активність імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *C. albicans* штам ССМ 335-867 та *C. tropicalis* штам АТТС 20336 з музею харківського науково-дослідного інституту мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова нами були отримані експериментальні зразки, які складались з антигенів та розчинників, що досліджувались. Після отримання зразків була вивчена їх активність на здорових білих мишах двохмісячного віку масою 18 - 22 г по 6 тварин у контрольній та дослідній групах, які утримувались в однакових умовах на стандартному раціоні. Перед дослідженнями тварини проходили акліматизацію в умовах експериментальної кімнати. Мишам внутрішньом'язово у верхню частину задньої правої лапи вводили 0,2 мл імунобіологічного препарату з досліджуваними розчинниками. Через 14 днів, повторно, в верхню частину задньої лівої лапи вводили 0,2 мл досліджуваного препарату. Тваринам у контрольній групі вводили ізотонічний 0,9 % розчин натрію хлориду з рН  $7,2 \pm 0,2$ . Після введення досліджуваного препарату через 1 місяць для однієї групи піддослідних тварин та через 3 місяці для другої групи піддослідних тварин проводили внутрішньочеревне зараження тварин. Для цього використовували суспензію грибів *C. albicans* штам ССМ 335-867 у кількості 20 млн. клітин та *C. tropicalis* штам АТТС 20336 у кількості 60 млн. клітин в об'ємі 1 мл, які вводили з інтервалом 1 година. Після чого через 14 діб проводили огляд тварин та визначали результати.

Результати проб урахували за кількістю різних проявів хвороби та оцінювали за наступною системою, яка була розроблена авторами систематизації наукової літератури та експериментальних даних:

здорові тварини (–) – відсутність проявів захворювання;

слабка форма захворювання (+) – неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, порушення функції вивідних органів;

середня форма захворювання (++) – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, контрактури шийних м'язів, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, ознаки патологічних процесів виявленні при

дослідженні слизових оболонок природних отворів були виявлені, висівання грибів з фекалій тварин;

розвинута форма захворювання (+ + +) – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, зниження маси тіла, контрактури шийних м'язів, параліч кінцівок, судоми, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, ознаки патологічних процесів виявленні під час розтину при дослідженні слизових оболонок природних отворів, внутрішніх органів тварин: мікроабсцеси у корковому шарі нирок, у легенях, селезінці, печені та інших, виділення ретрокультур грибів з органів тварин.

Терапевтичний ефект імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з різними розчинниками досліджували на здорових білих мишах двохмісячного віку масою 18 - 22 г по 6 тварин у контрольній та дослідній групах, які утримувалися в однакових умовах на стандартному раціоні. Перед дослідженнями тварини проходили акліматизацію в умовах експериментальної кімнати. Тварин інфікували внутрішньочеревно суспензією грибів *C. albicans* штам ССМ 335-867 у кількості 20 млн. клітин та *C. tropicalis* штам АТТС

20336 у кількості 60 млн. клітин в об'ємі 1 мл. Через 5 днів мишам внутрішньом'язово у верхню частину задньої правої лапи вводили 0,2 мл імунобіологічного препарату з досліджуваними розчинниками. Через 14 днів, повторно, в верхню частину задньої лівої лапи вводили 0,2 мл досліджуваного препарату. Тваринам у контрольній групі вводили ізотонічний 0,9 % розчин натрію хлориду з рН 7,2 ± 0,2. Після чого через 14 днів проводили огляд тварин та визначали результати. Результати урахували за тією ж схемою, що і при попередніх дослідженнях.

### Результати та обговорення

В результаті проведених досліджень встановлено, що імунобіологічний препарат на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з усіма досліджуваними розчинниками через 1 та 3 місяці захищав від зараження 100 % тварин. Статистично значущих відмінностей в ефективності імунобіологічного препарату з різними розчинниками не було виявлено (табл. 1).

**Таблиця 1.- Протективна дія імунобіологічного препарату з розчинниками**

Препарат	Дослідні тварини					
	1	2	3	4	5	6
Результати через 1 місяць						
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
Контроль	+++	++	+++	++	++	+++
Результати через 3 місяці						
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
Контроль	++	+++	+++	++	+++	++

Примітка. а) 1 – імунобіологічний препарат з водою для ін'єкцій; 2 - імунобіологічний препарат з ізотонічним 0,9 % розчином натрію хлориду; 3 - імунобіологічний препарат з фосфатно-буферним розчином; б) «-» - відсутність хвороби, «+» - слабка форма хвороби, «++» - середня форма хвороби, «+++» - сильна форма хвороби.

