

Рекомендована д. мед. наук, проф. С. І. Климнюком

УДК 616.992.282:616-097:615.371

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБГРУНТУВАННЯ КОНСЕРВАНТУ В СКЛАДІ ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ Й ЛІКУВАННЯ КАНДИДАМІКОЗІВ

© М. В. Рибалкін, Н. І. Філімонова, О. П. Стрілець, Л. С. Стрельников

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: в статті досліджено дію різних консервантів (фенол, мертіолят та формальдегід) у складі імунобіологічного препарату для попередження та лікування кандидозної інфекції. В результаті проведених досліджень встановлено, що імунобіологічний препарат з фенолу в концентрації 0,25 % при двократному внутрішньом'язовому введенні по 0,2 мл забезпечує протективний та терапевтичний ефекти. За ефективністю консервувальної дії консервант фенол у концентрації 0,25 % у складі імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* відповідав критерію А відповідно до ДФУ.

Ключові слова: кандидамікоз; антиген; вакцина; імунітет; консервант.

Вступ. Гриби роду *Candida* є найрозповсюдженішим збудником мікотичних захворювань. Ця нозологічна форма є опортуністичною інфекцією й найчастіше виникає на фоні дисбалансу в імунній системі організму, тому навіть при наявності високоактивних протигрибкових засобів лікування кандидозу не завжди буває вдалим. Зі зростанням частоти виявлення даного захворювання серед людей зростає інтерес до стану імунної системи при кандидозах для виявлення тих ланцюгів імунного захисту, вплив на які міг би сприяти лікуванню [1].

Для боротьби з кандидозною інфекцією в останні роки активно досліджують вакцини з імуномодельючими властивостями, як у країнах СНГ, так і в країнах Європи та Америки [5]. Слід зазначити, що на даний момент в Україні не випускають жодної вітчизняної та не зареєстровано жодної імпортової вакцини для профілактики та лікування кандидамікозів. Виходячи з цього, розробка вакцини проти кандидозної інфекції є нагальним 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 володіє протективним та терапевтичним ефектом, проведені дослідження з підбору розчинника, за результатами яких було обрано фосфатно-буферний розчин з рН 7,2 ± 0,2.

Одержаний імунобіологічний препарат доцільно випускати у багаторазових флаконах для одномоментної імунізації певної групи людей. Для багаторазових рідких лікарських засобів не-

обхідність введення ефективного антимікробного консерванту визначають з урахуванням можливого забруднення протягом використання і максимального рекомендованого терміну використання після розкриття контейнера.

Також необхідно відмітити, що введення вакцин можливе лише у лікарнях під наглядом лікарів. На даному етапі досліджень необхідно обрати консервант, який би забезпечував стерильність одержаної вакцини у багаторазовому флаконі після розкриття.

На стадії розробки лікарської форми треба довести, що антимікробна активність лікарського засобу або при необхідності лікарського засобу з додаванням відповідного консерванту забезпечує належний захист від небажаних ефектів, які можуть бути результатом мікробного забруднення лікарського засобу або розмноження в ньому мікроорганізмів у процесі зберігання та використання [2, 3, 4].

При використанні антимікробного консерванту слід показати, що не знижується безпека або ефективність вакцин. Звичайно, не допускається використання антибіотиків як антимікробних консервантів. При розробці вакцин в уповноважений орган необхідно надати дані, що підтверджують ефективність вибраного консерванту впродовж всього терміну придатності лікарського засобу [7, 9, 11].

Як консервант найчастіше у вакцинах використовують меркуротіолят (мертіолят або тимеросал), формальдегід та фенол [6, 8, 10]. Ефективність консерванту може посилюватись або послаблюватись у результаті взаємодії з діючою речовиною або іншими компонентами готового лікарського засобу, а також із пакувальним

або закупорювальним матеріалом. Тому протягом терміну зберігання треба контролювати антимікробну активність консерванту готового лікарського засобу, що зберігається у контейнері, з метою доведення того, що вона не знижується у процесі зберігання.

Дані наукової літератури свідчать, що багато консервантів є агресивними речовинами щодо біологічних об'єктів, тому перед їх використанням необхідно перевірити вплив консервантів на активність імунобіологічного препарату. Для виявлення впливу консерванту на активність імунобіологічного препарату були отримані експериментальні зразки, які складались з розчину імунобіологічного препарату та консервантів, що вивчали у максимально допустимій концентрації.

