

Кузьминский И.И., кандидат ветеринарных наук, доцент  
Степанова Е.А., кандидат ветеринарных наук, доцент  
Лиленко А.В., кандидат ветеринарных наук, доцент

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского», г. Минск

## ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГОВ «ЭНДОМЕТРАФАГ»

### Резюме

В статье представлены данные о фармако-токсикологической характеристике нового препарата на основе бактериофагов «Эндометрофаг». Описан опыт по определению острой токсичности препарата, местного раздражающего действия на кожные покровы, раздражающего действия на слизистые оболочки, сенсibiliзирующей (аллергенной) способности, эмбриотоксического и тератогенного действия на лабораторных животных. По параметрам острой токсичности согласно классификации ГОСТ 12.1.007 препарат на основе бактериофагов «Эндометрофаг» относится к IV классу опасности (вещества малоопасные) с  $LD_{50}$  более 5000 мг/кг.

Установлено, что препарат, применяемый крысам в различные сроки беременности, не вызывает патологических изменений в течение беременности у крыс, а также отклонений в развитии потомства, уродств, что свидетельствует об отсутствии у него эмбриотоксических и тератогенных свойств.

### Summary

The article presents data on pharmaco-toxicological characterization of a new drug based on bacteriophages «Endometrofag». The article describes the experience in determining the acute toxicity of the drug, the local irritant effect of the drug on the skin, the irritant effect of the drug on the mucous membranes, sensitizing (allergenic) ability, embryotoxic and teratogenic effects of the drug on laboratory animals. In the parameters of acute toxicity according to the classification GOST 12.1.007 the drug based on bacteriophages «Endometrofag» refers to the IV class of hazard (low hazard substances) with an  $LD_{50}$  of over 5000 mg/kg.

It was found that the drug used in a rats in different periods of pregnancy does not cause pathological changes during pregnancy in rats, as well as deviations in the development of offspring, deformities, which indicates the absence of embryotoxic and teratogenic properties.

Поступила в редакцию 17.05.2019

### ВВЕДЕНИЕ

Одну из важнейших проблем воспроизводительной функции молочного стада представляют послеродовые воспалительные процессы в матке. Частота эндометрита у коров составляет в среднем 27,4–35,0 %, а в некоторых хозяйствах достигает 60,0 % [4, 7].

При несвоевременном или недостаточно эффективном лечении острый эндометрит в большинстве случаев принимает характер хронического течения с развитием необратимых изменений в матке, что в последующем приводит к постоянному бесплодию. Выбраковка коров из стада по причинам гинекологических заболеваний и яловости составляет 8,8–13,9 % и иногда

доходит до 30 % [11, 12].

Для лечения коров, больных эндометритом, в большинстве случаев в практической ветеринарии используются антибиотики, применение которых сопряжено с целым рядом негативных сторон (высокая стоимость, недостаточная лечебная эффективность, снижение качества животноводческой продукции, ингибирующее влияние на факторы локальной и общей резистентности макроорганизма, отрицательное влияние на морфофункциональное состояние эндометрия, постоянно возрастающая лекарственная устойчивость возбудителей заболевания). В настоящее время все большую актуальность и востребованность приобретают биологические препараты на

основе бактериофагов, отличающиеся высокой чувствительностью к ним патогенной микрофлоры, сочетаемостью со всеми видами традиционной антибактериальной терапии, отсутствием противопоказаний к применению [1, 5, 6, 13, 14, 18, 19, 20, 22].

В связи с вышеизложенным представляется вполне обоснованным и актуальным разработка альтернативного метода лечения коров, больных эндометритом, препаратом на основе бактериофагов как эффективного, экологически безопасного и не оказывающего отрицательного влияния на качество животноводческой продукции [2, 3, 8, 9, 15, 17, 21].

В РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» разработан новый препарат на основе бактериофагов «Эндометрафаг».

**Целью** наших исследований было провести токсикологическую оценку разработанного препарата на основе бактериофагов «Эндометрафаг».

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Изучение острой и хронической токсичности, эмбриотоксического и тератогенного действия, а также раздражающих и аллергизирующих свойств лабораторного образца препарата на основе бактериофагов провели согласно «Методическим указаниям по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии» [10].

Для изучения острой токсичности препарата провели 2 серии опытов. В опытах использовали 48 клинически здоровых белых мышей обоего пола массой 18–20 г. Животные содержались на стандартном рационе со свободным доступом к корму и воде.

