



Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов

А.Ю. Зурабов¹, Н.Н. Каркищенко², Д.В. Попов¹, Е.Л. Жиленков¹,
В.М. Попова¹

¹ – Научно-производственный Центр «МикроМир», Москва

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Виктор Григорьевич Попов popoviie@mail.ru

В статье проанализированы основные принципы конструирования лечебно-профилактических фаговых препаратов и создания коллекции бактериофагов в научно-производственном центре «МикроМир».

Ключевые слова: фаготерапия, бактериофаги, бактериальные инфекции.

В течение десятилетий наша страна занимала лидирующие позиции в мире в области бактериофагии – одной из перспективных областей биологической науки. Благодаря исследованиям систем «фаг-клетка» были сформулированы базовые принципы, на которых основаны многие направления современной молекулярной биологии. Изучение свойств фагов в течение нескольких последних десятилетий способствовало развитию концепции фаготерапии. Последние двадцать лет социально-экономические изменения в нашем обществе привели к сокращению финансирования многих научных направлений, а порой — к забвению тех перспективных разработок, которые были созданы советской научной школой. Это относится и к вопро-

сам бактериофагии. Отсутствие средств привело к частичной утрате как рабочих коллекций бактериофагов, созданных ведущими российскими специалистами за долгие годы работы, так и к остановке перспективных поисковых работ.

В настоящее время в мире тема бактериофагии получает все возрастающее внимание и интерес. От внутрибольничных инфекций в мире погибает свыше 100 тыс. человек ежегодно. Большое количество хронических больных приобретает резистентность ко всем известным антибиотикам. Антибиотики далеко не всегда эффективны при лечении болезней бактериальной этиологии. Выделяемые из клинических материалов патогены, как правило, устойчивы к целому ряду антибиотиков. Многие клиницисты

в целом ряде случаев считают целесообразным дополнить антибиотикотерапию фаготерапией, основанной на использовании вирулентных узкоспецифичных бактериальных вирусов.

Все актуальнее становится вопрос применения бактериофагов в сельском хозяйстве (животноводство, растениеводство, рыбное хозяйство и др.), в сохранении пищевых продуктов без применения химических соединений.

Бактериальные вирусы в сравнении со всеми другими известными антибактериальными препаратами имеют следующие преимущества:

- фаги не подавляют рост представителей нормофлоры человека и животного;
- фаги лизируют антибиотикоустойчивые патогенные микроорганизмы;
- концентрация фагов в инфекционном очаге нарастает за счет их репродукции и быстро снижается после ликвидации инфекции;
- фаги не оказывают отрицательного влияния на эукариотические клетки;
- фаги могут быть использованы для профилактики бактериальных болезней.

Взаимодействие фага с бактерией можно условно разделить на несколько этапов. Первоначально фаг адсорбируется на определенных рецепторных участках клеточной поверхности. Затем происходит проникновение фаговой нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в клетку. С этого момента функционирование всего биосинтетического аппарата микроорганизма изменяется. Далее в процессе самосборки формируются дочерние фаги, то есть частицы размером 50-100 нм. Специфические фаговые ферменты разрушают клеточную стенку, освобождающиеся бактериальные вирусы взаимодействуют с другими клетками. Таким образом, фаги репродуцируются в

геометрической прогрессии, пока не будет уничтожена основная часть популяции конкретного микроба [6].

Для сохранения и дальнейшего развития национальной школы прикладной бактериофагии в 2010 г. создан Научно-производственный центр «МикроМир» под патронажем А.Ю. Зурабова.

На первом этапе главной задачей НПЦ «МикроМир» являлось объединение в Центре специалистов с большим опытом работы в фундаментальной и прикладной сферах вирусологии и создание для них необходимых условий для кропотливого и длительного воссоздания прежних лидирующих позиций российской школы бактериофагии.

Одно из основных направлений деятельности Центра на перспективу – формирование коллекции бактериальных вирусов. Всестороннее изучение характеристик бактериофагов осуществляется в Центре на базе лабораторий, оснащенных необходимым оборудованием (электронный микроскоп, скоростные центрифуги, качалки, флюориметры, мультискан и другие приборы) с применением современных вирусологических методов. Эксперименты по изучению биологических свойств фагов проводятся в соответствии с рекомендациями Международного Комитета по Таксономии Вирусов [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

На сегодняшний день коллекция фагов НПЦ «МикроМир» имеет международный статус и зарегистрирована в международной организации WFCC (World Federation for Culture Collections), рег. № 986. На сегодня НПЦ «МикроМир» располагает коллекцией бактериальных вирусов с литической активностью по отношению к микроорганизмам родов *Listeria*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Yersinia*, *Burkholderia*, *Staphylococcus*,

Streptococcus, *Haemophilus* и др. (25 родов). В коллекцию включены уникальные фаги, лизирующие возбудителей туберкулеза. Научным консультантом фаговых проектов является д.б.н. Э.Р. Зурабова. Группа вирусологов под руководством В.М. Поповой и Е.Л. Жиленкова пополняет коллекцию фагов новыми формами, изолированными из различных природных источников. Вирусологи выделяют фаги на основе методик собственной разработки. Методы изолирования необходимых фагов из природных материалов разрабатывались в течение трех десятилетий и являются предметом know how [3, 4, 5].

