

УДК 615.9

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология

DOI: 10.37903/vsgma.2025.4.2 EDN: BZWBZZ

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ АНТИГЕНОВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ КОМПЛЕКСОВ**© Сидоров Н.Г.¹, Солдатенкова А.В.¹, Михайлова Н.А.¹, Афанасьева Е.Ю.², Гуреев В.В.²**¹Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Россия, 105064, Москва, Малый Казенный пер., 5А²НМИЦК им. академика Е.И. Чазова, Россия, 121552, Москва, ул. Академика Чазова, 15а*Резюме*

Цель. Изучить острую токсичность антигенов *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* при внутрибрюшинном введении мышам, а также исследовать токсичность вариантов их комплексов при однократном подкожном введении и шестикратном интраназальном введении мышам и крысам.

Методика. Токсичность отдельных антигенов исследовали на мышах SHK при внутрибрюшинном введении в дозах от 50 до 200 мкг. Также изучена острая токсичность антигенного комплекса с и без добавления сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона гидрохлорида, используемого в качестве дополнительного иммуностимулятора. Варианты антигенных комплексов вводили мышам СВА и крысам Wistar однократно подкожно в дозах 150-300 мг/кг (мыши) и 90-150 мг/кг (крысы), а также шестикратно интраназально в дозах 120-180 мг/кг. Наблюдение за клинической картиной и изменением массы тела проводили ежедневно в течение 14 дней.

Результаты. Исследование острой токсичности антигенов *S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris* и *K. pneumoniae* показало отсутствие токсических эффектов, кроме обратимого снижения массы тела. Интраназальное введение комплексов в исследуемых дозах не вызывало интоксикации и гибели. При подкожном введении отмечали обратимые дозозависимые изменения (снижение активности, тремор, изменения шерстного покрова), наиболее выраженные при 300 мг/кг, но без летального исхода. Половых различий и различий между вариантами комплексов не обнаружено. ЛД₅₀ не определён из-за отсутствия гибели; максимальные дозы (300 мг/кг подкожно и 180 мг/кг интраназально) превышали предполагаемую терапевтическую дозу для человека более чем в 100000 и 60000 раз соответственно.

Заключение. Результаты исследования острой токсичности отдельных антигенов и вариантов антигенного комплекса при введении максимальных возможных доз подтверждают их безопасность, что позволяет продолжить доклиническое исследование вариантов антигенных комплексов, включая изучение иммуотропной активности, аллергенности, субхронической и репродуктивной токсичности.

Ключевые слова: респираторные инфекции, условно-патогенные бактерии, острая токсичность, антигенные комплексы

PRECLINICAL ACUTE TOXICITY STUDY OF ANTIGENS FROM OPPORTUNISTIC BACTERIA AND THEIR COMPLEXES**Sidorov N.G.¹, Soldatenkova A.V.¹, Mikhailova N.A.¹, Afanasyeva E.Yu.², Gureev V.V.²**¹I. I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 5A, Maly Kazenny lane, 105064, Moscow, Russia²National Medical Research Center of Cardiology named after academician E.I. Chazov, 15a, Akademika Chazova St., 121552, Moscow, Russia*Abstract*

Objective. To study the acute toxicity of antigens of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* following intraperitoneal administration in mice, and to investigate the

toxicity of their complex variants after a single subcutaneous injection and six repeated intranasal administrations in mice and rats.

Methods. The toxicity of individual antigens was studied in SHK mice after intraperitoneal injection at doses ranging from 50 to 200 µg. The acute toxicity of an antigen complex, with and without the addition of a copolymer of 2-methyl-5-vinylpyridine and N-vinylpyrrolidone hydrochloride (used as an additional immunostimulant), was also investigated. Variants of the antigen complexes were administered to CBA mice and Wistar rats either subcutaneously once at doses of 150-300 mg/kg (mice) and 90-150 mg/kg (rats), or intranasally six times at doses of 120-180 mg/kg. Clinical observations and body weight monitoring were performed daily for 14 days.

Results. The study of acute toxicity of *S. aureus*, *E. coli*, *P. vulgaris*, and *K. pneumoniae* antigens showed no toxic effects, except for reversible body weight loss. Intranasal administration of the complexes at the tested doses did not cause intoxication or mortality. Subcutaneous administration resulted in reversible dose-dependent changes (reduced activity, tremor, changes in coat condition), most pronounced at 300 mg/kg, but without lethal outcomes. No sex-related differences or differences between complex variants were observed. LD₅₀ could not be determined due to the absence of mortality; the maximum doses tested (300 mg/kg subcutaneously and 180 mg/kg intranasally) exceeded the estimated therapeutic dose for humans by more than 100,000 and 60,000 times, respectively.

