

# Изучение противомикробной активности стафилококкового бактериофага на модели инфицированной кожной раны

Г. Н. ГЕНАТУЛЛИНА

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

## Study of the Antimicrobial Activity of Staphylococcal Bacteriophage on a Model of an Infected Skin Wound

GUZEL N. GENATULLINA

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

### Резюме

Цель исследования — изучение противомикробной активности стафилококкового бактериофага на модели инфицированной *Staphylococcus aureus* кожной раны. Изучение противомикробной активности проводили в условиях *in vivo* путём экспериментального моделирования инфицированной *Staphylococcus aureus* кожной раны в межлопаточной области у нелинейных крыс-самцов. Все манипуляции с животными выполняли в соответствии с требованиями нормативной документации, регламентирующей содержание лабораторных животных и работу с ними. Полученные результаты свидетельствуют о выраженной противомикробной активности стафилококкового бактериофага в условиях раневой инфекции при наружном его применении, что подтверждается снижением степени бактериальной обсеменённости отделяемого ран, а также уменьшении воспалительных явлений как на локальном уровне в виде снижения гиперемии, так и генерализованном — в виде снижения уровня С-реактивного белка, общего количества лейкоцитов, а также уменьшения лейкоцитарного индекса воспаления. Выявленный противомикробный эффект сопоставим с наружным применением антисептического препарата — раствора хлоргексидина биглюконата 0,05%, однако при оценке микробной обсеменённости было установлено, что бактериофаг проявляет более выраженную антибактериальную активность. Таким образом, стафилококковый бактериофаг на модели инфицированной *S. aureus* кожной раны проявил выраженную противомикробную активность, подтверждённую уменьшением количества колоний микроорганизма в отделяемом раны, а также снижением выраженности степени воспаления.

**Ключевые слова:** бактериофаг; *Staphylococcus aureus*; инфицированная кожная рана; противомикробная активность

**Для цитирования:** Генатуллина Г. Н. Изучение противомикробной активности стафилококкового бактериофага на модели инфицированной кожной раны. *Антибиотики и химиотер.* 2023; 68 (9–10): 58–62. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-58-62>.

### Abstract

The purpose of this study was to investigate the antimicrobial activity of staphylococcal bacteriophage on a model of a skin wound infected with *Staphylococcus aureus*. The study of antimicrobial activity was carried out *in vivo* by experimental modeling of a skin wound infected with *S. aureus* in the interscapular region in nonlinear male rats. All manipulations with animals were performed in accordance with the requirements of regulatory documentation overseeing the management of laboratory animals and work with them. The results obtained indicate the pronounced antimicrobial activity of staphylococcal bacteriophage in conditions of wound infection when applied externally, which is confirmed by a decrease in the degree of bacterial contamination of wound discharge, as well as a decrease in inflammatory phenomena, both at the local level in the form of a decrease in hyperemia, and generalized in the form of a decrease in C-reactive protein levels, total leukocyte count, as well as a decrease in the leukocyte inflammatory index. The identified antimicrobial effect is comparable to the external use of an antiseptic drug — a solution of chlorhexidine digluconate 0.05%, however, when assessing microbial contamination, it was found that the bacteriophage exhibits more pronounced antibacterial activity. Thus, the staphylococcal bacteriophage showed pronounced antimicrobial activity in a model of a skin wound infected with *S. aureus*, confirmed by a decrease in the number of colonies of the microorganism in the wound discharge, as well as a decrease in the severity of inflammation.

**Keywords:** bacteriophage; *Staphylococcus aureus*; infected skin wound; antimicrobial activity

**For citation:** Genatullina G.N. Study of the antimicrobial activity of staphylococcal bacteriophage on a model of an infected skin wound. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2023; 68 (9–10): 58–62. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-9-10-58-62>.

