

*На правах рукописи*

**Тюрина Анна Владимировна**

**ОСНОВНЫЕ АСПЕКТЫ РАЗРАБОТКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО  
ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ХОЛЕРНЫХ  
БАКТЕРИОФАГОВ**

**1.5.6 – Биотехнология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

Ростов-на-Дону – 2025

Работа выполнена в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора)

**Научный руководитель:**

Кандидат медицинских наук

**Гаевская Наталья Евгеньевна**

**Официальные оппоненты:**

**Матвеева Ирина Николаевна** - доктор биологических наук, профессор, Федеральное Государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, лаборатория молекулярной биологии и вирусологии, заведующая

**Жарникова Ирина Викторовна** - доктор биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, научно-производственная лаборатория препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций, ведущий научный сотрудник

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании Диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан: «\_\_» \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

**Борисова Ольга Юрьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Современные системы здравоохранения сталкиваются с серьезными вызовами, связанными с постоянными сезонными вспышками холеры в эндемичных регионах и стремительным распространением антибиотикорезистентных штаммов *Vibrio cholerae* (Safa A. et al., 2010; Das B. et al., 2020; Bagheri-Josheghani S. et al., 2021). Неблагоприятная обстановка по холере ежегодно обостряется происходящими в мире чрезвычайными ситуациями биолого-социального характера (Карнаухов И.Г. и др., 2012; Москвитина Э.А. и др., 2020; Носков А.К. и др., 2023).

В настоящее время основным методом профилактики холеры остается проведение вакцинации (СанПиН 3.3686-21). Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рекомендует профилактические меры, включающие массовую вакцинацию против холеры в эндемичных странах. Для чрезвычайных ситуаций в 2013 г. при поддержке Глобального альянса по иммунизации был создан запас трех оральных вакцин против холеры, получивших предварительное одобрение ВОЗ: Dukoral (SBL, Швеция), Shanchol (Shantha Biotechnics, Индия) и Euvichol (EuBiologics, Южная Корея). Современные вакцины против холеры, несмотря на их доказанную эффективность, имеют ряд существенных ограничений в применении. К основным противопоказаниям относятся: возраст младше 2 лет, период грудного вскармливания, наличие хронических заболеваний в стадии декомпенсации, а также индивидуальная непереносимость компонентов вакцины. Как и другие биологические препараты, противохолерные вакцины могут вызывать ряд побочных реакций, что подтверждается многочисленными клиническими наблюдениями (Ryan E.T. et al., 2000; Hill D.R. et al., 2006; Wong K.K. et al., 2017). Данные ограничения существенно сужают круг лиц, которым может быть проведена вакцинопрофилактика, особенно в эндемичных регионах с высоким уровнем заболеваемости, то есть имеющиеся холерные вакцины не могут в полной мере обеспечить полноценную защиту населения.

Современные протоколы лечения холеры включают два основных направления (WHO/CDC/CSR/EDC/1999; Leibovici-Weissman Y. et al., 2014): патогенетическую (коррекция водно-электролитного баланса) и этиотропную терапию (элиминация возбудителя и сокращение вибриононосительства). Однако антибактериальная терапия сопряжена с рядом проблем: это побочные реакции на препараты (Granowitz E.V. et al., 2008; Чашина И.Л., 2014), ускоренное развитие антибиотикорезистентности (Селянская Н.А. и др., 2019; Das B. et al., 2020) и снижение эффективности лечения и рост смертности (Olesen S.W. et al., 2018). Особенно актуальны эти проблемы при холере, где резистентность существенно осложняет терапию (Kitaoka M. et al., 2011; Verma J. et al., 2019).

В связи с этим особую актуальность приобретает разработка новых действенных препаратов антимикробного действия, что отражено в декларациях, решениях и других документах ВОЗ (G20 Leaders' Declaration: Shaping an interconnected world 2017). В России вопросы противодействия биологическим угрозам, включая распространение опасных инфекционных заболеваний, находят свое отражение в системе стратегического планирования. Ключевыми нормативно-правовыми актами в этой сфере являются Федеральный закон "О биологической безопасности" и "Основы государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 г." (Давыдов Д.С., 2018, 2023). Эти документы формируют правовую основу для комплексного подхода к обеспечению биологической безопасности страны.

Особое значение в контексте борьбы с инфекционными заболеваниями приобретает проблема антимикробной резистентности. Для ее решения в России реализуется ряд важных инициатив. Это программа "СКАТ для стационаров" (Яковлев С.В. и др., 2018), направленная на оптимизацию использования антимикробных препаратов в медицинских учреждениях, а также Государственная стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности на период до 2030 года (Распоряжение Правительства РФ №2045-р от 25.09.2017 г.), которая включает мониторинг резистентности микроорганизмов, контроль за применением антибиотиков и развитие научных исследований в этой области.

Важным аспектом стратегических документов является акцент на разработку инновационных иммунобиологических и биотехнологических препаратов. Это направление рассматривается как перспективная альтернатива традиционной антимикробной терапии, особенно в условиях роста резистентности возбудителей. В частности, особые надежды возлагаются на развитие фаговой терапии и профилактики, что может существенно повысить эффективность борьбы с опасными инфекциями.

### **Степень разработанности темы исследования**

Современные исследования подтверждают эффективность бактериофагов для лечения и профилактики многих инфекций, особенно вызванных антибиотикорезистентными штаммами (Metersky M.L. et al., 2017; Бахрушина Е.О. и др., 2022). В России, согласно данным Государственного реестра лекарственных средств (ГРЛС), по состоянию на конец 2024 г. производилось 13 торговых наименований лечебно-профилактических препаратов бактериофагов, производителем которых является АО «НПО «Микроген». НПЦ «Микромир» производит бактериофаг-содержащие гели, которые не являются лекарственными средствами (Власов В.В. и др., 2020; Давыдов Д.С., 2023).

Однако применение коммерческих фаговых композиций не всегда является эффективным, что свидетельствует о необходимости индивидуального подбора состава препаратов бактериофагов к конкретному штамму возбудителя (Власов В.В. и др., 2020; Leitner L. et al., 2021) и комплексного рассмотрения терапии данными биосредствами (Furfaro L.L. et al., 2018; Давыдов Д.С., 2023). В современных исследованиях (Алешкин В.А. и др., 2016; Ujmajuridze A. et al., 2018; Иванова И.А. и др., 2019; Łusiak-Szelachowska M. et al., 2021) активно изучается иммунный ответ при фаготерапии, однако остаются нерешенными ключевые вопросы о влиянии иммунных реакций на эффективность лечения. В частности, отсутствует комплексная оценка: степени нейтрализации фагов антителами, формирования клеточного иммунитета, долгосрочной динамики гуморального ответа, корреляции между иммуногенностью фагов и их терапевтической активностью.

В последнее десятилетие идет успешное использование коммерческих бактериофагов для профилактики и лечения различных кишечных инфекций (Лыско К.А. и др., 2013; Alomari M.M.M. et al., 2021), однако в арсенале профилактических средств отсутствуют холерные препараты. Анализ состояния проблемы расширения числа устойчивых к антибактериальным препаратам штаммов *V. cholerae*, увеличение спектра антибиотикорезистентности на современном этапе течения седьмой пандемии дают основание говорить не только о необходимости использования фагов для профилактики и лечения холеры, но и актуальности разработки новых методических подходов для ее решения (Гаевская Н.Е. и др., 2004).

**Цель исследования** - экспериментальное обоснование возможности создания препарата на основе холерных бактериофагов, его характеристика, оценка безопасности и профилактической активности в отношении холерных вибрионов O1 серогруппы.

### **Задачи исследования:**

1. Отобрать наиболее перспективные холерные бактериофаги из коллекции-депозитария лаборатории бактериофагов и изучить их биологические свойства.
2. Осуществить молекулярно-генетический анализ набора холерных бактериофагов.
3. Разработать способ получения очищенной биомассы маточных холерных бактериофагов с наибольшим титром вирусных частиц.
4. Определить безопасность холерных бактериофагов и их смеси по следующим критериям: аномальной и хронической токсичности, апоптогенному и цитотоксическому влиянию на экспериментальных животных.
5. Оценить формирование системного и местного гуморального иммунного ответа у экспериментальных животных после введения холерных фагов и их смеси.
6. Оценить фармакокинетику и профилактическую эффективность экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов на биологических моделях.

### **Научная новизна работы**

Впервые проведена биологическая и генетическая характеристика холерных бактериофагов из коллекции-депозитария. Были отобраны вирулентные фаги с высокой литической активностью, полученные из объектов окружающей среды и лизогенных штаммов микроорганизмов (свидетельство о регистрации базы данных «Коллекция-депозитарий бактериофагов микроорганизмов III-IV групп патогенности» № 2022620881 от 19.04.2022 г.).

Разработан метод получения очищенной биомассы холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13, обеспечивающий наибольший выход вирусных частиц при соблюдении норм биологической безопасности. Очищенные фаголизаты включены в состав экспериментального профилактического препарата и соответствуют всем требованиям для проведения исследований *in vivo*.