Препарат задавали на крахмальном клейстере внутрижелудочно натошак при помощи шприца с зондом однократно. Поение и кормление проводили через 2,5–3 часа после введения препарата. За животными вели постоянное клиническое наблюдение в течение 14 дней, при этом учитывали поведенческие реакции (возбуждение или

угнетение), характер поедаемости корма, степень проявления реакции на внешние раздражители, клинический статус, время возникновения и характер проявления интоксикации, сроки наступления гибели животных. После окончания опыта все оставшиеся в живых животные были усыплены. После усыпления подопытных и контрольных животных было проведено патолого-анатомическое вскрытие не позднее чем через 2 часа после смерти. Определение класса опасности препарата проводили согласно ГОСТ 12.1.007-76 «Классификация веществ по степени воздействия на организм».

В первой серии опыта для проведения предварительных испытаний сформировали 1 опытную и 1 контрольную группы белых мышей по 6 голов в каждой. Животным опытной группы препарат применили в дозе 40 000,0 мг/кг (с содержанием фага 108 частиц на 1 мл), мышам контрольной группы вводили крахмальный клейстер, по объему соответствующей вводимой суспензии.

Во второй серии опыта острую токсичность устанавливали методом «тест накопления». Было сформировано 1 опытная и 1 контрольная группа (по 6 белых мышей в каждой). Введение препарата осуществляли трехкратно с интервалом между введениями 2 часа. Мышам опытной группы ввели препарат в дозе 120 000,0 мг/кг (с содержанием фага 108 частиц на 1 мл), мышам контрольной группы вводили крахмальный клейстер по объему соответствующей вводимой суспензии.

В опыте по определению местного раздражающего действия препарата на кожные покровы были использованы 3 кролика массой 2,0–2,5 кг. Препарат наносили на выстриженные боковые поверхности кожи (правая сторона) 1,5x2,0 см в разведениях 1:10, 1:50 и 1:100 на этаноле. Контролем служила противоположная сторона (левая) тела, куда наносили в этой же дозе этанол. Экспозиция составила 4 часа, после чего остатки вещества аккуратно смыли. Наблюдение вели первые 8 часов

ежечасно, а затем через 16 часов после экспозиции.

При определении раздражающего действия препарата на слизистые оболочки использовали метод конъюнктивальной пробы на 3 кроликах массой 2,0–2,5 кг.

Контрольным животным (3 кролика) препарат не применяли.

Изучение сенсibilизирующей (аллергенной) способности препарата определяли методом накожных аппликаций на 5 морских свинок массой 320–350 г. Для этого препарат наносили путём многократных аппликаций на участок кожи подопытных свинок ежедневно в течение 15 дней в разведении 1:50 и 1:100 на этаноле. Контрольным животным наносили дистиллированную воду по аналогичной методике. Затем после 14-дневного перерыва на свежесвыстриженные участки кожи с противоположной стороны наносили аналогично разрезающую дозу испытуемого препарата. Реакцию учитывали в течение 72 часов.

Исследование препарата провели на 45 половозрелых белых крысах обоего пола массой тела 220–250 г. Было сформировано 5 групп: самок разделили на четыре опытные и одну контрольную группы по 7 голов, в каждой группе было по 2 самца. Самок подсаживали в клетку к самцу вечером, а утром следующего дня исследовали мазок из влагалища. День обнаружения спермиев в мазке крыс (или влагалищной пробки у крыс) считали началом беременности. Препарат (с содержанием фага 108 частиц на 1 мл) в дозе 40 000 мг/кг массы тела применили внутрь: крысам первой группы с 1 по 7 день беременности (период эмбриогенеза), второй группы – с 8 по 14 день беременности (период органогенеза), третьей группы – с 15 по 19 день беременности (плодный период филогенеза), четвертой группы – с 1 по 19 день (в течение всего периода беременности). Крысам контрольной группы препарат не применяли. За животными велось клиническое наблюдение.

Для выявления эмбриотоксического эффекта по 5 самок из опытных и контрольной групп декапитировали на 20-й день беременности.

Для выявления тератогенного эффекта плоды переносили в чашки Петри с физиологическим раствором и исследовали под бинокулярной лупой с целью выявления уродств.

Для выяснения органогенеза в постнатальном периоде было получено потомство от двух самок из каждой группы, за которым вели клиническое наблюдение в течение двух месяцев. При этом учитывали двигательную активность, сроки открытия глаз, появление шерстного покрова и т.д.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В первой серии опыта мыши оставались активными, хорошо поедали корм, шерсть сохраняла гладкий и блестящий вид. Падежа животных отмечено не было, в связи с чем далее определение острой токсичности во второй серии опыта устанавливали методом «тест накопления».