© Г. Н. Генатуллина, 2023

\*Адрес для корреспонденции: Бакинская ул., 121. Астраханский ГМУ, г. Астрахань, Россия.  
E-mail: genatullina@mail.ru

© G. N. Genatullina, 2023

\*Correspondence to: 121 Bakinskaya st., Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia.  
E-mail: genatullina@mail.ru

## Введение

В настоящее время остро стоит проблема антибиотикорезистентности, основными причинами возникновения которой являются нецелесообразное назначение антибиотиков медицинским персоналом и неконтролируемое их применение пациентами [1, 2]. В связи с чем разработка новых методов и средств лечения инфекционно-воспалительных заболеваний является актуальной задачей. На сегодняшний день применение бактериофагов в качестве альтернативы антибиотикам является одним из направлений по профилактике антибиотикорезистентности [3–5]. Сегодня существует достаточное количество работ, свидетельствующих о перспективности использования фаготерапии в лечении заболеваний органов мочевыделительной системы, установлена эффективность применения пиобактериофага у пациентов с инфекционной патологией хирургического профиля, синегнойного бактериофага в гнойной остеологии, комплексного бактериофага в лечении кишечной инфекции и т. д. [6, 7]. Одним из актуальных направлений является применение стафилококкового бактериофага с целью терапии инфекций, вызванных устойчивыми к антибиотикам штаммами золотистого стафилококка [8].

Цель работы — изучение противомикробной активности стафилококкового бактериофага на модели инфицированной кожной раны.

## Материал и методы

Исследования проведены на нелинейных крысах-самцах (32 особи) массой 250–260 г. Все манипуляции с крысами осуществлялись согласно нормативным документам, регламентирующим правила содержания животных в лабораторных условиях (ГОСТ Р 50258-92, ГОСТ Р 51000.3-96 и 51000.4-96). Крысы получены из экспериментально-биологической клиники (виварий) Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России. Работа с животными одобрена этическим комитетом ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России (протокол № 6 от 27.11.2018).

Рану наносили после сбривания шерсти путём рассечения кожи (2 см) скальпелем в межлопаточной области (все манипуляции проводили под эфирным наркозом), затем обрабатывали края раны суспензией *S.aureus* в дозе  $10^4$  микробных тел на крысу. Инфекционный агент выделен из мокроты пациентов, проходивших лечение в стационарных условиях ГБУЗ АО «ГКБ № 3 им. С. М. Кирова» (г. Астрахань).

Животные были разделены на 4 группы ( $n=8$ ): «контроль» — интактные животные; «рана» — животные с инфицированной раной, не получавшие лечение; «рана+антисептик» — крысы, которые в качестве лечения получали

раствор хлоргексидина биглюконата 0,05% (Тульская фармацевтика, Россия) наружно 2 раза в день с 3-минутной экспозицией, начиная спустя 12 ч после нанесения раны, в течение 5 дней; «рана+бактериофаг» — крысы, получавшие в качестве лечения стафилококковый бактериофаг (раствор; Микроген НПО ФГУП, Россия) в том же режиме, как и хлоргексидина биглюконат.

Оценку противомикробной активности стафилококкового бактериофага на модели инфицированной кожной раны проводили путём посева раневого отделяемого с подсчётом количества микробных тел *S.aureus* [9]. Подсчёт количества микробных тел проводили через 12 ч, на 3-и и 5-е сутки с помощью системы BioMic V3 для микробиологического анализа («Giles Scientific», США).

Степень воспаления оценивали по уровню С-реактивного белка (СРБ), общего количества лейкоцитов и лейкоцитарному индексу воспаления (ЛИИВ) [10]. Индекс рассчитывали по формуле: количество лейкоцитов  $\times$  (палочкоядерные+юные+миелоциты) / (сегментоядерные + лимфоциты) (норма ЛИИВ 1,0–1,2). Состояние раны оценивали по динамике изменения размера гиперемии.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета Excel и программного обеспечения BIOSSTAT, с учётом критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми различия считали при  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Результаты оценки динамики развития гиперемии вокруг раны, инфицированной *S.aureus* показаны в табл. 1.