Метою даної роботи є експериментальне обґрунтування консерванту у складі імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *S. albicans* та *S. tropicalis*.

Методи дослідження. Імунобіологічний препарат на основі антигенів грибів *S. albicans* з концентрацією білка 3 мг/мл та *S. tropicalis* з концентрацією білка 5 мг/мл у співвідношенні 1:1 досліджували з різними консервантами: фенол 0,25 %, мертіолят 0,01 % та формальдегід 0,4 %. При виборі консерванту враховували вимоги, які висувають до цієї групи речовин: активність відносно широкого спектра мікроорганізмів, повільне формування резистентних варіантів мікроорганізмів, прояв антимікробних властивостей у широкому діапазоні рН, сумісність з основними компонентами лікарської форми, безпечність.

Для оцінки здатності імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *S. albicans* та *S. tropicalis* з різними консервантами викликати проєктивний ефект проводили дослідження на здорових білих мишах двохмісячного віку масою 18 – 22 г по 6 тварин у контрольних та дослідних 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 консервантами. Через 14 днів, повторно, в верхню частину задньої лівої лапи вводили 0,2 мл досліджуваного препарату. Тваринам у контрольній групі вводили імунобіологічний препарат без консервантів. Через 1 місяць для однієї групи піддослідних тварин та через 3 місяці для другої групи піддослідних тварин після імунізації проводили внутрішньочеревне зараження тварин. Для цього використовували суспензію грибів *S. albicans* штам ССМ

335-867 у кількості 20 млн. клітин та *S. 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 ураховували за кількістю різних проявів хвороби та оцінювали за наступною системою: (-) – відсутність проявів захворювання; слабка форма захворювання (+) – неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння маси тіла, порушення функції вивідних органів; середня форма захворювання (+ +) – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння маси тіла, контрактури шийних м'язів, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, під час розтину при дослідженні слизових оболонок природних отворів були виявлені ознаки патологічних процесів, висівання грибів з фекалій тварин; розвинута форма захворювання (+ + +) – адинамія, неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння маси тіла, контрактури шийних м'язів, параліч кінцівок, судоми, бокове розташування тіла, порушення функції вивідних органів, 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.

Терапевтичний ефект імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *S. albicans* та *S. tropicalis* з різними консервантами досліджували на здорових білих мишах двохмісячного віку масою 18 – 22 г по 6 тварин у контрольних та дослідних групах, яких утримували в однакових умовах на стандартному раціоні. Перед дослідженнями тварини проходили акліматизацію в умовах експериментальної кімнати. Тварин заражали внутрішньочеревно суспензію грибів *S. albicans* штам ССМ 335-867 у кількості 20 млн клітин та *S. 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 імунобіологічний препарат з досліджуваними консервантами. Через 14 днів, повторно, в верхню частину задньої лівої лапи вводили 0,2 мл досліджуваного препарату. Тваринам у контрольній групі вводили імунобіологічний препарат без консервантів. Після чого через 14 діб проводили огляд тварин та визначали результати. Результати ураховували за тією ж схемою, що і при попередніх дослідженнях.

Обґрунтування концентрації обраних консервантів здійснювали згідно з методикою ДФУ (5.1.3. Ефективність антимікробних консервантів). Дослідні зразки інокулювали тест-мікро-

організмами *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 або не спостерігалось збільшення числа мікроорганізмів, залежно від вимог до готового лікарського засобу. Критерії оцінки, що показують зменшення числа мікроорганізмів за певний період часу, залежить від потрібного ступеня захисту готових лікарських засобів.

Згідно з вимогами ДФУ препарати повинні відповідати критеріям А або критеріям В для парантеральних та офтальмологічних лікарських засобів, якщо це є обґрунтованим.

Результати й обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що імунобіологічної препарат на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з консервантами фенолом у концентрації 0,25 % та мертіолятом у концентрації 0,01 % при двократному внутрішньом'язовому введенні по 0,2 мл через 1 та 3 місяці забезпечує напружений імунітет у 100 % мишей. Статистично значимих відмінностей в ефективності вакцини з консервантами фенолом та меркуротіолятом не було виявлено.