Деятельность НПЦ «МикроМир» имеет выраженную прикладную составляющую. Многолетний опыт ведущих специалистов Центра, подробное исследование свойств выделенных фагов позволяет оценить перспективы их практического применения. Конструирование образцов проводится с ориентацией на определенные критерии:

1. Препарат должен включать строго вирулентные бактериальные вирусы с широким литическим спектром по отношению к штаммам конкретного патогена.
2. Фаги лечебно-профилактического препарата не должны взаимодействовать с представителями нормофлоры.
3. Фаги должны воспроизводиться в клетке-хозяине с высоким выходом (урожайностью) активных частиц.
4. Отобранные фаги должны сохранять литическую активность при длительном хранении лизатов.
5. Фаговый препарат должен содержать несколько видов бактериальных вирусов, существенно отличающихся друг от друга по специфике взаимодействия с чувствительной клеткой. Применение таких комбинаций разных бактериаль-

ных вирусов при лечении и профилактике значительно уменьшает вероятность генерации фагорезистентных форм в популяции патогена [1].

Таким образом, лечебный препарат должен представлять собой комбинацию (сочетание) различных бактериальных вирусов, отобранных по определенным критериям. Правильность изложенного выше методологического подхода неоднократно подтверждена вирусологами НПЦ «МикроМир» при конструировании конкретных лечебно-профилактических фаговых препаратов.

Один из примеров успешных разработок – фаговый препарат для профилактики и лечения гингивита и парадонтита («Фагодент»). На начальном этапе работы исследовали этиологическую структуру стоматологических заболеваний. Показано, что микробный пейзаж клинических материалов (соскобы со слизистых десен, отделяемое пародонтальных карманов пациентов и т.д.) представлен патогенами *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides gracilis*, *Wolinella recta*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces viscosus* и *Campylobacter rectus*.

Второй этап работы – поиск бактериофагов с литической активностью по отношению к перечисленным патогенам. На наличие бактериальных вирусов было изучено около тысячи образцов из различных природных источников (клинические материалы, стоки, почвы и т.д.). Широкие поисковые исследования позволили выделить около 100 видов фагов. Дальнейшее детальное изучение их характеристик позволило отобрать наиболее перспективные формы. В итоге был сконструирован лечебно-профилакти-

ческий препарат, включающий более 30 видов фагов (по 3-4 вида для каждого патогена) [2].

Среди аналогичных разработок НПЦ «МикроМир» следует отметить экспериментальные препараты для лечения и профилактики:

- 1) хирургических инфекций – абсцессов, фурункулов, флегмон и др. («Пиофагин»);
- 2) урогенитальных инфекций – уретритов, циститов, пиелонефритов и др. («Урофаг»);
- 3) инфекций желудочно – кишечного тракта («Кишечный бактериофаг»);
- 4) воспалительных заболеваний кожи («Фагодерм»);
- 5) ЛОР-патологии бактериальной этиологии («Фаголор»);
- 6) инфекционных заболеваний половых органов («Фагогин»).

На данном этапе НПЦ «МикроМир» разрабатывает новые фаговые препараты для профилактики и лечения заболеваний, вызываемых патогенами родов *Yersinia*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Listeria*, *Aeromonas* и др. Препараты будут применяться в медицине и ветеринарии. Ведется разработка профилактических средств для обработки помещений и пищевых продуктов. Ведутся работы по созданию биологически активных добавок с бактериофагами для профилактики желудочно-кишечных инфекций человека и животных, фаговых препаратов для борьбы с бактериозами растений и ферментных препаратов (лизинов).

В планах НПЦ «МикроМир» предусмотрено пополнение коллекции бактериальных вирусов, строительство нового корпуса Центра с соблюдением всех требований GMP, создание системы обучения молодых специалистов.

