

Бочкарева Светлана Сергеевна

**Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-
иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики инфекций,
связанных с оказанием медицинской помощи**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Научные консультанты:

Караулов Александр Викторович академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)», кафедра клинической иммунологии и аллергологии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского, заведующий кафедрой, г. Москва;

Ершова Ольга Николаевна, доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заместитель главного врача по эпидемиологической работе, г. Москва.

Официальные оппоненты:

Асланов Батырбек Исмелович, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии, заведующий кафедрой, г. Санкт-Петербург;

Брусина Елена Борисовна, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра эпидемиологии, инфекционных болезней и дерматовенерологии, заведующая кафедрой, г. Кемерово;

Пименов Николай Васильевич, доктор биологических наук, профессор РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина», кафедра иммунологии и биотехнологии, заведующий кафедрой, г. Москва.

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Санкт-Петербург.

Защита состоится « » 2023 г. в часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автореферат разослан « » _____ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 64.1.002.01

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Широкое распространение антибиотикорезистентности у бактерий угрожает современному здравоохранению (Founou R.C. et al., 2017; Cano E.J. et al., 2020). ВОЗ назвала проблему устойчивости к противомикробным препаратам одной из основных стоящих перед человечеством глобальных угроз здоровью населения. Устойчивость бактерий к антибиотикам приводит к снижению эффективности методов лечения бактериальных инфекций и увеличению смертности (Livermore D.M., 2012; Olesen S.W. et al., 2018).

Эту проблему пытаются решить путем поиска и синтеза новых антимикробных препаратов, однако микроорганизмы адаптируются к ним быстрее, чем происходит разработка и внедрение новых антимикробных средств. В настоящее время известно около 6000 антибиотиков. Путь от открытия и испытания до внедрения нового антибиотика занимает от 5 до 10 лет и обходится в сумму от десятков до сотен миллионов долларов, в то время как микроорганизмам в лабораторных условиях достаточно нескольких недель для адаптации к новому антимикробному препарату.

Одним из вариантов решения проблемы антибиотикорезистентности может стать фаготерапия. Решением Ученого Совета Роспотребнадзора от 21 июня 2011 года рекомендовано научно-исследовательским организациям совместно с производителями фармацевтических средств направить усилия на разработку новых препаратов на основе бактериофагов, эффективных при осуществлении мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения РФ.

Наиболее остро проблема антибиотикорезистентности стоит для лечения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) в медицинских организациях различного профиля. Такие инфекции наносят значительный ущерб здоровью населения, экономике и демографической ситуации, что определяет актуальность их профилактики и лечения. ИСМП ежегодно развиваются у 2-2,5 млн. человек в России (Куракин Э.С. с соавт., 2017). К высокому риску инфицирования относятся отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), ожоговые, онкологические, травматологические, урологические отделения, а также учреждения материнства и детства (Sydnor E.R. et al., 2011).

Риск возникновения периодических вспышек ИСМП у больных в критическом состоянии, находящихся на продленной искусственной вентиляции легких в ОРИТ, особенно высок (Минклис Н.И. с соавт., 2018). Ситуация усугубляется формированием «госпитальных штаммов» – штаммов микроорганизмов с измененными биологическими свойствами, они приобретают устойчивость к антимикробным препаратам, к физическим воздействиям, а также

повышенную вирулентность (Аветисян Л.Р. с соавт., 2016; Михалева Т.В. с соавт., 2019; Facciola A. et al., 2019). Антибиотикотерапия против штаммов ИСМП, отличающихся множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), зачастую является неэффективной, что значительно ухудшает течение основного заболевания. Больных, находящихся на длительном лечении в отделении реанимации, можно также отнести к категории «иммунокомпрометированных больных», поскольку длительная борьба с инфекцией у них приводит к истощению ресурсов иммунной системы.

В широком смысле термин «иммунокомпрометированный пациент» может быть применим к различным контингентам населения: больным, перенесшим тяжелые инфекции, травмы или операции; лицам, проживающим или работающим в экологически неблагоприятных условиях и подвергающимся постоянному воздействию радиационного, химического и других факторов; лицам определенных возрастных групп (в частности, пожилого и старческого возраста); лицам определенных профессий (например, подвергающихся постоянному стрессу (летчики, подводники и др.), сверхвысоким физическим нагрузкам, высоким и низким температурам и др. (Лусс Л.В., 2007; Dropulic L.K. et al., 2016).

Наиболее тяжело поддаются лечению именно иммунокомпрометированные больные, страдающие ИСМП. При проведении фаготерапии у таких больных для достижения максимального эффекта необходим индивидуализированный подбор бактериофагов с учетом, с одной стороны, быстрого изменения штаммов-возбудителей, вызывающих непрерывно рецидивирующую инфекцию у данной категории пациентов и зачастую обладающих МЛУ, а с другой стороны, возможного формирования антифагового иммунитета при повторных курсах фаготерапии с использованием бактериофагов, характеризующихся сходными антигенными детерминантами.

Степень разработанности темы исследования

Проблеме контроля и профилактики ИСМП уделяется большое внимание как в отечественных, так и в мировых публикациях (Орлова О.А. с соавт., 2019; Alp E. et al., 2015; Khan H.A. et al., 2015; Kollef, M.H. et al., 2021). Одним из методов профилактики и лечения ИСМП являются бактериофаги, интерес к которым значительно вырос в последнее время (Попова А.В. с соавт., 2014; Воложанцев Н.В. с соавт., 2017; Есипов А.В. с соавт., 2018; Акимкин В.Г. с соавт., 2019; Caflisch K.M. et al., 2019; Fauconnier A., 2019; McCallin S. et al., 2019). К настоящему времени в медицинской и научной практике накоплен обширный опыт применения бактериофагов в качестве антибактериальных препаратов для лечения инфекционных заболеваний (Бабалова Г.Г. с соавт., 1968; Литвинова А.М. с соавт., 1978; Милютин Л.Н. с соавт., 1990; Ковязина Н.А., 2009; Ворошилова Н.Н. с соавт., 2010; Перепанова Т.С. с соавт., 2020; Miedzybrodzki R. et al., 2012), в том

числе и как противоэпидемических средств (Асланов Б.И. с соавт., 2019; Власов В.В. с соавт., 2020).

Коммерческие препараты бактериофагов выпускаются в России с сороковых годов прошлого века, также сохранилось производство в Грузинской республике. Центры фаготерапии функционируют в Польше («Институт иммунологии и экспериментальной терапии им. Хиршфельда Польской академии наук»), Бельгии («Центр инфекционных заболеваний при военном госпитале королевы Астрид»), Грузии («Международный центр фаготерапии имени Г. Элиавы») и США («Центр инновационного применения фагов и терапии», основанный Медицинской школой Калифорнийского университета в Сан-Диего). Все эти центры осуществляют лечение больных в соответствии со стратегией «сострадательного» лечения, то есть в тех случаях, когда доказана неэффективность другой антибактериальной терапии. В ряде публикаций показана необходимость индивидуального подбора штаммового состава препаратов бактериофагов (Leszczyński P. et al., 2006; Aleshkin A.A. et al., 2017; Schooley R. et al., 2017), однако системного анализа лечения препаратами бактериофагов не было до сих пор опубликовано. Ряд авторов указывал на проблему возникновения иммунного ответа на введение пациентам бактериофагов (Łusiak-Szelachowska M. et al., 2014; Żaczek M. et al., 2016; Van Belleghem J.D. et al., 2017; Kishimoto T. et al., 2019; Maddocks S. et al., 2019), но отсутствуют данные об оценке влияния иммунного ответа на эффективность фаготерапии, также нет данных о всестороннем изучении как гуморального, так и клеточного, иммунитета в ответ на лечение бактериофагами.

Цель исследования: разработка технологии производства и рационального алгоритма подбора бактериофагов в составе фагового коктейля для эффективной фаготерапии и фагопрофилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, с обязательной оценкой иммунного ответа на бактериофаги у данной категории больных.

Для достижения данной цели необходимо решить следующие задачи.

Задачи исследования:

1. Выделение штаммов ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, из клинического материала, взятого от больных, и получение коктейлей бактериофагов, активных в отношении выявленных патогенов.
2. Анализ фенотипических и молекулярно-генетических характеристик бактериофагов, входящих в состав коктейлей.
3. Разработка технологии получения универсального состава лекарственной формы, включающего необходимый набор вспомогательных компонентов, для конструирования препаратов на основе коктейлей бактериофагов различного

штаммового состава, предназначенных для инъекционного и местного применения.

4. Проведение доклинических испытаний безопасности и эффективности коктейлей бактериофагов (острая и хроническая токсичность, фармакокинетические исследования, оценка эффективности на инфекционной модели).
5. Конструирование и клиническая апробация иммуноферментных тест-систем, предназначенных для определения IgG-антител к использованным в работе бактериофагам.
6. Изучение гуморального иммунного ответа больных на фоне фаготерапии.
7. Изучение клеточного иммунного ответа больных на фоне фаготерапии.
8. Определение критериев эффективности использования бактериофагов у больных, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые получены индивидуальные фармакокинетические и иммунологические характеристики бактериофагов: KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111. Были разработаны универсальные составы лекарственных форм на основе коктейля бактериофагов для различных путей введения, включающие необходимый набор вспомогательных компонентов, и технология их пилотного производства.

Проведены доклинические исследования по оценке острой и хронической токсичности раствора с коктейлем бактериофагов KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111. Изучена фармакокинетика бактериофагов, а также терапевтическая эффективность разработанных препаратов на примере клебсиеллёзного бактериофага KpV15.

Впервые сконструированы и клинически апробированы иммуноферментные тест-системы для определения IgG-антител к изучаемым бактериофагам. Изучены параметры гуморального и клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии; исследованы уровни IgG-антител к изучаемым бактериофагам и оценено их влияние на эффективность фаготерапии.

Показана высокая микробиологическая эффективность использования разработанного алгоритма персонализированного подбора бактериофагов для лечения пациентов, страдающих ИСМП, на четырех клинических базах, которая составила 89 %.

Теоретическая и практическая значимость исследования состоит в создании обоснованной концепции индивидуализированного подбора бактериофагов для эффективной терапии постоянно рецидивирующих, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, особенно вызванных возбудителями, обладающими МЛУ.

Концепция учитывает многофакторные аспекты взаимодействия фага как с бактерией-мишенью, так и с макроорганизмом.

Получен ряд лекарственных препаратов на основе оригинальных вирулентных бактериофагов, эффективных в отношении ведущих возбудителей инфекций (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Acinetobacter baumannii*), связанных с оказанием медицинской помощи (в том числе, возбудителей, обладающих МЛУ). В результате проведенных исследований разработаны универсальные составы лекарственных форм на основе коктейлей бактериофагов, а именно, раствор для приема внутрь и местного применения и инъекционный раствор, включающие необходимый набор вспомогательных компонентов для конструирования фаговых препаратов различного штаммового состава. Разработаны спецификации на лекарственные формы и лабораторные регламенты.

Сконструирована линейка иммуноферментных тест-систем, предназначенных для определения в образцах сыворотки крови пациентов IgG-антител к полученным и использованным в ходе работы бактериофагам. Данная линейка тест-систем может быть внедрена в широкую медицинскую практику. Сформулированы основные принципы оценки эффективности фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП, с учетом гуморального иммунного ответа на бактериофаг.

Методология и методы исследования

Методологической основой настоящей работы являются труды отечественных и зарубежных авторов в области фундаментальных исследований бактериофагов. Методология исследования спланирована с учетом современных принципов научного познания и организована адекватно поставленной цели. Объектами исследования являлись штаммы бактерий, вызывающих ИСМП, и обладающих МЛУ, а также штаммы бактериофагов, пациенты с различными инфекционно-воспалительными заболеваниями, связанными с оказанием медицинской помощи, проходившие лечение на четырех клинических базах. В работе предметом исследования является разработка концепции персонализированной фаготерапии. В исследовании использованы системный подход и специальные методы исследований, включающие ретроспективный анализ, микробиологические, молекулярно-генетические, иммунологические, биоинформационные, химико-фармацевтические и статистические методы.

При выделении и изучении бактериофагов использовали методы определения спектра литической активности фагов, выявления лизогенных штаммов бактерий, определения частоты возникновения фагорезистентных бактериальных мутантов, лиофильного высушивания, выделения и рестрикционного анализа ДНК бактериофагов, секвенирования ДНК

бактериофагов, определения устойчивости фагов к повреждающим факторам внешней среды и определения параметров инфекционного процесса в системе фаг-клетка, описанные в литературе.

Для разработки методов контроля качества лекарственных форм (ЛФ) бактериофагов использовали методы, регламентированные ГФ РФ XIV изд. и правилами ЕАЭС.

Доклинические исследования ЛФ бактериофагов проводились в соответствии с действующей нормативной документацией по параметрам: острая токсичность, хроническая токсичность, определение местного действия; изучение фармакокинетики, изучение профилактической и лечебной эффективности.