Экспериментальные исследования фармакокинетики продемонстрировали, что профилактический препарат на основе холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13 обладает способностью к длительной персистенции в организме. Научные данные свидетельствуют, что после курсового введения (5 и 7 дней) фаговая композиция продолжает выделяться с фекалиями лабораторных мышей на протяжении 21 суток после последнего введения, даже при отсутствии гомологичных штаммов *Vibrio cholerae*, данный срок может быть достаточным для реализации ее профилактического потенциала.

Впервые результаты экспериментальных исследований продемонстрировали, что бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13 – как при индивидуальном применении, так и в составе комбинированного препарата – не оказывают токсического воздействия на ключевые физиологические параметры лабораторных животных (отсутствие негативного влияния на: паренхиматозные органы (печень, почки, селезенку), гистологическую структуру тканей (сохранение нормальной морфологии), функциональную активность иммунокомпетентных клеток (отсутствие иммуносупрессии)).

Получены данные в отношении системного и местного гуморального иммунного ответа на введение как отдельных холерных бактериофагов, так и их смеси. Впервые показано, что после первичного курсового приема смеси Rostov-M3 и Rostov-13 в сыворотке крови и кишечнике экспериментальных животных регистрируется наличие специфических антител в невысоких титрах, не влияющих на ее эффективность, при повторном введении коктейля бактериофагов количество антифаговых антител увеличивается, но не препятствует реализации профилактической способности

экспериментального препарата.

Впервые экспериментально доказано, что пятидневный профилактический курс бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13 (как в виде монопрепаратов, так и в составе комбинированного средства) обеспечивает высокоэффективную защиту взрослых кроликов от заражения холерным вибрионом (Патент на изобретение РФ № RU2783000C1).

Впервые разработан экспериментальный профилактический препарат на основе холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13 с учетом его эффективности и безопасного действия в соответствии с требованиями, предъявляемыми к лечебно-профилактическим препаратам.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы заключается в расширении фундаментальных представлений о взаимодействии бактериофагов с макроорганизмом. Установлены закономерности персистенции холерных фагов Rostov-13 и Rostov-M3, включая длительное сохранение в отсутствие специфического хозяина, особенности распределения в организме, устойчивость к факторам иммунной защиты. Полученные данные вносят вклад в развитие фаговой экологии, раскрывая новые аспекты фаговых взаимодействий, и формируют базу для разработки новых подходов к созданию биопрепаратов на основе бактериофагов.

Диссертационная работа предлагает новое решение в области противоэпидемических мероприятий, демонстрируя возможность создания биологических профилактических средств на основе строго специфичных бактериофагов. Результаты исследования формируют теоретический фундамент для развития перспективного направления - фагопрофилактики особо опасных инфекций, что особенно актуально в условиях нарастающей антибиотикорезистентности.

Полученные результаты позволяют рассматривать Rostov-M3 и Rostov-13 в качестве перспективной основы для создания эффективных и безопасных профилактических препаратов против холерной инфекции.

Разработаны нормативные документы - Регламент получения и Инструкция по изготовлению и контролю препарата, утвержденные Ученым Советом Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (протокол №11 от 31.10.2022).

Научные данные, полученные в ходе работы, включены в монографию "Холера. Эпидемиология, диагностика, клиника, лечение, профилактика" (2024 г., 718 с., ISBN 978-5-98615-649-1); в Федеральные методические рекомендации МР 4.2.0263-21, регламентирующие работу с бактериофагами микроорганизмов I-IV групп патогенности. Депонирован в Государственную коллекцию патогенных бактерий Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт Микроб» Роспотребнадзора штамм *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор 20554, который может использоваться для размножения холерного бактериофага Rostov-M3 (KM 2157, 11.10.2023 г.).

Определены полногеномные нуклеотидные последовательности трех штаммов *Vibrio phage* (Rostov-1, Rostov-6, Rostov-13), депонированные в Международной базе данных GenBank, номера доступа (MG957431, MH105773, OK169294-OK169295).

Научные результаты диссертации используются сотрудниками Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт Микроб» Роспотребнадзора при выполнении научной темы № 228-4-24 (акт внедрения от 25.03.2024 г.), а также сотрудниками Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский институт» Роспотребнадзора при изучении влияния экзометаболитов

микробиома кишечника на рост холерного вибриона с целью разработки новых препаратов на основе бактериофагов (акт внедрения от 12.02.2025 г.).

Результаты диссертационного исследования включены в программы повышения квалификации Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (акт внедрения от 10.02.2025 г.).

### **Методология и методы исследования**

Методологическая основа диссертационного исследования была разработана в строгом соответствии с поставленными научными целями и задачами. В работе применялся комплекс современных исследовательских подходов, включающий: биологические (изучение взаимодействия фагов с бактериальными клетками, оценка профилактической эффективности *in vivo*), бактериологические (культивирование, выделение чистых культур), серологические (анализ иммунного ответа), молекулярно-генетические (характеристика геномов фагов), биотехнологические (оптимизация производства фаговых препаратов, стандартизация методов контроля качества) методы.

Все этапы экспериментальных исследований проводились в строгом соответствии с законодательством РФ, с соблюдением международных биоэтических норм (Хельсинкская декларация, Директива 2010/63/EU). Также в соответствии с внутренними регламентами исследования одобрены Комиссией по биоэтике ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протоколы № 2 от 12.02.2021; № 3 от 25.03.2021; № 5 от 08.06.2021; № 8 от 28.09.2021; № 4 от 20.04.2022; № 6 от 13.05.2022; №3 от 14.02.2024). Для обеспечения достоверности результатов каждый эксперимент повторялся не менее 3 раз, использовались статистические методы анализа данных.

### **Объекты исследования**

Штаммы холерных вибрионов. Использовали культуры патогенных микроорганизмов, полученные из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Холерные бактериофаги. В работу были отобраны из коллекции-депозитария лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора фаги Rostov-1, Rostov-6, Rostov-7, Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1.

### **Материалы исследования**

Питательные среды. При работе с культурами холерных вибрионов O1, O139 серогруппы и холерными бактериофагами использовали следующие лабораторно приготовленные питательные среды: 1% пептонная вода (ПВ, рН 8,4), щелочной агар (ЩА, рН 8,0), 0,3% ЩА (рН 8,0), 0,3%, 0,7% и 1,5% агар Мартена (рН 7,7), а также бульон Мартена (рН 7,7). Питательные среды готовили согласно инструкции производителя и методическим указаниям (МУК 4.2.3745-22).

Лабораторные животные. Для проведения исследований *in vivo* были использованы лабораторные животные: аутбредные мыши (6-10 недель, масса 17-20 г) и взрослые кролики (1,5-4 месяца, масса 1,5-3,5 кг), полученные из сертифицированного питомника ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

### **Методы исследования**

Работу с фагами осуществляли стандартными методами (Адамс М., 1961; Габриелович И.М., 1968). Оценку спектра литической активности фагов осуществляли с помощью метода Грациа в соответствии с ОФС 1.7.1.0002.15 «Бактериофаги лечебно-профилактические». Антифаговые сыворотки получали путем внутривенной иммунизации кроликов возрастающими дозами холерных

бактериофагов (Марьина Ю.Н., 1941). Титр специфических иммуноглобулинов G (IgG) в сыворотке крови кроликов определяли методом ИФА.

Выделение ДНК фагов проводили в соответствии со стандартными методиками (Yamamoto K.R., 1970; Маниатис Т. и др., 1984). Сравнение собранных геномов бактериофагов проводили при помощи алгоритма BLASTN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Наличие или отсутствие генов, характерных для умеренных и вирулентных бактериофагов определяли программой «PhageAnalyzer» (Свидетельство о государственной регистрации № 2019616060 от 17.05.2019).

Фармакокинетику экспериментального профилактического коктейля изучали на двух моделях лабораторных животных (белые мыши, кролики), используя рекомендации Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

Безопасность экспериментального профилактического коктейля оценивали в опытах по изучению острой и хронической (подострой) токсичности, а также аптогенного и цитотоксического влияния на лабораторных животных в соответствии с «Государственной Фармакопеей РФ» и Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза», используя «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Хабриев Р.У., 2005).

Эффективность экспериментального профилактического коктейля оценивали на модели генерализованной инфекции у белых мышей и изолированной петли тонкого кишечника взрослого кролика (Burrows W. et al., 1974).

Статистические методы. Использовали пакет прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007), Microsoft Excel 2010 и StatSoft Statistica Windows 10.01. Значения доверительных интервалов среднеарифметического (M) определяли для уровня достоверности (P) 95%. Для выявления достоверности различий между независимыми выборками использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Сравнение совокупностей по качественным признакам осуществляли с помощью критерия Фишера. Отличия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

#### **Личный вклад автора в исследования**

Автор осуществил комплексный вклад в исследование, включающий системный анализ научной литературы и разработку концепции исследования, планирование и проведение экспериментов (отбор фаговых штаммов, оценка их свойств *in vitro* и *in vivo*), статистическую обработку данных современными методами, подготовку публикаций и презентацию результатов. Личное участие автора составило 92% работы, включая наиболее ответственные этапы: разработку экспериментальных протоколов, проведение ключевых опытов, интерпретацию данных и формулирование выводов.

