

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ  
№ 139124

СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИГРИБКОВОЇ ДІЇ ЕМУЛЬСІЇ  
ЕВГЕНОЛУ В ПОЛІСОРБАТІ-80 НА ЕТАЛОННИЙ ШТАМ  
CANDIDA ALBICANS

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі **26.12.2019.**

Заступник Міністра розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України

Д.О. Романович





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **139124** (13) **U**  
(51) МПК (2019.01)  
**G01N 33/15** (2006.01)  
**C12N 1/00**  
**C12R 1/72** (2006.01)

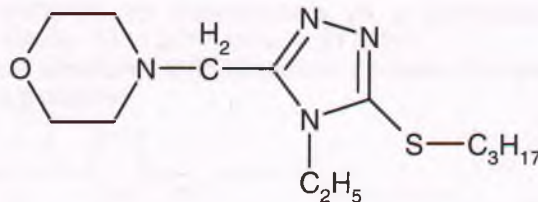
МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ  
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА  
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: <b>u 2019 05386</b>	(72) Винахідник(и): <b>Полянська Валентина Павлівна (UA), Федорченко Віра Іванівна (UA), Зачепило Світлана Вікторівна (UA), Боброва Нелля Олександрівна (UA), Лобань Галина Андріївна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>20.05.2019</b>	(73) Власник(и): <b>УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ, вул. Шевченка, 23, м. Полтава, 36011 (UA)</b>
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>26.12.2019</b>	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>26.12.2019, Бюл.№ 24</b>	

**(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИГРИБКОВОЇ ДІЇ ЕМУЛЬСІЇ ЕВГЕНОЛУ В ПОЛІСОРБАТІ-80 НА ЕТАЛОННИЙ ШТАМ CANDIDA ALBICANS****(57) Реферат:**

Спосіб визначення протигрибкової дії емульсії евгенолу в полісорбаті-80 на еталонний штам *Candida albicans* включає використання ефіру з протимікотичною активністю. Як діючу речовину на еталонний штам *C. albicans* ATCC 885-653 використовують евгенол, який емульгують в полісорбаті-80 у співвідношенні 1:1. Кількісне визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) евгенолу для культури грибів досліджують за допомогою методу послідовних макророзведень. Інокулюм готують шляхом отримання суспензії з 5 типових колоній добової культури *Candida albicans* ATCC 885-653 в рідкому середовищі Сабуро з використанням стандарту 0,5 МакФарланда.

U  
UA 139124 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до медичної мікробіології, та може бути використана як основа профілактики та лікування грибкових інфекцій.

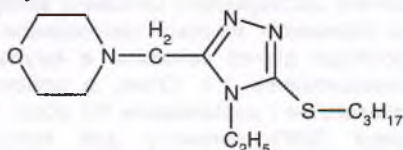
Гриби роду *Candida*, зокрема *Candida albicans*, належать до групи збудників опортуністичних інфекцій, отже, не є високо патогенними. Однак, особливості епідеміології кандидозу полягають в тому, що даний мікроорганізм може бути присутнім в складі резидентної мікрофлори здорових людей. Кандидоз, як прояв дисбіозу, виникає на тлі зниження колонізаційної резистентності слизових оболонок і шкіри в силу тих чи інших причин. Цьому може сприяти широке застосування антибактеріальних засобів (в першу чергу - антибіотиків), особливо самостійне і безконтрольне їх застосування, прийом кортикостероїдних гормонів, цитостатиків, контрацептивів.

Проблема профілактики та лікування даної опортуністичної інфекції є надзвичайно актуальною для широкого кола осіб. Схильні до виникнення кандидозу особи з тимчасовим імунodefіцитом, який виникає після перенесеного основного захворювання. Актуальною є ця проблема і для осіб з постійним порушенням імунного статусу, в тому числі для ВІЛ-інфікованих і зокрема для осіб зі СНІДом.

Розроблено ряд ефективних протигрибкових препаратів для системного, а також для місцевого застосування. Однак, недоліком хімічних препаратів часто є певний ступінь побічних дій, особливо в умовах системного застосування.