В ходе проведения второй серии опыта падежа животных во всех группах не отмечалось. Животные были клинически здоровы, основных признаков отравления не наблюдалось, поведение было активным, животные адекватно реагировали на внешние раздражители, потребление корма и воды хорошее. Координация движения, тактильная, болевая, звуковая и световая чувствительность, состояние волосяного и кожного покрова, окраска слизистых оболочек и консистенция каловых масс у животных опытных и контрольных групп были одинаковыми.

Патологоанатомическое вскрытие усыпленных животных показало, что состояние внутренних органов у опытных групп было таким же, как в контрольной группе, патологии отмечено не было.

Таким образом, абсолютно смертельную дозу и среднесмертельную дозу установить не удалось.

Результаты проведенных испытаний показали, что препарат на основе бактериофагов относится к IV группе опасности по ГОСТ 12.1.007-76 ( $LD_{50} > 5000$  мг/кг) [16].

В опыте по определению местного раз-

дражающего действия препарата на кожные покровы установлено, что препарат не обладает местным раздражающим действием на кожу животных, так как на протяжении всего периода наблюдений не отмечено каких-либо покраснений, припухлостей, болезненности и других изменений в месте применения препарата.

Определение раздражающего действия препарата на слизистые оболочки показало, что внесение препарата в дозе 50 мг однократно в конъюнктивальный мешок глаза кроликов вызывало незначительное слезотечение и покраснение слизистой оболочки, которое проходило через 30–60 минут. При дальнейшем наблюдении через 24 и 48 часов каких-либо патологических изменений со стороны конъюнктивы и склеры не отмечалось. В результате опыта установлено, что препарат не обладает раздражающим действием на слизистые оболочки и органы зрения животных, так как покраснения, припухлости, болезненности, расчёсов в области конъюнктивального мешка не отмечено.

Полученные данные при изучении сенсibilизирующей (аллергенной) способности препарата свидетельствуют о том, что препарат не обладает сенсibilизирующим действием, так как не вызывает реакции при использовании его после перерыва в длительном применении.

При определении эмбриотоксического эффекта по результатам вскрытия матки и обследования плаценты, плодов, определения числа желтых тел беременности в яичниках, количества мест имплантации в матке, количества живых и мертвых зародышей установлено, что количество живых плодов у самок первой группы – 56, второй группы – 55, третьей группы – 57, четвертой – 55, контрольной – 58 соответственно. Количество мест имплантации совпадало с количеством живых плодов.

При этом аномалий глаз (анофтальмия, микрофтальмия и др.), мозга (мозговая грыжа и др.), лицевого черепа (заячья губа, волчья пасть и др.), конечностей, пальцев, хвоста, позвоночника, передней брюшной стенки не выявлено, что еще

раз подтверждает отсутствие эмбриотоксического и тератогенного действия у комплексного препарата на эмбрионы крысят.

При выяснении органогенеза в постнатальном периоде установлено, что во всех опытных и контрольной группах патологических родов, уродств и мертворожденных животных не наблюдали.

Наблюдение за крысятами на протяжении 2 месяцев (срок наблюдения) показало, что отклонений в их поведении, развитии и физиологическом состоянии отмечено не было. Аппетит был хороший, животные подвижные. Потомство во всех группах развивалось одинаково, без каких-либо изменений, и сохранность составила 100 %.

Таким образом, препарат, применяемый крысам в различные сроки беременности (периоды эмбриогенеза, органогенеза, плодный период филогенеза и в течение всего периода беременности), не вызывает патологических изменений у крыс, а также отклонений в развитии потомства, что свидетельствует об отсутствии у препарата тератогенных, мутагенных и эмбриотоксических свойств.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По параметрам острой токсичности согласно классификации ГОСТ 12.1.007 препарат на основе бактериофагов «Эндометрофаг» относится к IV классу опасности (вещества малоопасные) с LD<sub>50</sub> более 5000 мг/кг.

Препарат не оказывает местного раздражающего действия на кожные покровы, раздражающего действия на слизистые оболочки лабораторных животных и не обладает аллергенными свойствами.