Conclusion. The results of acute toxicity studies of individual antigens and antigen complex variants at the highest feasible doses confirm their safety, supporting further preclinical evaluation of the antigen complexes, including studies of immunotropic activity, allergenicity, subchronic, and reproductive toxicity

Keywords: respiratory infections, opportunistic bacteria, acute toxicity, antigenic complexes

Введение

Респираторные инфекции остаются одними из наиболее часто встречающихся и социально значимых заболеваний, характеризующихся высокой заболеваемостью и смертностью. Условно-патогенные бактерии, наряду с вирусными патогенами, являются значимыми возбудителями респираторных инфекций и отличаются широкой распространённостью и разнообразием [4, 7, 9]. Существующие терапевтические стратегии, основанные на применении антибактериальных средств, часто демонстрируют ограниченную эффективность, особенно у пациентов с нарушениями иммунной системы [6].

В этой связи актуальной задачей является поиск альтернативных стратегий профилактики и лечения, направленных на усиление собственных защитных механизмов организма. Особый интерес представляет стимуляция системы врождённого иммунитета, обеспечивающей первую линию защиты от инфекционных агентов. Одним из перспективных направлений является использование препаратов на основе антигенов условно-патогенных бактерий. Исходя из литературных данных, иммуностимуляторы, полученные из лиофилизированных бактериальных экстрактов для перорального применения, уже более полувека используются в клинической практике для профилактики и лечения инфекций дыхательных путей. Их важное преимущество заключается в способности вызывать перекрёстный иммунный ответ и формировать более устойчивую защиту без риска развития антибиотикорезистентности [2, 3, 8, 12].

Слизистые оболочки верхних дыхательных путей являются основным входными воротами респираторных инфекций и важным звеном защиты организма. Эффективная профилактика респираторных инфекций предполагает не только формирование системного иммунитета, но и усиление местной защиты слизистых оболочек, что ограничивает размножение патогенов и снижает риск повторного инфицирования [10]. Назальная форма введения обеспечивает доставку активных веществ непосредственно к слизистой, способствует секреции sIgA, лизоцима, антимикробных пептидов и активации врождённого иммунитета [3, 11]. С учётом указанных преимуществ особый интерес представляет оценка безопасности при интраназальном введении.

В рамках исследования проводили изучение токсичности отдельных антигенов условно-патогенных бактерий *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, на основании чего формировали их совместный комплекс, подвергнутый дальнейшему токсикологическому исследованию. В связи с этим целью исследования являлось изучение острой токсичности антигенов *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. aureus* при внутрибрюшинном введении мышам, а также исследование токсичности вариантов их комплексов при однократном подкожном введении и шестикратном интраназальном введении мышам и крысам.

Методика

В работе использовали антигены условно-патогенных бактерий *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. aureus* – как по отдельности, так и в виде совместного антигенного комплекса (КА), а также КА с добавлением сополимера 2-метил-5-винилпиридина и N-винилпирролидона гидрохлорида (КА + сополимер), в качестве дополнительного иммуностимулятора. Антигены были получены по методике, описанной в патенте [1]. В антигенной композиции комплексов содержалось по 0,25 мг антигенов каждого вида.

Токсичность антигенов *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. aureus* изучали на белых мышах SHK весом 18-20 г. Для оценки чувствительности лабораторных животных к токсическому действию изучаемых КА использовали 320 мышей линии СВА (160 самок и 160 самцов), массой 18-20 г. и 320 крыс линии Wistar (160 самок и 160 самцов), массой 200-220 г. полученных из питомника филиала «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животных содержали в виварии в соответствии с рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.11.2023 г. N33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований».

Лабораторные животные были разделены на группы в зависимости от дозы и способа введения исследуемых образцов. Для изучения острой токсичности отдельных антигенов формировали группы по 5 мышей. При исследовании вариантов КА группы мышей и крыс состояли из 20 особей (по 10 самок и 10 самцов). Для проведения исследования отдельных антигенов использовали дозы в диапазоне от 50 до 200 мкг в 0,5 мл физиологического раствора и вводили внутривентрально. Варианты КА вводили шестикратно интраназально в дозах 120-180 мг/кг для мышей и крыс, либо однократно подкожно – мышам в диапазоне 150-300 мг/кг, крысам – 90-150 мг/кг. Объём интраназального введения составлял 5 мкл в каждую ноздрю для мышей и 50 мкл для крыс (с учётом ограничений по объёму), введение проводили 6 раз с интервалом в 1 час. Подкожное введение осуществляли однократно с помощью шприца, объёмом до 1 мл для мышей и до 5 мл для крыс. Интактным группам вводили физиологический раствор в эквивалентном количестве. Наблюдение за клинической картиной и изменением массы тела осуществляли в течение 14 дней.