Исследования по безопасности и эффективности экспериментального препарата проведены на базе лаборатории экспериментально-биологических моделей и биологической безопасности (и.о. зав. лабораторией, к.м.н. Д.А. Левченко). Геномный анализ холерных бактериофагов (секвенирование и биоинформатика) выполнен на базе лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций (и.о. зав. лабораторией, к.б.н. Р.В. Писанов). Изучение иммунного ответа у экспериментальных животных проведено на базе лаборатории иммунологии (и.о. зав. лабораторией, к.б.н. И.А. Иванова). Гистологические исследования проведены на базе патологоанатомического отделения Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Ростовской области "Областная клиническая больница №2" (зав. отделением Е.А. Синельник).

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Холерные бактериофаги Rostov-13, Rostov-M3 и ФБ1, охарактеризованные по биологическим и генетическим свойствам, обладают строгой литической активностью в отношении *V. cholerae* серогрупп О1 и О139, не содержат генов интеграз, антибиотикорезистентности и токсинов, что подтверждает их безопасность и перспективность использования в качестве основы для разработки профилактических препаратов против холеры.

2. Разработанный технологический способ получения очищенных жидких форм маточных бактериофагов Rostov-13 и Rostov-M3 обеспечивает увеличение концентрации активных фаговых частиц до  $10^8$ – $10^9$  БОЕ/мл, что на порядок превышает стандартные показатели и создает основу для дальнейших исследований *in vivo*.

3. Бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13 демонстрируют высокую безопасность *in vivo*, не проявляя токсического, апоптогенного и цитотоксического действия на иммунокомпетентные клетки, а также эффективно предотвращают развитие экспериментальной холеры, вызванной *V. cholerae* серогруппы О1, при этом вызывают незначительное формирование специфического местного и системного гуморального иммунного ответа, не препятствующего проявлению их профилактических свойств, что подтверждает их перспективность для включения в состав экспериментального профилактического противохолерного препарата.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Экспериментальная часть исследования выполнена с использованием сертифицированного современного оборудования и коммерческих диагностических препаратов, включая тест-системы, срок годности которых соответствовал требованиям на момент проведения работ.

Надежность результатов исследования обоснована достаточным объемом выборки, использованием сертифицированных методов бактериологического, иммунохимического и молекулярно-генетического анализа, обладающих высокой специфичностью и чувствительностью.

Результаты диссертационной работы получены при выполнении двух государственных научно-исследовательских тем, в которых автор являлся исполнителем и ответственным исполнителем: «Экспериментальное обоснование возможных путей преодоления антибиотикоустойчивости у холерных вибрионов» № АААА-А16-116070610104-9 от 06.06.2016 г. и «Создание экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов и изучение иммунного ответа организма на введение холерных фагов» № АААА-А19-119032090077-3 от 20.03.2019 г.

Диссертация апробирована на заседании Ученого совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 16 от 27.11.2024 г.)

Материалы диссертационной работы были представлены и обсуждены на конференциях различного уровня, включая конференции молодых ученых: IX Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Иркутск, 2017); XIV Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Московская обл., ОК «Лужки», 2022); Международный молодежный форум «Неделя науки-2022» (Ставрополь, 2022); Международная конференция «Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению» (Новосибирск, 2024).

### Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 20 научных работ, в которых достаточно полно отражено содержание диссертации, из них 10 статей в рецензируемых изданиях, 1 – в другом издании и 7 в материалах конференций (тезисы), 1 патент на изобретение РФ, 1 база данных.

### Структура и объем диссертации

Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 150 страницах, состоит из введения, главы обзора литературы, шести глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы. Диссертация содержит 23 таблицы и иллюстрирована 11 рисунками. Список использованной литературы содержит 113 отечественных и 124 зарубежных источников.

### ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

#### Характеристика генетических и биологических свойств холерных бактериофагов и отбор наиболее перспективных из них для разработки экспериментального профилактического препарата

В соответствии с поставленными задачами была осуществлена биологическая характеристика коллекционных штаммов холерных бактериофагов (Rostov-1, Rostov-6, Rostov-7, Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1), которая показала их выраженную серогрупповую и биоварную специфичность в отношении *V. cholerae*. Наибольший спектр литической активности продемонстрировал фаг Rostov-6, эффективный против 63,3% штаммов classical и 55% штаммов El Tor биоваров. Фаги Rostov-1 и Rostov-7 показали избирательную активность против El Tor (70% и 63,5% соответственно), тогда как Rostov-13 проявил активность, лизируя 97% вибрионов биовара El Tor. Фаг Rostov-M3 отличался высокой лизабельностью в отношении биовара classical (83,3%), тогда как только 43,3% El Tor вибрионов оказались чувствительными к нему. Особый интерес представляет фаг ФБ1, показавший 50% лизирующую способность против серогруппы O139 (Рисунок 1). Все исследуемые холерные фаги обладали высокой стабильностью, сохраняя литическую активность в течение года, устойчивостью к температурным воздействиям и действию хлороформа. Была проведена также визуальная оценка морфологии колоний бактериофагов на газоне индикаторных культур (Рисунок 2).

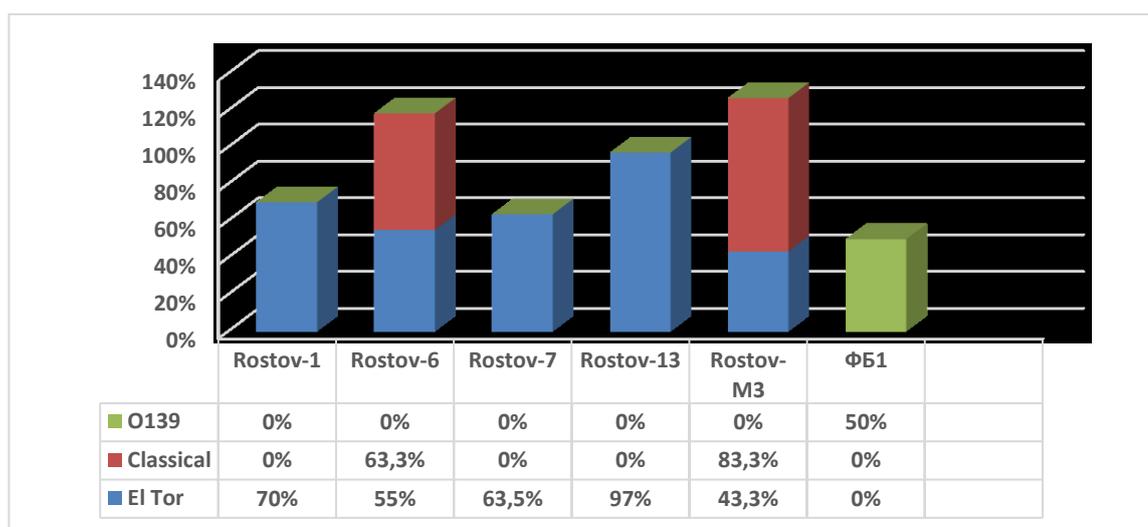


Рисунок 1 – Оценка литической активности испытуемых холерных бактериофагов

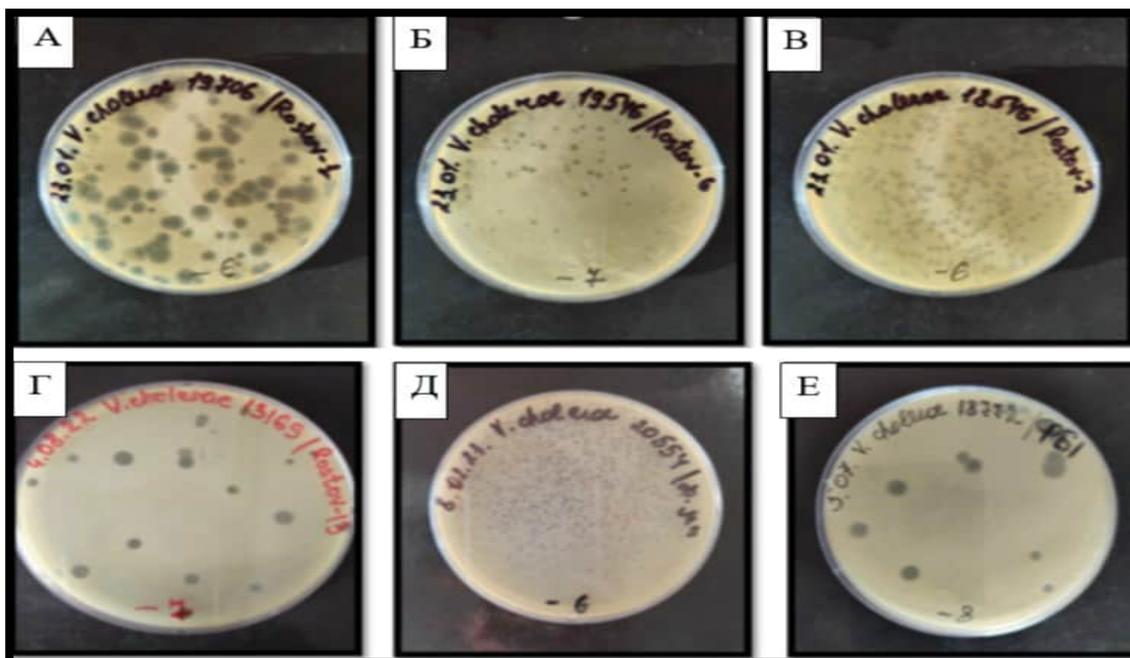


Рисунок 2 – Холерные бактериофаги (Негативные колонии на индикаторных штаммах)

Примечание: А – Rostov-1, Б – Rostov-6, В – Rostov-7, Г – Rostov-13, Д – Rostov-M3, Е – ФБ1

Применение трансмиссионной электронной микроскопии показало, что все отобранные фаги являются головчатыми, но относятся к различным морфогруппам и семействам (Рисунок 3).