Клинические исследования препаратов бактериофагов представляли собой открытое рандомизированное контролируемое исследование в параллельных группах. Клинические базы: ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Министерства Здравоохранения России, отделение реанимации и интенсивной терапии; «Городская клиническая больница № 67 им. Л.А. Ворохобова», отделение реанимации и интенсивной терапии; «3 Центральный Военный Клинический Госпиталь им. А.А. Вишневского», отделение реанимации и интенсивной терапии, Ганноверская медицинская школа (Ганновер, Германия).

В исследовании принимали участие 160 пациентов в возрасте 18 лет и старше, которые рандомизированно были распределены в 2 группы: группа 1 – 80 пациентов, страдающих инфекциями/колонизацией, связанными с оказанием медицинской помощи, получавшие стандартную терапию в сочетании с персонализированной фаготерапией; группа 2 – 80 пациентов, страдающих инфекциями/колонизацией, связанными с оказанием медицинской помощи, получавшие стандартную терапию.

Бактериофаги для персонализированной терапии назначали пациентам группы 1 на Осмотре 2. Курс составлял 5 дней перорально по 20 мл 1 раз в день за 1 час до приема пищи или внутривентрикулярно. Возможно одновременное применение бактериофагов для персонализированной терапии местно и перорально или с учетом локализации инфекционного процесса, например, в область абсцесса. Стандартная терапия для данного исследования — это весь комплекс антибактериальных и других препаратов, назначаемых в обычной врачебной практике: антибиотики; препараты симптоматической терапии; препараты для лечения острых и хронических сопутствующих заболеваний.

Порядок включения в исследование и рандомизация пациентов, у которых в результате бактериологического анализа биологического материала выявлено наличие штаммов бактерий *Acinetobacter baumannii/Pseudomonas aeruginosa/Klebsiella pneumoniae/Staphylococcus aureus*, проводились методом конвертов на Осмотре 1 и оценки критериев включения/не включения. Каждому

пациенту, включенному в исследование, соответствующему всем критериям включения на Осмотре 1, непосредственно перед рандомизацией присваивали индивидуальный номер пациента для распределения по группам. Индивидуальный номер пациента присваивался по нарастанию (по порядку), состоял из трех цифр от 001 до 160, например: 001, 047, 100, фиксировался в индивидуальной регистрационной карте (ИРК). После присвоения пациенту номера, вскрывался конверт с номером пациента. Внутри конверта находился номер группы, в которую рандомизирован пациент, и информация о лечении, которое ему назначалось на Осмотре 1.

Критерии включения пациентов в клинические исследования: наличие подписанного и датированного информированного согласия; наличие у пациента инфекции/колонизации, связанной с оказанием медицинской помощи; лабораторно подтвержденное наличие в биологическом материале, полученном от пациента патогенов (таких как *Pseudomonas aeruginosa* и/или *Acinetobacter baumannii* и/или *Klebsiella pneumoniae* и/или *Staphylococcus aureus*), обладающих резистентностью к компонентам стандартной антимикробной терапии; возраст пациентов 18 лет и старше. Критерии невключения пациентов в клинические исследования: аллергические реакции на компоненты исследуемой терапии; поливалентная аллергия. Критерии исключения пациентов из клинического исследования: ошибочное включение; появление у пациента критериев невключения во время проведения исследования; желание пациента или его законного представителя завершить участие в исследовании. Критерии завершения участия пациентов в клинических исследованиях: элиминация или значимое снижение титра возбудителя (на 3-4 порядка), либо смена возбудителя в биологическом материале, полученном от пациента, по данным микробиологического исследования и/или клиническое улучшение состояния пациента.

Регламент клинического исследования: Осмотр 1. Оценка критериев включения/невключения; сбор медицинского анамнеза, физикальное обследование; клинический анализ крови, биохимический анализ крови, клинический анализ мочи; оценка состояния пациента с использованием клинко-инструментальных методов учитывая локализацию текущего инфекционного процесса. Рандомизация. Для группы терапии с использованием фагов отправка в лабораторию отсевов бактериальных культур. Заполнение ИРК. Забор и последующая передача в лабораторию образцов венозной крови и сыворотки пациента для иммунологического исследования. Осмотр 2. Для обеих групп пациентов проводят физикальное обследование; контроль за возможным развитием нежелательных явлений (НЯ) и серьезных нежелательных явлений (СНЯ); оценка критериев исключения; заполнение ИРК. В группе терапии с использованием фагов: после получения из лаборатории препарата фага осуществляли введение

фагов, подобранных для пациента. Во второй группе проводили стандартную терапию. Осмотр 3 проводился через 5 суток от начала введения бактериофагов: забор биологического материала для бактериологического анализа из инфицированных локусов; клинический анализ крови, биохимический анализ крови, клинический анализ мочи, физикальное обследование; продолжение стандартной терапии; контроль за возможным развитием СНЯ и НЯ; оценка критериев исключения; заполнение ИРК.

В случае недостижения критериев эффективности исследуемой терапии проводилась: оценка результатов бактериологического анализа и в случае наличия исследуемых патогенов проводился повторный цикл процедур, начиная с осмотра 2 для группы персонализированной фаготерапии; проводилась оценка напряженности антифагового иммунного ответа методом ИФА и изменение состава препарата, а именно, замена штаммов бактериофагов.

В случае достижения критериев эффективности исследуемой терапии проводится завершающий Осмотр 4 (завершение исследования). Осуществляли: забор и последующую передачу в лабораторию образцов венозной крови и сыворотки пациента для иммунологического исследования; оценку эффективности терапии.

В работе использован ряд иммунологических методов: преципитации в геле по Оухтерлони; ИЭФ, ИФА. Для конструирования тест-систем, позволяющих оценить уровень IgG-антител в сыворотке крови пациентов, получали кроличьи поликлональные моноспецифические антисыворотки к использованным бактериофагам. Для этого проводили внутримышечную иммунизацию кроликов растворами бактериофагов, смешанными с полным или неполным адьювантом Фрейнда («Difco», США).

Для определения антифаговых IgG-антител использовали ИФА с применением самостоятельно сконструированных тест-систем (рисунок 1).

Проведение ИФА и учет результатов проводили в ряд стадий: антиген (бактериофаг) сорбировали в лунках полистиролового планшета («Вектор-Бест», Россия), для чего в лунки вносили по 100 мкл раствора бактериофага, инкубировали 18-20 часов при температуре $+(6-8)^{\circ}\text{C}$. В последние лунки рядов антиген не вносили – данные лунки служили контролем отсутствия антигена («пустые лунки»); после инкубации удаляли содержимое лунок и промывали планшет раствором для промывки 5-6 раз с обязательным внесением в лунки 300-400 мкл раствора; делали ряд разведений исследуемых сывороток в забуференном фосфатами физиологическом растворе с твином (PBS-T), начиная от минимального разведения 1:100; в лунки вносили по 100 мкл исследуемых образцов в нескольких разведениях, положительных контролей и отрицательного контроля (PBS-T). Все образцы и положительные контроли вносили в дублях, отрицательный контроль –

в триплете; планшет инкубировали 60 мин при 37°C, со встряхиванием 700 об/мин; после инкубации промывали планшет 5-6 раз; во все лунки планшета вносили по 100 мкл конъюгата (Protein A-Peroxidase, Sigma, США) в рабочем разведении; планшет инкубировали 60 мин при 37°C, со встряхиванием 700 об/мин; промывали; во все лунки планшета вносили по 100 мкл субстратного раствора; планшет инкубировали 15-25 мин. в темноте при комнатной температуре; для прекращения реакции в каждую лунку вносили по 100 мкл стоп-реагента; проводили измерение оптической плотности при 450 нм на планшетном фотометре Infinite F50 («Tecan», Австрия). После определения оптической плотности осуществляли учет результатов. Значения оптической плотности в «пустых лунках» (отсутствие антигена) и в лунках с отрицательным контролем (отсутствие антифаговых антител) не должно превышать 0,1. Значение ОП в лунках с положительными контролями должно превышать 0,4. Титром антифаговых IgG-антител в исследуемом образце сыворотки крови считалось его максимальное разведение, показавшее положительный результат.

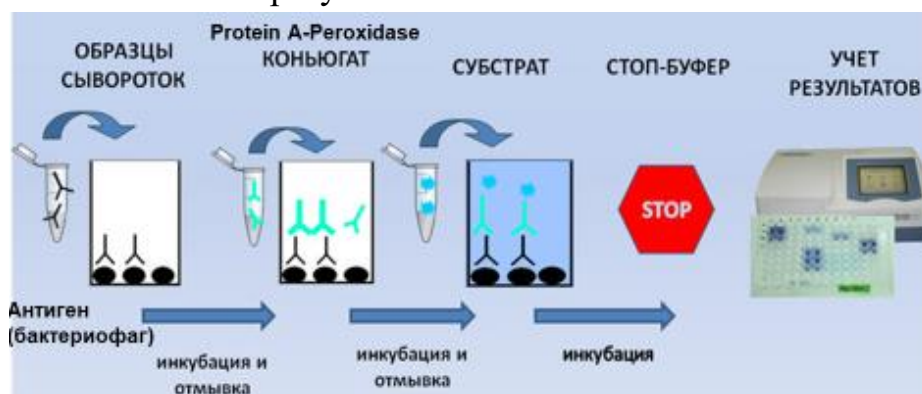


Рисунок 1 - Схема иммуноферментной тест-системы по выявлению антифаговых IgG-антител

Оценку гуморального иммунного ответа на бактериофаги проводили также в реакции нейтрализации, учитывающей падение силы литической активности (титра) бактериофага при добавлении к нему сыворотки крови, содержащей соответствующие антитела. Исследуемую сыворотку крови человека или кролика разводили в 1500 раз PBS, затем к 450 мкл разведенной сыворотки добавляли 50 мкл фаголизата исследуемого бактериофага в титре 10^6 БОЕ/мл. Полученную смесь инкубировали в течение 30 минут при 37°C. После инкубации смесь разводили в 100 раз МПБ и титровали по методу Грация. Контроль – инкубация без добавления сыворотки. Падение титра бактериофага при добавлении сыворотки крови свидетельствовало о наличии в ней нейтрализующих антифаговых антител. Результат учитывали в БОЕ на мл, как в стандартной методике Грация, описанной в фармакопее.

Изучение антифагового клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии проводили на базе лаборатории по изучению клеточных и

молекулярных основ иммунитета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского (рук. лаборатории – д.м.н., профессор Бляхер М.С.). Влияние бактериофагов при изучении реакций клеточного иммунитета пациента на фаготерапию было оценено *in vitro* в культуре лимфоцитов, выделенных из крови пациентов до начала фаготерапии и спустя 1-5 недель после. Лимфоциты в составе фракции мононуклеаров были выделены в градиенте плотности Histopaque-1077, путем 20-минутного центрифугирования в basket-роторе при 400g. После отмывания в PBS клетки были разведены до концентрации 5×10^6 /мл в полной среде RPMI-1640 с антибиотиками и 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS) и для дальнейшей стимуляции помещены в культуральный 96-луночный планшет в объеме 200 мкл. Процент лимфоцитов среди выделенных мононуклеаров колебался от 92 до 95%. Для проведения исследования по выявлению специфической активации клеточного иммунитета предварительно была отработана схема стимуляции лимфоцитов пациентов бактериофагами (рисунок 2).

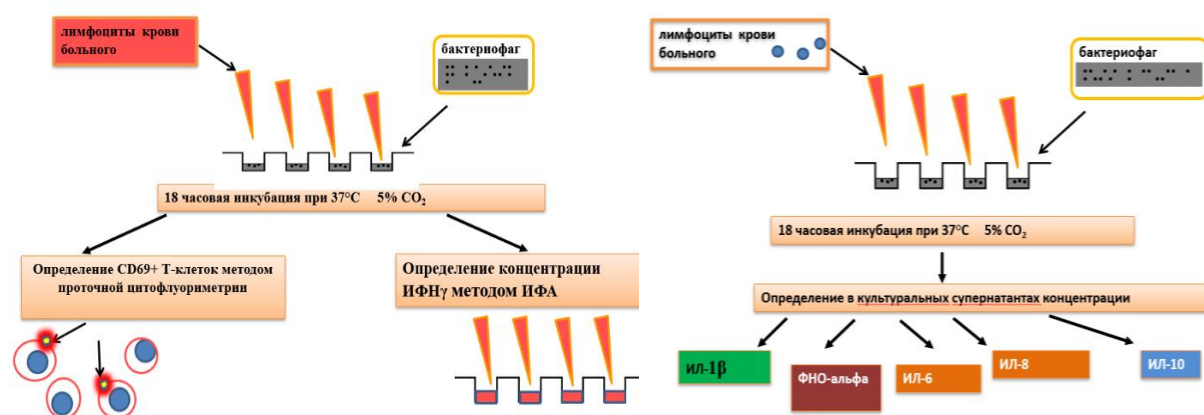


Рисунок 2 - Схема стимуляции лимфоцитов бактериофагами для выявления активированных Т-клеток (слева) и для выявления уровня их неспецифической активации (справа)

Исследуемые бактериофаги (в концентрации 10^6 БОЕ/мл) были сорбированы в лунках полистиролового планшета. Иммунофенотипирование лимфоцитов после антигенной стимуляции проведено с помощью 3-параметровой проточной цитометрии (реагенты и оборудование Beckman Coulter, США). Использованы следующие комбинации моноклональных антител с флюорохромами: CD3/FITC, CD4/PC7, CD8/PE, CD69/PC5. Активацию Т-лимфоцитов регистрировали по увеличению среди них количества клеток, экспрессирующих маркер активации CD69: Т-хелперов (CD3+CD4+CD69+) или цитотоксических Т-клеток (CD3+CD8+CD69+). Культуральные супернатанты были отобраны из лунок до изъятия из планшета лимфоцитов для их иммунофенотипирования. В этих супернатантах определяли концентрацию ИФН γ , повышение уровня которого также происходит при появлении среди лимфоцитов больного

антигенспецифических Т-клеток, распознающих бактериофаги (Zaczek M. et al., 2016; Van Belleghem J.D. et al., 2019).

