



УКРАЇНА

(19) UA (11) 55114 (13) U  
(51) МПК (2009)  
G01N 33/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ДО БІОПЛІВОК ГРИБІВ CANDIDA ALBICANS

1

(21) u201005241

(22) 29.04.2010

(24) 10.12.2010

(46) 10.12.2010, Бюл.№ 23, 2010 р.

(72) БІЛОЗОРОВ ОЛЕКСІЙ ПАВЛОВИЧ, ЧАСТІЙ  
ТЕТЯНА ВОЛОДИМИРІВНА, ВАСИЛЬЧЕНКО ВА-  
ЛЕРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ДЕРМА-  
ТОЛОГІЇ ТА ВЕНЕРОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"

2

(57) Спосіб визначення протимікробної активності лікарських засобів до біоплівки грибів *Candida albicans*, який включає оцінку метаболічної активності біоплівки, який **відрізняється** тим, що визначення протимікробної активності лікарського засобу здійснюють вимірюванням рівня асиміляції глюкози із середовища життєздатними клітинами біоплівки *Candida albicans*.

Корисна модель належить до медицини, а саме до мікології та фармакології, та може бути застосована для визначення протимікробної активності лікарських засобів до біоплівки грибів *C. albicans* з метою вибору ефективних препаратів для лікування інфекцій, які викликаються цими грибами з утворенням біоплівок та розробки нових більш ефективних лікарських засобів і можливості їх застосування для лікування цих інфекцій.

Для визначення протимікробної активності лікарських засобів до біоплівок грибів застосовують наступні методи: прямий підрахунок клітин за допомогою мікроскопії, методи радіохімії, люмінометрії та метод редукції тетразолію життєздатними клітинами. Найбільш розповсюджений та стандартизований є метод редукції тетразолію [Ramage G., Walle K.V., Wiskes B.L. and Lopez -Ribot J.L. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms// Antimicrob. Agents Chemother.-2001. -Vol.45, №9.-P.2475-2479.]. Методично цей спосіб виконується наступним чином. Для одержання біоплівок *C. albicans* використовують планшети для імунологічних досліджень. *C. albicans* завершує формування біоплівок на протязі 24-48 год. інкубації. Їх метаболічна активність в цей час виходить на плато та залишається достатньо високою, що відтворює збільшення кількості клітин, які формують зрілу біоплівку. Після утворення біоплівок до них додаються протимікробні засоби, що тестуються, в відповідних концентраціях, і біоплівки з ними інкубуються ще на протязі 24 год., після чого відмиваються від протимікробних засобів. Далі додається барвник тетразолій і метадіон і суміш

інкубується при 37 °C для редукції тетразолію. Остання реєструється колориметрично на спеціальному обладнанні - мікротитраційному ридері для планшетів типу мультискан фірми Labsistem, Швеція, по появі забарвлення коричневого кольору в наслідок метаболічної активності життєздатних клітин, і визначається спектрофотометрично [Kuhn D.M., Balnis M., Chandra J. et al. Uses and limitations of the XTT assay in studies of *Candida* growth and metabolism //J. Clin. Microbiol.-2003.-Vol.41, № 1.-P.506-508.].

Даний спосіб є стандартизованим, оснований на вивченні метаболізму життєздатних клітин, широко застосовується, а також найбільш близький до того, що заявляється, за технічною суттю та результатом, який може бути досягнутий, тому його обрано прототипом.

Основним недоліком методу, який використовується як прототип є його недостатня точність та достовірність, тому що визначення показників редукції тетразолію: утворення розчиненого формазану не являється достатньо точним і залежить від таких чинників, як особливості будови клітинної стінки конкретного штаму *C. albicans* і її спроможності затримувати дифузію формазану в середовищі, а також від концентрації клітин, які утворюють біоплівки і ці показники не завжди є пропорційними і таким чином знижується достовірність визначеної протимікробної активності лікарських засобів.

У зв'язку з вищевикладеним в основу корисної моделі покладено задачу підвищення точності та достовірності способу визначення протимікробної

(19) UA (11) 55114 (13) U

активності лікарських засобів до біоплівок *C. albicans*.

Задачу, яку покладено в основу корисної моделі, вирішують тим, що у відомому способі визначення протимікробної активності лікарського засобу до біоплівок грибів шляхом оцінки метаболічної активності біоплівок згідно з корисною моделлю, визначення протимікробної активності лікарського засобу здійснюють вимірюванням рівня асиміляції глюкози із середовища життєздатними клітинами біоплівки *C. albicans*.

Технічний ефект корисної моделі, а саме підвищення точності визначення обумовлена тим, що життєздатні клітини біоплівок краще за все із живильного середовища асимілюють глюкозу і за 6 год. інкубації її рівень знижується більш ніж на 95 %. В той же час біоплівки, оброблені відповідними лікарськими засобами здійснюють асиміляцію глюкози в меншій мірі в залежності від їх концентрації і при певних концентраціях відмічається навіть повна зупинка цього процесу, що і відображає рівень метаболічної активності біоплівок. Це явище обумовлено тим, що полісахаридний матрикс, який синтезується при формуванні біоплівок *C. albicans*, серед інших компонентів містить 32 % глюкози [Al-Fattani M.A. and Douglas L.J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* : chemical composition and role in drug resistance // J.Mad. Microbiol. -2006.-Vol. 55, №5.-P.999- 1008], і лікарські засоби, які здатні пригнічувати його синтез або навіть руйнувати біоплівку тим самим можуть частково або повністю пригнічувати асиміляцію ними глюкози.