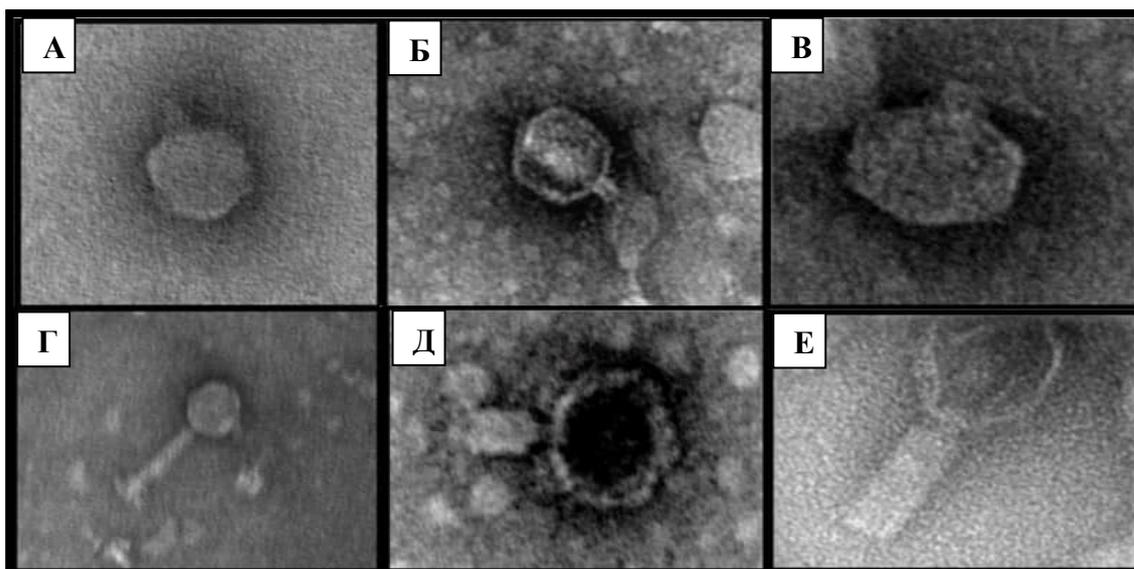


Рисунок 3 – Холерные бактериофаги (просвечивающий электронный микроскоп Jeol JEM 1011 «JEOL Ltd», Япония) (Увеличение: А – 150 000, Б – 150 000, В – 200 000, Г – 150 000, Д – 150 000, Е – 200 000)

Примечание: А – Rostov-1, Б – Rostov-6, В – Rostov-13, Г – Rostov-7, Д – Rostov-M3, Е – ФБ1

Однако по результатам молекулярно-генетического анализа выявлено, что в структуре генома *V. phage* Rostov-6 и Rostov-7 присутствовали интегразы, поэтому их использование в составе профилактических или лечебных препаратов исключено. Остальные испытуемые фаги являлись вирулентными (литическими) и не содержали нежелательных генов, что дало основание рассматривать их в качестве компонентов профилактического препарата против холеры.

Исследованные фаги имели высокий процент сходства (83-99%) с геномами бактериофагов, представленных в базе данных GenBank (NCBI). Часть аннотированных последовательностей фагов зарегистрированы в международной базе GenBank (NCBI) (Таблица 1).

Таблица 1 – Зарегистрированные геномы исследованных бактериофагов

Название бактериофага	Таксономическая принадлежность (Turner D. et al., 2023)	Номер доступа в Genbank (NCBI)
Rostov-1	Класс Caudoviricetes, сем. Autographiviridae	MG957431
Rostov-6	Класс Caudoviricetes, род Enhodamvirus	MH105773
Rostov-7	Класс Caudoviricetes	MK575466.1
Rostov-M3	Класс Caudoviricetes	MN379460-MN379463
Rostov-13	Класс Caudoviricetes, сем. Autographiviridae	OK169294-OK169295

Учитывая, что бактериофаг Rostov-1 продемонстрировал более низкую литическую активность в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы El Tor по сравнению с фагом Rostov-13, последующие эксперименты были сосредоточены на изучении бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1. Эти фаги обладали широким спектром литической активности (от 43 до 97%) в отношении холерных вибрионов O1 и O139 серогруппы, высокой урожайностью (до 10<sup>9</sup> БОЕ/мл), а также устойчивостью к температурным воздействиям и хлороформу. Кроме того, они являлись вирулентными, оригинальными и генетически безопасными, так как их ДНК не содержала нежелательных генов, таких как гены устойчивости к антибиотикам, токсинов или интеграз.

#### **Разработка метода получения экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов**

Принимая во внимание работы коллег Московского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского по разработке специализированного продукта «Фудфаг» (Киселева И.А., 2015), активного в отношении условно-патогенных и патогенных бактерий родов *Staphylococcus*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, и проводя исследования по получению холерных фаголизатов, мы подобрали и оптимизировали условия для культивирования холерных бактериофагов с высоким титром вирусных частиц в физиологическом растворе.

С целью получения фаговой биомассы с наибольшим титром холерных вирусных частиц и низким содержанием токсинов был разработан методический подход, состоящий из нескольких этапов:

1. *Подготовка и розлив питательной среды.* На начальном этапе проводилась подготовка питательных сред, необходимых для культивирования индикаторных штаммов бактерий и бактериофагов. Среда разливалась в стерильные емкости с соблюдением асептических условий.
2. *Культивирование индикаторных штаммов.* Индикаторные штаммы *V. cholerae* высевались в бульон Мартена и инкубировались в термостате при температуре 37°C в течение 20 часов для достижения оптимальной плотности бактериальной культуры.
3. *Пересев на плотную питательную среду.* После инкубации в жидкой среде индикаторные штаммы пересевались на агаровые чашки Петри с 1,5% агаром Мартена и инкубировались при 37°C для получения изолированных колоний.
4. *Отбор колоний и подготовка бактериальной суспензии.* Колонии бактерий 2-го пассажа отбирались микробиологической петлей и засеивались в бульон Мартена (4,5 мл на пробирку).

Культуры инкубировались в термостате при 37°C в течение 18 часов до достижения концентрации  $10^8$ – $10^9$  колониеобразующих единиц в 1 мл (КОЕ/мл).

5. *Формирование бактериального газона.* Для формирования бактериального газона использовали чашки Петри с 1,5% агаром Мартена (толщина слоя 10 мм). Растопленный 0,7% агар Мартена, охлажденный до 45°C, смешивали с 0,5 мл 18-часовой культуры индикаторного штамма и равномерно распределяли по поверхности основного агара, формируя верхний посевной слой. После 20-минутного застывания при комнатной температуре чашки инкубировали для получения плотного сплошного бактериального газона.
6. *Нанесение бактериофага.* На сформированный бактериальный газон наносили маточный штамм бактериофага с титром  $10^7$ – $10^8$  БОЕ/мл. Фаг равномерно распределяли по поверхности газона покачивающими движениями и инкубировали в термостате при 37°C в течение 18 часов для достижения лизиса бактерий.
7. *Сбор и очистка фаголизата.* Для выделения бактериофагов зоны лизиса вместе с верхним слоем агара аккуратно срезали скальпелем и переносили в колбу с 500 мл (1 чашка петри на 100 мл) стерильного физиологического раствора (0,9% NaCl, pH 7,0-7,2). Далее к полученной суспензии добавляли хлороформ в объеме 1/10 от общего количества и инкубировали при постоянном встряхивании в течение 30 минут для полного лизиса оставшихся бактериальных клеток. После этого проводили центрифугирование при 5000-6000 об/мин в течение 30 минут, по окончании которого надосадочную жидкость, содержащую очищенные фаговые частицы, аккуратно собирали для последующих исследований.
8. *Очистка и контроль качества.* Фаголизаты подвергали поэтапной очистке, включающей: последовательную фильтрацию через мембранные фильтры с порами 0,45 мкм (удаление клеточного дебриса) и 0,22 мкм (стерилизация); обязательный контроль специфической стерильности по утвержденной методике (Инструкция по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерных микробов. – Саратов, 1982. – 8 с.).

Данный метод позволил увеличить количество фаговых частиц в очищенных фаголизатах бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 (Таблица 2), которые являются перспективными кандидатами для создания профилактического препарата.

