

Рекомендована д. фармац. наук, проф. Л. Л. Давтян

УДК 616.992.282:615.371:616-097

ВИЗНАЧЕННЯ ТЕМПЕРАТУРНОГО РЕЖИМУ В ТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ ПРОТИ КАНДИДАМІКОЗІВ

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

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: розроблено імунобіологічний препарат на основі грибів *S. albicans* з концентрацією білка 3 мг/мл та *S. tropicalis* з концентрацією білка 5 мг/мл у співвідношенні 1:1, тобто загальна концентрація білка 4 мг/мл. Мета роботи – обґрунтування температурного режиму технологічного процесу виготовлення розчину імунобіологічного препарату. Вплив температури на активність розчину імунобіологічного препарату вивчали при температурі $(25 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ та $(30 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ з часом експозиції 60 хв. В результаті проведених досліджень встановлено, що імунобіологічний препарат зменшує свою активність при температурі $(30 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$.

Ключові слова: кандидамікоз, антиген, вакцина, температура, рН.

Вступ. Окрім відносно легких форм кандидозів слизових оболонок і шкіри, можливі тяжкі вісцеральні форми мікозу, частіше з переважним ураженням шлунково-кишкового тракту і органів дихання [1].

В останні роки активно здійснюються розробки вакцин для попередження і лікування кандидозної інфекції в країнах СНД, Європи та Америки [2, 3]. Необхідно зазначити, що сьогодні в Україні не випускають жодної вітчизняної і не зареєстровано жодної імпортової вакцини проти кандидозу. Тому розробка даної вакцини є актуальним питанням для сучасної медицини та фармації.

Розроблено імунобіологічний препарат на основі грибів *S. albicans* з концентрацією білка 3 мг/мл та *S. tropicalis* з концентрацією білка 5 мг/мл у співвідношенні 1:1, тобто загальна концентрація білка 4 мг/мл [4, 5]. Технологія отримання даного препарату передбачає руйнування клітини грибів для виділення білка за допомогою ультразвуку. При обробці клітин грибів ультразвуком відбувається підвищення температури [6], що, в свою чергу, може призвести до денатурації білка і втрати антигенних властивостей. З даних літератури відомо, що саме білкові детермінанти антигенного матеріалу найбільше схильні до дії температури [7–10]. Тому необхідно провести вивчення впливу температури на активність імунобіологічного препарату.

Метою даної роботи є обґрунтування температурного режиму технологічного процесу виготовлення розчину імунобіологічного препарату для попередження і лікування кандидозної інфекції.

Методи дослідження. Вплив температури на активність розчину імунобіологічного препарату вивчали при температурі $(25 \pm 0,2)$ та $(30 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$

з часом експозиції 60 хв. Для цього відбирали розчин імунобіологічного препарату у стерильні скляні ємності, герметично закупорювали стерильними кришками і поміщали в термостат при заданій температурі для кожного зразка окремо. Після експозиції в термостаті ємність з імунобіологічним препаратом поміщали в ламінарний бокс, знімали кришку і розчин імунобіологічного препарату брали для аналізу.

Для оцінки здатності імунобіологічного препарату формувати протективний ефект, проводили дослідження на здорових білих мишах двомісячного віку масою 18 – 22 г по 6 тварин у контрольній і дослідній групах, які містилися в однакових умовах на стандартному раціоні. Перед дослідженнями проходили акліматизацію тварин в умовах експериментальної кімнати. Мишам внутрішньом'язово в верхню частину задньої правої лапи вводили 0,2 мл імунобіологічного препарату. Через 14 діб, повторно, у верхню частину задньої лівої лапи вводили 0,2 мл досліджуваного препарату. Тваринам в контрольній групі вводили фізіологічний розчин. Через 1 місяць для однієї групи піддослідних тварин і через 3 місяці для другої групи піддослідних тварин після введення досліджуваного препарату проводили внутрішньочеревне зараження тварин. Для цього використовували суспензію грибів *S. albicans* штам ССМ 335-867 у кількості 20 млн клітин і *S. tropicalis* штам АТТС 20336 в кількості 60 млн клітин в об'ємі 1 мл, які вводили з інтервалом 1 годину. Після чого через 14 діб проводили огляд тварин і визначали результати.

Результати проб ураховували за кількістю різних проявів хвороби та оцінювали за 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 кірковому шарі нирок, у легенях, селезінці, печені та інших, виділення ретрокультури грибів з органів тварин.