Помимо ИФН γ в присутствии бактериофагов лимфоциты продуцировали и другие цитокины: провоспалительные ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 и противовоспалительные ИЛ-4, ИЛ-10. Концентрация перечисленных цитокинов определялась в тех же супернатантах, что и ИФН- γ . Этот подход применялся для оценки неспецифической активации лимфоцитов при контакте с бактериофагом. Концентрацию ИФН γ , ФНО α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 ИЛ-4, ИЛ-10 определяли методом ИФА (тест-системы «Вектор-Бест», Россия).

До проведения фаготерапии и 1-3 раза в ходе нее (с интервалом в 1 неделю) у пациентов было проведено *комплексное иммунологическое обследование*, которое включало определение параметров: клеточного иммунитета, гуморального иммунитета, интерферонового статуса, цитокинового статуса.

Оценка клеточного иммунного статуса больных. Лимфоциты цельной крови метили антителами против CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD25, CD38, CD69, HLADR, конъюгированными с флуорохромами (FITC, PE, ECD, PC5, PC7) по безотмывочной технологии на автоматической станции пробоподготовки TQprep. Определение процента клеток, относящихся к той или иной субпопуляции лимфоцитов, проводили на проточном цитометре Cytomics FC 500 в протоколах для 2-х и 3-х цветной метки. Все оборудование и антитела – производства Beckman Coulter (США). Помимо процента клеток оценивали абсолютную численность каждой субпопуляции лимфоцитов в 1 мкл крови. *Оценка гуморального иммунитета больных.* Сывороточная концентрация общих иммуноглобулинов – IgG, IgA, IgM – определена методом турбидиметрии (реагенты «Human», Германия) на приборе Chem-7 (Erba Mannheim, Германия).

Оценка интерферонового статуса больных. Интерфероновый статус оценивали методом определения биологической активности интерферонов в культуральных супернатантах. Методика основана на микрометоде С.С. Григорян, предназначенной для оценки интерферонового статуса в цельной гепаринизированной крови. В анализ интерферонового статуса входят 4 основных параметра: содержание интерферонов в сыворотке крови, спонтанная продукция интерферонов клетками крови, индуцированная продукция IFN α и IFN γ клетками крови (Луцкий А.А. с соавт., 2015).

Определение способности лейкоцитов и лимфоцитов продуцировать цитокины использовалось для характеристики общего уровня воспалительной реакции, регуляции формирования клеточного и гуморального ответа на вирусную инфекцию и оценки потенциальных возможностей иммунной системы для защиты организма от присоединения других инфекций в периоде реконвалесценции. В супернатантах, снятых с культуры клеток цельной крови, после стимуляции

различными индукторами (ФГА, ЛПС, ФМА) методом ИФА определяли концентрацию цитокинов, наиболее важных для формирования противоинфекционного иммунитета: IL4, IL6, IL8, IL10, ФНО α , IFN γ и IFN α . Концентрацию ФНО α , IFN γ , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 ИЛ-4, ИЛ-10 определяли методом ИФА (тест-системы «Вектор-Бест», Россия).

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан алгоритм конструирования и технология получения фагосодержащих лекарственных форм для инъекционного и местного применения, в том числе, на основе бактериофагов KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111, лизирующих бактериальные патогены, этиологически значимые для инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

2. Концепция персонализированного подхода к фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, основными элементами которой являются: определение чувствительности выделенных от больного бактерий-мишеней к фагам с подбором рабочего титра препарата, оценка уровня нейтрализующих IgG-антител в крови пациента к входящим в состав коктейля бактериофагам, выбор (с учетом локализации инфекционного процесса и фармакокинетических свойств отобранных для терапии фагов) пути введения и соответствующей ему лекарственной формы, обеспечивает высокую микробиологическую эффективность терапии (89%) со снижением в 1,5 раза риска летальных исходов.

3. Применение препаратов, содержащих бактериофаги, у пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, вызывает штаммоспецифический антифаговый иммунный ответ, который необходимо учитывать при подборе коктейля бактериофагов, что исключительно важно при повторной фаготерапии.

Достоверность результатов научных положений и выводов

О достоверности полученных результатов работы свидетельствует достаточный объем выборки анализируемых образцов, использование сертифицированных бактериологических, иммунохимических и молекулярно-генетических методов, которые характеризуются высокой специфичностью и чувствительностью. Комплексное бактериологическое, иммунохимическое и молекулярно-генетическое исследование бактериальных штаммов и штаммов бактериофагов позволило получить данные, сопоставимые с данными литературы, что также свидетельствует о достоверности полученных результатов. При проведении экспериментальной работы использовано сертифицированное современное оборудование: методами статистической обработки установлена воспроизводимость и правильность результатов исследований, что также позволяет считать их достоверными. Основные положения, изложенные в

настоящей работе, опубликованы в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах и прошли экспертную оценку.

Личный вклад автора состоит в участии во всех этапах выполнения диссертационного исследования. Непосредственно автором разработана концепция исследования, определены алгоритмы и методология выполнения работы, обобщены литературные данные по проблеме, проведены экспериментальные и аналитические исследования. Автор принимал непосредственное участие в разработке лекарственных форм бактериофагов и их изучении, в подборе фагового коктейля для лечения 160 больных, разработке иммуноферментных тест-систем, изучении гуморального и клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии. Автором непосредственно разработана документация для проведения инициативного научного исследования (протокол инициативного научного исследования, индивидуальная регистрационная карта, информация для пациента и форма информированного согласия), утвержденная Этическим комитетом. Автором лично проведены анализ полученных результатов с применением статистических методов исследования, подготовка основных публикаций и докладов по выполненной работе на научно-практических мероприятиях, разработка концепции персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП. Доклинические исследования проведены совместно с сотрудниками лаборатории биологических испытаний ФБУН ГНЦ ПМБ (зав. лабораторией А.И. Борзилов). Бактериофаги выделены в ходе совместных исследований в лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ (зав. лабораторией Воложанцев Н.В.)

Апробация работы

Материалы диссертации доложены и обсуждены на ряде научных конференций, форумов и конгрессов: Научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе», 26-27 сентября 2016 г., Новосибирск; Национальном конгрессе бактериологов «Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях», 20-22 сентября 2016 г., Санкт-Петербург; Третьей научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13-15 октября 2016 г., Москва; Всероссийской научно-практической конференции «Здоровье медицинского персонала и обеспечение эпидемиологической безопасности медицинской деятельности», 21-23 апреля 2016 г., Омск/МедиАль; 4th World Congress on Targeting Infectious Diseases “Phage Therapy 2016”. Paris, France, June 2-3, 2016; Federation of Infection Societies (FIS) Annual Conference and the 10th Healthcare Infection Society (HIS) International Conference 2016. 6-8 November 2016, EICC,

Edinburg, UK; 1st German Phage Symposium October 09-11, 2017, Steinbeis-Haus für Management und Technologie (SHMT) Filderhauptstraße 142, 70599 Stuttgart, Germany; The 15th Finnish Microbial Pathogenesis Day, August 21-23, 2017, University of Helsinki, Haartman Institute, Helsinki, Finland; Conference on Centennial Celebration of Bacteriophage Research, April 24-26, 2017, Institut Pasteur, Paris, France; X Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», 26-28 февраля 2018 г., Москва; Научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 24-26 сентября, 2018, Нижний Новгород; XIII Международном научном конгрессе «Рациональная фармакотерапия», 2018, Санкт-Петербург; XI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», 1-3 апреля 2019 г., Москва; VI Национальном конгрессе бактериологов, 14-16 сентября 2021 г., Казань; Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2020 г., Москва.

Диссертация апробирована на заседании Ученого Совета ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора 30 июня 2022 г. (протокол № 5).

Внедрение результатов исследования

Работа проводилась в рамках НИР 2017-2020 гг. ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора «Конструирование препаратов бактериофагов и клинико-иммунологические аспекты фаготерапии и фагопрофилактики у больных, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи».

По теме диссертации получен патент РФ №2664681 «Способ лечения инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи, вызванной возбудителем или возбудителями с МЛУ» (авторы: Алёшкин В.А., Алешкин А.В., Ершова О.Н., Бочкарева С.С., Шкода А.С., Вайншток И.И., Ведяшкина С.Г., Митрохин С.Д., Калачева О.С., Орлова О.Е., Киселева И.А., Рубальский Е.О., Зулькарнеев Э.Р.)

Научно-практические результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре клинической микробиологии и фаготерапии факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, в клиническую работу ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, а также в работу Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов Роспотребнадзора. Лабораторные регламенты на производство РПВМП и ИР с коктейлями бактериофагов апробированы в АО «Биннофарм».

На основании проведенных исследований разработаны и рекомендованы Департаментом здравоохранения города Москвы Методические рекомендации (№105) «Персонализированная фаготерапия пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП)».

Публикации

Основное содержание работы отражено в 45 публикациях, 12 из которых в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, в том числе 10 – в журналах, индексируемых международными базами данных, 10 статей в других изданиях, 1 – глава в монографии, 20 – в материалах конференций и конгрессов, 1 – методические указания, 1 – патент.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, шести глав, выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 350 страницах, содержит 69 таблиц и 71 рисунок. Библиография содержит 240 источников (51 отечественных и 189 иностранных).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В настоящее время в РФ фаготерапию проводят с использованием серийно выпускаемой продукции. Производитель при серийном выпуске зарегистрированного ранее и разработке нового ЛС на основе бактериофагов должен руководствоваться «Правилами проведения исследований биологических ЛС ЕАЭС» от 3.11.2016 г. В главу 4 данного документа были включены раздел 3 «Клинические исследования лечебно-профилактических бактериофагов» и раздел 4 «Отработка показаний к назначению исследуемого препарата и рекомендаций по его использованию в медицинской практике», определяющие дизайн клинических исследований ЛПП бактериофагов. В этом же документе приведены критерии определения эффективности ЛПП бактериофагов, основываясь на которых врач сможет объективно оценить результат проведенной фаготерапии: *лечебная эффективность фаготерапии* предполагает полное исчезновение всех субъективных и объективных клинических признаков заболевания; уменьшение клинических проявлений или отсутствие прогрессирования по данным объективных исследований; *микробиологическая эффективность* оценивается после завершения курса фаготерапии и определяется как элиминация возбудителя – прекращение высева возбудителя из очага первичной локализации инфекции.

На основании этих критериев эффективности можно оценить достоинства и недостатки персонализированного подхода к лечению ИСМП в стационарах РФ. Во-первых, к бактериофагам обращаются только в случае инфекции, вызванной полирезистентным возбудителем, что отражает эксклюзивность фаготерапии как метода лечения пациентов, страдающих ИСМП. Во-вторых, назначение бактериофагов без предварительного определения чувствительности к ним

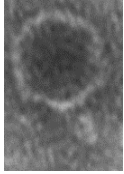

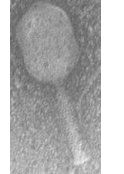
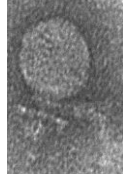
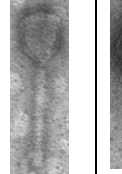
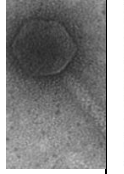

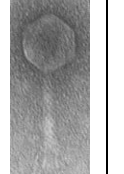
возбудителя нецелесообразно, так как в случае индивидуализированного алгоритма подбора бактериофагов появляется разница в составах тестируемого в лаборатории препарата и закупаемого родственниками пациента или клиникой для непосредственного проведения фаготерапии. Коллекции трех заводов, выпускающих препараты бактериофагов, различны, посерийная смена фагов в коктейлях повышает их эффективность в отношении внебольничных патогенов, но снижает вероятность совпадения, тестируемого в бактериологической лаборатории и назначаемого пациенту в ОРИТ препарата. Кроме того, в этой ситуации невозможно учесть возникновение штаммоспецифического антифагового иммунного ответа при повторном курсе бактериофагов, назначаемом пациентам, длительно находящимся в стационаре, при развитии рецидива инфекционного процесса. Серийно выпускаемые ЛФ бактериофагов ориентированы на пероральное или местное применение, для получения других ЛФ, например, для инъекционного, ингаляционного или ректального применения потребуется проведение фармакокинетических и клинических исследований. Если же удастся пройти весь представленный процесс подбора бактериофагового препарата из серийно-выпускаемой продукции, то это уже ничем не отличается от услуги по индивидуализированному подбору бактериофагов для персонифицированной фаготерапии.