Статистический анализ полученных данных был проведен с использованием языка программирования Python. Достоверность различий между группами устанавливали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Результаты считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении острой токсичности антигенов условно-патогенных бактерий поведение и общее состояние животных оставалось без изменений, гибели животных не зафиксировано. Антигены *S. aureus* не вызывали токсических эффектов, масса тела оставалась стабильной. Антигены *E. coli* и *P. vulgaris* вызывали кратковременное снижение массы тела в первые два дня: максимальная потеря на 2-е сутки составила 13,3% и 10,9% соответственно, далее масса возвращалась к исходным значениям. При введении антигенов *K. pneumoniae* в дозах 50 и 100 мкг снижение массы тела наблюдалось в течение четырёх дней, максимальная потеря составила 14,9% и 16,2% соответственно, затем масса восстанавливалась до исходных значений. В группе с дозой 200 мкг у двух мышей снижение массы сохранялось до 7-х суток, максимальная потеря на 1-е сутки составила 15%, после чего масса вернулась к исходному уровню.

Интраназальное введение двух вариантов КА в выбранном диапазоне доз не вызывало признаков интоксикации и гибели у мышей и крыс. При этом при подкожном введении обоих вариантов КА у мышей и крыс наблюдали прямой дозозависимый эффект, при котором токсические явления усиливались с увеличением дозы, но не приводили к летальному исходу.

В группах крыс, получавших варианты КА в дозах 90-130 мг/кг, токсических эффектов не наблюдали. При дозе 150 мг/кг у мышей и крыс через 4-5 ч. отмечали снижение двигательной активности, которое исчезало в течение суток. В дозе 200 мг/кг у мышей выявляли: снижение активности до 2 суток, взъерошенность шерсти и лёгкий тремор. В вышеупомянутых группах изменений массы тела не зафиксировано (табл. 1 и 2). При дозе 250 мг/кг проявлялись выраженные симптомы: тремор, угнетение активности (3-4 дня), изменение состояния шерсти, слезотечение и конъюнктивит на 3 день, умеренное снижение массы на 7-е сутки (табл. 2).

Таблица 1. Динамика массы крыс при однократном подкожном введении

Группы	Пол животных	Масса до введения, г M±m	Масса на 7 сутки, г M±m	Масса на 14 сутки, г M±m
Контроль	Самцы	190,50±1,5	198,70±1,75	206,00±1,93
	Самки	188,90±0,86	197,00±1,03	205,50±0,85
Без сополимера, 90 мг/кг	Самцы	191,20±1,6	199,20±1,70	207,60±1,94
	Самки	189,00±1,58	197,20±1,69	205,50±1,61
С сополимером, 90 мг/кг	Самцы	190,70±1,83	198,90±1,93	206,40±2,12
	Самки	187,70±1,47	198,30±1,99	206,10±2,0
Без сополимера, 110 мг/кг	Самцы	189,60±1,62	197,40±1,51	205,10±1,27
	Самки	189,20±1,97	195,60±1,61	203,80±1,56
С сополимером, 110 мг/кг	Самцы	191,50±1,24	197,40±1,38	206,70±1,56
	Самки	189,70±1,63	196,60±1,93	205,10±1,96
Без сополимера, 130 мг/кг	Самцы	189,30±1,35	197,40±1,44	205,70±1,54
	Самки	189,20±1,97	200,20±1,59	203,80±1,61
С сополимером, 130 мг/кг	Самцы	190,70±2,08	198,80±2,11	206,60±2,18
	Самки	189,00±1,3	197,60±1,93	205,10±1,16
Без сополимера, 150 мг/кг	Самцы	188,50±1,94	196,50±2,01	205,10±2,08
	Самки	190,10±1,83	198,20±2,08	205,50±2,11
С сополимером, 150 мг/кг	Самцы	186,60±2,02	198,80±2,11	202,90±1,91
	Самки	189,70±1,99	203,50±1,89	206,40±2,4

Масса тела самцов, получавших КА без сополимера составляла 18,00±0,20*, самок – 18,00±0,17*; при введении КА с сополимером масса тела самцов была 17,98±0,14*, самок – 18,29±0,17*, что статистически значимо отличалось от контрольных значений ($p < 0,05$).