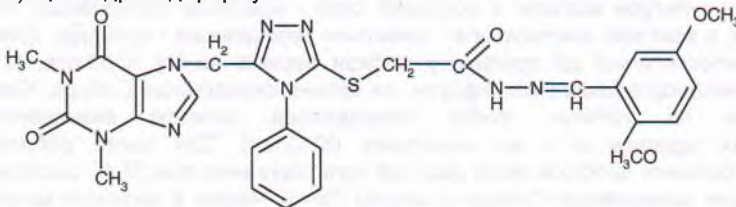
Розробка протигрибкових препаратів на основі рослинної сировини також може бути корисною, особливо це стосується препаратів для місцевого застосування. Існує велика кількість рослин і екстрактів з них, для яких характерна антимікробна активність. Однією з речовин рослинного походження зі значною антимікробною дією є еugenol. Для нього характерні антисептичні, протизапальні і знеболюючі властивості. Він широко застосовується в стоматологічній практиці як один з компонентів цинкоксидної пасти для тимчасового і постійного пломбування зубів. У той же час, еugenol не отримав широкого застосування як антисептик для зовнішнього застосування, а також для обробки слизових оболонок.

Серед тих, що відомі, є 4-((4-етил-5-(октилтіо)-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)метил)морфолін формули:



що проявляє протимікробну та протигрибкову активність. Пат. на корисну модель 120703, Україна, МПК С07D 249/00, С07D 295/00, А61К 31/00, А61Р 31/00, А61К 31/5375. 4-((4-ЕТИЛ-5-(ОКТИЛТІО)-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)МЕТИЛ)МОРФОЛІН, ЩО ПРОЯВЛЯЄ ПРОТИМІКРОБНУ ТА ПРОТИГРИБКОВУ АКТИВНІСТЬ /Книш Євгеній Григорович (UA); Панасенко Олександр Іванович (UA); Щербина Роман Олександрович (UA); Камишний Олександр Михайлович (UA); Поліщук Наталія Миколаївна (UA); заявник та патентовласник: ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Маяковського, 26, м. Запоріжжя, 69035 (UA).-№ и201705862; Заявл. 12.06.2017; Опубл. 10.11.2017, бюл. № 21 /2017;

N-(2,5-диметоксибензиліден)-2-((5-((теофілін-7'-іл)метил)-4-феніл-4Н-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетогідразид формули:



який проявляє антимікробну та протигрибкову активність. Пат. на корисну модель 122480 Україна, МПК С07D 249/08 (2006.01), А61К 31/00, А61К 31/4196 (2006.01), А61Р 31/04(2006.01), А61Р 31/10. N'-(2,5-ДИМЕТОКСИБЕНЗИЛІДЕН)-2-((5-((ТЕОФІЛІН-7'-ІЛ)МЕТИЛ)-4-ФЕНІЛ-4Н-1,2,4-ТРИАЗОЛ-3-ІЛ)ТІО)АЦЕТОГІДРАЗІД, ЯКИЙ ПРОЯВЛЯЄ АНТИМІКРОБНУ ТА ПРОТИГРИБКОВУ АКТИВНІСТЬ /Гоцуля Андрій Сергійович (UA); Панасенко Олександр Іванович (UA); Книш Євгеній Григорович (UA); Поліщук Наталія Миколаївна (UA); заявник та патентовласник: ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, пр. Маяковського,

26, м. Запоріжжя, 69035 (UA). - № u201707573; Заявл. 17.07.2017; Опубл. 10.01.2018, бюл. № 1/2018.

Найбільш близьким до запропонованого є фармацевтична композиція з антимікробною, протигрибковою і протизапальною дією, яка характеризується тим, що в її склад входять сухі екстракти трави герані сибірської і герані криваво-червоної, а також ефірна олія шавлії мускатної у співвідношенні 1:3:1,2... Пат. на корисну модель 131363 Україна, МПК А61К 36/00, А61К 36/537 (2006.01), А61К 47/46. ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ З АНТИМІКРОБНОЮ, ПРОТИГРИБКОВОЮ І ПРОТИЗАПАЛЬНОЮ ДІЄЮ НА ОСНОВІ РОСЛИННИХ ЕКСТРАКТІВ ТА ЕФІРНОЇ ОЛІЇ /Автори: Гордієнко Ольга Іванівна (UA); Грошовий Тарас Андрійович (UA); Климнюк Сергій Іванович (UA); Покришко Олена Володимирівна (UA); Бензель Ігор Леонідович (UA); Бензель Леонід Васильович (UA); заявник та патентовласник: ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД "ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ", вул. Майдан Волі, 1, м. Тернопіль, 46001 (UA). -№ u201807941; Заявл. 16.07.2018; Опубл. 10.01.2019, бюл. 10.01.2019, бюл. № 1/2019.