На 2-е сутки после инфицирования раны и нанесения терапевтического агента было отмечено нарастание воспалительного процесса во всех группах, при этом в группе нелеченых животных практически на 20%, в двух других — в среднем на 11% в сравнении с первым днем эксперимента. В группе «рана» со 2-х по 4-е сутки наблюдалось нарастание гиперемии, на 5-е сутки — снижение. В группе животных «рана+антисептик» с 3-х суток отмечалось уменьшение гиперемии на 25, 33 и 57% в сравнении с предыдущим днем; в группе «рана+бактериофаг» снижение размеров гиперемии на 27, 38 и 48%, соответственно.

На 3-и сутки было установлено, что размер гиперемии в группах «рана+антисептик» и «рана+бактериофаг» был меньше, чем в группе «рана» в среднем в 1,6 ( $p < 0,05$ ) раза; на 4-е сутки — в 2,3 и 2,7 ( $p < 0,01$ ) раза; на 5-е сутки — в 4,7 и 4,3 ( $p < 0,01$ ) раза, соответственно.

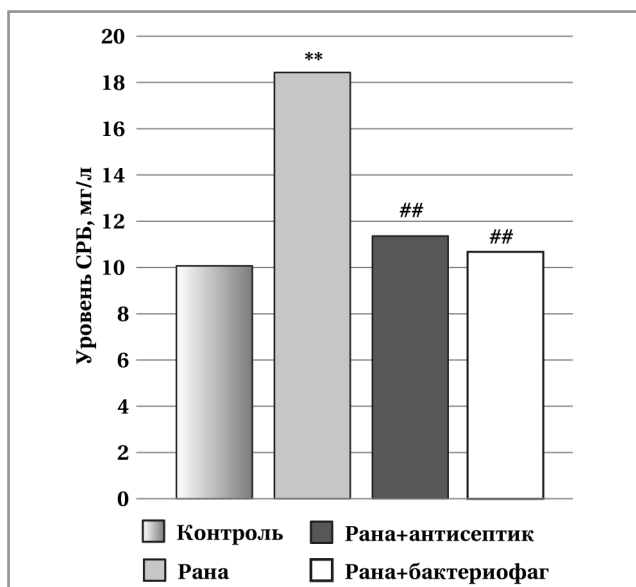
На рис. 1 показаны изменения уровня СРБ на фоне лечения инфицированного раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

**Таблица 1. Динамика изменения гиперемии вокруг раны, инфицированной *S.aureus***  
**Table 1. Dynamics of changes in hyperemia around a wound infected with *S.aureus***

Экспериментальные группы	Радиус гиперемии, мм				
	1-е сутки	2-е сутки	3-и сутки	4-е сутки	5-е сутки
Рана	4,63 $\pm$ 0,52	5,35 $\pm$ 0,54	5,91 $\pm$ 0,43	6,00 $\pm$ 0,45	5,23 $\pm$ 0,57
Рана+антисептик	4,56 $\pm$ 0,61	5,12 $\pm$ 0,30	3,83 $\pm$ 0,28*	2,56 $\pm$ 0,19**	1,10 $\pm$ 0,07**
Рана+бактериофаг	4,61 $\pm$ 0,42	5,10 $\pm$ 0,41	3,74 $\pm$ 0,33*	2,33 $\pm$ 0,08**	1,21 $\pm$ 0,05**

**Примечание.** \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$  по отношению к показателям группы «рана».

**Note.** \* —  $P < 0.05$ ; \*\* —  $P < 0.01$  in relation to the indicators in the «wound» group.



**Рис. 1.** Изменение уровня С-реактивного белка на фоне лечения инфицированного раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

**Примечание.** \* и # —  $p < 0,05$  по отношению к показателям группы «контроль» и «рана»; \*\* и ## —  $p < 0,01$  по отношению к показателям группы «контроль» и «рана».