Таблица 2. Динамика массы мышей при однократном подкожном введении

Группы	Пол животных	Масса до введения, г M±m	Масса на 7 сутки, г M±m	Масса на 14 сутки, г M±m
Контроль	Самцы	19,39±0,14	21,28±0,19	23,30±0,28
	Самки	19,08±0,18	21,06±0,21	23,02±0,24
Без сополимера, 150 мг/кг	Самцы	19,34±0,13	21,27±0,19	23,34±0,19
	Самки	19,22±0,07	20,87±0,13	23,21±0,13
С сополимером, 150 мг/кг	Самцы	19,15±0,12	21,12±0,16	23,08±0,22
	Самки	19,26±0,18	21,30±0,25	23,08±0,19
Без сополимера, 200 мг/кг	Самцы	19,12±0,15	20,85±0,25	22,64±0,24
	Самки	19,50±0,14	21,57±0,19	23,53±0,20
С сополимером, 200 мг/кг	Самцы	19,20±0,12	20,96±0,20	22,86±0,30
	Самки	19,31±0,13	21,31±0,21	23,18±0,29
Без сополимера, 250 мг/кг	Самцы	19,21±0,17	18,00±0,20*	20,11±0,22*
	Самки	19,20±0,17	18,00±0,17*	19,69±0,23*
С сополимером, 250 мг/кг	Самцы	19,20±0,14	17,98±0,14*	19,89±0,21*
	Самки	19,35±0,17	18,29±0,17*	20,28±0,20*
Без сополимера, 300 мг/кг	Самцы	19,02±0,13	17,23±0,13*	19,11±0,17*
	Самки	19,19±0,13	17,09±0,19*	18,76±0,23*
С сополимером, 300 мг/кг	Самцы	19,32±0,15	17,08±0,18*	19,05±0,24*
	Самки	19,21±0,12	17,25±0,22*	19,05±0,23*

В контрольной группе масса тела самцов составляла 21,28±0,19, самок – 21,06±0,21. Наиболее выраженные реакции отмечались при дозе 300 мг/кг: вялость, тремор, адинамия (3-4 дня), признаки конъюнктивита на 1-2 сутки, изменения шерстного покрова и снижение массы тела (табл. 2). Масса тела самцов, получавших КА без сополимера составляла 17,23±0,13*, самок – 17,09±0,19*, при введении КА с сополимером масса тела самцов была 17,08±0,18*, самок – 17,25±0,22*, что статистически значимо отличалось от контрольных значений ($p < 0,05$). В

контрольной группе масса тела самцов составляла $21,28 \pm 0,19$, самок – $21,06 \pm 0,21$. Во всех группах дыхание, саливация, цвет мочи, мышечный тонус и рефлексы оставались в пределах нормы. К 14-му дню все симптомы исчезали, масса тела животных в экспериментальных группах восстанавливалась до исходного уровня.

Половых различий в чувствительности животных к токсическому действию изученных вариантов КА не выявлено, также, как и различий в токсикологических свойствах между вариантами КА.

В связи с ограничениями, обусловленными растворимостью КА и максимально допустимыми объемами введения, а также отсутствием гибели животных, определение среднесмертельной дозы (LD_{50}) и других количественных показателей токсичности вариантов КА не представлялось возможным. Следует подчеркнуть, что применённые максимально возможные дозы – 150 мг/кг при подкожном введении крысам, 300 мг/кг при подкожном введении мышам и 180 мг/кг при интраназальном введении мышам и крысам – превышали предполагаемую терапевтическую дозу для человека (3 мкг/кг) более чем в 50 000, 100 000 и 60 000 раз соответственно.

Таким образом, отсутствие гибели животных при введении максимально возможных доз, значительно превышающих предполагаемую терапевтическую, указывает на высокий уровень безопасности. Кратковременные и обратимые изменения поведения и массы тела, наблюдавшиеся при введении высоких доз, вероятно, связаны с неспецифической реакцией на нагрузку антигенным материалом или с временным системным стрессом, а не с прямым токсическим действием. Это подтверждается быстрым восстановлением массы тела и исчезновением симптомов в течение 3-14 дней. Отсутствие различий в чувствительности между полами животных и между вариантами КА говорит о сходстве их токсикодинамических свойств и указывает, что добавление сополимера не влияет на безопасность.

