

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-160-162

УДК 616.932:614.8

А.В. Тюрина¹, Н.Е. Гаевская¹, Е.А. Синельник², И.А. Иванова¹, А.В. Филиппенко¹, Н.Д. Омельченко¹,
А.А. Труфанова¹, М.П. Погожова¹, А.О. Анопrienko¹, Н.И. Пасюкова¹

Оценка безопасности смеси холерных бактериофагов на модели экспериментальных животных

¹ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация;
²ГБУ РО «Областная клиническая больница № 2», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Распространение штаммов *Vibrio cholerae*, обладающих множественной антибиотикоустойчивостью, обусловливает необходимость поиска альтернативных антибиотикам средств. Такими средствами могут стать холерные бактериофаги. **Цель** работы – изучение безопасности смеси холерных бактериофагов на модели экспериментальных животных. **Материалы и методы.** В работе использовали композицию на основе холерных фагов Rostov-M3, Rostov-13, FB1. Проведена оценка токсичности препарата, цитотоксического и апоптогенного влияния на экспериментальных животных. **Результаты и обсуждение.** Показано, что однократное введение максимальной определенной дозы смеси фагов не вызывает негативного воздействия на организм лабораторных животных. Сравнение с контролем не показало статистически достоверных отличий гистологической картины в органах опытных животных после длительного введения препарата. Также после однократного и повторного семидневного приема данные фаги не вызывают апоптоза и некроза иммунокомпетентных клеток экспериментальных животных. Результаты данных исследований свидетельствуют о безопасности 3-компонентной фаговой композиции и в перспективе могут быть использованы для дальнейшей разработки новых биопрепаратов на основе холерных бактериофагов.

Ключевые слова: бактериофаги, профилактика холеры, аномальная и хроническая токсичность, апоптогенное и цитотоксическое влияние.

Корреспондирующий автор: Тюрина Анна Владимировна, e-mail: tyurina.anuta2010@yandex.ru.

Для цитирования: Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Синельник Е.А., Иванова И.А., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Погожова М.П., Анопrienko А.О., Пасюкова Н.И. Оценка безопасности смеси холерных бактериофагов на модели экспериментальных животных. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2023; 4:160–162. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-160-162

Поступила 09.06.2023. Отправлена на доработку 04.09.2023. Принята к публ. 23.11.2023.

A.V. Tyurina¹, N.E. Gaevskaya¹, E.A. Sinel'nik², I.A. Ivanova¹, A.V. Filippenko¹, N.D. Omel'chenko¹,
A.A. Trufanova¹, M.P. Pogozhova¹, A.O. Anoprienko¹, N.I. Pasyukova¹

Assessment of Cholera Bacteriophages Mixture Safety on an Experimental Animal Model

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

²Regional Clinical Hospital No. 2, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The spread of *Vibrio cholerae* strains with multiple antibiotic resistance necessitates the search for alternatives to antibiotics. Cholera bacteriophages can become such means. **The aim** of the work was to study the safety of a mixture of cholera bacteriophages using an experimental animal model. **Materials and methods.** We used a composition based on cholera phages Rostov-M3, Rostov-13, FB1. The toxicity of the drug, cytotoxic and apoptogenic effects in experimental animals were assessed. **Results and discussion.** It has been shown that a single administration of the maximum defined dose of the mixture of phages does not cause negative effects on the body of laboratory animals. Comparison with the control group has not revealed statistically significant differences in the histological picture in the organs of the experimental animals after long-term administration of the drug. Also, after a single and repeated seven-day administration, these phages do not cause apoptosis and necrosis of immune competent cells in experimental animals. The results of the studies indicate the safety of the 3-component phage composition and can be used for the further development of new biological products based on cholera bacteriophages in the future.

Key words: bacteriophages, cholera prevention, abnormal and chronic toxicity, apoptogenic and cytotoxic effects.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Bioethics: All stages of the research complied with the legislation of the Russian Federation, international ethical standards and regulatory documents of the institution, and were also approved by the bioethics commission of the Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute of the Rospotrebnadzor.

Corresponding author: Anna V. Tyurina, e-mail: tyurina.anuta2010@yandex.ru.

Citation: Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Sinel'nik E.A., Ivanova I.A., Filippenko A.V., Omel'chenko N.D., Trufanova A.A., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O., Pasyukova N.I. Assessment of Cholera Bacteriophages Mixture Safety on an Experimental Animal Model. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 4:160–162. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-4-160-162

Received 09.06.2023. Revised 04.09.2023. Accepted 23.11.2023.

Tyurina A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9359-3997>
Gaevskaya N.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0762-3628>
Sinel'nik E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2201-5065>
Ivanova I.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7068-4071>
Filippenko A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1103-4244>

Omel'chenko N.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5208-7724>
Trufanova A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4770-5994>
Pogozhova M.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9779-3577>
Anoprienko A.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8466-9315>
Pasyukova N.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1525-5693>

В результате широкого распространения антибиотикоустойчивости *Vibrio cholerae* заболевание холерой представляет серьезную проблему для современного здравоохранения [1]. В связи с этим сохраняет актуальность проблема расширения арсенала профилактических средств, обладающих направленным бактерицидным действием в отношении холерных вибрионов. В качестве одного из таких средств рассматриваются бактериофаги [2].

