



РЕЗУЛЬТАТЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ВЕТЕРИНАРИИ

ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК 615.835.56:616.24-002.153:619

DOI: 10.52419/issn2782-6252.2024.3.31

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИНГАЛЯЦИОННОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ ПРИ БРОНХОПНЕВМОНИИ, АССОЦИИРОВАННОЙ С *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Киянчук Маргарита Владимировна, orcid.org/0009-0006-2884-9630

Сухинин Александр Александрович, д-р.биол.наук, проф., orcid.org/0000-0002-1245-3440
Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, Россия

РЕФЕРАТ

На фоне нарастающей антибиотикорезистентности среди возбудителей бронхопневмонии крупного рогатого скота возрождается интерес к фаготерапии, как терапевтическому средству. Ингаляционная фаготерапия в свою очередь потенциально может изменить схему лечения бактериальных респираторных инфекций, в том числе вызванных устойчивыми к антибиотикам бактериями. Ингаляционные инструменты доставки препаратов позволяют осуществить доставку бактериофагов непосредственно в очаг поражения. Немаловажным преимуществом, особенно если говорить про бактериофаги, является возможность применять меньшие дозы лекарственных средств, чем потребовались бы при выборе другого способа введения. В статье приложены результаты оценки эффективности ингаляционного метода введения коммерческих препаратов бактериофагов на мышинной модели. Мышей разделили на пять групп (1,2-животные, подвергшиеся заражению *Klebsiella pneumoniae* и проходящие курс ингаляции бактериофага (n=6), 3- животные, подвергшиеся заражению и не проходившие терапию (n=3), 4- контрольная группа животных, не подвергшихся заражению (n=3)). Ингаляции проводили с применением компрессорного четырёхрежимного ингалятора Неб-Эйд (Flaem Nuova, Италия). Использовали распылитель «Рапидфлаем 2» в режиме I (размер частиц 0,8-2,0 мкм). Результаты демонстрируют эффективность ингаляционной терапии, что позволяет в дальнейшем применять бактериофагосодержащие препараты при инфекционных болезнях животных.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, телята, фаготерапия, ингаляция, мышинная модель.

ВВЕДЕНИЕ

Фаготерапия - это комплекс лечебных мероприятий с применением фагов в качестве лекарственных средств для лечения человека и животных от болезней инфекционной этиологии. Болезни респираторной системы инфекционной этиологии могут приводить к уменьшению численности поголовья и снижению продуктивности. При наличии резистентных к антибиотикам штаммов бактерий привлекательной перспективной альтернативой является ингаляционная фаготерапия, поскольку позволяет доставить препарат непосредственно в очаг поражения [4,10]. Ингаляционная фаготерапия потенциально может изменить схему лечения бактериальных респираторных инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам бактериями. Немаловажным преимуществом, особенно если говорить про бактериофаги, является возможность применять меньшие дозы лекарственных средств, чем потребовалось бы при выборе другого способа введения [5,7].

Не зависимо от способа введения фаготерапию принято делить на пассивную и активную.

Пассивная терапия подразумевает применение большего количества фагов по отношению к бактериям, в отличие от активной, когда эффективность зависит от саморепликации и вторичной инфекции. При ингаляции фагосодержащего препарата существенное значение имеет репликация фагов *in situ*, то есть пассивная терапия. Известны исследования по применению фаготерапии для лечения инфекций, вызванных *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Burkholderia cepacia* и *Mycobacterium tuberculosis*. Для успешной ингаляции фагов необходимо, чтобы они обладали биохимической стабильностью, которой легче достигнуть, применяя жидкую форму препарата [1,2,3,6,8,9]. Особый интерес при бронхопневмонии у телят представляет *Klebsiella pneumoniae*. На данный момент на территории Российской Федерации изготавливаются разнообразные фагосодержащие лечебно-профилактические препараты, эффективные против различных возбудителей, в том числе – *Klebsiella pneumoniae*. Однако фаготерапия сталкивается с биологическими, нормативными и

экономическими препятствиями на пути её дальнейшего внедрения в область сельского хозяйства.

Целью исследования является разработка эффективной схемы ингаляционного введения препаратов бактериофагов на мышинной модели с перспективой внедрения в противоэпизоотические мероприятия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

In vivo оценивали эффективность путём интраназального заражения лабораторных мышей штаммом *Klebsiella pneumoniae*, выделенным от телёнка с бронхопневмонией с дальнейшей ингаляцией коммерческим препаратом бактериофага. Препараты, применяемые в эксперименте представлены в таблице 1.