Заключение

Результаты исследования острой токсичности отдельных антигенов и обоих вариантов КА при введении максимальных возможных доз подтверждают их безопасность, что позволяет продолжить доклиническое исследование комплексов КА, включая изучение иммуотропной активности, аллергенности, субхронической и репродуктивной токсичности.

Литература (references)

1. Михайлова Н.А., Солдатенкова А.В., Грубер И.М. и др. Способ получения поликомпонентной вакцины на основе антигенов условно-патогенных микроорганизмов // Патент РФ на изобретение №2799527. Опубликовано 05.07.2023. Бюллетень №19. [Mikhailova N. A., Soldatenkova A. V., Gruber I. M. i dr. *Sposob polucheniya polikomponentnoy vaksiny na osnove antigenov uslovno-patogennykh mikroorganizmov* // Patent of Russian Federation N2799527. Publication 05.07.2023. Bulletin N19 (in Russian)]
2. Свистушкин В.М., Никифорова Г.Н., Золотова А.В. и др. Применение топических бактериальных лизатов в современной клинической практике // Медицинский совет. – 2021. – №6. – С. 49-56. [Svistushkin V.M., Nikiforova G.N., Zolotova A.V. i dr. *Meditsinskiy sovet*. Medical Council. – 2021. – N6. – P. 49-56. (in Russian)]
3. Хаитов М.Р., Ильина Н.И., Лусс Л.В. и др. Мукозальный иммунитет респираторного тракта и его роль при профессиональных патологиях // Медицина экстремальных ситуаций. – 2017. – Т.61, – №3. – С. 8-24. [Khaitov M.R., Ilyina N.I., Luss L.V. i dr. *Meditsina ekstremal'nykh situatsiy*. Extreme medicine. – 2017. – V.61, N3. – P. 8-24. (in Russian)]
4. Calderaro A., Buttrini M., Farina B. et al. Respiratory Tract Infections and Laboratory Diagnostic Methods: A Review with A Focus on Syndromic Panel-Based Assays // Microorganisms. – 2022. – V.10, N9. – P. 1856.
5. Cazzola M., Anapurapu S., Page C.P. Polyvalent mechanical bacterial lysate for the prevention of recurrent respiratory infections: a meta-analysis // Pulmonary Pharmacology & Therapeutics. – 2012. – V.25, N1. – P. 62-68.
6. Duhaniuc A, Păduraru D, Nastase E-V. et al. Multidrug-Resistant Bacteria in Immunocompromised Patients // Pharmaceuticals. – 2024. – V.17, N9. – P. 1151.
7. GBD 2021 Upper Respiratory Infections Otitis Media Collaborators. Global, regional, and national burden of upper respiratory infections and otitis media, 1990–2021: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2021 // The Lancet Infectious Diseases. – 2025. – V.25, N1. – P. 36-51.

8. Jurkiewicz D., Zielnik-Jurkiewicz B. Bacterial lysates in the prevention of respiratory tract infections // Otolaryngologia Polska. – 2018. – V.72, N5. – P. 1-8.
9. Lee R.A., Boucher H.W. Respiratory Tract Infections in the Postpandemic Era: A Return to Basics and Call to Action // Infectious Disease Clinics of North America. – 2024. – V.38, N1. – P. xiii–xv.
10. Moreno-Fierros L., Garcia-Silva I., Rosales-Mendoza S. Development of SARS-CoV-2 vaccines: should we focus on mucosal immunity? // Expert Opinion on Biological Therapy. – 2020. – V.20, N8. – P. 831-836.
11. Sinha D., Yaugel-Novoa M., Waeckel L. et al. Unmasking the potential of secretory IgA and its pivotal role in protection from respiratory viruses // Antiviral Research. – 2024. – N223. – P. 105823.
12. Suárez N., Ferrara F., Rial A., et al. Bacterial Lysates as Immunotherapies for Respiratory Infections: Methods of Preparation // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2020. – N8. – P. 545.

Информация об авторах

Сидоров Никита Геннадьевич – аспирант, младший научный сотрудник лаборатории протективных антигенов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. E-mail: deel@yandex.ru

Солдатенкова Алена Владимировна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории протективных антигенов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. E-mail: sol.alena.v@yandex.ru

Михайлова Наталья Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией протективных антигенов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. E-mail: n_michailova@inbox.ru

Афанасьева Елена Юльевна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии НМИЦК им. академика Е.И. Чазова. E-mail: Afanasyeva_eyu@pfur.ru

Гуреев Владимир Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии НМИЦК им. академика Е.И. Чазова. E-mail: produmen@yandex.ru

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 23.08.2025

Принята к печати 28.11.2025