Таблица 2 – Урожайность холерных бактериофагов на основе 0,9% раствора NaCl

Выход бактериофага БОЕ/мл (бульон Мартена)	Штамм для размножения бактериофага (индикаторный штамм)	Выход бактериофага, БОЕ/мл (0,9% раствора NaCl)
Rostov-13 ( $6,1 \times 10^7$ )	<i>V. cholerae</i> El Tor KM 199 (P-13169)	$7,4 \times 10^8$
Rostov-M3 ( $7,2 \times 10^8$ )	<i>V. cholerae</i> El Tor: KM 2157 (20554)	$8,2 \times 10^9$
ФБ1 ( $5,1 \times 10^8$ )	<i>V. cholerae</i> O139 18772	$5,1 \times 10^9$

Для количественного определения ЛПС в фаговых препаратах (Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1) применяли ИФА-метод с прямым пероксидазным конъюгатом, разработанным специалистами лаборатории диагностических препаратов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (Алексеева Л.П., 2022).

Препараты бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1 были исследованы на наличие ЛПС методом ИФА до и после очистки на хроматографической колонке EndoTrap® HD (Hyglos GmbH, Германия) (Rostov-M3К, Rostov-13К, ФБ1К). В опыт их брали в двух разведениях – 1:2 и 1:4. Моноклональный антилиполисахаридный пероксидазный конъюгат разводили до 1:200. В качестве положительного контроля использовали инактивированные микробные клетки двух

штаммов *V. cholerae* O1 – 18963 и 18512, а в качестве отрицательного контроля – буфер, в котором разводили пробы. Установлено наличие ЛПС в препарате Rostov-M3 в разведении 1:2. После очистки препарата на колонке ЛПС в его составе отсутствовал. В других двух препаратах Rostov-13К и ФБ1К наличие ЛПС также не регистрировалось, что свидетельствует о чистоте всех полученных препаратов бактериофагов (Таблица 3).

Таблица 3 – Наличие ЛПС в препаратах холерных бактериофагов

Препарат	Разведение	Реакция в ИФА	Оптическая плотность
Rostov-M3	1:2	+	0.450±0.02
	1:4	-	0.212±0.01
ФБ1	1:2	-	0.069±0.01
	1:4	-	0.073±0.03
Rostov-13	1:2	-	0.109±0.01
	1:4	-	0.069±0.03
<b>Rostov-M3К</b>	<b>1:2</b>	-	<b>0.225±0.02</b>
	<b>1:4</b>	-	<b>0.110±0.01</b>
<b>ФБ1К</b>	<b>1:2</b>	-	<b>0.037±0.02</b>
	<b>1:4</b>	-	<b>0.043±0.02</b>
<b>Rostov-13К</b>	<b>1:2</b>	-	<b>0.035±0.03</b>
	<b>1:4</b>	-	<b>0.056±0.04</b>
K <sup>+</sup> – бак. масса <i>V. cholerae</i> O1 18963 (ctx <sup>+</sup> )	1:10	+	1.081±0.01
K <sup>+</sup> – бак. масса <i>V. cholerae</i> O1 18512 (ctx <sup>+</sup> )	1:10	+	1.140±0.01
K <sup>-</sup> – буфер ФСБ	–		0.199±0.02

Примечание: представлены средние значения оптических плотностей (ОП) и стандартное отклонение  $P < 0,05$ ; K<sup>+</sup> (положительный контроль); K<sup>-</sup> (отрицательный контроль); ОП – оптическая плотность

Из бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 был составлен коктейль в дозе  $n \times 10^8 - n \times 10^9$  БОЕ/мл в соотношении 1:1:1 и проведены фармакокинетические исследования на модели взрослых кроликов. Установлено, что после однократного перорального введения животным 1 мл данного коктейля бактериофаги не выводятся сразу с экскрементами, а находятся в организме 3-е суток. У группы животных, которым вводили раз в день фаговый коктейль в течение 3 дней, регистрировали выделение фаговых частиц из крови и испражнений кролика до 6 суток. У кроликов, получавших препарат раз в день в течение 5-ти и 7-ми суток, фаговые частицы выделялись из мочи до 8 дней. Учитывая полученные результаты, свидетельствующие о том, что данный объем коктейля (1 мл) относительно быстро выводится из организма животного, было принято решение о его увеличении до 3 мл ( $n \times 10^8 - n \times 10^9$  БОЕ/мл).

Таким образом, проведенные исследования показали, что очищенные фаголизаты Rostov-M3, Rostov-13 и ФБ1 обладают комплексом ценных свойств для профилактического применения: широким спектром литической активности (43-97%) в отношении *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, высокой урожайностью (до  $10^9$  БОЕ/мл), устойчивостью к температурным воздействиям и хлороформу, отсутствием токсинов и нежелательных генов в фаговой ДНК, а также сохранением вирулентных характеристик. На их основе составлен экспериментальный коктейль, безопасность и профилактическая эффективность которого в дальнейшем оценена на лабораторных моделях (белые мыши, взрослые кролики).

## Оценка безопасности экспериментального фагового коктейля на модели белых мышей и взрослых кроликов

В результате изучения острой токсичности на двух экспериментальных моделях (белые мыши, взрослые кролики) установлено, что при любом способе введения однократной максимальной дозы для животных испытываемые фаги не являются токсичными, признаков интоксикации у лабораторных животных не наблюдали в течение 14 дней.

Длительное (в течение 20 дней) ежедневное внутрижелудочное введение белым беспородным мышам 0,5 мл экспериментального профилактического коктейля ( $n \times 10^8 - n \times 10^9$  БОЕ/мл) показало отсутствие общетоксического действия. Микроскопические исследования гистологических препаратов паренхиматозных органов (легкие, сердце, печень, селезенка, почки) и фрагменты головного мозга, а также кишечника с брыжейкой, взятых для исследования 21-е сутки эксперимента, не выявили патологических изменений (Рисунки 4-5).

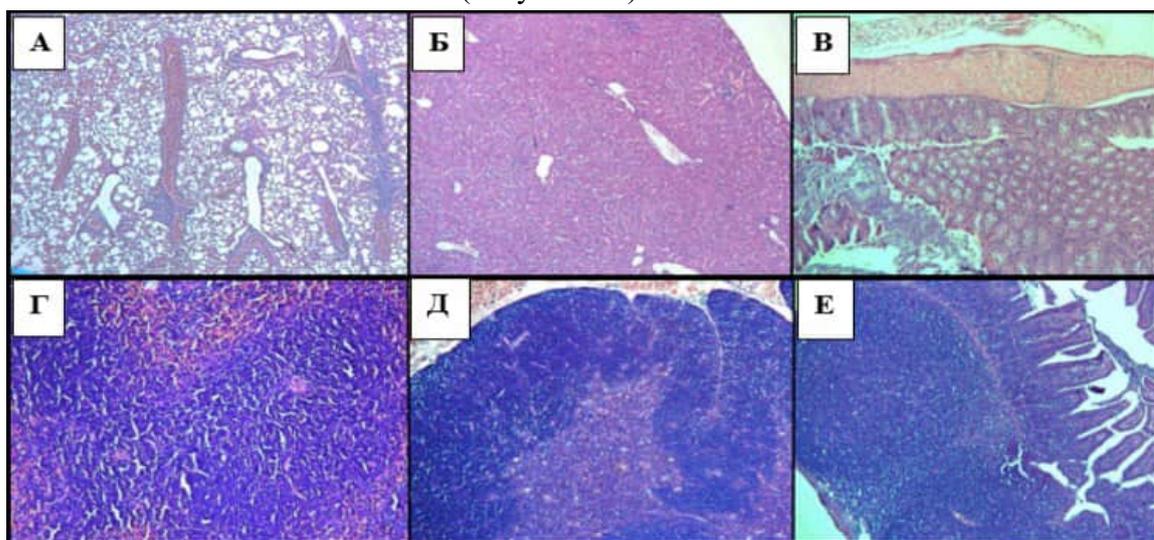


Рисунок 4 – Гистологические снимки органов опытных мышей (Моторизованный исследовательский микроскоп Leica DM 6000 «Leica Microsystems», Германия)  
(Увеличение: А -  $\times 10$ ; Б -  $\times 10$ ; В -  $\times 10$ ; Г -  $\times 20$ ; Д -  $\times 10$ ; Е -  $\times 10$ )

Примечание: А – Легкое; Б - Печень; В -Толстая кишка; Г - Селезенка; Д - Тимус; Е -Тонкая кишка