Таким образом, необходима разработка алгоритма эффективной многократной индивидуализированной фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП. Для этих целей на первом этапе работы сконструированы препараты бактериофагов для лечения инфекций у больных, страдающих ИСМП. Были наработаны бактериофаги, активные в отношении штаммов-возбудителей ИСМП – KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111, охарактеризованы фенотипические свойства изолированных штаммов бактериофагов, включая: морфологию негативных колоний, спектр литической активности, максимальный титр при культивировании на жидких и плотных питательных средах, устойчивость к агрессивным факторам внешней среды, продолжительность литического цикла и ряд других. На основании биологических свойств проведен отбор производственно перспективных штаммов бактериофагов. Характеристика штаммов приведена в таблице 1.

Молекулярно-генетические исследования фагов-кандидатов включали рестрикционный анализ, фрагментарное и полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов, а также биоинформатический анализ их полных нуклеотидных последовательностей. На основании полученных данных сделано заключение, что отобранные бактериофаги вирулентны, не содержат нежелательных генов, а их бактериальные штаммы-хозяева не содержат профагов. Пары фаг-штамм хозяин

депонированы в ГКПМ-Оболенск, нуклеотидные последовательности бактериофагов депонированы в GenBank NCBI.

Таблица 1 - Характеристика производственно-перспективных штаммов бактериофагов, включенных в состав ЛФ

Фаг	SCH1	SCH111	KPV15	KPV811	PA5	PA10	AP22*	AM24
Бактерия-хозяин	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
Источник и место выделения	Клинический материал, Челябинск	Клинический материал, Москва	Сточные воды, Моск. обл.	Сточные воды, Моск. обл.	Сточные воды, Моск. обл.	Сточные воды, Моск. обл.	Клинический материал, Москва	Клинический материал, Москва
Спектр литической активности (%/штаммы бактерий)	Суммарно 95% штаммов (в т.ч. MRSA)		Суммарно 92,5% штаммов <i>K. pneumoniae</i> (в т.ч. панрезистентных)		76% штаммов <i>P. aeruginosa</i> (в т.ч. антибиотико-резистентных)		56,25% штаммов <i>A. baumannii</i> (в т.ч. антибиотико-резистентных)	
Устойчивость к хлороформу	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив
Температурная устойчивость	-20 - 55 °С	-20 - 55 °С	-20 - 60 °С	-20 - 65 °С	-20 - 60 °С	-20 - 65 °С	-20 - 65 °С	-20 - 60 °С
Размер и форма ДНК (пн)	18023, линейная	18018, линейная	167034, линейная	42641, линейная	66182, линейная	91212, линейная	46387, кольцевая	97139, линейная
Урожайность (титр), БОЕ/мл	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰
Класс Семейство/ Подсемейство/ Род	<i>Класс Caudoviricetes; семейство Rountreviridae; подсемейство Rakietenvirinae; род Rosenblumvirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes; семейство Rountreviridae; подсемейство Rakietenvirinae; род Rosenblumvirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes; семейство Straboviridae; подсемейство Tenvirinae; род Jiaodavirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes; семейство Autographiviridae; подсемейство Slopevirinae; род Drulisvirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes; род Pbvnavirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes; род Pakpnavirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes; род Obolenskivirus</i>	<i>Класс Caudoviricetes</i>
Электронные микрофотографии								

* Бактериофаги выделены в ходе совместных исследований в лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФГУН ГНЦ ПМБ. Бактериофаг AP22 предоставлен А.В. Поповой (Ророва А.В. et al., 2012)

На следующем этапе исследования разрабатывали составы и технологию получения «универсальных» ЛФ для включения в них коктейлей различного штаммового состава.

Получены две ЛФ – ППВМП и ИР. Состав обеих ЛФ идентичен, это фаговый коктейль, растворенный в изотоническом растворе натрия хлорида, который показал наилучшую биосовместимость, в определенном титре. Титр подбирается в рамках персонализированной терапии. Различия у ЛФ в стадиях технологического цикла, а именно, в очистке препарата и в показателях качества.

Технология получения ЛФ складывается из следующих этапов: вспомогательные работы (водоподготовка, подготовка производства, которая

состоит из стадий подготовки дезинфицирующих растворов для санитарной обработки помещений, оборудования и персонала, подготовка сырья и материалов: мойка, сушка и стерилизация флаконов и укупорочного материала, получение и стерилизация изотонического раствора хлорида натрия, подготовка и стерилизация питательных сред); получение фаголизата: получение ночной (18-ти часовой) культуры штамма-хозяина для каждого фага, входящего в состав коктейля, нанесение штамма-хозяина на поверхность плотной питательной среды, нанесение маточного (стартерного) штамма бактериофага, сбор бактериофага, очистка фаголизата в две стадии: стерилизующая фильтрация и хроматографическая очистка от эндотоксинов; разведение бактериофага стерильным 0,9% раствором натрия хлорида до нужного титра; фасовка и упаковка раствора.

Технология в общем виде представлена на рисунке 3. Раствор для инъекций дополнительно ультрацентрифугируют с хлоридом цезия, затем проводят диализ, и еще раз подвергают стерилизующей фильтрации. На основе разработанной технологии составлены лабораторные регламенты.

Определены в соответствии с действующей нормативной базой показатели качества лекарственных форм, разработаны спецификации и проекты НД. ЛФ бактериофагов контролируют по показателям: описание, подлинность, специфическая активность, стерильность, извлекаемый объем, рН, аномальная токсичность, бактериальные эндотоксины. ЛФ для инъекционного применения дополнительно проверяют по показателям: прозрачность, цветность и механические включения.

Получены результаты по изучению стабильности ЛФ с различными составами фаговых коктейлей и обоснован срок годности препаратов, который составил 24 месяца.

Следующий этап работы – доклинические исследования ЛФ бактериофагов. Для определения безопасности был выбран коктейль бактериофагов следующего состава: КрV15, КрV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111. Посчитали, что если состав ЛФ, содержащей 8 фагов, не будет оказывать токсического действия, то составы с меньшим штаммовым составом также будут безопасны. Было показано, что ЛФ бактериофагов не оказывает острого и хронического токсического действия и не обладает местно-раздражающим эффектом.

Однако наблюдается небольшое снижение количества лейкоцитов в крови животных, принимавших препарат, этот эффект пропадает после окончания курса введения препарата, что говорит о функциональном характере изменений показателей крови у экспериментальных животных. Фармакокинетику изучали на примере ЛФ, содержащей бактериофаг КРV15. Обнаружено, что фаговые частицы в течение 1 часа проникают в кровь и паренхиматозные органы, достигая в них максимальных концентраций. В течение 9 часов фаговые частицы практически

полностью элиминируются из организма, продолжая циркулировать до 24 часов в незначительных количествах у единичных животных.

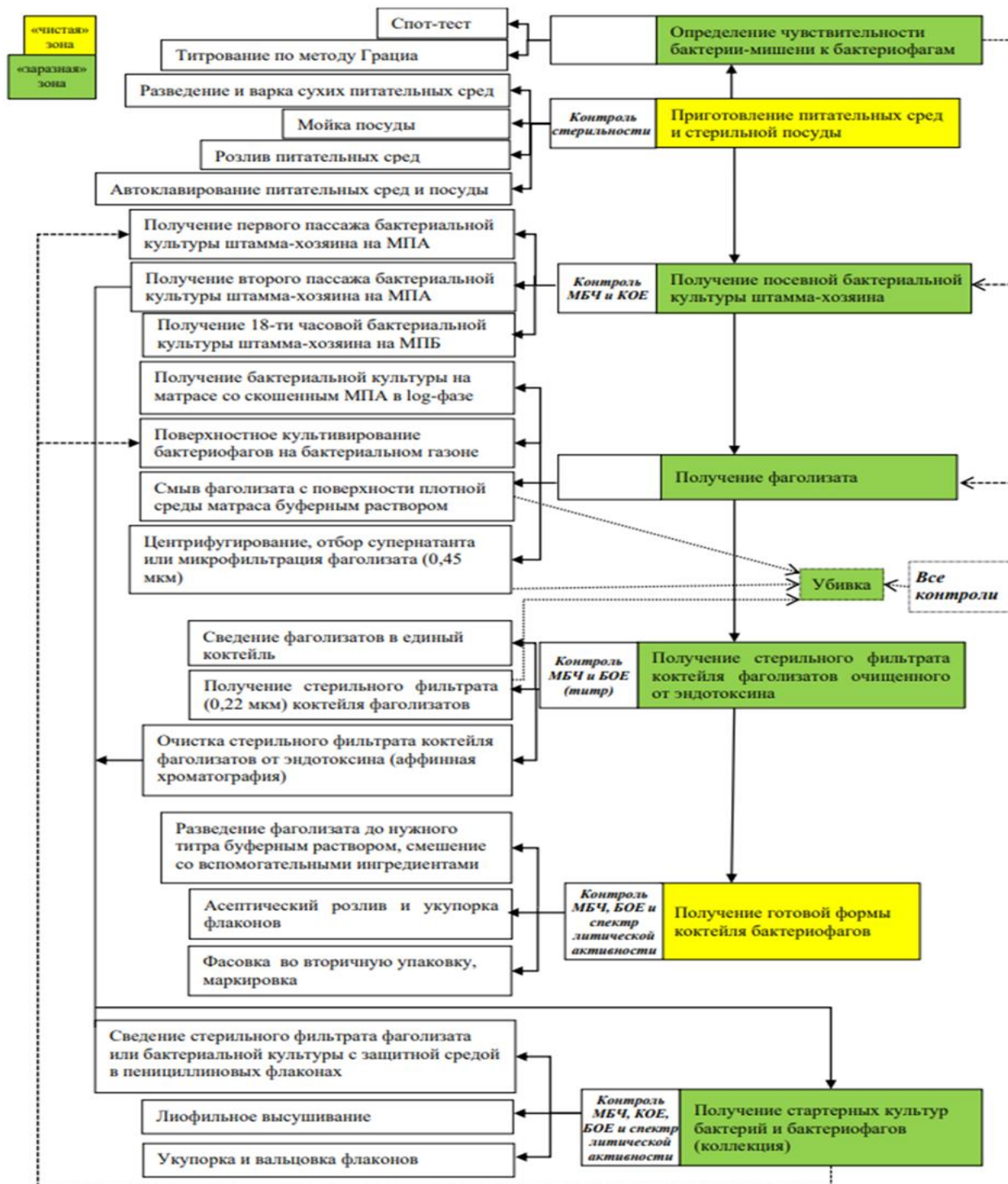


Рисунок 3 - Универсальная схема производства ЛП, а также процедуры контроля качества продукта на всех этапах производственного цикла

Лечебную и профилактическую эффективность исследовали на примере летальной клебсиеллезной инфекции у белых беспородных мышей. При однократном внутрибрюшинном введении в период от 24 до 1 часа до заражения мышей вирулентным штаммом *Klebsiella pneumoniae* B2580 ЛФ защищает от гибели 90-100 % инфицированных животных. У 67-100% выживших мышей

происходит полная санация организма от возбудителя клебсиеллёза. При лечении максимальная эффективность препарата наблюдается при его использовании на ранних стадиях развития клебсиеллёзной инфекции (начало лечения не позднее 6 часов после заражения). Введение бактериофага в течение 10 суток приводит к клиническому и бактериологическому выздоровлению 100% инфицированных мышей. Если лечение начато через 12-24 часа, то выживают в среднем 50% животных. Можно сделать вывод, что терапевтический эффект фаготерапии зависит от сроков начала лечения.

Получение безопасных ЛФ бактериофагов было необходимым этапом для решения основной задачи данной работы – разработки рационального алгоритма подбора бактериофагов для эффективной фаготерапии и фагопрофилактики инфекций у больных, страдающих ИСМП.

На базе четырех клинических площадок было проведено инициативное научное исследование с целью оценки эффективности и безопасности персонализированной фаготерапии пациентов, страдающих ИСМП. На первой стадии проведения персонализированной фаготерапии выделяют от больного и идентифицируют штаммы бактерий-мишеней. Для идентификации используют микробиологические методы, заключающиеся в посеве биологического материала от пациентов на ряд питательных сред, и последующее использование российских и импортных коммерческих биохимических тест-систем. Видовую идентификацию труднокультивируемых микроорганизмов проводили масс-спектрометрическим методом с использованием времяпролетного масс-спектрометра MALDI-TOF MS.

На основании определения чувствительности/резистентности выделенных бактериальных штаммов к антимикробным средствам определяют поли- и панрезистентные штаммы. Дополнительно выделенные штаммы бактерий могут быть исследованы методом ИФА для идентификации фактора, обеспечивающего резистентность. Кроме того, известные локусы антибиотикорезистентности тестируют методом ПЦР со специфическими праймерами. Параллельно отбирают вирулентные штаммы бактериофагов, специфически лизирующие эти патогенные микроорганизмы.