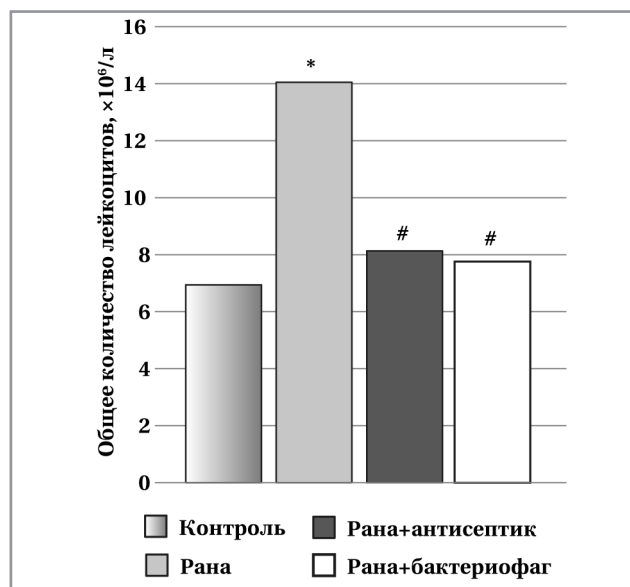
**Fig. 1.** Changes in C-reactive protein levels during treatment of an infected wound process with chlorhexidine bigluconate and staphylococcal bacteriophage.

**Note.** \* and # —  $P < 0.05$  in relation to the indicators in the «control» and «wound» groups; \*\* and ## —  $P < 0.01$  in relation to the indicators in the «control» and «wound» groups.

Развитие инфекционного процесса в ране сопровождалось увеличением уровня СРБ в 1,8 ( $p < 0,01$ ) раза по отношению к группе «контроль»; в условиях применения хлоргексидина биглюконата и стафилококкового бактериофага было отмечено снижение уровня данного показателя в среднем в 1,6 ( $p < 0,01$ ) раза в сравнении с группой нелеченых животных.

На рис. 2 показаны изменения общего количества лейкоцитов на фоне лечения инфицированного раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

Развитие раневой инфекции способствовало повышению общего количества лейкоцитов в сравнении с интактными животными в 2 раза ( $p < 0,05$ ); на фоне проведенного лечения антисептиком и бактериофагом было отмечено снижение



**Рис. 2.** Изменение уровня общего количества лейкоцитов на фоне лечения инфицированного раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

**Примечание.** \* и # —  $p < 0,05$  по отношению к показателям группы «контроль» и «рана».

**Fig. 2.** Changes in the level of total leukocyte count during treatment of an infected wound process with chlorhexidine bigluconate and staphylococcal bacteriophage.

**Note.** \* and # —  $P < 0.05$  in relation to the indicators in the «control» and «wound» groups.

данного показателя в среднем в 1,8 ( $p < 0,05$ ) раза по отношению к группе «рана».

На рис. 3 показано изменение лейкоцитарного индекса воспаления на фоне лечения инфицированного раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

Раневая инфекция привела к повышению лейкоцитарного индекса воспаления в 2,4 ( $p < 0,01$ ) раза по отношению к интактным крысам; на фоне лечения хлоргексидином и бактериофагом отмечено снижение индекса практически в 2,2 раза ( $p < 0,01$ ) в сравнении с группой нелеченых животных.

В табл. 2 представлены результаты микробиологического анализа раневого отделяемого в условиях лечения раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.