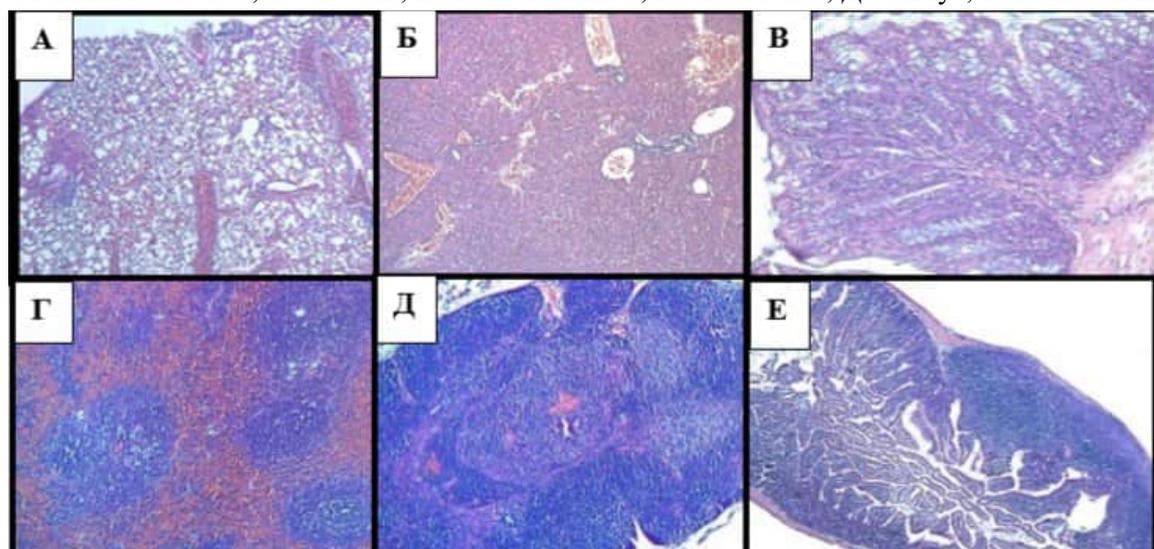


Рисунок 5 – Гистологические снимки органов контрольных мышей (Моторизованный исследовательский микроскоп Leica DM 6000 «Leica Microsystems», Германия)  
(Увеличение: А -  $\times 10$ ; Б -  $\times 10$ ; В -  $\times 10$ ; Г -  $\times 20$ ; Д -  $\times 10$ ; Е -  $\times 10$ )

Примечание: А – Легкое; Б - Печень; В -Толстая кишка; Г - Селезенка; Д - Тимус; Е -Тонкая кишка

При изучении цитотоксического и апоптогенного действия профилактического коктейля бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1 на форменные элементы крови взрослых кроликов выявлено, что семидневный прием препарата не вызывает увеличения числа клеток в состоянии апоптоза, по сравнению с контрольными животными, и не действует на них цитотоксически. Количество жизнеспособных моноцитов, лимфоцитов, нейтрофилов сохранялось на уровне 93-97% и статистически не отличалось от аналогичных показателей у кроликов контрольной группы (Таблица 4).

Таблица 4 – Изучение цитотоксичности и апоптогенной активности смеси на основе холерных бактериофагов в отношении иммунокомпетентных клеток крови взрослых кроликов

Показатели (%)	Коктейль бактериофагов (Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1)			Контрольные значения		
	моноциты	лимфоциты	нейтрофилы	моноциты	лимфоциты	нейтрофилы
Жизнеспособные клетки	95±1,3	96±0,9	94±1,0	94±2,3	97±0,8	95±1,5
Некроз	2,3±0,9	1,9±0,8	2,0±0,79	2,7±0,8	1,1±0,7	2,3±0,7
Апоптоз	2,2±0,7	2,2±0,9	3,8±0,8	2,6±0,9	2,3±0,8	3,4±0,9

Такая же тенденция сохранялась и после повторного введения (в течение семи дней) смеси бактериофагов этой группе кроликов, что свидетельствует о безопасности ее применения для макроорганизма.

#### **Оценка формирования гуморального иммунного ответа к холерным фагам и их смеси на модели экспериментальных животных**

При исследовании гуморального иммунного ответа на введение фагов выявлено, что профилактический прием в течение трех, пяти и семи дней холерных фагов Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1 и их смеси приводят к незначительному образованию специфических антител, что является залогом успешного применения этих препаратов для профилактики холеры. Результаты показали, что при повторных курсах введения каждого из фагов у экспериментальных животных формируются антифаговые IgG, однако, у животных, получавших повторно смесь бактериофагов, титры специфических антител в сыворотке крови сохранялись на низком уровне при трех-, пяти- и семидневном ее применении.

При изучении антителопродукции в тонком кишечнике взрослых кроликов не было выявлено достоверного, по сравнению с контролем, усиления секреции sIgA после трех, пяти и семи дневного первичного приема бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13. У кроликов, которым в течение семи дней вводили бактериофаг ФБ1, регистрировалось достоверное, по сравнению с контрольными животными, увеличение количества этого иммуноглобулина. Смесь испытуемых фагов не вызывала статистически достоверного повышения количества sIgA при всех схемах ее введения. Повторные курсы препаратов бактериофагов сопровождалась усилением продукции этого иммуноглобулина, особенно у животных, получавших фаг ФБ1. Уже после трехкратного повторного приема фага ФБ1 наблюдалось увеличение секреции sIgA в 2,5 раза, по сравнению с контролем (Рисунок 6).

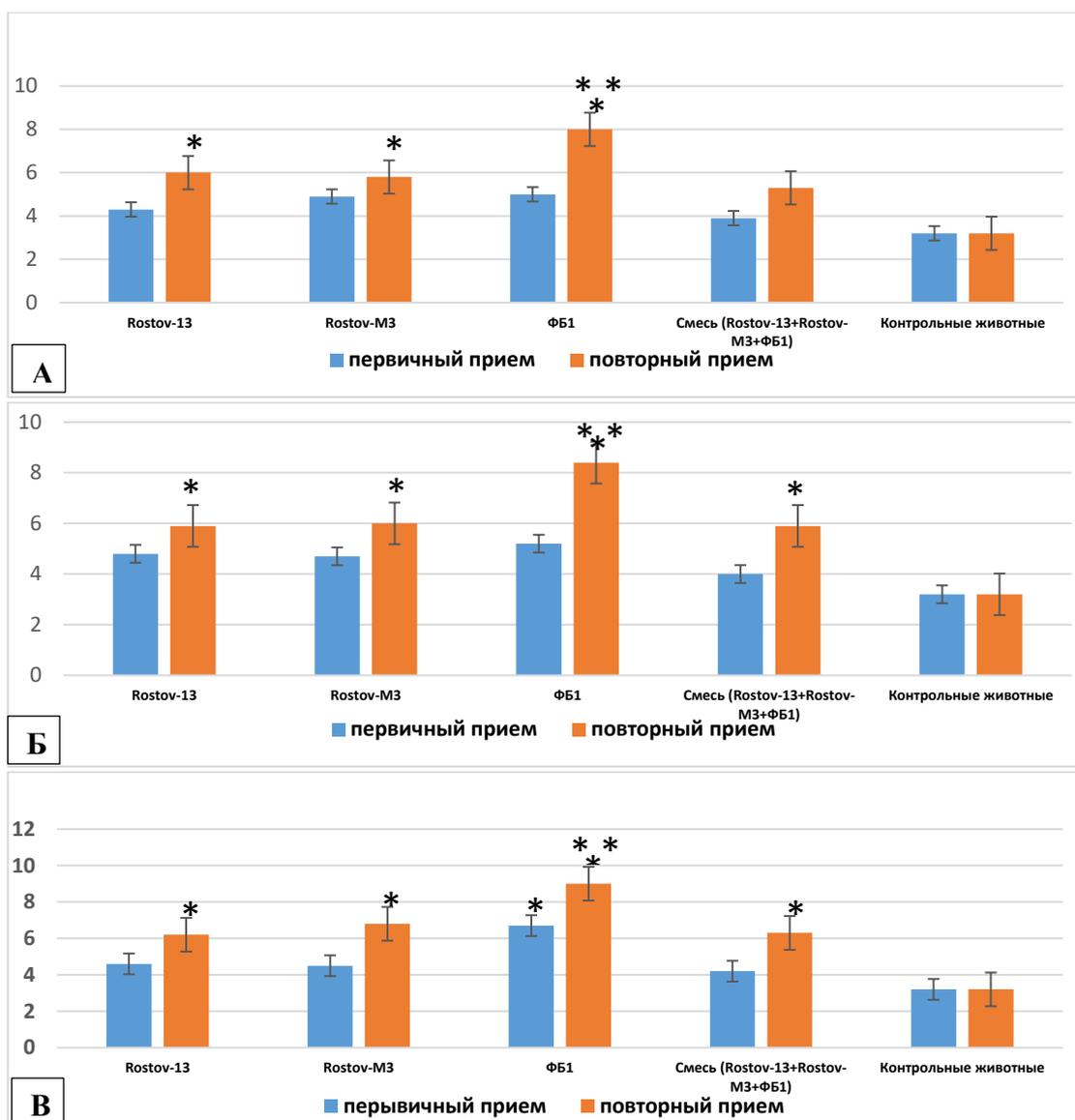


Рисунок 6 – Количество (нг/мл) секреторного иммуноглобулина А: А – после трех; Б – после пяти; В – после семидневного введения холерных бактериофагов

Примечание:

\* - достоверное отличие от показателя контрольных животных ( $p < 0,05$ )

\*\* - достоверное отличие от показателя в эти сроки в других группах ( $p < 0,05$ )

### Профилактическая эффективность холерных бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1 и их смеси

Проведенные эксперименты по оценке профилактического действия экспериментального коктейля бактериофагов в отношении холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп на модели генерализованной инфекции у белых мышей показали, что прием смеси бактериофагов в течение пяти дней перед заражением препятствует развитию заболевания, вызванного вибрионами O1 серогруппы, примерно у 90% животных, в то время как в группе мышей, зараженных штаммом *V. cholerae* O139, выжило только около 10%.