При подборе бактериофагов в рамках данного исследования проводили выбор из банка бактериофагов лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского. Процедура подбора бактериофагов проводили в два этапа:

- на первом этапе использовали spot-тест. Получали бактериальный газон в чашке Петри на плотной питательной среде, состоящей из 1,5-2 % агара. Отбирали бактериофаги или бактериофаг, под воздействием которых происходит полный или частичный лизис бактериального газона или если в зоне нанесенного пятна есть отдельные негативные колонии;

- на втором этапе отобранный бактериофаг или бактериофаги в объеме 10-100 мкл переносили на газоны бактериальных штаммов, нанесенных на поверхность питательного агара в полужидкой (0,6 %-ной) агарозе, первым слоем является 1,5-2,0% агаризованной среды в чашке или чашках Петри. Бактериофаги предварительно готовили в десятикратных разведениях (исходный титр около $10^{10} \times \text{БОЕ/мл}$) в фосфатном буферном растворе в 96-луночной планшете (максимальное разведение $1/10^5$). Необходимо наносить бактериофаги в титре, обеспечивающем множественность инфицирования от 0,01 до 1 с учетом титра бактерии-мишени, высеянной из очага инфекции (модифицированный метод Грация). Результаты учитывали после инкубации чашек при температуре 37 °С в течение 18-24 часов. Штаммы, на которых негативные зоны наблюдали в разведениях $1/100$ и выше, считали чувствительными. Штаммы, на которых зоны лизиса наблюдали при нанесении нативного препарата фага (неразведенного) или разведенного не более чем в 10 раз, относили к условно чувствительным. Штаммы, на которых зоны лизиса отсутствовали, считали резистентными. Таким способом одновременно на одном бактериальном газоне оценивали литическую активность нескольких бактериофагов, чашки Петри при этом делили на сектора для проверки различных разведений фага и/или разных фагов на одной чашке одновременно.

Этот этап позволяет оценить возможную эффективность назначения данного бактериофага/бактериофагов конкретному пациенту, т.е. убедиться в возможности размножения фаговых частиц на бактериальном штамме-возбудителе при попадании *in vivo* в очаг воспаления в титре, соизмеримом с концентрацией вирионов в раститрованном испытуемом препарате. Использование такого двухэтапного определения чувствительности выделенных микроорганизмов к тестируемым фагам позволяет исключить все сомнительные случаи, отобрать штаммы бактериофагов, способные к репликации на бактерии-мишени *in vivo*.

В предварительных экспериментах было обнаружено, что даже при таком двухэтапном подборе бактериофагов конкретному пациенту возникают случаи неэффективности фаготерапии. И было высказано предположение, что эффективности фаготерапии может препятствовать наличие антител к выбранным бактериофагам у пациентов, а именно нейтрализующих антител. Антитела к бактериофагам у пациентов могут появиться на фоне дезинфекции помещений больниц бактериофагами, так как штаммы, применяемые для обработки больничной среды, а также в составе коммерческих препаратов бактериофагов, используемых для терапии, могут быть одинаковыми, кроме того, если пациент проходил лечение бактериофагами ранее, антитела могут персистировать до одного года.

В связи с этим следующей стадией было определение антифагового иммунитета пациента к выбранному фагу или фагам. Затем необходимо было

выбрать путь введения ЛП и ЛФ. ЛП назначались перорально, внутривенно, местно, вводились непосредственно в очаг воспаления. При выборе пути введения и соответственно ЛФ необходимо учитывать локализацию инфекционного процесса и фармакокинетику бактериофагов, входящих в состав назначаемого препарата. Это должно обеспечить доставку бактериофагов к очагу инфекции и длительное персистирование в нём для осуществления активной фаготерапии.

Изучали фармакокинетику ЛФ бактериофагов с коктейлем КрV15, КрV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111 на ограниченном количестве пациентов после пятидневного курса фаготерапии при пероральном введении, образцы биологического материала (эндотрахиальный аспират (ЭТА), моча, кал) отбирали через 24 часа после последнего приема препарата (таблица 2).

Таблица 2 - Результаты изучения наличия бактериофагов в клиническом материале пациентов после 5-ти дневного курса фаготерапии

Пациент, №	PA5	PA10	КрV15	КрV811	AM24	AP22	SCH1/ SCH111	Биологический материал
1	20*	25	-	-	+++	+	-	Кал
2	+++**	+++	+	-	+++	+	-	Кал
3	4·10 ⁴	3·10 ⁵	-	-	-	-	-	ЭТА
	-	10	-	-	-	-	-	Кал
4	+	30	+	-	++	-	++++	Кал
5	-	-	-	+	-	-	-	Моча
	-	-	-	-	++	+	-	Кал
6	+++	+++	++	+	+++	++	-	Кал
7	2·10 ²	++++	2·10 ²	+++	+++	-	-	Моча
	5·10 ⁴	4·10 ⁵	-	-	-	-	-	ЭТА
	18	10	-	-	++	+	-	Кал
8	-	+++	+	10 ⁴	-	-	-	Моча
	-	-	-	-	++	-	-	Кал
9	-	-	-	-	3·10 ⁸	-	-	Моча
	17	25	++	-	+++	++	-	Кал
10	+++	+++	++	-	+++	+++	-	Кал

* титр бактериофага по методу Грация БОЕ/мл

**зона лизиса на чувствительном штамме-хозяине методом спот-теста, где меньшее количество плюсов означает нечистый лизис в результате недостаточной концентрации бактериофага в данном образце.

«-» отсутствие бактериофага в данном образце

Из результатов, представленных в таблице 2, видно, что при пероральном приеме коктейля бактериофагов, все штаммы попадают в кровеносную систему через стенку кишечника, и через 24 ч после последнего приема индивидуальные штаммы бактериофагов обнаруживаются в моче, эндотрахеальном аспирате и кале пациентов. Полученные результаты явились основанием для выбора способа введения бактериофагов. Для пациентов с инфицированным содержимым эндотрахиального аспирата выбирался внутривенный или пероральный способ введения. Раневые поверхности обрабатывались местно или обкалывались

внутримышечно. При санации полостей ЛФ вводилась через дренажную систему.

Титр бактериофагов определяется множественностью инфицирования, учитывающей КОЕ выделенного из очага инфекции штамма-мишени. При введении пациенту отношение количества бактериофагов к титру бактерий возбудителей, высеваемых из очага воспаления, составляет от 1 до 100, с учетом максимального падения титра бактериофага от исходного в препарате в момент достижения очага инфекции не более двух порядков. Условием терапевтического эффекта фаготерапии является то, что концентрация фага должна быть не выше количества бактериальных клеток. Активная терапия может продолжаться только в том случае, если общее количество фагов увеличивается, фаги, полученные в результате репликации, могут заменить те, которые были потеряны в результате деградации. То есть, если скорость размножения фагов *in situ* превышает скорость их рассеяния и (или) разрушения, то концентрация фагов будет расти до исчерпания доступных клеток-хозяев. В этом случае говорят об активной фаготерапии (Cairns B. et al., 2009).

Кроме того, необходимо учитывать потери титра бактериофагов при достижении очага инфекции. Так, если препарат вводят непосредственно в очаг воспаления, то титр может быть ниже, при пероральном введении необходимо учитывать потери титра, происходящие из-за воздействия кислой среды желудка. Далее препарат назначался пациенту и исследование проводилось в соответствии с методологией исследования. В общем виде алгоритм проведения персонализированной фаготерапии представлен на рисунке 4.



Рисунок 4. – Рациональный алгоритм проведения персонализированной фаготерапии

В таблице 3 показан объем проведенных исследований для разработки алгоритма персонализированной терапии.

Таблица 3 - Объекты и объем проведенных исследований в рамках разработки алгоритма персонализированной фаготерапии

Раздел работы	Методы исследования (производственные операции)	Объем исследования/ количество анализов
I. Выделение и идентификация штаммов бактерий-мишеней от пациента ОРИТ	1. Микробиологические методы	1.1. Посев патологического материала на несколько видов питательных сред/ <u>1560</u> 1.2. Использование отечественных и импортных биохимических тест-систем/ <u>1350</u>
	2. Видовая идентификация для труднокультивируемых микроорганизмов	2.1. Масс-спектрометрический метод с использованием времяпролетного масс-спектрометра MALDI-TOF MS/ <u>840</u>
	3. Определение возбудителей ИСМП, обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ)	3.1. Определение чувствительности/резистентности бактериальных штаммов к антимикробным средствам, антибиотикам, антисептикам/ <u>650</u>
		3.2. Тестирование микроорганизмов с МЛУ иммуноферментным методом для идентификации фактора, обеспечивающего резистентность/ <u>175</u>
	3.3. Регистрация известных локусов антибиотикорезистентности с помощью амплификации со специфическими праймерами в ПЦР-реакции/ <u>130</u>	
	4. Определение количества выделяемого (КОЕ) из очага возбудителя	<u>360</u>
II. Подбор бактериофага	1. Spot-test на возбудителе	<u>100</u>
	2. Модифицированный метод Грация на возбудителе с определением максимального количества БОЕ	<u>132</u>
III. Определение наличия антифаговых антител в сыворотке крови пациента ОРИТ	1. Получение моноспецифической антисыворотки к бактериофагу	<u>42</u>
	2. Конструирование иммуноферментной тест-системы	<u>14</u>
IV. Производство препарата бактериофага для пациента ОРИТ	Получение серий ЛП с подобранным штаммовым составом с учетом способа введения	<u>132</u>
V. Контроль готовой ЛФ	В соответствии со спецификацией	<u>132</u>
VI. Оценка лечебной и санационной эффективности после курса бактериофага у пациента ОРИТ	1. Аналогично разделу I.	<u>458</u>
	2. Определение наличия антифаговых IgG-антител	<u>250</u>
	3. Реакция нейтрализации	<u>260</u>
	4. Иммунный статус	<u>40</u>
	5. Клинический анализ крови	<u>352</u>
	6. Биохимический анализ крови	<u>352</u>

Разработанный алгоритм был апробирован на базе четырёх лечебных учреждений на 160 пациентах отделений ОРИТ, после проведения

высокотехнологичных операций по основному заболеванию были сформированы опытная группа (1) и группа сравнения (2) в зависимости от включения бактериофагов в схему лечения. Гендерные различия не учитывались. Для оценки микробиологической эффективности фаготерапии сравнивали частоту встречаемости элиминации патогенных микроорганизмов в 1 и 2 группах. Результаты представлены на рисунках 5, 6.

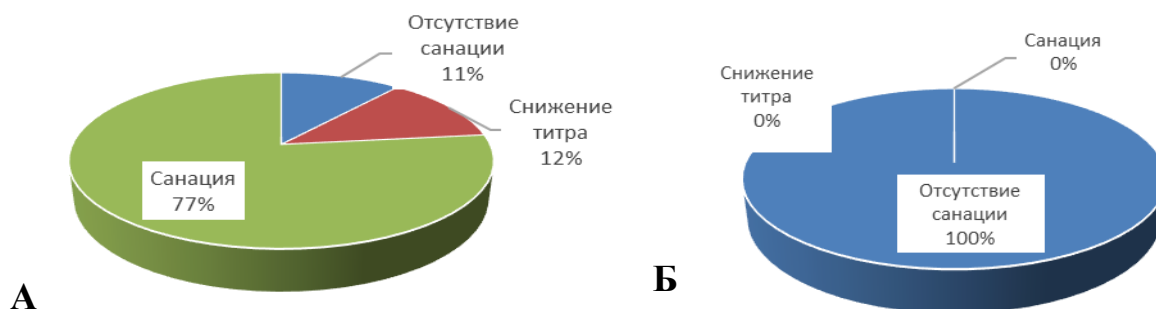


Рисунок 5 - Частота встречаемости различных эффектов в результате применения бактериофагов в отношении патогенных микроорганизмов у пациентов ОРИТ.

А – опытная группа, Б – группа сравнения

На рисунке 5 показано, что в 77% случаев применение бактериофагов приводило к элиминации микроорганизмов, в 12% – к снижению титра микроорганизма, а в 11% – действие бактериофагов не влияло на интенсивность обсемененности патогенной микрофлорой. В группе сравнения в 100% случаев отсутствовала санация и снижение интенсивности обсемененности патогенными микроорганизмами.