Установлено, что препарат, применяемый крысам в различные сроки беременности (периоды эмбриогенеза, органогенеза, плодный период филогенеза и в течение всего периода беременности), не вызывает патологических изменений у крыс, а также отклонений в развитии потомства, уродств, что свидетельствует об отсутствии у него эмбриотоксических и тератогенных свойств.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Использование адаптированного сальмонеллезного бактериофага в практике лечения и профилактики нозокомиального сальмонеллеза / В.Г. Акимкин [и др.] // Журнал микробиологии – 1998. – № 6. – С. 85–86.
2. Бактериофаги для лечения и профилактики гнойно-септических инфекций / З.И. Алавидзе [и др.] // Госпитальная эпидемиология: сб. науч. тр. – Л., 1989. – С. 92–94.
3. Алферова, Э.В. Биологические свойства бактериофага *Enterobacter* и разработка научных основ технологии получения препарата бактериофагов: автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Э.В. Алферова. – Уфа, 1995. – 30 с.
4. Андреева, А.В. Некоторые показатели естественной резистентности организма коров, больных эндометритами / А.В. Андреева // Вестник ветеринарии: науч. тр. Академии ветеринарной медицины. – Вып. V. – Оренбург, 2002. – С. 13–17.
5. Эффективность применения пиобактериофага у беременных с пиелонефритом / Н.Г. Бесмертная [и др.] // Современные методы диагностики и лечения в акушерстве и гинекологии: сб. науч. тр. – Саратов, 1999. – С. 35–36.
6. Фаготерапия и профилактика острых кишечных инфекций и детей: метод. рекомендации / Н.В. Воротынцева [и др.]. – М., 1991. – 11 с.
7. Гавриш, В.Г. Субклинический эндометрит у коров (диагностика и терапия) / В.Г. Гавриш // Ветеринария. – 1998. – № 1. – С. 36–38.
8. Фагобиодерм – новые перспективы для лечения ран и трофических язв / Н. Джавакишвили [и др.] // Экспер. клиническая медицина. – 1999. – № 2. – С. 83–84.
9. Чувствительность возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний к лечебным бактериофагам / Д.Д. Меньшиков [и др.] // Антибиотики. – 1980. – № 5. – С. 356–359.
10. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / НАН Беларуси, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского; сост. А.Э. Высоцкий [и др.]. – Минск, 2007. – 156 с.
11. Муртазин, Б.Ф. Бактериальная флора при эндометритах у коров (идентификация и терапия): автореф. дисс. ... канд. ветеринар. наук / Б.Ф. Муртазин. – М., 1972. – 20 с.
12. Напримеров, В.А. Микрофлора матки при гнойно-катаральных эндометритах у коров / В.А. Напримеров // Актуальные проблемы сельскохозяйственной экологии. – Новосибирск, 2004. – С. 39–42.
13. Стандартизация лечебно-профилактических бактериофагов. Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов / Л.Д. Перемитина [и др.]. – М., 1976. – № 2. – С. 157–161.
14. Сафронова, Л.А. Характеристика микрофлоры, выделенной при эндометритах крупного рогатого скота / Л.А. Сафронова, В.А. Кудрявцев, А.И. Осадчая // Микробиологический журнал. – 1991. – Т. 53. – № 6. – С. 71–77.
15. Сидоров, М.А. Нормальная микрофлора животных и ее коррекция пробиотиками / М.А. Сидоров, В.В. Субботин, Н.В. Данилевская // Ветеринария. – 2000. – № 11. – С. 17–21.
16. ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности: ГОСТ 12.1.007-76. – Введ. 01.01.77. – М.: Изд-во стандартов, 1976.
17. Сушин, И.А. Бактериофаги и их применение в медицинской практике / И.А. Сушин. – М., 1958. – 120 с.
18. Barrow, P.A. Bacteriophage therapy and prophylaxis rediscovery and renewed assessment of potential / P.A. Barrow, J.S. Soothill // Trends Microbiol. – 1997; 7: 268–271.
19. Bacteriophage treatment of suppurative skin infection / St. Cislo [et al.]. // Arch Immunol Ther Exp. – 1987; 2: 175–83.
20. Use of bacteriophages in the treatment of chronic bacterial diseases / H. Kaczkowski [et al.] // Wiad Lek. – 1990; 43:136–41.
21. Smith, H.W. The control of experimental *E. coli* diarrhea in calves by means of bacteriophage / H.W. Smith, M.B. Huggins // J Microbiol. – 1987; 33: 1111–1126.
22. Sulakvelidze, A. Bacteriophage therapy (minireview) / A. Sulakvelidze Z. Alavidze, J.G. Morris // Antimicrob Agents Chemother. – 2001; 45:3: 649–659.