Семидневный профилактический курс фагов способствовал увеличению числа выживших животных при инфицировании *V. cholerae* O139, однако их количество оставалось на низком уровне. Этот факт свидетельствует о необходимости продолжения исследований и поиска новых литических бактериофагов, лизирующих данную серогруппу.

Оценка способности изучаемых препаратов препятствовать развитию инфекции в тонком

кишечнике взрослых кроликов показала, что трехдневный прием бактериофагов в объеме 3 мл, содержащем  $n \times 10^8 - n \times 10^9$  БОЕ/мл, как отдельно, так и в смеси, недостаточен для предотвращения развития холеры у экспериментальных животных (Таблица 5).

Таблица 5 – Оценка профилактического действия препаратов бактериофагов по наличию/выраженности холерогенного и энтеропатогенного эффектов в изолированной петле тонкого кишечника взрослого кролика

Препарат бактериофагов + инфекционный агент	Влияние фага на инфекционный процесс после приема в течение:					
	3 дней		5 дней		7 дней	
	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)
Rostov-M3 <i>V. cholerae</i> O1 classical 145	средняя	1,10±0,09	слабая	0,35±0,09	отсутствует	0,17±0,10
Rostov-13 <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18899	средняя	1,15±0,07	слабая	0,38±0,10	отсутствует	0,19±0,12
ФБ1 <i>V. cholerae</i> O139 16066	сильная	1,22±0,04	сильная	1,15±0,10	сильная	1,18±0,06
Rostov-M3, Rostov-13, ФБ1 (смесь 1:1:1) <i>V. cholerae</i> O1 classical 145, El Tor 18899, <i>V. cholerae</i> O139 16066 (смесь 1:1:1)	сильная	1,20±0,08	сильная	1,18±0,04	сильная	1,13±0,06
Контроль (интактные)	сильная	1,33±0,04	сильная	1,27±0,07	сильная	1,25±0,08

Отсутствие профилактического эффекта в этом случае связано с тем, что в коктейль входит фаг ФБ1, обладающий недостаточной литической активностью, что подтверждается при проведении посева содержимого тонкого кишечника опытных животных, который показал наличие холерных вибрионов O139 серогруппы. В связи с тем, что применение бактериофага ФБ1 для профилактики холеры, вызванной вибрионами O139 серогруппы, не эффективно, включение этого фага в состав экспериментального препарата является нецелесообразным. Введение фагов Rostov-M3 и Rostov-13 в течение пяти и семи дней перед заражением животных токсигенными штаммами *V. cholerae* O1 классического биовара и биовара El Tor предотвращало развитие инфекции в тонком кишечнике всех экспериментальных животных, поэтому в состав профилактического препарата были включены именно эти фаги.

#### **Оценка фармакокинетики и профилактической эффективности препарата на основе холерных бактериофагов Rostov-M3, Rostov-13 в отношении холерных вибрионов O1 серогруппы**

Следующим этапом исследований стала оценка фармакокинетики и профилактической активности фаговой композиции, состоящей из бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13. Результаты показали, что после пяти- и семидневного курса приема фаговые частицы обнаруживались в испражнениях мышей даже спустя 21 день (Таблица 6). Это свидетельствует о способности фагов длительно персистировать в организме животных, даже при отсутствии

гомологичных штаммов *V. cholerae*. Такое длительное сохранение фагов в кишечнике может быть связано с их способностью адаптироваться к условиям желудочно-кишечного тракта и взаимодействовать с другими компонентами микрофлоры, несмотря на то, что происходит дезактивация неопределенного количества фагов кислой средой желудка.

Таблица 6 — Количество н.к. (фаговых частиц) в кишечнике белых мышей после разных курсов введения (per os по 0,5 мл) экспериментального препарата

Способ/доза введения	Время после введения препарата, сутки	Смесь бактериофагов Rostov-13+Rostov-M3 ( $n \times 10^8$ – $n \times 10^9$ БОЕ/мл)		
		3 дня	5 дней	7 дней
Per os/0,5 мл	1	$4,2 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$7,4 \times 10^5$
	2	$3,1 \times 10^6$	$2,7 \times 10^5$	$8,1 \times 10^6$
	3	$8 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	$1,9 \times 10^4$
	4	$2 \times 10^3$	$4,1 \times 10^2$	$5,1 \times 10^4$
	5	$2 \times 10^3$	$1 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$
	6	$1 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$
	9	4 н.к.	$1,2 \times 10^1$	$1,8 \times 10^1$
	12	0	8 н.к.	10 н.к.
	15	0	5 н.к.	7 н.к.
	18	0	2 н.к.	3 н.к.
	21	0	1 н.к.	2 н.к.
	24	0	0	0

Оценка эффективности препарата показала, что он оказывает профилактическое действие в отношении холерных вибрионов O1 серогруппы сероваров classical и El Tor уже после пятидневного, но особенно семидневного, курса введения лабораторным животным.

Учитывая, что повторные курсы приема коктейля из фагов Rostov-M3 и Rostov-13 вызывали формирование антифагового иммунного ответа, как в сыворотке крови, так и в тонком кишечнике экспериментальных животных, была оценена профилактическая способность препарата при повторных курсах введения. Установлено, что при повторных курсовых приемах в течение пяти и семи дней, как и при первичных курсах, признаков развития экспериментальной холеры не было зарегистрировано у всех взятых в эксперимент взрослых кроликов и у 90% белых мышей (Таблицы 7-8).

Таблица 7 – Оценка профилактической эффективности экспериментального препарата при первичных и повторных курсах приема на модели генерализованной формы холеры у белых мышей

Количество животных (%)	Профилактика смесью бактериофагов в дозе 0,5 мл ( $n \times 10^8$ – $n \times 10^9$ БОЕ/мл) в течение						Контроль культур <i>V. cholerae</i> O1	
	первичные курсы			повторные курсы			classical 569B	El Tor 18899
	3 дней	5 дней	7 дней	3 дней	5 дней	7 дней		
выжившие	60,3±5,7	92±2,65	94,3±2,08	66,4±4,7	93,3±5,13	95,3±4,5	0	0
павшие	38,5±5,8	7,5±2,8	5,2±2,1	34,5±4,8	6,9±5,1	4,5±3,5	100	100

Таблица 8 – Оценка профилактического действия препарата после повторных курсов приема по наличию/выраженности холерогенного и энтеропатогенного эффектов в изолированной петле тонкого кишечника зараженного взрослого кролика

Препарат бактериофагов + инфекционный агент	Наличие эффектов после приема бактериофагов в течение:					
	3 дней		5 дней		7 дней	
	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)	Энтеропатогенный (степень выраженности)	Холерогенный (K>1)
Rostov-13 и Rostov-M3 (смесь 1:1) <i>V. cholerae</i> O1 classical 569B, El Tor 18899 (смесь 1:1)	средняя	1,09±0,02	отсутствует	0,27±0,17	отсутствует	0,17±0,03
Контроль (интактные)	сильная	1,24±0,09	сильная	1,17±0,07	сильная	1,35±0,13

Полученные результаты подтверждают тот факт, что синтез антифаговых антител не всегда означает снижение жизнеспособности фага, а формирование выраженного антифагового гуморального иммунитета не снижает проявление профилактической способности бактериофагов.

Таким образом, отобраны вирулентные холерные бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13, обладающие высокой литической активностью в отношении холерных вибрионов O1 серогруппы классического и Эль Тор биоваров. Разработан методический подход накопления очищенной биомассы холерных бактериофагов с наибольшим титром вирусных частиц. Показано, что данные фаги являются безопасными: не обладают хронической и подострой токсичностью, а также цитотоксическим и апоптогенным действием. При однократном введении они способны персистировать в организме экспериментальных животных в течение суток, даже при отсутствии гомологичных к фагам штаммов *V. cholerae*, а при пяти и семидневном приеме – более двадцати дней. Доказано, что бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13 как в отдельности, так и в смеси (в соотношении 1:1) оказывают профилактический эффект в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы уже после пятидневного курса приема. Установлено, что образующиеся антифаговые антитела и в том, и другом случае не препятствует реализации профилактической способности бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13. Представленные результаты свидетельствуют о том, что использование смеси данных бактериофагов для профилактики холеры, вызванной вибрионами, относящимися к разным биоварам (classical и El Tor), в качестве компонентов нового профилактического препарата является действенным и эффективным.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что холерные бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13 являются безопасными и эффективными компонентами нового профилактического препарата, это свидетельствует о перспективности их использования в качестве средства для профилактики холеры.

## ВЫВОДЫ

1. На основе изучения биологических и молекулярно-генетических характеристик были выбраны холерные бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13, которые не содержат генов интеграз, антибиотикоустойчивости и токсинов. При этом они демонстрируют высокую литическую

активность (43–97%) в отношении *V. cholerae* серогруппы O1. Эти свойства делают их перспективными кандидатами для включения в состав экспериментального профилактического средства против холеры.