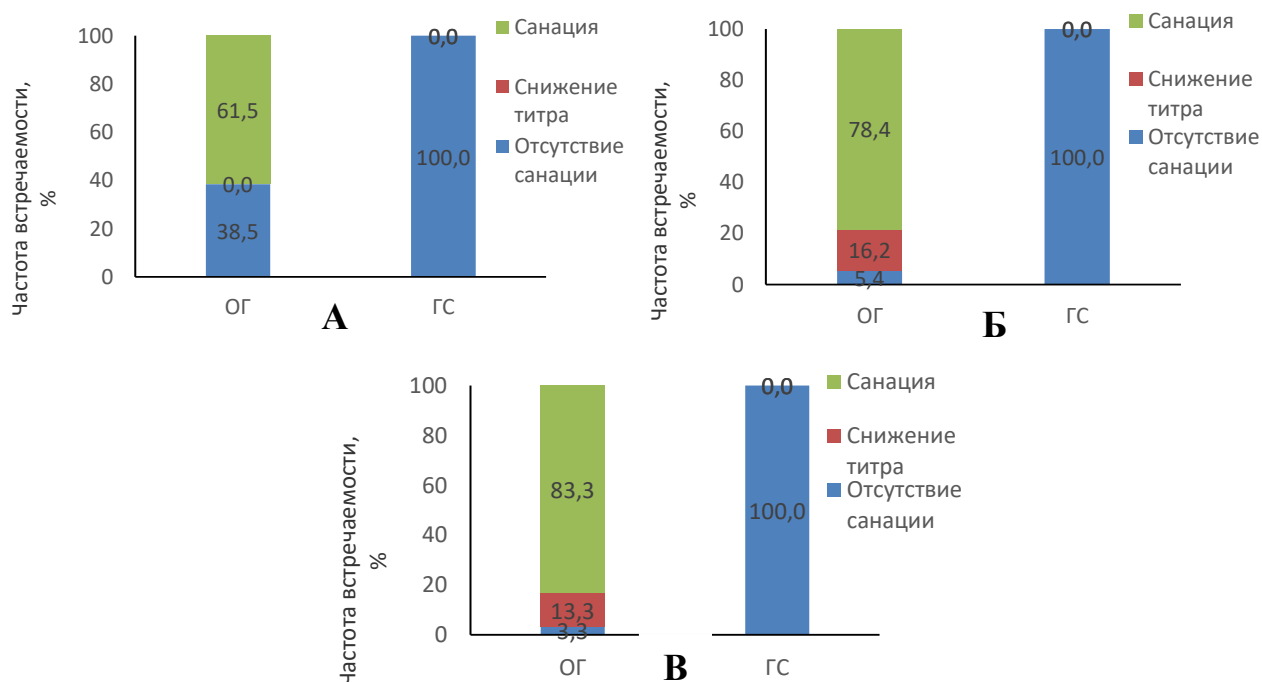


Рисунок 6 - Частота встречаемости различных эффектов в результате применения бактериофагов в отношении различных патогенных микроорганизмов у пациентов ОРИТ. А - *A. baumannii*, Б - *K. pneumoniae*, В - *P. Aeruginosa*

На рисунке 6 показано, что применение бактериофага в отношении *P. aeruginosa* оказалось наиболее эффективным, так как у 83,3% пациентов наблюдалась элиминация микроорганизма, а у 13,3% снижался их титр. Несколько менее эффективен бактериофаг к *K. pneumoniae*, так как санация наблюдалась у 78,4%, снижение титра у 16,2% пациентов, а отсутствие санации – у 5,4%. Наименее эффективен бактериофаг к *A. baumannii*, который приводил к санации 61,5% пациентов, а у остальных 38,5% отсутствовали снижение титра и элиминация микроорганизмов. Таким образом, персонализированная фаготерапия имеет высокую микробиологическую эффективность.

Терапевтическая эффективность фаготерапии оценивалась по снижению риска летальных исходов. Для оценки динамики основного заболевания сравнивали частоту встречаемости исходов основного заболевания в 1 и 2 группах. Результаты представлены на рисунке 7.

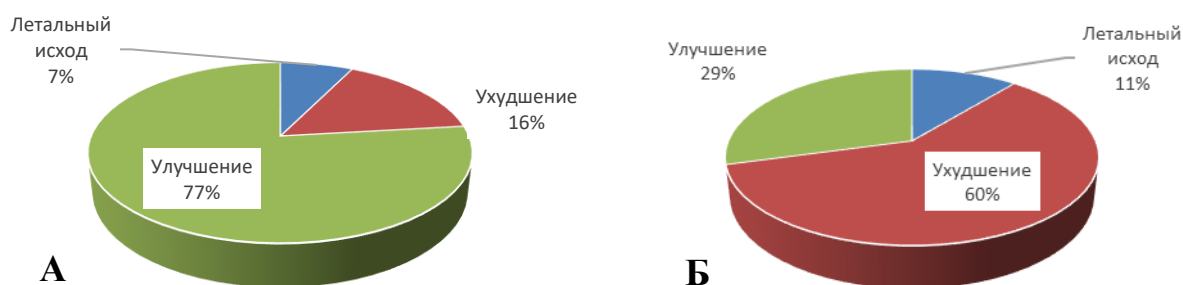


Рисунок 7 – Частота встречаемости различных эффектов в результате применения бактериофагов в отношении патогенных микроорганизмов у пациентов ОРИТ (А - опытная группа, Б - группа сравнения)

На рисунке 7 показано, что в случае применения бактериофагов улучшение наступало у 77% пациентов, ухудшение — у 16%, а у 7% фиксировался летальный исход. В группе сравнения только в 29% случаев наблюдалось улучшение, а у 60% пациентов было выявлено ухудшение. У 11% пациентов отмечался летальный исход.

Сравнение абсолютного и относительного риска летального исхода по частоте встречаемости случаев применения бактериофагов и количеству летальных исходов представлено в таблице 4

В таблице 4 показано, что в опытной группе в 1,5 раза ниже риск летального исхода. Доверительный интервал отношений вероятностей группы сравнения и опытной группы ($1,5 \pm 0,088$) изменяется от 1,412 до 1,588, то есть 1 (отношение рисков 1:1) в доверительный интервал не входит. Это является показателем статистической значимости более высокого риска летального исхода в группе сравнения относительно опытной группы. Это достаточно высокий показатель, так как клинические исследования проводились для пациентов ОРИТ, находящихся в тяжелом и крайне тяжёлом состоянии.

Таблица 4 – Сравнение рисков летального исхода при применении бактериофагов у пациентов ОРИТ

	Вероятность, ед.		Отношение вероятностей	
	Опытная группа	Группа сравнения	Группа сравнения / опытной группы	Статистическая значимость, $p < 0,05$
Летальный исход	$0,073 \pm 0,056$	$0,11 \pm 0,068$	$1,5 \pm 0,088$	$p < 0,05$

Ниже представлено несколько клинических примеров использования фаготерапии.

Пациент 1. Диагноз пациента - перелом зубовидного отростка С2 позвонка. После стабилизирующей операции – атланта-аксиальный спондилодез с использованием фиксатора с эффектом памяти развились гнойно-септические осложнения. Проведенная на первом этапе антибиотикотерапия ванкомицином и меропенемом не привела к купированию осложнений. Из раневого отделяемого выделена *Klebsiella pneumoniae*. Бактерия показала отсутствие чувствительности к широкому спектру антибиотиков: ампициллину, сульбактаму, гентамицину, цефуроксиму, тобрамицину, цефуроксиму/аксетилу, налидиксовой кислоте, цефокситину, цiproфлоксацину, цефтазидиму, тетрациклину, цефтриаксону, цефоперазону/сульбактаму, нитрофурантоину, цефепиму, хлорамфениколу, имипенему/циластатину и триметоприму. Имела слабую чувствительность к амикацину и тигециклину. На следующем этапе лечения проводили следующую терапию: тигециклин+бактериофаг+вакуум-аспирация раневого отделяемого (ЛФ бактериофагов: перорально + экспозиция губки, пропитанная раствором для местного применения в ране). Пероральное и местное использование подобранных по чувствительности и титру бактериофагов, а именно KPV811, на втором этапе комплексного антибактериального лечения позволило добиться положительного терапевтического эффекта, послеоперационная рана спокойная, зажила первичным натяжением, дефект от раневого дренажа слева затягивается вторичным натяжением, после чего пациент был выписан.



Рисунок 8 - Открытая, в условиях перевязочной, операционная рана

Пациент 2. У пациента запущенная флегмона передней брюшной стенки, вскрытие и последующее дренирование которой вместе с медикаментозной терапией на фоне прогрессирования инфекционного процесса привели к неклостридиальному некротическому целлюлофасциомиозиту передней брюшной

стенки и левой поясничной области. В раневом отделяемом – *S. aureus* (MRSA-штамм). Проведение комплексной эндолимфатической иммуно-антибактериальной терапии (меропенем, метрогил, полиоксидоний, циклоферон, галавит, клиндамицин, гепарин, бактериофаг, включавшей применения бактериофага, подобранного по чувствительности к возбудителю (коктейль из SCH111 и SCH1) и в необходимом титре для нанесения на повязки и внутримышечное обкалывание по краям раны, привели к полному выздоровлению и выписке пациента.



Рисунок 9 - Неклостридиальный некротический целлюлофасциомиозит передней брюшной стенки, левой поясничной области в процессе (1) и после лечения (2)

Пациент 3 с молниеносной левосторонней эмпиемой плевры, вызванной *S. aureus*, после имплантации вспомогательного устройства для левого желудочка. Рисунок 10 иллюстрирует степень воспаления в зараженной области, несмотря на терапию антибиотиками. Бактериофаги вводили дважды в день в течение 5 суток через дренаж, установленный во время операции по поводу декорткации эмпиемы. После фаготерапии в посевах из раневого отделяемого бактерий обнаружено не было. LVAD оставался незараженным, что было отражено на ПЭТ-КТ через два месяца после фаготерапии.

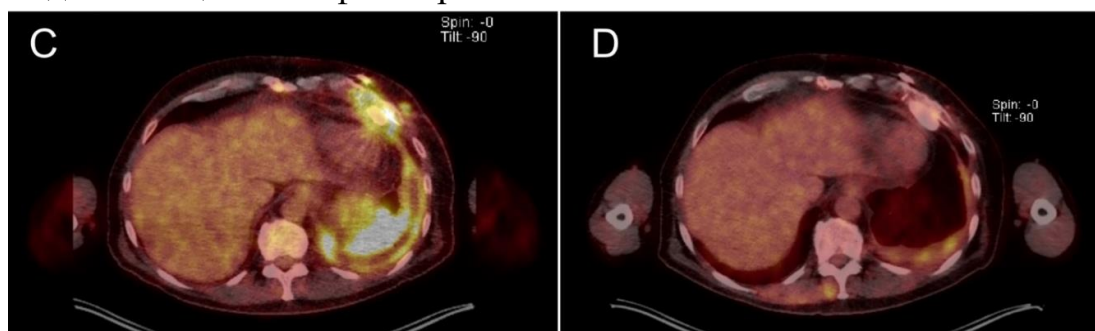


Рисунок 10 - Результаты ПЭТ-КТ пациента до (С) и через два месяца после (D) фаготерапии в области устройства поддержки левого желудочка и полости эмпиемы плевры. Эмиссия желтого цвета показывает накопление меченого вещества (2-[18F]флюоро-2-дезоксид-Д-глюкоза), что соответствует наличию воспаления

В проведенных клинических исследованиях подтверждена безопасность терапии препаратами бактериофагов, за все время исследования не было

достоверно выявлено наличие НЯ и СНЯ, за исключением нарастания уровней белков острой фазы в первые сутки фаготерапии, свидетельствующим о выделении эндотоксинов при бактериолизе в очаге инфекции.

В данной работе изучено влияние иммунного антифагового ответа на эффективность терапии. Для обнаружения антифаговых антител в сыворотке крови пациентов были сконструированы и апробированы тест-системы, выявляющие методом ИФА IgG-антитела к штаммам бактериофагов, активных в отношении *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*. Для разработки иммуноферментных тест-систем были использованы как коммерческие реактивы, так и реагенты, приготовленные в лабораторных условиях. Были подобраны условия иммуноферментной реакции – продолжительность и температура стадий инкубации, концентрация реагентов (положительные контроли, конъюгат), необходимость встряхивания планшета при инкубации. Для выявления связавшегося с сорбированным антигеном иммуноглобулина G использовали конъюгат Protein A-Peroxidase, выбранный на том основании, что содержащийся в нем реагент Protein A стафилококка имеет сродство к иммуноглобулинам G разных видов млекопитающих, в том числе человека и кролика. Для каждого исследуемого фага предварительно подбирали рабочее разведение конъюгата (диапазон – 1:4000-1:64000) и рабочее разведение кроличьей поликлональной моноспецифической сыворотки (первый положительный контроль), обеспечивающее значение оптической плотности положительного контроля в диапазоне 0,4-1,0. В первоначальных исследованиях выявлялись сыворотки крови больных, имеющих IgG-антитела к данному бактериофагу, из которых формировали пул, использованный в дальнейшем как второй положительный контроль антител к конкретному фагу.

При выполнении исследований по конструированию иммуноферментных тест-систем, выявляющих IgG-антитела к новым штаммам бактериофагов, активных в отношении *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, были получены кроличьи поликлональные моноспецифические антифаговые антисыворотки. Иммунохимическая характеристика кроличьих антисывороток была выполнена с помощью иммунопреципитации по Оухтерлони, ИЭФ и в реакции нейтрализации фагов. Иммунопреципитация по Оухтерлони позволила убедиться, что иммунизация животных привела к выработке антител к бактериофагам. В центральные лунки вносили соответствующие антигены-бактериофаги (РА5, AP22, KPV15), а в периферические лунки – сыворотки крови иммунизированных кроликов. Линии преципитации свидетельствуют о специфичности сывороток в отношении исследуемых антигенов. В случае с фагом KPV15 обнаруживается несколько линий преципитации с соответствующей кроличьей антисывороткой, и эта антисыворотка была проанализирована также

методом иммуноэлектрофореза. Было выявлено, что антисыворотка содержит как минимум три вида антител к трем различным эпитопам фага (рисунок 11).