Основными преимуществами фагопрофилактики являются отсутствие побочных эффектов, совместимость с любыми фармакологическими препаратами, безопасность приема во время беременности, возможность применения пациентами с аллергическими реакциями, стимуляция факторов специфического и неспецифического иммунитета [3]. Также фагопрофилактика показана детям до двух лет, что является важным аспектом при разработке средств лечения и профилактики инфекционных болезней [4].

Одним из важных критериев разработки новых фармакологических препаратов, в том числе и фаговых, является проведение токсикологических исследований на здоровых животных, так как выявление патологий, развивающихся в результате введения исследуемого вещества, позволяет получить дополнительную информацию о его токсичности для корректировки дозы и состава.

Целью нашей работы стало изучение аномальной (острой) и хронической (подострой) токсичности смеси холерных бактериофагов, апоптогенного и цитотоксического влияния на иммунокомпетентные клетки экспериментальных животных.

Материалы и методы

В работе использовалась фаговая композиция, в состав которой вошли холерные бактериофаги Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 из коллекции-депозитария лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Изучение свойств бактериофагов проводили общепринятыми методами [5].

Фаги, взятые в эксперимент, подвергали стерилизующей фильтрации с помощью насадки Filtropur S 0,22 мкм. Очистку от эндотоксинов проводили на хроматографической колонке Endo Trap HD (Германия) согласно инструкции производителя. После фильтрации фаги были соединены в равных соотношениях.

Все стадии исследований соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения, а также были одобрены комиссией по биоэтике ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Для статистической обработки все эксперименты проводили в трех повторах.

Для проведения опыта по оценке аномальной токсичности в эксперимент взяты беспородные бе-

лые мыши с массой тела 18–20 г. Животных разделили на три группы по 10 особей. Фаговую композицию (Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1) вводили экспериментальным животным разными способами в максимальной определенной (опытной) дозе [6] в концентрации $n \cdot 10^8$ – $n \cdot 10^9$ БОЕ/мл. Испытуемое средство вводили животным однократно, первой группе – по 1,0 мл внутривентриально, второй группе – по 0,5 мл подкожно в область задней лапы, третьей группе – 0,5 мл *per os*. Также исследование аномальной токсичности было выполнено на четырех здоровых кроликах (2–2,5 кг). Данным животным перорально вводили одну разовую максимальную определенную (опытную) дозу испытуемого препарата по 10,0 мл ($n \cdot 10^8$ – $n \cdot 10^9$ БОЕ/мл). За испытуемыми наблюдали в течение 14 суток. Контрольные группы животных получали перорально забуференный раствор натрия хлорида (ЗФР) 0,9 % в объемах, аналогичных опытным группам.

Эксперимент по оценке хронической (подострой) токсичности проведен на 20 здоровых белых мышях (20–24 г). Первой группе (10 животных) препарат вводили внутривентриально один раз в день по 0,5 мл ($n \cdot 10^8$ – $n \cdot 10^9$ БОЕ/мл) в течение 15 дней. Второй группе (10 животных) препарат вводили внутривентриально в той же дозе один раз в день по 0,5 мл в течение 21 дня. Контрольные группы получали перорально ЗФР в том же объеме. У взятых в опыт животных ежедневно проводили осмотр на наличие клинических симптомов общей интоксикации, а также измеряли массу тела (протокол заседания Комиссии по биоэтике от 25.03.2021 № 3).

По окончании сроков наблюдения (15-й и 21-й день) проводили эвтаназию белых мышей с соблюдением требований биоэтики, после чего осуществляли их вскрытие. Полученные паренхиматозные органы и их фрагменты сразу фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине. Подготовка гистологических препаратов проводилась по стандартной методике [7]. Тканевые образцы заключали в парафин и с помощью микротомы получали полутонкие срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологическое исследование проводилось на моторизованном микроскопе Leica DM 6000 (Германия).