Развитие инфекционного процесса в ране сопровождалось нарастанием микробной массы че-

**Таблица 2.** Микробиологический анализ раневого отделяемого в условиях лечения раневого процесса  
**Table 2.** Microbiological analysis of wound discharge during the treatment of wound process

Экспериментальные группы	Количество микробных тел <i>S.aureus</i> , тыс.		
	12 ч	3 сут	5 сут
Рана	12,88±1,20	14,56±1,29	6,75±0,74
Рана+антисептик	11,87±0,72	3,36±0,14**	0,22±0,01**
Рана+бактериофаг	11,47±0,94	1,99±0,10**	0,17±0,01**

**Примечание.** \*\* —  $p < 0,01$  по отношению к показателям группы «рана».

**Note.** \*\* —  $P < 0.01$  in relation to the indicators in the «wound» group.

рез 12 ч во всех экспериментальных группах. На 3-и сутки в группах животных, у которых в качестве лечения применяли хлоргексидин и бактериофаг отмечалось значительное снижение количества микробных тел *S.aureus* практически в 4,3 и 7 раз ( $p<0,01$ ) в сравнении с нелеченной группой животных; на 5-е сутки количество колоний микроорганизмов также уменьшилось и по сравнению с группой «рана» практически в 31 и 39% ( $p<0,01$ ) раз, соответственно.

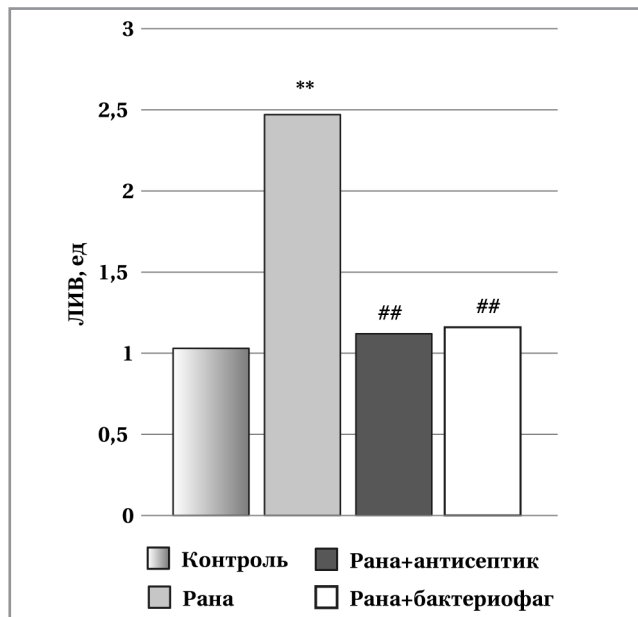
Таким образом, принимая во внимание полученные результаты, можно сделать вывод о выраженной противомикробной активности стафилококкового бактериофага в условиях раневой инфекции при наружном его применении, что подтверждается снижением степени бактериальной обсеменённости отделяемого ран, а также уменьшении воспалительных явлений как на локальном уровне в виде снижения гиперемии, так и генерализованном в виде снижения уровня СРБ, общего количества лейкоцитов, а также уменьшения ЛИВ. Следует отметить, что противомикробный эффект сопоставим с наружным применением антисептического препарата — раствором хлоргексидина биглюконата 0,05%, однако при оценке микробной обсеменённости было установлено, что бактериофаг проявляет более выраженную антибактериальную активность, что вероятно связано с возможным развитием частичной перекрёстной резистентности за счёт активации эффлюксных насосов, что присуще внутрибольничным штаммам *S.aureus*, а также бактериостатического действия препарата, что характерно для концентрации раствора менее 0,05% [11–13].

## Заключение

Таким образом, применение стафилококкового бактериофага на модели инфицированной *Staphylococcus aureus* кожной раны показало выраженную противомикробную активность, подтверждённую уменьшением количества колоний микроорганизма в отделяемом раны, а также снижением выраженности степени воспаления.