Мышей разделили на пять групп (1,2-животные, подвергшиеся заражению и проходящие курс ингаляции бактериофага (n=6), 3-животные, подвергшиеся заражению и не проходившие терапию (n=3), 4- контрольная группа животных, не подвергшихся заражению (n=3)). Животные второй группы содержались в боксе для заражённых животных №1, первой – в боксе для заражённых животных №2, третьей – в виварии. Во всех помещениях поддерживалась температура 25°C. Животным обеспечили свободный доступ к воде и корму. При содержании и умерщвлении животных соблюдали основные принципы Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях и «Правила надлежащей лабораторной практики» (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 апреля 2016 года N 199н). Ингаляции проводили с применением компрессорного четырёхрежимного ингалятора Неб-Эйд (Flaem Nuova, Италия). Использовали распылитель «Рапидфлаем 2» в режиме I (размер частиц 0,8-2,0 мкм).

Ингаляции осуществляли в герметичном полимерном боксе, в который проводили распыляющую часть распылителя.

За состоянием мышей осуществляли ежедневный контроль по следующим показателям: гибель, состояние шёрстного покрова и видимых слизистых оболочек, температура кожных покровов, наличие хрипов, активность, жажда, аппетит.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через 24 часа после заражения зафиксировали гибель мышей второй группы. У мышей первой и второй групп в течение всего курса терапии не наблюдали внешних патологических изменений. Патологоанатомическое вскрытие павших мышей проводили непосредственно после гибели. Животных из 1,2 и 4 групп эвтаназировали и так же подвергли патологоанатомическому исследованию. При вскрытии мышей третьей группы

наблюдали следующие изменения, характерные для клебсиеллёза: гиперемия лёгких, на разрезе из просвета бронхиол выделяется серозный экссудат с примесью серой слизи, гиперемия и набухание слизистой оболочки желудка. Патологические изменения у животных первой и третьей групп не выявлены. Из крови, взятой из сердца павших мышей, выделена чистая культура *Klebsiella pneumoniae*.

Обсуждение. В условиях нарастающей антибиотикорезистентности среди возбудителей респираторных болезней крупного рогатого скота, которым относится *Klebsiella pneumoniae*, фаготерапия позволяет усовершенствовать существующие и разработать новые схемы лечебно-профилактических мероприятий при болезнях дыхательной системы животных. Ингаляционный метод доставки препаратов представляет особый интерес, поскольку отличается высокой биодоступностью по сравнению с пероральным введением, при котором наблюдается быстрое уничтожение фагов в печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку возрастает проблема нарастающей антибиотикорезистентности среди микроорганизмов, фаготерапия становится привлекательной альтернативой. Хотя она обладает очевидной клиническим потенциалом, она сталкивается с биологическими, нормативными и экономическими препятствиями на пути её дальнейшего внедрения и более широкого применения.

В ходе научно-исследовательской работы *in vivo* оценена эффективность коммерческих препаратов бактериофагов (Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный, Пиобактериофаг комплексный). Анализ полученных результатов демонстрирует возможность их потенциального применения в составе схемы терапевтических мероприятий при инфекционной бронхопневмонии сельскохозяйственных животных, в том числе в виде препаратов для ингаляционного введения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abedon, Stephen T, and Cameron Thomas-Abedon. "Phage therapy pharmacology." *Current pharmaceutical biotechnology* vol. 11,1 (2010): 28-47. doi:10.2174/138920110790725410
2. Boe, J et al. "European Respiratory Society Guidelines on the use of nebulizers." *The European respiratory journal* vol. 18,1 (2001): 228-42. doi:10.1183/09031936.01.00220001
3. Buncek, Martin. (2002). Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R., Gelbart, W.M.: *An Introduction to Genetic Analysis. Biologia Plantarum - BIOL PLANT.* 45. 50-50. 10.1023/A:1015187026471.
4. Dzuliashvili, M et al. "Study of therapeutic potential

Таблица 1.

Коммерческие лекарственные препараты, используемые в исследовании

Наименование препарата	Производитель
Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный (<i>Klebsiella polyvalent bacteriophage purified</i>)	НПО МИКРОГЕН, АО, Россия
Пиобактериофаг комплексный (<i>Pyobacteriophage complex</i>)	НПО МИКРОГЕН, АО, Россия

of the experimental pseudomonas bacteriophage preparation.” Georgian medical news ,147 (2007): 81-8.

5. Golshahi, Laleh et al. “Toward modern inhalational bacteriophage therapy: nebulization of bacteriophages of Burkholderia cepacia complex.” Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery vol. 21,4 (2008): 351-60. doi:10.1089/jamp.2008.0701

6. Hoe, Susan & Semler, Diana & Goudie, Amanda & Lynch, Karlene & Matinkhoo, Sadaf & Finlay, Warren & Dennis, Jonathan & Vehring, Reinhard. (2013). Respirable Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Lung Infections. Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery. 26. 10.1089/jamp.2012.1001.