Для оценки апоптогенной и цитотоксической активностей взрослым кроликам (три группы по два кролика весом 1,5 кг) внутривентриально через зонд вводили по 3 мл смеси бактериофагов (Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1) в концентрации $n \cdot 10^8$ – $n \cdot 10^9$ БОЕ/мл в течение 7 дней. Контрольным животным вводили раствор натрия хлорида 0,9 % в объемах, аналогичных опытным группам. Забор крови осуществляли из ушной вены кролика в вакуумные пробирки с гепарином. Цельную кровь окрашивали реагентами из набора Annexin V (eBioscience, США). На проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США) проводили подсчет относительно количества жизнеспособных клеток в состоянии

апоптоза и некроза, оценивали не менее 10 тыс. событий (протокол заседания Комиссии по биоэтике от 08.06.2021 № 5).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием пакета прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007). Значения доверительных интервалов среднеарифметического (M) определяли для уровня достоверности (P) 95 %. Отличия считали значимыми при $p < 0,05$. Для выявления достоверности различий между независимыми выборками использовали непараметрический критерий Манна – Уитни. Как значимый оценивался уровень $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Оценка аномальной и хронической токсичности на двух экспериментальных моделях показала, что при любом способе введения однократной максимально определенной для животных дозы испытуемые фаги не являются токсичными, так как признаков интоксикации у мышей и кроликов не наблюдали. Также установлено, что при длительном пероральном приеме коктейля бактериофагов внешний вид и привес мышей, поведенческие реакции в экспериментальной и контрольной группах не отличались.

Исследование гистологических препаратов органов, взятых для исследования на 15-е и 21-е сутки эксперимента, не выявило патологических изменений, значимых для здоровья животных. Анализ полученных данных показал, что количество животных в опытных группах, имеющих изменения в органах, достоверно не отличалось от такового в контрольных группах.

Оценка цитотоксического и апоптогенного влияния смеси холерных фагов на форменные элементы крови взрослых кроликов показала, что прием данного коктейля в течение 7 дней не вызывает увеличения количества иммунокомпетентных клеток в состоянии апоптоза и не оказывает цитотоксического эффекта. Количество жизнеспособных моноцитов, лимфоцитов, нейтрофилов у опытных животных статистически не отличалось от аналогичных показателей контрольных групп кроликов. Такая же тенденция сохранялась и после повторного введения (в течение 7 дней) смеси бактериофагов этой группе кроликов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о безопасности смеси холерных фагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 для экспериментальных животных и, после оценки ее профилактической эффективности, могут быть использованы для разработки экспериментального профилактического фагового препарата, способного расширить возможности профилактических мероприятий против холеры.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Биоэтика. Все стадии исследований соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам учреждения, а также были одобрены комиссией по биоэтике ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Список литературы

1. Das B., Verma J., Kumar P., Ghosh A., Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*. 2020; 1:A83–A92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031.
2. Kakasis A., Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2019; 53(1):16–21. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004.
3. Ильина Т.С., Толордава Э.Р., Романова Ю.М. Взгляд на фаготерапию через 100 лет после открытия бактериофагов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2019; 37(3):103–12. DOI: 10.17116/molgen201937031103.
4. Хавкин А.И., Алешкин А.В., Зейгарник М.В. Перспективы фаготерапии при болезнях органов пищеварения у детей. *Вопросы практической педиатрии*. 2018; 13(4):82–90. DOI: 10.20953/1817-7646-2018-4-82-90.
5. Адамс М. Бактериофаги. М.; 1961. 527 с.
6. Хабриев Р.У., редактор. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина; 2005. 832 с.
7. Прудников В.С., Луппова И.М., Жуков А.И., Федотов Д.Н. Организация гистологических исследований, техника изготовления и окраски гистопрепаратов. Витебск; 2011. 28 с.

References

1. Das B., Verma J., Kumar P., Ghosh A., Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*. 2020; 1:A83–A92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031.
2. Kakasis A., Panitsa G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2019; 53(1):16–21. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004.
3. Il'ina T.S., Tolordava E.R., Romanova Yu.M. [A view on the phage therapy 100 years after the discovery of bacteriophages]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2019; 37(3):103–12. DOI: 10.17116/molgen201937031103.
4. Khavkin A.I., Aleshkin A.V., Zeigarnik M.V. [Prospects for phage therapy in case of digestive system diseases in children]. *Voprosy Prakticheskoy Pediatrii [Clinical Practice in Pediatrics]*. 2018; 13(4):82–90. DOI: 10.20953/1817-7646-2018-4-82-90.
5. Adams M. [Bacteriophages]. Moscow; 1961. 527 p.
6. Khabriev R.U., editor. [Guidelines for Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances]. Moscow: "Medicine"; 2005. 832 p.
7. Prudnikov V.S., Luppova I.M., Zhukov A.I., Fedotov D.N. [Organization of Histological Studies, Techniques for Making and Staining Histological Preparations]. Vitebsk; 2011. 28 p.

Authors:

Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Ivanova I.A., Filippenko A.V., Omel'chenko N.D., Trufanova A.A., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O., Pasyukova N.I. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.
Sinel'nik E.A. Regional Clinical Hospital No. 2. 33, 1st Cavalry Army St., Rostov-on-Don, 344029, Russian Federation.

Об авторах:

Тюрин А.В., Гаевская Н.Е., Иванова И.А., Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Труфанова А.А., Погужова М.П., Аноприенко А.О., Пасюкова Н.И. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.
Синельник Е.А. Областная клиническая больница № 2. Российская Федерация, 344029, Ростов-на-Дону, ул. 1-й Конной Армии, 33.