Імунобіологічної препарат на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з консервантам формальдегідом у концентрації 0,4 % через 1 місяць після повторного введення за-

хищав від зараження 100 % тварин та через 3 місяці після повторного введення захищав від зараження 84 % тварин. У 16 % тварин спостерігали ознаки слабкої форми захворювання (+) – неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння маси тіла, порушення функції вивідних органів.

Терапевтичний ефект імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* з усіма консервантами становив 100 %. Терапевтичний ефект почав проявлятися через 8 – 14 діб після першого введення вакцини, а через 8 – 14 діб після повторного введення препарату наступало повне одужання тварин (табл. 1).

Результати вивчення активності зразків свідчать, що формальдегід у концентрації 0,4 % знижує протективний ефект імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis*, а мертіолят у концентрації 0,01 % та фенол у концентрації 0,25 % зберігає активність імунобіологічного препарату.

Необхідно зазначити, що фенол є концентрованою речовиною, однак його кількість в одній дозі об'ємом 0,2 мл незначна. Мертіолят – це органічна сіль ртуті, однак вона не містить чисту ртуть. Окрім того, фенол та мертіолят добре себе зарекомендував як консерванти для вакцин у продовж багатьох років. Отже, для подальших досліджень обрано фенол і мертіолят.

Далі проведено дослідження ефективності антимікробної консервувальної дії консервантів мертіоляту у концентрації 0,01 %, 0,005 % та фенолу у концентраціях 0,2 %, 0,25 % у розчині імунобіологічного препарату (табл. 2).

Таблиця 1. Склад та активність імунобіологічного препарату з досліджуваними консервантами

Назва консерванту	Вміст консерванту, %	Протективний ефект, %		Терапевтичний ефект, %
		тривалість, місяць		
		1	3	
Фенол	0,25	100	100	100
Мертіолят	0,01	100	100	100
Формальдегід	0,4	100	84	100
Контроль		100	100	100

Примітки: n=6, контроль – імунобіологічної без консерванту.

Таблиця 2. Ефективність антимікробної консервувальної дії фенолу та мертіоляту з імунобіологічним препаратом

Тест-мікроорганізми	Консервант/ концентрація у розчині, %	Lg зменшення числа життєздатних мікроорганізмів				
		Експозиція				
		6 год.	24 год.	7 діб	14 діб	28 діб
	1	2	3	4	4	5
Критерій ДФА А/В	Бактерії	2/-	3/1	-/3	-/-	НВ*/НЗ
Критерій ДФА А/В	Гриби	-/-	-/-	2/-	-/1	НЗ

	1	2	3	4	4	5
S. aureus	Фенол / 0,2%	1,78	2,85	1,37	НВ	НВ
	Мертіолят / 0,005%	1,34	1,68	1,32	НВ	НВ
	Фенол / 0,25%	2,15	3,54	НВ	НВ	НВ
	Мертіолят / 0,01%	1,73	1,82	1,95	НВ	НВ
P. aeruginosa	Фенол / 0,2%	1,87	2,54	НВ	НВ	НВ
	Мертіолят / 0,005%	1,23	2,35	1,12	НВ	НВ
	Фенол / 0,25%	2,47	3,17	НВ	НВ	НВ
	Мертіолят / 0,01%	1,64	2,73	1,57	НВ	НВ
C. albicans	Фенол / 0,2%	2,45	3,24	НВ	НВ	НВ
	Мертіолят / 0,005%	3,42	4,35	3,54	НВ	НВ
	Фенол / 0,25%	4,15	5,73	НВ	НВ	НВ
	Мертіолят / 0,01%	3,87	4,78	3,95	НВ	НВ
A. niger	Фенол / 0,2%	0,38	1,85	2,65	2,07	5,17
	Мертіолят / 0,005%	0,83	2,64	3,45	НВ	НВ
	Фенол / 0,25%	4,52	НВ	НВ	НВ	НВ
	Мертіолят / 0,01%	1,25	3,02	3,74	НВ	НВ

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

У результаті досліджень встановлено, що за ефективністю консервувальної дії критерію А ДФУ відповідав консервант фенол у концентрації 0,25 %. Фенол у концентрації 0,2 % та мертіолят у концентрації 0,01 % та 0,005 % не відповідали вимогам ДФУ. Згідно з отриманими результатами як консервант обрано фенол у концентрації 0,25 %.