## Литература/References

1. Намазова-Баранова Л. С., Баранов А. А. Антибиотикорезистентность в современном мире. Педиатрическая фармакология. 2017; 14 (5): 341–354. doi: <https://doi.org/10.15690/pf.v14i5.1782> [Namazova-Baranova L. S., Baranov A. A. Antibiotic resistance in modern world. Pediatr. tricheskaya Farmakologiya. 2017; 14 (5): 341–354. doi: <https://doi.org/10.15690/pf.v14i5.1782> (in Russian)]
2. Сомотруева М. А., Цибизова А. А., Габитова Н. М., Озеров А. А., Тюренков И. Н. Противомикробная активность нового производного хинололина VMA-13-03. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2020; 83 (80): 24–28. doi: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2020-83-8-24-28>. [Samotrueva M. A., Tsiybizova A. A., Gabitova N. M., Ozerov A. A., Tyurenkov I. N. Antimicrobial activity of the new quinolone derivative VMA-13-03. Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya. 2020; 83 (80): 24–28. doi: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2020-83-8-24-28> (in Russian)].



**Рис. 3. Изменение уровня лейкоцитарного индекса воспаления на фоне лечения инфицированного раневого процесса хлоргексидином биглюконатом и стафилококковым бактериофагом.**

**Примечание.** \*\* —  $p<0,01$  по отношению к показателям группы «контроль»; # —  $p<0,05$ ; ## —  $p<0,01$  по отношению к показателям группы «рана».

**Fig. 3. Changes in the level of leukocyte inflammation index during treatment of an infected wound process with chlorhexidine bigluconate and staphylococcal bacteriophage.**

**Note.** \*\* —  $P<0.01$  in relation to the indicators in the «control» group; # —  $P<0.05$ ; ## —  $P<0.01$  in relation to the indicators in the «wound» group.

## Дополнительная информация

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации в части проведения НИР по теме «Разработка композиций для персонализированной антибактериальной терапии на основе вирулентных стафилококковых бактериофагов с контролируемой литической активностью».

3. Власов В. В., Тикунова Н. В., Морозова В. В. Бактериофаги как терапевтические препараты: что сдерживает их применение в медицине. Биохимия. 2020; 85 (11): 1587–1600. doi: <https://doi.org/10.31857/S0320972520110068> [Vlasov V.V., Tikunova N.V., Morozova V.V. Bacteriophages as therapeutic drugs: what hinders their use in medicine. Biohimiya. 2020; 85 (11): 1587–1600. doi: <https://doi.org/10.31857/S0320972520110068> (in Russian)].
4. Багаева В. В., Попова В. М., Пашкова Г. С., Исаджанян К. Е., Никитин В. В., Жиленков Е. Л. Изучение эффективности и безопасности применения антимикробных средств. Исследования и практика в медицине. 2015; 2 (3): 35–42. doi: <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2015-2-3-35-42> [Bagaeva V.V., Popova V.M., Pashkova G.S., Isadzhanyan K.E., Nikitin V.V., Zhilenkov E.L. The study of the efficacy and safety of antimicrobial agents. Issled. Prakt. Med. 2015; 2 (3): 35–42. doi: <https://doi.org/10.17709/2409-2231-2015-2-3-35-42> (in Russian)].