Терапевтичний ефект імунобіологічного препарату досліджували на здорових білих мишах двомісячного віку масою 18 – 22 г по 6 тварин у контрольній і дослідній групах, які містилися в однакових умовах на стандартному раціоні. Перед дослідженнями тварини проходили акліматизацію в умовах експериментальної кімнати. Тварин заражали внутрішньочеревно суспензію грибів *S. albicans* штам ССМ 885-653 у кількості 20 млн клітин і *S. tropicalis* штам АТТС 20336 в кількості 60 млн клітин в об'ємі 1 мл. Через 5 діб мишам

внутрішньом'язово в верхню частину задньої правої лапи вводили 0,2 мл імунобіологічного препарату. Через 14 діб, повторно, у верхню частину задньої лівої лапи вводили 0,2 мл досліджуваного препарату. Тваринам в контрольній групі вводили фізіологічний розчин. Після чого через 14 діб проводили огляд тварин і визначали результати. Результати враховували за тією ж схемою, що і при попередніх дослідженнях.

Результати й обговорення. У результаті проведених досліджень встановлено, що імунобіологічний препарат на основі антигенів грибів *S. albicans* та *S. tropicalis* при температурі (25 ± 0,2) °С при експозиції 60 хв через 1 місяць після повторного введення препарату захищає від зараження 100 % тварин та через 3 місяці після повторного введення препарату захищала від зараження також 100 % тварин (табл. 1).

Імунобіологічний препарат для попередження та лікування кандидозної інфекції при температурі (30 ± 0,2) °С при експозиції 60 хв зменшує свою активність. Імунобіологічний препарат, виготовлений при вказаній температурі, через 1 місяць після повторного введення препарату захищає від зараження 83 % тварин та через 3 місяці після повторного введення препарату захищає від зараження також 67 % тварин. У хворих дослідних тварин були виявлені ознаки інфікування, що відповідає легкій формі хвороби: неохайний вигляд, відмова від їжі, падіння маси тіла, порушення функції вивідних органів (табл. 2).

Таблиця 1. Протективна дія імунобіологічного препарату при температурі 25 °С

Препарат	Тварини					
	1	2	3	4	5	6
	Результати через 1 місяць					
Дослід	-	-	-	-	-	-
Контроль	-	-	-	-	-	-
	Результати через 3 місяці					
Дослід	-	-	-	-	-	-
Контроль	-	-	-	-	-	-

Примітки: «-» – відсутність хвороби, «+» – слабка форма хвороби, «+ +» – середня форма хвороби, «+ + +» – сильна форма хвороби.

Таблиця 2. Протективна дія імунобіологічного препарату при температурі 30 °С

Препарат	Тварини					
	1	2	3	4	5	6
	Результати через 1 місяць					
Дослід	-	+	-	-	-	-
Контроль	-	-	-	-	-	-
	Результати через 3 місяці					
Дослід	-	+	-	-	+	-
Контроль	-	-	-	-	-	-

Примітки: «-» – відсутність хвороби, «+» – слабка форма хвороби, «+ +» – середня форма хвороби, «+ + +» – сильна форма хвороби.

Терапевтичний ефект імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* при температурі $(20 \pm 0,2)$ °C при експозиції 60 хв становив 100 %. Терапевтичний ефект почав проявлятися через 8 – 14 діб після першого введення вакцини, а через 8 – 14 діб після повторного введення вакцини наступало повне одужання тварин (табл. 3).

Імунобіологічний препарат для попередження та лікування кандидозної інфекції при температурі $(30 \pm 0,2)$ °C при експозиції 60 хв забезпечував терапевтичний ефект також у 83 % мишей (табл. 4).

Висновки. При вивченні впливу температурного фактора на активність імунобіологічного препарату на основі антигенів грибів *C. albicans* та *C. tropicalis* встановлено, що його специфічна активність при температурі $(25 \pm 0,2)$ °C та експозиції 60 хв залишається стабільною. Імунобіологічний препарат для попередження та лікування кандидозної інфекції зменшує свою активність при температурі $(30 \pm 0,2)$ °C та експозиції 60 хв. Відповідно подальше збільшення температури і часу експозиції призводить до зменшення активності імунобіологічного препарату. За отриманими даними, критична температура ведення технологічного процесу була обрана $(30 \pm 0,2)$ °C з часом експозиції 60 хв.