2. Отработана технология культивирования маточных штаммов холерных бактериофагов в физиологическом растворе, способствующая увеличению количества фаговых частиц в очищенных фаголизатах, что позволяет повысить титр холерных бактериофагов Rostov-M3 и Rostov-13.

3. Холерные бактериофаги Rostov-M3 и Rostov-13 в максимальных дозах не оказывают токсического действия на макроорганизм и не вызывают апоптоза и некроза иммунокомпетентных клеток у лабораторных животных, что свидетельствует о безопасности их использования на экспериментальных моделях.

4. Проведенные иммунобиологические исследования позволили установить, что применение фаговой композиции Rostov-M3/Rostov-13 (как однократное, так и повторное в течение 7 дней) сопровождается незначительной выработкой антител в сыворотке крови и тонком кишечнике, что не оказывает влияния на профилактическую эффективность препарата.

5. Результаты экспериментальных исследований свидетельствуют о высокой профилактической эффективности разработанного фагового препарата на основе штаммов Rostov-M3 и Rostov-13. Установлено, что пятисуточный курс перорального применения данного средства обеспечивает полную защиту лабораторных животных от инфицирования холерным вибрионом серогруппы O1.

6. Разработанный экспериментальный профилактический препарат, безопасный и активный в отношении холерных вибрионов O1 серогруппы, расширит возможности в тактике профилактических мероприятий против холеры.

#### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Представленные в диссертационном исследовании основные этапы получения экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов могут быть полезны при разработке новых иммунобиологических средств для профилактики холеры у людей.

Данный экспериментальный биопрепарат может быть рекомендован для декретированных категорий работников в период повышения риска заболеваемости холерой, а также для населения, находящегося на эндемичных территориях.

#### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Для расширения спектра литической активности профилактического препарата в отношении холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп требуется дальнейшее проведение поиска вирулентных рас холерных бактериофагов.

Целесообразна разработка таблетированной формы экспериментального профилактического средства в отношении холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп для придания препарату лучшего товарного вида, уменьшения его объемов при транспортировании и хранении.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Тюрина, А.В.** Изучение активности *in vitro* фаговой композиции в отношении штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп для оценки перспективности ее апробации в профилактике холеры / **А.В. Тюрина**, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова // Актуальные вопросы инфекционной патологии Юга России (Краснодар, 31 мая-1 июня 2018 г.): материалы XI научно-практической конференции, посвященной 115-летию ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница» Министерства Здравоохранения Краснодарского края. - Краснодар, 2018. – С. 172-174.

2. Погожова, М.П. Полногеномный сиквенс холерных бактериофагов Rostov-1 и Rostov-6 / М.П. Погожова, Н.Е. Гаевская, Р.В. Писанов, А.С. Водопьянов, Л.В. Романова, С.О. Водопьянов, **А.В. Тюрина**, А.О. Кочеткова // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены (Москва, 24-26 октября 2018 г.): материалы X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – Москва, 2018. – С. 244-248.
3. **Тюрина, А.В.** Изучение некоторых аспектов фармакокинетики холерного экспериментального профилактического фагового препарата *in vitro* и *in vivo* / **А.В. Тюрина**, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.О. Кочеткова // Холера и патогенные для человека вибрионы: сборник статей Проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Саратов: Амирит, 2018. – Вып. № 31. – С. 149-151.
4. **Тюрина, А.В.** История и перспективы использования холерных бактериофагов в терапии и профилактике холеры / **А.В. Тюрина**, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, **А.О. Кочеткова** // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2019. – Т. 15, № 3. – С. 66-71.
5. **Аноприенко, А.О.** Создание экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов / **А.О. Аноприенко**, **А.В. Тюрина**, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. — 2020. — Т. 16, № 3. – С. 10-14.
6. **Тюрина, А.В.** Изучение биологических и генетических свойств холерных бактериофагов, входящих в состав экспериментального профилактического препарата / **А.В. Тюрина**, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены (г. Екатеринбург, 15-17 сентября 2021 г.): материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора / под ред. А. Ю. Поповой. – Екатеринбург: ФБУН ЕМНЦ ПОЗРПП Роспотребнадзора, 2021. – С. 317-319.
7. **Погожова, М.П.** Биологические свойства и генетическая характеристика экспериментальных диагностических бактериофагов *Vibrio cholerae* / М.П. Погожова, Н.Е. Гаевская, А.С. Водопьянов, Р.В. Писанов, А.О. Аноприенко, Л.В. Романова, **А.В. Тюрина** // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2021. – № 3. – С. 290-297.
8. **Тюрина, А.В.** Аспекты конструирования экспериментальных профилактических препаратов на основе холерных бактериофагов / **А.В. Тюрина**, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2021. – Т. 17, № 3. – С. 60-68.
9. **Тюрина, А.В.** Оценка формирования местного гуморального иммунного ответа на введение холерных фагов у экспериментальных животных / **А.В. Тюрина**, И.А. Иванова, Н.Е. Гаевская, А.В. Филиппенко, А.А. Труфанова, Н.Д. Омельченко, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко // Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на юге России. Ермольевские чтения (Ростов-на-Дону, 8 сентября 2022 г.): межрегиональная научно-практическая конференция. – Ростов-на-Дону, 2022. – С. 321-324.
10. **Тюрина, А.В.** Оценка гуморального иммунного ответа на введение холерных бактериофагов у экспериментальных животных / **А.В. Тюрина**, Л.В. Ларионова, **А.В. Филиппенко**, Н.Д. Омельченко, А.А. Труфанова, Д.И. Симакова, И.А. Иванова, Н.Е. Гаевская, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко, Н.И. Пасюкова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2022. – Т. 18, № 2. – С. 36-41.

11. Гаевская, Н.Е. Использование бактериофагов в терапии и профилактике особо опасных инфекций / Н.Е. Гаевская, А.В. Тюрина, А.А. Труфанова, А.В. Филиппенко, И.А. Иванова, Н.Д. Омельченко, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2022. – Т. 18, № 3. – С. 70-78.
12. Погожова, М.П. Создание коллекции фагов патогенных вибрионов и её применение в диагностических и профилактических целях / М.П. Погожова, Н.Е. Гаевская, А.В. Тюрина, А.О. Аноприенко // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2023. — Т. 19, № 3. – С. 37-45.
13. Тюрина, А.В. Оценка безопасности смеси холерных бактериофагов на модели экспериментальных животных / А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, Е.А. Синельник, И.А. Иванова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, А.А. Труфанова, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко, Н.И. Пасюкова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. — № 4. — С. 160-162.
14. Тюрина, А.В. Оценка эффективности использования холерных бактериофагов для профилактики экспериментальной холеры / А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, И.А. Иванова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, А.А. Труфанова, М.П. Погожова, А.О. Аноприенко, Ю.В. Сизова, Н.И. Пасюкова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2024. — № 2. — С. 193-195.
15. Тюрина, А.В. Оценка профилактической эффективности на модели белых мышей / А.В. Тюрина, М.П. Погожова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, И.А. Иванова, Ю.В. Сизова // Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии, диагностики и профилактики холеры и других инфекционных болезней (Ростов-на-Дону, 7–8 ноября 2024 г.): сборник научных трудов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. – Ростов-на-Дону, 2024. – С. 371-375.
16. Тюрина, А.В. Фармакокинетика и антимикробное действие экспериментального препарата на основе холерных бактериофагов на модели белых мышей / А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, И.А. Иванова, М.П. Погожова, Ю.В. Сизова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, А.О. Аноприенко // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2024. – Т. 20, № 3. – С. 28-33.
17. Иванова, И.А. Современное состояние проблемы альтернативных методов профилактики и лечения холеры / И.А. Иванова, А.В. Филиппенко, Н.Д. Омельченко, А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2024. – № 3. – С. 19-28.
18. Тюрина, А.В. Микробиологические аспекты разработки экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов / А.В. Тюрина, Н.Е. Гаевская, И.А. Иванова, М.П. Погожова, Ю.В. Сизова // Бактериофаги: от фундаментальных исследований к применению (Новосибирск, 21–23 сентября 2024 г.): материалы международной конференции. – Новосибирск, 2024. – С. 59.

#### ПАТЕНТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

19. Патент RU2783000C1 Российская Федерация. Способ профилактики холеры с помощью бактериофагов / Иванова И.А., Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Омельченко Н.Д., Филиппенко А.В., Труфанова А.А. заявитель и патентообладатель: ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU). – № 2021137429; заявл. 16.12.21; опубл. 8.11.2022, Бюл. № 31. – 10 с.

## БАЗА ДАННЫХ

20. База данных RU2022620881 Российская Федерация. Коллекция-депозитарий бактериофагов микроорганизмов III-IV группы патогенности / Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Аноприенко А.О., Тюрина А.В. правообладатель: ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU). – № 2022620059; заявл. 12.01.2022; опубл. 19.04.2022, Бюл. № 4. – 1 с.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БОЕ/мл – бляшкообразующие единицы в 1 миллилитре

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

ИФА – иммуноферментный анализа

нг/мл – нанограмм в 1 миллилитре

Ig – иммуноглобулины

sIgA – иммуноглобулин А