

ходов, технологических схем позволяет расширить ассортимент отечественных, высокоэффективных, экологически безопасных антибактериальных препаратов.

*Библиографический список*

1. Адамс, М. Бактериофаги. – [Методы изучения вирусов бактерий] – М., 1961. - 527 с.
2. Ворошилова, Н.Н. Эпидемиологическая и клиническая эффективность препаратов бактериофагов при лечении и профилактике инфекционных заболеваний / Н.Н. Ворошилова, Т.Б. Казакова, Г.Г. Боговазова, Э.В. Алферова // Создание и перспективы применения медицинских иммунобиологических препаратов: Материалы конференции. – Пермь, 2008. С. 91-94.
3. Казьянин, А.В. Бактериофаги: опыт производства и применения / А.В. Казьянин, Е.В. Орлова, М.Г. Ефимова и др., // Фармация, № 3, 2010. – С.36-37.
4. Ковязина, Н.А. Разработка состава и технологии желудочно-резистентных таблеток «Секстафаг» / Н.А. Ковязина, В.И. Решетников, Е.В. Функнер, М.Г. Ефимова // Фармация, № 7, 2008. - С.36-39.
5. Ковязина, Н.А. Характеристика свойств таблетированной лекарственной формы поливалентных бактериофагов / Н.А. Ковязина, Е.В. Функнер, О.И. Шитова и др., // Биопрепараты, № 2, 2010. - С.18-21.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). Часть 2 – Москва.: Гриф и К. 2012.-536с.

**DEVELOPMENT OF SOLID DOSAGE FORMS ON THE BASE OF COMPLEX POLYVALENT BACTERIOPHAGE PREPARATIONS**

*Kovyazina N.A., Kazyanin A.V., Nikolaeva A.M., Funkner E.V.*

**Key words:** *bacteriophage, bioavailability, capsules, design, lytic activity, tablets, pharmacokinetics.*

*The article is devoted to the development of solid dosage forms of bacteriophages. High bioavailability of the original composition of the tablets and capsules as compared with the liquid drug has been revealed. As a result of the researches conducted the algorithm design of solid dosage forms of bacteriophages has been developed: in the sum the proposed constructive approaches and the technological schemes enable us to extend the range of domestic, high-performance, environmentally safe antibacterial drugs.*

УДК 578.232.4

**ПСЕВДОЛИЗОГЕННЫЕ АССОЦИАЦИИ ВИРУЛЕНТНОГО БАКТЕРИОФАГА G7C И ШАММА-ХОЗЯИНА E. COLI 4S**

*<sup>1,2</sup>Летарова М.А., <sup>1</sup>Стрелкова Д.А., <sup>2</sup>Бакумова А.Д., <sup>1</sup>Куликов Е.Е., <sup>1</sup>Голомидова А.К., <sup>1</sup>Прохоров Н.С., <sup>3</sup>Кутузова Н.М.<sup>1,2</sup>Летаров А.В.*

*1 – ФГБУН «Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН», 117312, г. Москва, Проспект 60-летия Октября, д. 7, корп. 2, +7(499) 135-21-39*

*2 – ГБОУ «Школа-Интернат Интеллектуал», 121357, г. Москва, ул. Кременчугская, д. 13. +7(499) 445-52-10*

**Ключевые слова:** N4-подобный бактериофаг, подовирус, псевдолизогенные ассоциации, *Escherichia coli*.

В работе исследовано образование и развитие метастабильных, перевиваемых на плотных средах ассоциаций облигатно-вирулентного N4-подобного бактериофага G7C и его хозяина.