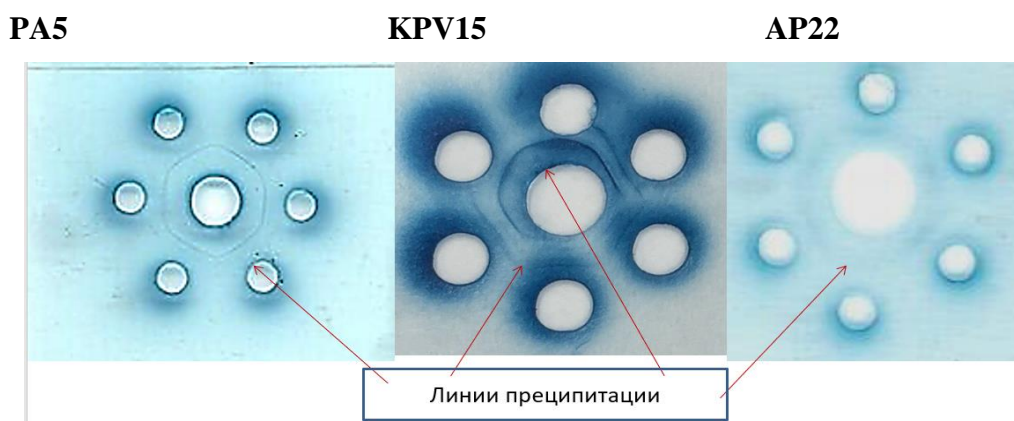


Рисунок 11 - Иммунохимическая характеристика антифаговых сывороток с помощью иммунопреципитации по Оухтерлони

На примере фагов, лизирующих *S. aureus* и *K. pneumoniae*, и соответствующих антисывороток, показано, что антисыворотки строго специфичны (рисунок 12). При взаимодействии бактериофагов SCH1 и KP15 с антисыворотками, полученными в результате иммунизации другими бактериофагами, линии преципитации отсутствовали.

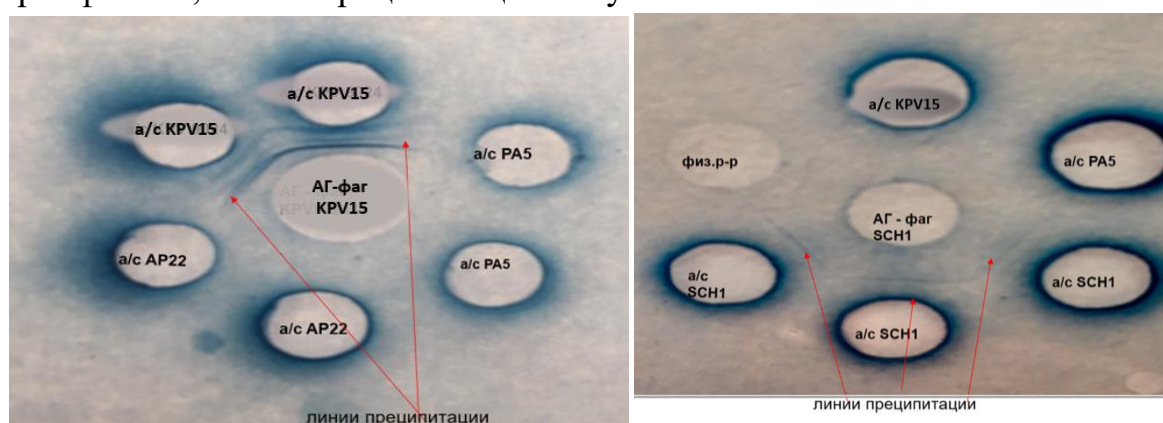


Рисунок 12 - Проверка специфичности антисыворотки к фагу KP15, лизирующему *K. pneumoniae* (А) и к фагу SCH1, лизирующему *S. aureus* (Б), методом иммунопреципитации по Оухтерлони (центральная лунка – фаг KP15 в титре 10^{10} БОЕ/мл, периферические лунки – кроличьи моноспецифические антисыворотки к фагам KP15, PA5, AP22)

В реакции нейтрализации было показано влияние антител на возможность фага лизировать бактерию-мишень. Инкубация фага с соответствующей антисывороткой приводила к значительному ослаблению (для фага AP22) или даже полному отсутствию (в случае фага PA5) лизиса бактерий, а вот в случае с фагом KP15 нейтрализующая активность у сыворотки не наблюдалась (рисунок 13).

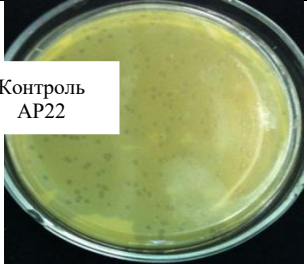

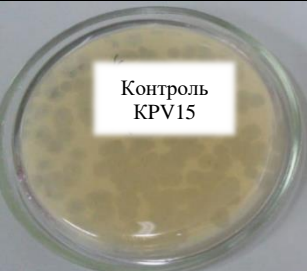


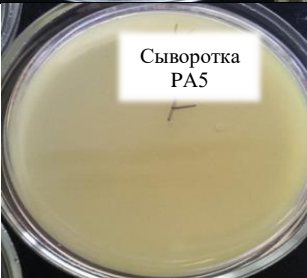
<i>Анализируемый образец фаголизата с внесенной сывороткой (разведение сыворотки в PBS 1/1500)</i>		<i>БОЕ/мл (титр образца по Грация после 30 минутной инкубации при температуре 37°C)</i>	
AP22	Анализируемый образец фаголизата без внесения сыворотки	10²	 Контроль AP22
	Анализируемый образец фаголизата с внесенной сывороткой (разведение сыворотки в PBS 1/1500)	5	 Сыворотка AP22
KPV15	Анализируемый образец фаголизата без внесения сыворотки	10³	 Контроль KPV15
	Анализируемый образец фаголизата с внесенной сывороткой (разведение сыворотки в PBS 1/1500)	10³	 Сыворотка KPV15
PA5	Анализируемый образец фаголизата без внесения сыворотки	10³	 Контроль PA5
	Анализируемый образец фаголизата с внесенной сывороткой (разведение сыворотки в PBS 1/1500)	0	 Сыворотка PA5

Рисунок 13 - Результаты реакции нейтрализации литического действия фагов сыворотками крови иммунизированных животных, исходный титр фаголизатов PA5, AP22, KPV15 – 10⁶ БОЕ/мл

В качестве апробации сконструированных тест-систем на наличие антифаговых антител были проанализированы сыворотки крови, полученные от разных контингентов испытуемых, как взрослых, так и детей, а также препараты, полученные из крови человека – «Габриглобин» (представляет собой IgG человека и предназначен для внутривенного введения) и «Комплексный иммуноглобулиновый препарат» (представляет собой комбинацию IgG, IgA и IgM человека, пероральный препарат). Результаты представлены в таблице 5. В сыворотках крови детей в возрасте до одного года антитела не обнаружены, в крови людей, работавших с бактериофагами титры антител более чем в два раза выше (1:128 к PA5, 1:64 к AP22), чем в препаратах «Габриглобин» (1:64 к PA5, 1:32 к AP22) и «Комплексный иммуноглобулиновый препарат» (1:32 к PA5, 1:16 к AP22).

Таблица 5 - Апробация сконструированных тест-систем (на примере тест-систем по выявлению IgG-антител к фагам PA5 и AP22), указаны средние титры антител

<i>Исследуемые образцы</i>	<i>Фаг</i>	
	<i>PA5</i>	<i>AP22</i>
Сыворотки крови лиц, работающих с фагами (n=20)	1:128	1:64
Сыворотки крови детей в возрасте до 1 года (n=40)	Антитела отсутствуют	
«Габриглобин» (внутривенный иммуноглобулиновый препарат) (n=5)	1:64	1:32
«Комплексный иммуноглобулиновый препарат» (для перорального применения) (n=5)	1:32	1:16

Важным аспектом оценки антифагового гуморального иммунитета является не только обнаружение специфических антител, но и выяснение вопроса о том, являются ли эти антитела нейтрализующими фаговую активность в отношении бактерии-мишени. При исследовании в реакции нейтрализации кроличьих антифаговых сывороток было обнаружено, что инкубация фагов с соответствующими антисыворотками приводила к значительному ослаблению (в 100 раз в случае фагов AP22 и SCH1) или даже полному отсутствию (в случае фага PA5) лизиса бактерий, а в случае с фагом KPV9024 нейтрализующая активность антисыворотки отсутствовала. Таким образом, было выявлено, что образовавшиеся антитела необязательно обладают свойством нейтрализовать антибактериальную активность фага, что может иметь принципиальное значение при проведении фаготерапии у больных, особенно при повторных курсах.

Результаты исследований выявили, что антитела после первого курса фаготерапии образуются преимущественно против бактериофагов, лизирующих *A. baumannii*, *P. aeruginosa* (таблица 6). Результаты исследований так же показали, что образующиеся через три недели после первичного курса фаготерапии, нейтрализующие IgG-антитела штаммоспецифичны (таблица 7). Следовательно,

замена штаммов при проведении последовательных курсов фаготерапии позволяет поддерживать ее высокую эффективность.

Таблица 6 - Характеристика продукции антител у больных ИСМП

Курс фаготерапии	Количество пациентов	Вид бактерии, против которой проводилась терапия	Средний уровень титр антител
Первый	13	<i>A. baumannii</i>	1:16
Второй	5		1:256
Третий	1		1:512
Первый	37	<i>K.pneumoniae</i>	0
Второй	12		1:64
Третий	4		1:128
Первый	30	<i>P.aeruginosa</i>	1:32
Второй	7		1:256
Третий	4		1:1024
Первый	20	<i>S.aureus</i>	1:16
Второй	8		1:128
Третий	2		1:256

Таблица 7 - Штаммоспецифичность IgG-антител к бактериофагам

Номер пациента (курс фаготерапии)	Наименование бактериофага	Наличие титра антител к фагу
лизирующего <i>P.aeruginosa</i>		PA5
Пациент 1 (первый курс) (второй курс)	PA1C	Отр.
	PA1C, PA10	Отр.
Пациент 2 (первый курс) (второй курс) (третий курс)	PA5	1:16
	PA5	1:256
	PA10, PAV5	1:256
Пациент 3 (первый курс)	PAV5, PA10	Отр.
Пациент 4 (первый курс)	PAV10	Отр.
лизирующего <i>S. aureus</i>		SCH1
Пациент 5 (первый курс) (второй курс)	SCH1, SCH111	1:128
	Sa30, CH1	1:128
Пациент 6 (первый курс) (второй курс)	SCH111, CH1	Отр.
	Sa30	Отр.
лизирующего <i>A. baumannii</i>		AP22
Пациент 6 (первый курс) (второй курс)	AM24	Отр.
	AP22	1:256

В отношении бактериофагов, лизирующих *K. pneumoniae*, необходимо отметить, что после первого курса фаготерапии в большинстве случаев антител зафиксировано не было (таблица 6). Выявленные в единичных случаях антитела не обладали нейтрализующей активностью, следовательно, не влияли на эффективность проводимой фаготерапии

Результаты оценки антифагового иммунитета у пациентов демонстрируют, что образующиеся после первого курса фаготерапии антитела не влияют на эффективность проводимой фаготерапии, что также было подтверждено

клинически. Повторный курс приема фагов сопровождается достаточно быстрым подъемом уровня соответствующих антител, что приводит к неэффективности терапии. Таким образом, полученные результаты подтвердили необходимость детекции соответствующих антител в крови больных для корректировки штаммового состава препаратов при проведении курсов фаготерапии, как первичных, так и повторных.

Было изучено также влияние фаготерапии на клеточное звено иммунитета.

Специфическое распознавание бактериофага Т-лимфоцитами выразалось в появлении на их поверхности маркера активации CD69 и продукции этими клетками ИФН- γ . Показано, что для антиген-стимулированной продукции ИФН- γ лимфоцитами пациентов большое значение имело, чтобы в присутствии фага одновременно активировались Т-хелперы и цитотоксические лимфоциты. Большинство образцов клеток, в которых была зарегистрирована АГ-стимулированная продукция ИФН- γ , принадлежит больным, получившим более 1 курса бактериофага, причем максимум АГ-стимулированной продукции ИФН- γ регистрируется на 3-4 неделе после 2-го курса (таблица 8).

Таблица 8 - Различия в частоте и интенсивности АГ-активации Т-лимфоцитов у больных при первичном и повторном курсе фаготерапии

	Курс фаготерапии	
	Первичный	Повторный
Количество образцов с АГ-стимулированным повышением концентрации ИФН γ , %	5,9	72,7
Средний прирост концентрации ИФН γ , пг/мл	16,8 \pm 13,9	74,2 \pm 28,3*

*значимое отличие от образцов после первичного курса фаготерапии (p<0,05)

Динамика появления АГ-стимулированной продукции ИФН γ при первичных и повторных курсах фаготерапии показана на рисунке 14.