Спосіб виконують наступним чином.

Для культивування *C. albicans* використовують рідке живильне середовище, яке містить (вага/об'єм) 1% дріжджового екстракту, 2 % пептону, 2 % глюкози (середовище ДЕПГ). Культуру *C. albicans* інкубують на рідкому ДЕПГ на протязі 18 год. при 32 °С. Клітини збирають центрифугуванням при 4000 об/хв на протязі 10 хв., відмивають стерильним рідким ДЕПГ і розводять цим середовищем до концентрації  $1,0 \times 10^5$  КУО/мл. Концентрацію КУО гриба встановлюють спектрофотометрично на підставі побудованої попередньо калібровочної кривої залежності оптичної щільності від кількості КУО визначеної шляхом висіву серійних розведень на щільне середовище Сабуро.

Біоплівки *C. albicans* одержують в планшетах для імунологічних досліджень. В кожну лунку

планшета вносять по 100 мкл стандартизованої суспензії клітин *C. albicans* (100 мкл 106 КУО/мл) і інкубують на протязі 48 год. при 32 °С. Після утворення біоплівки середовище відсмоктують піпеткою і клітини, що прикріпилися до дна видаляють промивкою трічі стерильним забуференим фізіологічним розчином. Залишок розчину видаляють смужкою фільтрувального паперу. Лікарські засоби розводять методом двократних серійних розведень рідким живильним середовищем ДЕПГ із концентрованих розчинів в окремому планшеті і по 100 мкл відповідного розведення вносять в лунки планшета і інкубують додатково на протязі 24 год. Після цього живильне середовище відсмоктують, біоплівки промивають як описано вище і до них додають по 100 мкл в кожну лунку стерильного рідкого живильного середовища ДЕПГ. Контролем є лунки з біоплівками без лікарського засобу. Планшети додатково інкубують при 32 °С на протязі 6 год. Із кожної лунки відбирають по 50 мкл середовища, переносять в пробірки епендорф і центрифугують для видалення клітин при 12000 об/хв на протязі 10 хв. Із пробірок відбирають по 10 мкл і в них визначають вміст глюкози за допомогою тест-системи тов. НВП "Філіст-Діагностика", Дніпропетровськ., відповідно до "Інструкції для визначення глюкози у біологічних рідинах глюкозооксидантним методом", яка додається для набору. Показники протимікробної активності перераховуються на 1 мл розчину. Протимікробна активність лікарського засобу, визначеного за допомогою способу, що рекомендується, є мінімальною його концентрація, яка повністю інгібує асиміляцію глюкози із живильного середовища ДЕПГ життєздатними клітинами біоплівок *C. albicans*.

Ефективність способу встановлена експериментально. В порівняльних дослідженнях були визначені протимікробна активність тербінафіну (антимікотик, який застосовується в мікології) і бензоїла пероксиду (дезінфікуючий агент з широким спектром дії) по відношенню до біоплівок грибів *C. albicans* як способом оцінки рівня пригнічення ними здатності біоплівок до асиміляції глюкози (АГ), так і способом підрахування кількості КУО (ККУО). В досліді були використані субстанції тербінафіна гідрохлориду фірми Hetero Labs Limited, Індія, і бензоїла пероксиду фірми Merck, Німеччина. Результати приведені в таблиці 1.

Таблица 1

Протимікробна активність в мкг/мл тербінафіну і бензоїла пероксиду, визначені за допомогою рекомендованого способу (АГ) і способу оцінки кількості КУО (ККУО).

Тербінафін		Бензоїла Пероксид	
АГ	ККУО	АГ	ККУО
256,0	256,0	290,0	290,0

Як видно із даних, наведених в таблиці 1, протимікробна активність МІЖ тербінафіну і бензоїла пероксиду, визначені обома способами, збігаються, що свідчить про те, що рекомендований спосіб може використовуватися для визначення МІЖ

протимікробних засобів до біоплівок грибів *C. albicans*.

Ефективність способу ілюструє наступний приклад його клінічного застосування:

Хвора Х, діагноз: алергодерматоз, знаходилася на лікуванні в дерматологічному відділенні. Зі

шкіри хворої було виділено та ідентифіковано *C. albicans*. Була визначена протимікробна активність тербінафину до біоплівки виділеного штаму *C. albicans*, яка склала 0,25 мг/мл, та виготовлені зразки мазі з концентраціями 0,15 мг/мл, 0,25 мг/мл та 0,3 мг/мл. При клінічному застосуванні

зразків мазі у хворої Х було виявлено, що клінічний ефект давали тільки мазі з концентрацією 0,25 мг/мл та 0,3 мг/мл, що свідчить об ефективності визначення протимікробної активності даного засобу до виділеної у хворої біоплівки *C. albicans*.