7. Semler, Diana D et al. “Aerosol phage therapy efficacy in Burkholderia cepacia complex respiratory infections.” Antimicrobial agents and chemotherapy vol. 58,7 (2014): 4005-13. doi:10.1128/AAC.02388-13

8. Takemura-Uchiyama, Iyo et al. “Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by Staphylococcus aureus in mice.” Microbes and infection vol. 16,6 (2014): 512-7. doi:10.1016/j.micinf.2014.02.011

9. Waldor, M K, and J J Mekalanos. “Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin.” Science (New York, N.Y.) vol. 272,5270 (1996): 1910-4. doi:10.1126/science.272.5270.1910

10. Wright, A et al. “A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa; a preliminary report of efficacy.” Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery vol. 34,4 (2009): 349-57. doi:10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x

EVALUATION OF THE EFFICACY OF INHALATION APPLICATION OF BACTERIOPHAGE PREPARATIONS IN BRONCHOPNEUMONIA ASSOCIATED WITH *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Margarita Vl. Kiyanchuk, orcid.org/0009-0006-2884-9630

Alexander Al. Sukhinin, Dr.Habil. in Biological Sciences, Prof., orcid.org/0000-0002-1245-3440
Saint Petersburg State University of Veterinary Medicine, Russia

Against the background of increasing antibiotic resistance among pathogens of bovine bronchopneumonia, interest in phagotherapy as a therapeutic tool is revived. Inhaled phagotherapy in turn has the potential to change the treatment regimen for bacterial respiratory infections, including those caused by antibiotic-resistant bacteria. Inhaled drug delivery tools allow the delivery of bacteriophages directly to the lesion. An important advantage, especially when it comes to bacteriophages, is the ability to use smaller doses of drugs than would be required if another route of administration were chosen. The article presents the results of evaluating the efficacy of the inhalation method of administration of commercial bacteriophage preparations in a mouse model. Mice were divided into five groups (1,2-animals exposed to *Klebsiella pneumoniae* infection and undergoing bacteriophage inhalation (n=6), 3-animals exposed to infection and not undergoing therapy (n=3), 4- control group of animals not exposed to infection (n=3)). Inhalations were performed using a compressor four-mode Neb-Aid inhaler (Flaem Nuova, Italy). Rapidflyam 2 nebuliser was used in mode I (particle size 0.8-2.0 µm). The results demonstrate the effectiveness of the developed therapy scheme, which allows further use of bacteriophage-containing preparations in infectious diseases of animals.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, calves, bacteriophage therapy, inhalation, mouse model.

REFERENCES

1. Abedon, Stephen T, and Cameron Thomas-Abedon. “Phage therapy pharmacology.” Current pharmaceutical biotechnology vol. 11,1 (2010): 28-47. doi:10.2174/138920110790725410

2. Boe, J et al. “European Respiratory Society Guidelines on the use of nebulizers.” The European respiratory journal vol. 18,1 (2001): 228-42. doi:10.1183/09031936.01.00220001

3. Buncek, Martin. (2002). Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R., Gelbart, W.M.: An Introduction to Genetic Analysis. Biologia Plantarum - BIOL PLANT. 45. 50-50. 10.1023/A:1015187026471.

4. Dzuliashvili, M et al. “Study of therapeutic potential of the experimental pseudomonas bacteriophage preparation.” Georgian medical news ,147 (2007): 81-8.

5. Golshahi, Laleh et al. “Toward modern inhalational bacteriophage therapy: nebulization of bacteriophages of Burkholderia cepacia complex.” Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery vol. 21,4 (2008): 351-60. doi:10.1089/jamp.2008.0701

6. Hoe, Susan & Semler, Diana & Goudie, Amanda & Lynch, Karlene & Matinkhoo, Sadaf & Finlay, Warren &

Dennis, Jonathan & Vehring, Reinhard. (2013). Respirable Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Lung Infections. Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery. 26. 10.1089/jamp.2012.1001.

7. Semler, Diana D et al. “Aerosol phage therapy efficacy in Burkholderia cepacia complex respiratory infections.” Antimicrobial agents and chemotherapy vol. 58,7 (2014): 4005-13. doi:10.1128/AAC.02388-13

8. Takemura-Uchiyama, Iyo et al. “Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by Staphylococcus aureus in mice.” Microbes and infection vol. 16,6 (2014): 512-7. doi:10.1016/j.micinf.2014.02.011

9. Waldor, M K, and J J Mekalanos. “Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin.” Science (New York, N.Y.) vol. 272,5270 (1996): 1910-4. doi:10.1126/science.272.5270.1910

10. Wright, A et al. “A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa; a preliminary report of efficacy.” Clinical otolaryngology : official journal of ENT-UK ; official journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery vol. 34,4 (2009): 349-57. doi:10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x