Список литературы

1. **Попов Д.В.** Разработка фагового препарата для лечения хронического гнойного среднего отита. Автореф. дисс. н. с. уч. степ. канд. мед. наук. Москва. 2003. 29 с.
2. **Жиленков Е.Л., Попов Д.В., Желудева И.В., Чубатова С.А., Попова В.М., Бальянская Э.Л., Казначеева Л.Ф.** Изучение возможности использования фаготерапии для антимикробной терапии гнойно-воспалительных инфекций в дерматологии, стоматологии, отоларингологии. Российский национальный конгресс «Человек и лекарство», М. 2001. Сборник тезисов докладов. 371 с.
3. **Жиленков Е.Л., Попов Д.В., Попова В.М., Дарбеева О.С., Майская Л.М.** Совершенствование методов конструирования бактериофагов для лечения лор-патологии // Биопрепараты. 2002. № 2-6. С. 2-6.
4. **Попова В.М., Жиленков Е.Л., Попов Д.В.** Выделение новых стафилококковых фагов и получение эффективного лечебного препарата бактериофага против стафилококковой инфекции. Конференция «Проблемы медицинской и экологической биотехнологии». Оболенск. 14-15 декабря 1999 г. Сборник тезисов докладов. С. 128-129.
5. **Попов Д.В., Попова В.М., Тульский В.С., Жиленков Е.Л.** Разработка комбинированного препарата бактериофагов для лечения инфекционных заболеваний уха, горла и носа. Сессия Российской Академии медицинских наук, посвященная памяти академика РАМН и РАМТН И.Н. Блохиной «Новые биотехнологии — практическому здравоохранению»

- нию». М. 2001. Сборник тезисов докладов. С. 62-63.
6. **Адамс М.** Бактериофаги. - М.: Изд-во Иностранной литературы, 1961. 527 p.
7. **Ackermann H. – W.** Die classification des bacteriophages des cocci Gram – positives: Micrococcus, Staphylococcus et Streptococcus // Pathol. Biol. 1975. v. 23. 247 p.
8. **Ackermann H. – W.** Die classification des phages caudes des enterobacteries // Pathol. Biol. 1976. v. 24. 359 p.
9. **Ackermann H. – W., Cantor E. D., Jarvis A. W., Lembke J., Mayo J. A.** New species definitions in phages of Gram-positive cocci // Intervirology, 1984. v. 22. 181 p.
10. **Ackermann H. – W., Dubow M. S.** Viruses of prokaryotes, vol. I. General properties of bacteriophages. – CRC Press: Boca Raton, 1987. 231 p.
11. **Ackermann H. – W., Dubow M. S.** Viruses of prokaryotes, vol. II. Natural groups of bacteriophages. – CRC Press: - Boca Raton. 1987. 242 p.
12. **Ackermann H. – W., Eisenstark A.** The present state of phage taxonomy // Intervirology. 1974. v. 3. P. 201-219.

Creation of native bacteriophages collection and principle of treatment and profilactic phages drug design

A.Yu. Zurabov, N.N. Karkischenko, D.V. Popov,
E.L. Zhilenkov, V.M. Popova

The paper analyzes the basic principles of designing treatment and prevention of phage preparations and creating a collection of bacteriophages in the S-PC «MicroWorld»

Key words: phagetherapy, bacteriophages, bacterial infections.

Токсикологический профиль новых противовирусных производных аденина

Д.Г. Ковалев¹, Н.А. Мохаммад Амин²

¹ – НИИ фармакологии Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград

² – Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Контактная информация: Ковалев Дмитрий Геннадьевич kovalev_dmi@mail.ru

Целью данной работы явилось изучение фармакологических свойств, определение широты диапазона безопасного действия и токсикологических свойств нового оригинального производного аденина, 9-[2-(4-изопропилфенокс)этил]аденин, под лабораторным шифром VMA-99-82, проявляющего противовирусную активность *in vitro*. В работе представлены результаты изучения нейротоксикологического профиля соединения VMA-99-82, с использованием методики многотестового наблюдения по «S.Irvin». В ходе исследования установлено, что по токсичности и по степени безопасности вещество VMA-99-82 относится к классу малотоксичных соединений. Определен диапазон доз (от 18,7 до 300 мг/кг) отчетливой терапевтической активности вещества, в которой сопутствующие побочные эффекты выражены несущественно.

Ключевые слова: производные аденина, токсикологический профиль, тест «S.Irvin», крысы.

В НИИ фармакологии Волгоградского государственного университета был открыт новый класс антицитомегаловирусных агентов, демонстрирующих активность *in vitro* в наномолярном диапазоне [1].

В рамках изучения фармакологических свойств и определения широты диапазона безопасного действия новых веществ были исследованы токсикологические свойства 9-[2-(4-изопропилфенокс)этил]аденин, под лабораторным шифром VMA-99-82, как типичного представителя этого класса химических соединений.

В настоящей работе представлены результаты изучения токсикологического профиля соединения VMA-99-82 с использованием схемы многотестового наблюдения по «S.Irvin».

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 90 белых лабораторных крысах обоего пола, мас-

сой 220-240 г. Проведение всех экспериментов над животными руководствуется базисными нормативными Рекомендациями Комитета по экспериментальной работе с использованием животных при Минздравсоцразвития России, «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985)», а также согласно ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ 3 5100.4-96, правилами GLP. Приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики РФ», а также с разрешения Регионального независимого этического комитета ГУ Волгоградский Научный Центр РАМН и АВО. Вещество VMA-99-82, на 50% водном растворе ДМСО, вводили крысам внутрижелудочно (металлическим зондом) в арифметически возрастающих дозах от 18,7 до 4800 мг/кг за 1 ч до тестирования.