Висновки. У результаті проведених досліджень встановлено, що фосфатно-буферний розчин з рН $7,2 \pm 0,2$ імунобіологічного препарату 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 з консервантом фенол у концентрації 0,25 % при двократному внутрішньом'язовому введенні по 0,2 мл забезпечує протективний та терапевтичний ефекти.

За ефективністю консервувальної дії консервант фенол у концентрації 0,25 % у складі імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* відповідав критерію А відповідно до ДФУ.

Література

1. Голубка О. В. Поширення кандидозів, загальна характеристика збудника, особливості лабораторної діагностики / О. В. Голубка // Annals of Mechnikov Institute. – 2011. – № 2. – С. 51-59.
2. Державна Фармакопея України / Держ. п-во «Науково-експертний фармакопейний центр» – 1-е вид., 3 допов., – Х. : РІРЕГ, 2009. – 280 с.
3. Допоміжні речовини в технології ліків: вплив на технологічні, споживчі, економічні характеристики і терапевтичну ефективність: навч. посіб. / МОЗ України; НФаУ; авт.-уклад: І. М. Перцев, Д. І. Дмитрієвський, В. Д. Рибачук [та ін.]; за ред. І. М. Перцева. – Х. : Золоті сторінки, 2010. – 598 с.
4. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология. Технология производства иммунобиологических препаратов / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2009. – 352 с.
5. Cassone A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer / A. Cassone // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – Vol. 11. – P. 884–891.
6. Comparative evaluation of phenol and thimerosal as

- preservatives for a candidate vaccine against American cutaneous leishmaniasis / W. Mayrinkl, C. A. P. Tavares, R. B. de Deus [et al.] // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2010. – Vol. 105, № 1. – P. 86–91.
7. 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.
8. Geier D. A. The relative toxicity of compounds used as preservatives in vaccines and biologics / D. A. Geier, S. K. Jordan, M. R. Geier // Med. Sci. Monit. – 2010. – Vol. 16, № 5. – P. 21–27.
9. Globig S. Current Research in Pharmaceutical Technology / S. Globig, W. Hunter Jr. – Apple Academic Press, 2011. – 294 p.
10. Offit P. A. Addressing Parents' Concerns: Do Vaccines Contain Harmful Preservatives, Adjuvants, Additives, or Residuals? / P. A. Offit, R. K. Jew // Pediatrics. – 2003. – Vol. 112, № 6. – P. 1394–1397.
11. Vaccine manufacturing: challenges and solutions / Jeffrey B Ulmer, Ulrich Valley & Rino Rappuoli // Nature Biotechnology. – 2006. – № 24. – P. 1377–1383.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ КОНСЕРВАНТА В СОСТАВЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ КАНДИДАМИКОЗОВ

Н. В. Рыбалкин, Н. И. Филимонова, О. П. Стрилец, Л. С. Стрельников

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: в статье исследовано действия различных консервантов (фенол, мертиолят и формальдегид) в составе иммунобиологического препарата для предупреждения и лечения кандидозной инфекции. В результате проведенных исследований установлено, что иммунобиологический препарат с фенол в концентрации 0,25 % при двукратном внутримышечном введении по 0,2 мл обеспечивает протективный и терапевтический эффекты. По эффективности консервирующих действия консервант фенол в концентрации 0,25 % в составе иммунобиологического препарата на основе антигенов грибов *C. albicans* и *C. tropicalis* отвечал критерию А согласно ГФУ.

Ключевые слова: кандидамикоз, антиген, вакцина, иммунитет, консервант.

EXPERIMENTAL BASIS PRESERVATIVES IN IMMUNOBIOLOGICALS COMPOSITION FOR PREVENTION AND TREATMENT CANDIDIASIS

M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, O. P. Strilets, L. S. Strelnikov

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: this article was researching different preservatives (phenol, formaldehyde and mertiolat) consisting of immunobiological preparations for the prevention and treatment of this infection. As a result, the research found that immunobiological preparations of phenol at a concentration of 0.25 % at twice the intramuscular injection of 0.2 ml provides protective and therapeutic effects. On the effectiveness of preserving action phenol preservative at a concentration of 0.25 % as part of immunobiological preparations of antigens from fungi *C. albicans* and *C. tropicalis* meet criteria A in accordance with the SPU.

Key words: candidiasis, antigen, vaccine, immunity, preservative.

Отримано 19.08.14