### **Введение.**

Бактериофаги являются естественными индигенными компонентами симбиотических микробных систем человека и животных. Особенностью кишечной экосистемы лошади является преобладание вирулентных бактериофагов, что относится также и к популяциям фагов *E. coli*, которые обнаруживаются у некоторых животных в достаточно большом титре до  $10^7$  Б.О.Е. грамм фекалий. В то же время титры колифагов подвергаются значительным колебаниям (более 4 порядков в течение недели; Golomidova et al. 2007, Куликов с соавт. 2007), падая в определенные периоды до весьма низких значений (при использовании любой конкретной тест-культуры для мониторинга) При этом общий титр *E. coli* составляет около  $10^6$  К.О.Е./ г. Штаммовое разнообразие колиформных бактерий чрезвычайно высоко - в кишечнике одной лошади могут содержаться первые сотни различных штаммов (Golomidova et al. 2007, Исаева с соавт. 2010). Также известно (Golomidova et al. 2007), что спектр хозяев большинства кишечных колифагов, выделенных от лошадей, достаточно узок, вплоть до того, что хозяином может являться единственный штамм кишечной палочки. Обнаружено, что эти вирулентные бактериофаги могут длительное время обнаруживаться в кишечнике лошади, так, например, показана персистенция бактериофага Lc3 у лошади в течение трех лет (Голомидова с соавт. личное сообщение). Таким образом популяции индивидуальных колифагов в экосистеме кишечника лошади часто оказываются в ситуации, когда общая плотность доступных хозяев падает ниже критической (Kasman 2005), что должно было бы приводить к элиминации этих фагов. Одним из возможных объяснений длительного существования штаммов вирулентных бактериофагов в экосистеме кишечника лошади может быть образование ими так называемых псевдолизогенных ассоциаций (ПА) с хозяевами, которые могут существовать в виде локальных (микро) колоний. В таких ПА должны создаваться следующие условия:

1. Все время существования ассоциации обеспечивается рост клеток, чувствительных к данному бактериофагу.
2. Поддерживается высокая плотность популяции *E. coli*, достаточная для поддержания фага в литическом цикле.
3. ПА должна быть стабильна.
4. ПА должна иметь способность к пролиферации.

В этой работе мы исследовали возможность формирования и свойства ПА на модели системы бактериофаг G7C – *E. coli* 4s, которая была выделена из образца фекалий лошади и детально охарактеризована, включая определение полной последовательности генома фага (Kulikov et al. 2012)

### **Материалы и методы.**

Штаммы бактерий и бактериофагов и их культивирование.

В работе использовали штамм *E. coli* 4s и N4 – подобный бактериофаг G7C из коллекции лаборатории. Кроме того использовали T5 – подобный фаг MPC600, также выделенный

нами от лошадей, который обладал способностью инфицировать дериваты *E. coli* 4s, резистентные к фагу G7C, но не исходный штамм. Для культивирования фага MPC600 использовали штамм *E. coli* C600. Бактерии выращивали на питательной среде LB следующего состава: триптон (Pronadisa) – 10г, дрожжевой экстракт (Pronadisa), - 5г, NaCl – 5г, вода до 1 л. Агаризованная среда, LBsoft содержала 0,6% агар-агара, твердый LB – 1%.

Анализ состава ПА.

В некоторых случаях (см. результаты) определяли отношение фаг/клетки. Для этого приготавливали суспензию псевдолизогенной ассоциации (ПА) в физиологическом растворе, фаг высевали в разведениях на газон штамма-хозяина до отдельных бляшек, а клетки шпателем до получения отдельных колоний

Для получения субклонов бактерий из ПА клетки отмывали от экзогенного фага с помощью инактивирующего свободные вирусные частицы экстракта чая (de Siqueira et al. 2006). Вирицидный экстракт готовили следующим образом: 10 г листьев чая заливали 100 мл кипящей стерильной воды, настаивали в сухожаровом шкафу при 100°C в плотно закрытом флаконе 30 мин, фильтровали через бумажный, а затем через мембранный фильтр, с порами 0,44 мкм или автоклаивировали. Экстракт хранили при +4°C.

Получение отдельные бляшек бактериофагов производилось методом посева двойным слоем на питательную среду. Получение газонов также производилось с помощью метода «двойного слоя», только без добавление бактериофага.

Пассирование ассоциаций с помощью стерильных зубочисток или стерильных гематокритных капилляров, путем перекалывания с одной чашки Петри с агаром на другие, с твердой средой или преформированным газоном.

ПЦР и анализ его результатов

ПЦР ставили в объеме 20 мкл, на амплификаторе BioRad 1852000. Для детекции фага использовали праймеры на ген 50 (g50D 5' GCCCATGCGTATTCACAA и g50R 5' CCATAGC-GTGTGTTACCGA).

Анализ продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1 %-ном агарозном геле с добавлением 0,1% раствора бромистого этидия. Просматривали гели на трансиллюминаторе при длине волны 254 н.м. или 312, в зависимости от концентрации материала.