Таблиця 3. Терапевтична дія імунобіологічного препарату при температурі $(25 \pm 0,2)$ °C

Тварини	Дослід		Контроль	
	Результат			
	після зараження	після другої ін'єкції	після зараження	після другої ін'єкції
1	++	–	+	–
2	+	–	++	–
3	++	–	+	–
4	+	–	++	–
5	++	–	+	–
6	++	–	++	–

Примітки: «–» – відсутність хвороби, «+» – слабка форма хвороби, «+ +» – середня форма хвороби, «+ + +» – сильна форма хвороби.

Таблиця 4. Терапевтична дія імунобіологічного препарату при температурі $(30 \pm 0,2)$ °C

Тварини	Дослід		Контроль	
	Результат			
	після зараження	після другої ін'єкції	після зараження	після другої ін'єкції
1	+	–	+	–
2	++	–	++	–
3	++	+	++	–
4	++	–	+	–
5	+	–	+	–
6	++	–	++	–

Примітки: «–» – відсутність хвороби, «+» – слабка форма хвороби, «+ +» – середня форма хвороби, «+ + +» – сильна форма хвороби.

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. Cassone A. Development of vaccines for *Candida albicans*: fighting a skilled transformer / A. Cassone // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – Vol. 11. – P. 884–891.
3. *Candida albicans* vaccines / A. Grover, B. S. Bhandari, N. Rai, P. C. Lakhera // Biotechnology International. – 2010. – Vol. 3, № 1. – P. 4–17.
4. The study of protective properties of associated antigens

- of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* / M. V. Rybalkin, N. I. Filimonova, O. P. Strilets, L. S. Strel'nikov // Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. – 2014. – Vol. 6, № 4. – P. 954–957.
5. Rybalkin M. V. The study of the therapeutic action of the cell-associated antigens of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* fungi / M. V. Rybalkin // Вісник фармації. – 2014. – Т. 78, № 2. – С. 78–81.
6. Технологія ліків промислового виробництва: підручник для студ. вищ. навч. закл. : в 2-х ч. / [В. І. Чуєшов, Є. В. Гладух, І. В. Сайко та ін.]. – 2-е вид.,

перероб. і доп. – Х. : НФаУ: Оригінал, 2012. – Ч. 1 – 694 с.

7. Ulmer J. B. Vaccine manufacturing: challenges and solutions / J. B. Ulmer, U. Valley, R. Rappuoli // Nature Biotechnology. – 2006. – № 24. – P. 1377 – 1383.

8. Петров Р. В Иммуногены и вакцины нового поколения / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов. – М. : ГЭОСТАР-Медицина, 2011. – 608 с.

9. Краснопольский Ю. М. Фармацевтическая биотехнология. Технология производства иммунобиологических препаратов / Ю. М. Краснопольский, М. И. Борщевская. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2009. – 352 с.

10. 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.

ИЗУЧЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНОГО РЕЖИМА В ТЕХНОЛОГИИ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ПРОТИВ КАНДИДАМИКОЗОВ

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

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: разработан иммунобиологический препарат на основе грибов *C. albicans* с концентрацией белка 3 мг/мл и *C. tropicalis* с концентрацией белка 5 мг/мл в соотношении 1:1, т.е. общая концентрация белка 4 мг/мл. Цель работы – обоснование температурного режима технологического процесса изготовления раствора иммунобиологического препарата. Влияние температуры на активность раствора иммунобиологического препарата изучали при температуре $(25 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ и $(30 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ со временем экспозиции 60 мин. В результате проведенных исследований установлено, что иммунобиологический препарат уменьшает свою активность при температуре $(30 \pm 0,2)^\circ\text{C}$.

Ключевые слова: кандидамикоз, антиген, вакцина, температура, pH.

STUDY OF TEMPERATURE IN THE MANUFACTURING TECHNOLOGY OF VACCINES PROTECTING AGAINST CANDIDIASIS

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

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: the authors developed immunobiologicals based fungi *C. albicans* at a protein concentration of 3 mg/ml, and *C. tropicalis* with a protein concentration of 5 mg/ml in 1:1 ratio, i.e. total protein concentration of 4 mg/ml. The aim of this work is to validate the temperature of the solution process of manufacturing immunobiological preparations. Effect of temperature on the activity of the solution immunobiologicals studied at $(25 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ and $(30 \pm 0.2)^\circ\text{C}$ with an exposure time of 60 min. The studies found that the drug reduces its immunobiological activity at $(30 \pm 0.2)^\circ\text{C}$.

Key words: candidiasis, antigen, the vaccine, temperature, pH.

Отримано 24.10.14