Терапевтичний ефект імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з усіма розчинниками становив 100 %. Терапевтичний ефект починав проявлятися через 8 -

14 днів після першого введення вакцини, а через 8 - 14 днів після повторного введення вакцини наступало повне одужання тварин (табл. 2).

**Таблиця 2. Терапевтичної дія імунобіологічного препарату з досліджуваними розчинниками**

Тварини	Препарат							
	1		2		3		4	
	Результат							
	після зараження	після другої ін'єкції	після зараження	після другої ін'єкції	після зараження	після другої ін'єкції	після зараження	після другої ін'єкції
1	++	-	+	-	+	-	+	++
2	+	-	++	-	++	-	++	+++
3	++	-	++	-	+	-	+	+++

4	+	-	++	-	++	-	++	++
5	++	-	+	-	+	-	+	+++
6	++	-	++	-	++	-	++	+++

Примітка. а) 1 – імунобіологічний препарат з водою для ін'єкцій; 2 – імунобіологічний препарат з ізотонічним 0,9 % розчином натрію хлориду; 3 – імунобіологічний препарат з фосфатно-буферним розчином, 4 – контроль ізотонічний 0,9 % розчин натрію хлориду; б) «-» - відсутність хвороби, «+» - слабка форма хвороби, «+ +» - середня форма хвороби, «+ + +» - сильна форма хвороби

У тварин контрольної групи були зафіксовані ознаки інфікування, що відповідали середній формі захворювання (+ +) та розвинутій формі захворювання (+ + +). Враховуючи, що імунобіологічний препарат з усіма розчинниками показав однакові результати, більш доцільним для подальших досліджень є використання фосфатно-буферного розчину. Тому, що фосфатно-буферний розчин зберігає постійне значення рН протягом тривалого часу, а це забезпечує стабільність препарату, оскільки незначна зміна рН може значно вплинути на активність антигенів, що позначиться на активності препарату.

### Висновки

В результаті проведених досліджень встановлено, що імунобіологічний препарат на основі антигенів грибів *C. albicans* з концентрацією білка 3 мг/мл та *C. tropicalis* з концентрацією білка 5 мг/мл у співвідношенні 1:1 у фосфатно-буферному розчині з рН  $7,2 \pm 0,2$  при двократному внутрішньом'язевому введенні по 0,2 мл забезпечує протективний та терапевтичний ефект протягом 3 місяців. А також враховуючи той факт, що фосфатно-буферний розчин забезпечує постійне значення рН середовища, то саме цей розчинник було обрано для введення до складу запропонованого імунобіологічного препарату.

### References

1. Golubka O. V. Distribution of candidiasis, the general characteristics of the pathogen, especially laboratory diagnostics / O. V. Golubka // Annals of Mechnikov Institute. – 2011. - № 2. – P. 51-59.
2. Patent 2445109 The Russian Federation, МПК<sup>7</sup> А 61 К 36/062, А 61 К 47/02, С 12 N 1/14. Associated vaccine against cutaneous candidiasis carnivores, a method of manufacturing associated vaccine against cutaneous candidiasis carnivorous way of prevention and treatment of cutaneous candidiasis carnivores. A. M. Litvinov, N. A. Apanasenko. (RF). – 2010127796/10; stated 07.07.2010; published 20.03.2012.
3. Cassone A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer / A. Cassone // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – Vol. 11. - P. 884–891.
4. *Candida albicans* vaccines / A. Grover, B. S. Bhandari, N. Rai, P. C. Lakhera // Biotechnology International. – 2010. – Vol. 3, № 1. – P. 4-17.
5. Rybalkin M. V., The study of protective properties of associated antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* / Rybalkin M. V., Filimonova N. I., Strilets O. P., Strelnikov L. S. // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. – 2014. – Vol. 6, № 4. – P. 954 - 957.