Получение псевдолизогенных асоциаций.

Фаг G7C был рассеян до отдельных бляшек. Из некоторых, случайно выбранных бляшек с помощью стерильной зубочистки, на чашку с твердым агаром, были перенесено содержимое бляшек. На чашке наблюдался рост бактерий.

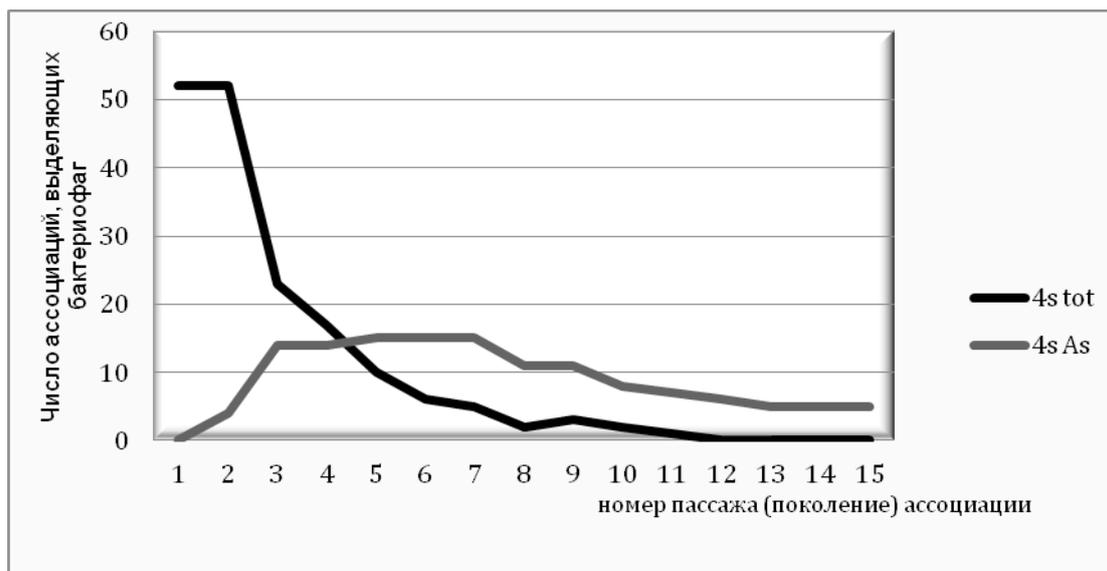
Эти культуры переносили на чашки с газоном исходного штамма. Если в популяции наблюдался бактериофаг, то на газоне вокруг места посева образовывалась зона лизиса.

Одна итерация называлась поколением. Всего было протестировано 53 ассоциаций (ПА) в 12 поколениях.

### Результаты.

В каждом поколении учитывалось количество ПА, выделяющих детектируемый фаг.

Из 53 ПА к четвертому поколению большинство прекратило выделять фага, но шесть ПА продолжали выделять фага вплоть до 15 поколения (Рис. 1)



**Рис.1. Изменение количества ассоциаций, выделяющих фаг, в череде поколений при тестировании на газонах E.coli 4s и 4sAs (информацию об этом штамме см. ниже)**

Были проанализированы свойства субклонов бактерий из пяти ПА, которые сохраняли способность выделять фага к 12 поколению. Определили их чувствительность к исходному фагу G7C.

Было обнаружено, что не смотря на активное выделение фага, субклоны ПА из поколений с высокими номерами (6-7) не чувствительны к исходному фагу.

При расewe суспензии исходного штамма E.coli 4s на фаговый агар, содержащий фаг G7C было обнаружено, что в культуре всегда присутствуют устойчивые клетки с частотой около  $10^{-4}$  (что значительно выше обычной частоты фагоустойчивых мутантов). Этот дериват мы обозначили 4sR. В отличие от штамма 4s, 4sR оказался чувствителен к фагу MPC600.