5. Генатуллина Г. Н., Ясенявская А. Л., Цибизова А. А. Оценка литической активности бактериофага в отношении *Staphylococcus aureus*. Астраханский медицинский журнал. 2022; 17 (4): 78–84. doi <https://doi.org/10.48612/agmu/2022.17.4.78.84>. [Genatullina G. N., Yasyavskaya A. L., Tsibizova A. A. Assessment of the lytic activity of the bacteriophage against *Staphylococcus aureus*. Astrahanskij Medicinskij Zhurnal. 2022; 17 (4): 78–84. doi <https://doi.org/10.48612/agmu/2022.17.4.78.84> (in Russian)].
6. Асланов Б. И., Любимова А. В., Зуева Л. П. Бактериофаги как эффективные противоэпидемические средства для купирования вспышек внутрибольничных инфекций. Журнал инфектологии. 2019; 11 (1): 65–70. [Aslanov B. I., Lyubimova A. V., Zueva, L. P. Bacteriophages as effective anti-epidemic agents for stopping outbreaks of nosocomial infections. Journal of Infectology 2019; 11 (1): 65–70 (in Russian)].
7. Грудянов А. И., Фролова О. А., Исаджанян К. Е., Попова В. М. Изучение возможности совместного использования бактериофагов с антисептическими препаратами. Стоматология. 2016; 95 (6–2): 30. [Grudyanov A. I., Frolova O. A., Isadzhanian K. E., Popova V. M. Studying the possibility of combining bacteriophages with antiseptic drugs. Stomatologiya. 2016; 95 (6–2): 30 (in Russian)].
8. Воронкова О. С., Воробей Е. С., Рожнева И. Л., Шевченко Т. Н. Влияние стафилококкового бактериофага на процесс плёнообразования штаммов золотистого стафилококка. Лабораторная диагностика. Восточная Европа. 2019; 8 (1): 71–77. [Voronkova O. S., Vorobey E. S., Rozhneva I. L., Shevchenko T. N. The influence of staphylococcal bacteriophage on the process of film formation of *Staphylococcus aureus* strains. Laboratory Diagnostics. Vostochnaya Evropa. 2019; 8 (1): 71–77 (in Russian)].
9. Ярец Ю. И., Шевченко Н. И., Еремин В. Ф. Методология микробиологического посева раневого отделяемого в рамках современных представлений о диагностике инфекционного процесса. Лабораторная служба. 2021; 10 (3): 33–42. doi: <https://doi.org/10.17116/labs20211003133> [Yarets Yu. I., Shevchenko N. I., Eremine V. F. Methodology of microbiological culture of wound discharge within the framework of modern ideas about the diagnosis of an infectious process. Laboratornaya Sluzhba. 2021; 10 (3): 33–42. doi: <https://doi.org/10.17116/labs20211003133> (in Russian)].
10. Рыбдылов Д. Д., Хитричев В. Е. Применение лейкоцитарного индекса воспаления в гнойной хирургии. Вестник Бурятского государственного университета. 2011; 12: 62–64 [Rybdylov D. D., Khitrichev V. E. Application of the leukocyte inflammation index in purulent surgery. Vestnik Buryatskogo Gosudarstvennogo Universiteta. 2011; 12: 62–64 (in Russian)].
11. Земляной А. Б., Афиногенова А. Г., Матвеев С. А. Применение антисептиков в лечении ран с высоким риском инфицирования. Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н. И. Пирогова, 2020; 15 (2): 129–137. doi: <https://doi.org/10.25881/BPNMSC.2020.61.32.023> [Zemlyanoy A. B., Afinogenova A. G., Matveev S. A. The use of antiseptics in the treatment of wounds with a high risk of infection. Vestnik Nacional'nogo Mediko-Hirurgicheskogo Centra im. N. I. Pirogova. 2020; 15 (2): 129–137. doi: <https://doi.org/10.25881/BPNMSC.2020.61.32.023> (in Russian)].
12. Costa S.S. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. Open Microbiol J. 2013; 7: 59–71. doi: 10.2174/1874285801307010059.
13. Зухридинова А., Махкамова Д. Использование бактериофагов против золотистого стафилококка. Перспективы развития медицины. 2021; 1 (1): 630. [Zukhriddinova A., Makhkamova D. Use of bacteriophages against *Staphylococcus aureus*. Perspektivy Razvitiya Mediciny. 2021; 1 (1): 630. (in Russian)]

## Информация об авторе

Генатуллина Гузель Наилевна — к. б. н., заместитель руководителя Научно-исследовательского центра; доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID: 0000-0001-5417-4477

## About the authors

Guzel N. Genatullina — Ph. D. in Biology, Deputy Head of the Research Center, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology, and Biotechnology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russia. ORCID: 0000-0001-5417-4477