В основу корисної моделі поставлена задача комплексного вивчення дії евгенолу, емульгованого в Полісорбаті-80 на культуру *Candida albicans* ATCC 885-653 шляхом визначення мінімальної інгібуючої, мікоцидної та мікостатичної концентрацій, а також показників інтенсивності розмноження грибів в постмікостатичних концентраціях евгенолу.

Поставлену задачу вирішують створенням способу визначення протигрибкової дії емульсії евгенолу в полісорбаті-80 на еталонний штам *Candida albicans*, що включає використання ефіру з протимікотичною активністю, та відрізняється тим, що як діючу речовину на еталонний штам *C. albicans* ATCC 885-653 використовують евгенол, який емульгують в полісорбаті-80 у співвідношенні 1:1, кількісне визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) евгенолу для культури грибів досліджують за допомогою методу послідовних макророзведень, інокулюм готують шляхом отримання суспензії з 5 типових колоній добової культури *Candida albicans* ATCC 885-653 в рідкому середовищі Сабуро з використанням стандарту 0,5 МакФарланда. До 1 мл емульсії евгенолу з концентрацією в діапазоні від 0,1 до 0,00313 обсяг. % додають по 100 мкл культури мікроорганізмів і інкубують проби протягом діб.

Спосіб здійснювали наступним чином: як основну досліджувану речовину використовували евгенол (виробник ТОВ "Латус", Україна). Для отримання емульсії застосували емульгатор полісорбат-80, здатний забезпечити якісний розподіл діючої речовини в емульсії. Евгенол первинно емульгували в Полісорбаті-80 в співвідношенні 1:1. Отже, в робочому розчині концентрації евгенолу і полісорбату-80 були однаковими і дорівнювали 50 обсяг. %. Кількісне визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) евгенолу для культури грибів досліджували за допомогою методу послідовних макророзведень в рідкому середовищі Сабуро в діапазоні від 0,1 до 0,00313 обсяг. %. У роботі був використаний еталонний штам *C. albicans* ATCC 885-653, отриманий з ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України" (м. Київ). Інокулюм готували шляхом отримання суспензії з 5 типових колоній добової культури *Candida albicans* ATCC 885-653 в рідкому середовищі Сабуро з використанням стандарту 0,5 МакФарланда. До 1 мл емульсії евгенолу з концентрацією в діапазоні від 0,1 до 0,00313 обсяг. % додавали по 100 мкл культури мікроорганізмів і інкубували проби протягом 2 діб. Мінімальна інгібуюча концентрація препарату (МІК) визначалася за ознакою відсутності видимого росту грибів в рідкому поживному середовищі. У дослідній серії містилися всі компоненти у відповідних концентраціях. У контроль емульгатора евгенол не вносилися. Контролі культури містили: в дослідній серії - живильне середовище, полісорбат-80 (ПС-80) і культуру; в контролі емульгатора - живильне середовище і культуру. Для визначення фунгіцидної і фунгіостатичної дії препарату робили пересів вмісту пробірок, в яких видимі ознаки зростання мікроорганізмів були відсутні, на щільне середовище Сабуро. Кількісна оцінка впливу евгенолу на клітини грибів проводилася шляхом визначення кількості колонієутворюючих одиниць в 1 мл інокулюму (КУО/мл). Для цього робили пересів з досліджених і контрольних пробірок після двох діб культивування при 37 °С секторним методом на щільне живильне середовище Сабуро в чашках Петрі. Чашки з посівами витримували при 37 °С протягом доби. Контроль культури містив живильне середовище Сабуро і відповідну кількість досліджуваної культури. Контроль емульгатора містив полісорбат-80 в розведеннях, що відповідають його розведенням в дослідних пробах. Експерименти виконані в кількості 5 серій. Величини мінімальної мікостатичної і мікоцидної активності, а також кількість КУО/мл кожен раз дорівнювали постійної величини, що обумовлено, ймовірно, ступенем чутливості застосовуваних стандартних методів дослідження з одного боку, а також точністю їх відтворення. У зв'язку із зазначеним, статистична обробка даних за визначенням стандартного

відхилення отриманих показників не проводилася. Результати визначення протигрибкової дії евгенолу методом серійних розведень в рідкому середовищі Сабуро представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Визначення мінімальної інгібуючої концентрації емульсії евгенолу в Полісорбаті-80 для еталонного штаму *Candida albicans* ATCC 885-653 в рідкому середовищі Сабуро

об'єм. %. Серії експерименту	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,00313	Контроль культури
Дослід	-	-	-	+	+	+	+
Контроль емульгатора		+	+	+	+	+	+

Примітки: "+" - видиме зростання культури; "-" - відсутність видимого росту.