Тестирование субклонов ПА обнаружило, что практически все они чувствительны к MPC600 и при этом часто выделяют фага на своих собственных газонах, а на газонах исходного штамма-хозяина фага не выделяют. При дальнейшем исследовании было обнаружено что:

- Все субклоны ПА чувствительны к фагу MPC600

- Несмотря на вируцидную обработку суспензии перед посевом, некоторые субклоны содержат ассоциированный с ними фаг

- Все субклоны способны расти на фаговом агаре с G7C

- В 7 пассаже появляются субклоны, на которых фаг G7C способен образовывать мелкие бляшки. В 8 пассаже такие субклоны преобладают, что, однако, не сопровождается увеличением титра фага, детектируемого на газоне штамма 4s.

Таким образом, при образовании и развитии ПА изменяются и фаги и клетки. Для дальнейшего исследования этого явления мы выбрали такой субклон, на котором растет фаг, содержащийся в ПА (далее –phi 8810), но не растет исходный фаг G7C. Этот штамм мы назвали 4sAs Производные этого штамма, резистентные к фагу phi8810 (а равно и к исходному фагу G7C) были назывались 4sAR. Мы исследовали эффективность посева (относительно штаммов, на которых получены соответствующие лизаты) фагов G7C и phi8810 и MPC600 на газонах штаммов E.coli 4s, 4sAs, 4sR и 4sAR. (Табл. 1).

Штаммы	ЭП, бактериофаги		
	G7C	Phi8810	MPC600
4s	1,0	10 <sup>-5</sup>	0
4sAS	10 <sup>-6</sup>	1,0	1,0
4sR	0	Л	1,0
4sAR	0	0	1,0
C600	0	0	1,0

**Таблица 1 - Эффективность посева (ЭП) бактериофагов на различных штаммах *E.coli* относительно штаммов, использованных для приготовления соответствующих лизатов. Л – зона лизиса наблюдается при нанесении на газон капли концентрированного лизата, но при разведении фага отдельных блешек не образуется.**

Анализ морфологии фагов с помощью трансмиссионной электронной микроскопии показал, что фаг phi8810 морфологически неотличим от исходного фага G7C. Это подтверждается также данными ПЦР. Таким образом, фаг phi 8810 не является контаминантом, но представляет собой дериват фага G7C с измененным спектром хозяев. Исследование профилей белков этих фагов с помощью ДСН-ПААГ электрофореза также не выявило между ними различий.

Морфология клеток различных дериватов *E.coli* 4s, полученных в этой работе, также не различалась (по данным световой микроскопии), однако исходный штамм 4s и штамм 4sAs обладали способностью формировать крупные агрегаты клеток, причем у 4sAs эти агрегаты иногда достигают размеров, различимых невооруженным взглядом. При этом все эти штаммы практически не образуют биопленок на поверхности пластика иммунологических плашек (данные не приведены).

#### **Выводы.**

1. Выявлен один из механизмов длительного поддержания вирулентных бактериофагов в ПА.
2. Развитие ПА бактериофага G7C и штамма *E. coli* 4s сопровождается увеличением разнообразия штаммов бактерии и фага, по сравнению с исходными компонентами.
3. Этот механизм может принимать участие в формировании и поддержании высокой внутривидовой гетерогенности популяций *E. coli* в кишечнике лошадей.

#### **Библиографический список**

1. Golomidova A, Kulikov E, Isaeva A, Manykin A, Letarov A. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions. // *Appl Environ Microbiology*. 2007. 73:5975–5981
2. Куликов Е.Е., Исаева А.С., Роткина А.С., Манькин А.А. и Летаров А.В. Биоразнообразие и динамика бактериофагов в фекалиях лошадей. // *Микробиология*. 2007. **76**, 271-278
3. Исаева А.С., Куликов Е.Е., Тарасян К.К., Летаров А.В. Новый метод высококорреляющего геномного ПЦР-фингерпринтинга энтеробактерий. // *Acta naturae*. 2010. **2** (1), 82-87
4. Kasman LM. Barriers to coliphage infection of commensal intestinal flora of laboratory mice. // *Virology*. 2005 Apr 15;2:34.
5. Kulikov E., Kropinski A.M., Golomidova A.K., Isolation and characterization of a novel indigenous intestinal N4-related coliphage vB\_EcoP\_G7C. // *Virology*. 2012. 426 (2012) 93–99
6. de Siqueira RS, Dodd CE, Rees CE. Evaluation of the natural virucidal activity of teas for use in the phage amplification assay. // *Int J Food Microbiol*. 2006. Oct 1;111(3):259-62.