6. Rybalkin M. V. The study of the therapeutic action of the cell-associated antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi / M. V. Rybalkin // News in pharmacy. – 2014. – Vol. 78, № 2. – P. 78-81.
7. Krasnopol'skij Ju. M. Pharmaceutical biotechnology. Technology of production of immunobiological preparations / Ju. M. Krasnopol'skij, M. I. Borshhevskaja. – Kh.: NTU «HPI», 2009. – 352 p.
8. Excipients in Drug Technology: Impact on technology, consumer, economic characteristics and therapeutic efficacy / I. M. Percev, D. I. Dmitrievs'kij, V. D. Ribachuk and other. – Kh.: Golden Pages, 2010. – 598 p.
9. Crommelin D. J. A. Pharmaceutical biotechnology: fundamentals and applications, 4th ed. / D. J. A. Crommelin, R. D. Sindelar, B. Meibohm. - New York : Springer, 2013. – 490 p.
10. Vaccine manufacturing: challenges and solutions / Jeffrey B Ulmer, Ulrich Valley & Rino Rappuoli // Nature Biotechnology. – 2006. - № 24. – P. 1377 – 1383.

**BIOPHARMACEUTICAL SUBSTANTIATION OF THE SOLVENT IN THE COMPOSITION OF THE IMMUNOBIOLOGICAL DRUG FOR PREVENTION AND TREATMENT OF CANDIDAL INFECTION**

**Rybalkin M. V., Strilets O. P., Strelnikov L. S., Kalyuzhna O. S.**

Today diseases caused by potentially pathogenic microorganisms become increasingly important. This phenomenon is connected with increase of power of influence of the environment: chemical pollution, radiation, irrational use of antibiotics and hormone therapy; it leads to decrease of the immune response and human nonspecific resistance. For the last years one of the indicators of failure of the human body immune protection is chronic and local candidiasis caused by potentially pathogenic fungi of *Candida* genus.

Prevalence and risk of candidal infections determine the need for searching new medicines with a high efficiency and safety for human. Development of a vaccine for prevention and treatment of candidal infection is being actively conducted in many countries of the world. It should be noted that currently no domestic vaccine is produced in Ukraine and no candidiasis vaccines have been registered. Therefore, development of such vaccine is the topical issue of modern pharmacy and medicine.

In our previous studies it was found that the immunobiological drug based on the antigens of fungi of *C. albicans* with the protein concentration of 3 mg/ml and *C. tropicalis* with the protein concentration of 5 mg/ml in the ratio of 1:1 possesses the protective and therapeutic effect. At the current stage of research it is necessary to substantiate the solvent in the composition of the immunobiological drug. The aim of this work is the experimental substantiation of the solvent in the composition of the immunobiological drug based on the antigens of *C. albicans* and *C. tropicalis* fungi.

**Materials and Methods.** The immunobiological drug with the protein concentration of 4 mg/ml was investigated using various solvents. The following solvents was studied: water for injections, 0.9 % isotonic saline solution, phosphate buffer solution. To determine the protective and therapeutic activity of the immunobiological drug based on the antigens of *C. albicans* and *C. tropicalis* fungi the research was conducted in healthy two-month white mice with the body weight of 18-22 g. There were 6 animals in the control and test groups. Mice were intramuscularly injected 0.2 ml of the immunobiological drug twice with an interval of 14 days. To determine the protective activity of the immunobiological drug the animals were infected intraperitoneally in 3 months after the second introduction. For this purpose the suspension of *Candida albicans* fungi of CCM 335-867 strain in the amount of 20 mln. of cells and *Candida tropicalis* of ATTC 20336 strain in the amount of 60 mln. of cells in the volume of 1 ml was used; they were introduced with the interval of 1 hour. After that in 14 days the animals were examined and the results were determined. To determine therapeutic activity of the immunobiological drug the animals were infected according to the scheme described, in 5 days a

double injection of the drug was introduced to mice. After that in 14 days the animals were examined and the results were determined.

As a **result of the research** conducted it was found that the immunobiological drug based on the antigens of *C. albicans* and *C. tropicalis* fungi with all solvents studied protected 100 % of animals from infection in 1 and 3 months. The therapeutic effect of the immunobiological drug based on the antigens of *C. albicans* and *C. tropicalis* fungi with all solvents was 100 %. The therapeutic effect started to exhibit in 8 - 14 days after the first introduction of the vaccine, and in 8 - 14 days after the repeated introduction of the vaccine the full recovery of animals occurred. In animals of the control group the signs of infection corresponding to the moderate form of the disease and the advanced form of the disease were registered. Taking into account the fact that the immunobiological drug with all solvents has shown the similar results the use of phosphate buffer solution is more expedient for further study because it preserves the constant value of the pH medium for a long period of time. Thus, it provides the drug stability since an insignificant change in pH can greatly affect the activity of antigens, and it will have an influence on the drug activity.

**Keywords:** candidiasis; antigen; vaccine; immunity; solvent