- 5 Середовище залишалося прозорим (видимого зростання не спостерігалось) після двох діб культивування в концентрації евгенолу до 0,025 об'єм. % включно, а в контролі емульгатора в концентрації 0,1 обсяг. %. Таким чином, МІК евгенолу для культури *Candida albicans* ATCC 885-653 становила 0,025 об'єм. %, а полісорбату - 80-0,1 об'єм. %. У той же час, після пересіву вмісту пробірок на середовище Сабуро в чашках Петрі, відсутність зростання виявлено в
- 10 концентрації до 0,05 об'єм. % (що розцінювалося як мінімальна фунгіцидна концентрація). В контролі емульгатора в зазначених розведеннях фунгіцидна активність не виявлена.

Таблиця 2

Визначення мінімальної мікоцидної і мікостатичної концентрації емульсії евгенолу в Полісорбаті-80 для еталонного штаму *Candida albicans* ATCC 885-653

об'єм. %. Серії експерименту	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,00313	Контроль культури
Дослід	-	-	+	+	+	+	+
Контроль емульгатора	+	+	+	+	+	+	+

Примітки: "+" - видиме зростання культури; "-" - відсутність видимого росту.

- 15 Механізм антимікробної активності евгенолу полягає у впливі на синтез компонентів клітинної стінки (бета-гліканов, хітину, Манану) шляхом впливу на важливі мембрано-зв'язані ферменти. Вплив на структуру оболонки *C. albicans* вважається практично значущим, оскільки це означає можливість впливу на такий фактор патогенності, як адгезивні властивості (зменшення здатності гриба колонізувати тканини організму-хазяїна). Також це призводить до
- 20 морфологічної трансформації в гіфів форму (збільшення його інфекційності). Результати секторного посіву представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Кількість КУО/мл еталонного штаму *Candida albicans* ATCC 885-653 в середовищі Сабуро в умовах культивування з різними концентраціями емульсії евгенолу в Полісорбаті-80.

об'єм. %. Серії експерименту	0,1	0,05	0,025	0,0125	0,00625	0,00313	Контроль культури
Дослід	-	-	$<10^3$	$5 \times 10^7$	$5 \times 10^7$	$5 \times 10^7$	$5 \times 10^6$
Контроль емульгатора	$<10^3$	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$

- 25 В контролі культури кількість КУО/мл дорівнювало  $5 \times 10^6$ . Евгенол в концентрації 0,025 об'єм. % зменшував кількість КУО/мл до  $<10^3$ . У концентраціях від 0,0125 до 0,00313 об'єм. % Кількість КУО перевищувало відповідний показник контролю на один порядок, стабільно

рівняючись  $5 \times 10^7$ , Таке збільшення кількості КУО/мл в дослідних пробірках в інтервалі концентрацій евгенолу від 0,0125 до 0,00313 об'єм.% в порівнянні з контролем (постмікостатична дія), заслуговує додаткового аналізу.

- 5 В результаті проведених досліджень було встановлено, що евгенол, емульгований в Полісорбаті-80, надає високу протигрибкову дію на культуру *Candida albicans* ATCC 885-653 (мінімальна мікоцидна концентрація склала 0,5 об'єм.%). Мінімальна мікостатична концентрація - 0,025 об'єм.%). Постмікостатична концентрація евгенолу приводить до збільшення кількості КУО/мл в порівнянні з контролем в 10 разів.

#### 10 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб визначення протигрибкової дії емульсії евгенолу в полісорбаті-80 на еталонний штам *Candida albicans*, що включає використання ефіру з протимікотичною активністю, який **відрізняється** тим, що як діючу речовину на еталонний штам *C. albicans* ATCC 885-653 використовують евгенол, який емульгують в полісорбаті-80 у співвідношенні 1:1, кількісне визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) евгенолу для культури грибів досліджують за допомогою методу послідовних макророзведень, інокулюм готують шляхом отримання суспензії з 5 типових колоній добової культури *Candida albicans* ATCC 885-653 в рідкому середовищі Сабуро з використанням стандарту 0,5 МакФарланда.
- 15 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що до 1 мл емульсії евгенолу з концентрацією в діапазоні від 0,1 до 0,00313 об'єм.% додають по 100 мкл культури мікроорганізмів і інкубують проби протягом 2 діб.
- 20

---

Комп'ютерна верстка С. Чулій

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,  
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601