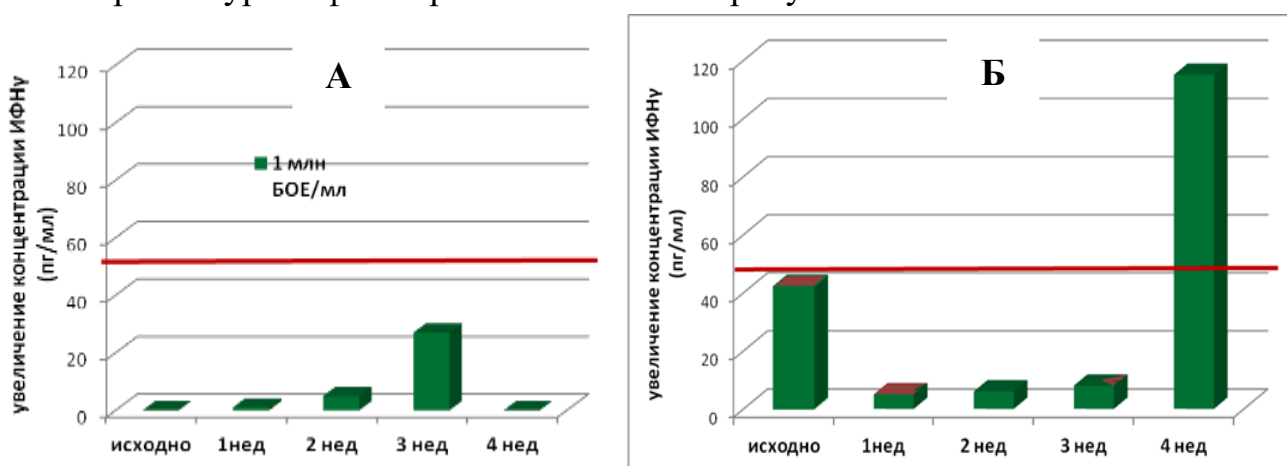


Рисунок 14 - Активации продукции ИФН γ при первичном (А) и повторном (Б) курсе фаготерапии

При повторном курсе АГ-активация продукции ИФН γ у некоторых пациентов наблюдалась уже исходно - как результат 1-го курса фаготерапии. Затем активация снова регистрировалась у ряда пациентов на 2, и 3 неделях, но не

отражалась на средних показателях динамики, а с 4 недели была характерна для большинства лиц с ИСМП, прошедших повторные курсы с применением того же самого, что и при первом курсе, или другого бактериофага.

Исследование иммунофенотипа Т-лимфоцитов, которые могли бы обеспечивать наблюдаемое повышение продукции ИФН γ при АГ-стимуляции мононуклеаров, выделенных из крови больных, показало следующее.

Перед началом первого курса фаготерапии в крови пациентов не выявлялись Т-лимфоциты, способные активироваться в присутствии бактериофагов с повышением экспрессии CD69+. Однако, через 3 недели ЦТЛ, активирующиеся в присутствии бактериофага, применяемого для терапии, обнаруживались у 58% больных и, напротив, Т-хелперы активировались только у 15%. При повторных курсах фаготерапии повышенные уровни активированных Т-лимфоцитов выявляются уже со 2-ой недели.

Оказалось, что для АГ-стимулированной продукции ИФН γ большое значение имело, чтобы в присутствии фага активировались как Т-хелперы, так и цитотоксические лимфоциты. В обследованной нами группе больных это происходило не на всех сроках, и в целом признаки АГ-активации ЦТЛ регистрировались чаще, чем признаки активации Т-хелперов. Если активация затрагивала только одну субпопуляцию, то прирост продукции ИФН γ выше 50 пг/мл вообще не происходил.

У пациентов, обе субпопуляции Т-лимфоцитов которых активировались в присутствии бактериофага и имели фенотип CD3+CD4+CD69+ и CD3+CD8+CD69+, прирост продукции ИФН γ также отмечался не в каждом из культуральных супернатантов этих клеток, но все же наблюдался чаще: в 46,6% образцов. В этом случае АГ-стимулированная продукция ИФН γ демонстрирует статистически значимый прирост (таблица 9).

Таблица 9 - Соотношение между появлением активационного фенотипа на Т-лимфоцитах и АГ-стимулированной продукцией ИФН γ

Средние показатели АГ-активации	АГ-стимуляция вызвала повышение экспрессии CD69+	
	только на Тх или ЦТЛ	на обеих субпопуляциях
прирост CD3+CD4+CD69+, %	0,8±0,3	4,4±0,9
прирост CD3+CD8+CD69+, %	2,2±0,9	7,2±1,1
прирост продукции ИФН γ , пг/мл	5,4±1,9	45,1±16,1*

* значимое отличие от образцов с активацией только одной субпопуляции ($p < 0,05$)

Неспецифическое влияние бактериофагов у пациентов с ИСМП выразилось в стимуляции продукции ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-10. У пациентов исследовали также субпопуляционный состав лимфоцитов, цитокиновый статус, интерфероновый статус. В целом картина была неоднородной в связи с тем, что на состояние пациента влияло несколько факторов, а именно, основное заболевание,

присоединившаяся инфекция и фаготерапия. На основании выявленных изменений показателей клеточного иммунитета можно предположить иммуномодулирующее влияние фагов на организм, заключающееся в улучшении противoinфекционной защиты организма, которое связано со снижением бактериальной нагрузки после эффективной фаготерапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в рамках проведенных исследований результаты подтвердили предположения, что при разработке лекарственных форм бактериофагов для борьбы с ИСМП нельзя придерживаться классического пути применения лечебно-профилактических продуктов бактериофагов — стратегии фиксированного штаммового состава коктейля. Во-первых, влияние антибиотиков и дезинфектантов на патогенные микроорганизмы, особенно в замкнутой экологической нише больничных учреждений, ускоряет эволюционный процесс в направлении формирования штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Следовательно, изменение штамма возбудителя требует внесения изменений и в штаммовый состав фагового коктейля для поддержания необходимого уровня спектра его литической активности. А во-вторых, снижение клинической эффективности используемого фагового коктейля может возникать при проведении повторного курса препаратом того же штаммового состава у одного и того же пациента в связи с образованием специфических антифаговых антител к используемым в данном препарате штаммам бактериофагов. Решением возникшей проблемы является индивидуальный подбор бактериофагов, активных в отношении инфекционного патогена, выделенного у конкретного больного.

ВЫВОДЫ

1. Подобраны штаммы вирулентных бактериофагов, в том числе KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH11, обладающие широким (до 92%) спектром литической активности в отношении гомологичных бактериальных штаммов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* и *Acinetobacter baumannii*), полученных из клинического материала пациентов, находящихся в тяжелом и крайне тяжелом состоянии в отделениях реанимации и интенсивной терапии после проведения высокотехнологичных операций. Доказано, что указанные фаги обладают свойствами производственно-перспективных: высокой урожайностью (до 10^{10} БОЕ/мл) на депонированных в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» нелизогенных штаммах-хозяевах, устойчивостью к агрессивным факторам внешней среды, оригинальностью и генетической безопасностью (ДНК фагов не содержат нежелательных генов).

2. Разработаны универсальные составы лекарственных форм на основе коктейлей бактериофагов, а именно, раствора для приема внутрь и местного применения и инъекционного раствора, включающие необходимый набор вспомогательных компонентов для конструирования фаговых препаратов различного штаммового состава. Подготовлены проекты спецификации на готовые лекарственные формы бактериофагов, а также нормативная документация.

3. Подготовлен лабораторный регламент, описывающий технологию производства препаратов, содержащих различные варианты коктейлей бактериофагов. Разработанная технология прошла успешную апробацию при выпуске валидационных серий, что подтверждено соответствием показателей качества произведенных готовых лекарственных форм нормативной документации, а также сохранностью их физико-химических и биологических свойств в течение 2-х летнего периода изучения их стабильности.

4. Доклинические испытания безопасности коктейлей бактериофагов показали, что бактериофаги не оказывают острого и хронического общетоксического действия. Фармакокинетические исследования внутрибрюшинного введения бактериофагов (на примере бактериофага KpV15) продемонстрировали, что фаговые частицы быстро проникают в кровь и внутренние органы, элиминация бактериофага происходит через 9 ч. На примере летальной клебсиеллезной инфекции у белых беспородных мышей продемонстрирована высокая терапевтическая и профилактическая эффективность препарата. Показано, что при профилактическом применении бактериофага в период от 24 до 1 ч. до заражения выживают 90-100 % инфицированных животных, причем у 67-100% выживших мышей происходит полная санация организма от возбудителя, а при лечении бактериофагами высокий терапевтический эффект (100% выживших животных) наблюдается при раннем начале терапии (не позднее 6 ч. после заражения). Показано, что более позднее начало фаготерапии (через 12-24 ч. после заражения) приводит к выживанию 70-20 % животных.

5. Были сконструированы и апробированы в клинической практике иммуноферментные тест-системы для оценки наличия в сыворотке крови IgG-антител к бактериофагам KpV15, KpV811, PA5, PA10, AM24, AP22, SCH1 и SCH111.

6. Изучены показатели гуморального антифагового иммунитета у больных с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, на фоне фаготерапии. Выявлено, что уже после первого курса фаготерапии в крови пациентов, как правило, обнаруживаются нейтрализующие антифаговые антитела в титре, зависящем от вида применяемого фага (в среднем 1:16-1:32). Показано, что при повторных курсах фаготерапии тем же штаммом бактериофага регистрировался более высокий уровень антител (средний титр 1:64-1:1024), что

приводило к снижению эффективности лечения и являлось основанием для смены штаммового состава препарата. Исключение составляла фаготерапия препаратами, лизирующими *Klebsiella pneumoniae*, при которой антитела вырабатывались в единичных случаях и не обладали нейтрализующей активностью.

7. Изучены показатели клеточного иммунитета больных на фоне фаготерапии. Обнаружено дозо-зависимое влияние бактериофагов на лимфоциты. При первичном курсе фаготерапии не было выявлено специфической активации Т-лимфоцитов. Показано, что при повторных курсах фаготерапии наблюдается повышение уровня активированных Т-лимфоцитов со 2-ой недели терапии, и увеличение специфической продукции ИНФγ. Продемонстрировано, что на фоне фаготерапии происходит неспецифическая стимуляция продукции провоспалительных цитокинов – ФНОα, ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-8 – при отсутствии изменений в продукции противовоспалительного цитокина ИЛ-10. Наблюдаемые *ex vivo* изменения функциональной активности иммунной системы больных после фаготерапии можно оценить как стимуляцию клеточного иммунитета, точнее, как нормализацию, возвращение к уровню его активности у здоровых людей.

8. Доказано, что оценка эффективности фаготерапии у больных, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, должна затрагивать три аспекта – микробиологический, клинический и иммунологический.

9. Разработан алгоритм персонализированной фаготерапии, состоящий из следующих этапов: выделение штаммов возбудителей от пациента; подбор из банка бактериофагов, лизирующих данные штаммы инфекционного агента; оценка антифагового иммунитета к выбранным фагам; определение титра бактериофага в лекарственной форме и способа введения препарата, обеспечивающих множественность инфицирования в очаге инфекции от 0,01 до 1, производство партии лекарственной формы бактериофага для конкретного пациента, оценка качества полученной серии препарата и передача ее в лечебное учреждение, контроль эффективности проводимой фаготерапии; в случае отсутствия эффективности повторный подбор бактериофагов. Апробация данного алгоритма на четырех клинических базах в отделениях реанимации и интенсивной терапии продемонстрировала высокую эффективность персонализированной фаготерапии. В целом, по всем использованным лекарственным формам бактериофагов, микробиологическая эффективность составила 89%, риск летальных исходов снизился в 1,5 раза.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Разработанная концепция эффективной персонализированной фаготерапии подразумевает следующие направления развития:

1. Разработка новых лекарственных форм, с универсальным составом для включения в них подобранного коктейля бактериофагов.
2. Разработка новых комбинаций с бактериофагами и/или их ферментами, например, эндолизинами.
3. Расширение спектра литического действия бактериофагов за счет изменения их генома.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в реферируемых журналах

1. Aleshkin, A.V. Phage bioticsin treatment and prophylaxis of health care-associated infections / A.V. Aleshkin, O.N. Ershova, N.V. Volozhantsev, E.A. Svetoch, A.V. Popova, E.O. Rubalskii, A.I. Borzilov, V.A. Aleshkin, S.S. Afanasev, A. V. Karaulov, K.M. Galimzyanov, O.V. Rubalsky, **S.S. Bochkareva** // *Bacteriophage*. – 2016.–V. 6., N. 4. (Цит. 6)

2. **Бочкарева, С.С.** Иммунологические аспекты фаготерапии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в отделении нейрореанимации / **С.С. Бочкарева**, А.В. Алешкин, О.Н. Ершова, Л.И. Новикова, С.С. Афанасьев, И.А. Киселева, Э.Р. Зул'карнеев, Е.О. Рубальский, О.Ю. Борисова, А.В. Караулов // *Журн. Микробиол. Эпидемиол. Иммунобиол.* – 2017. - №4. – С.42-48. **IF PИИЦ 0,512 (Цит. 5)**

3. **Bochkareva, S.S.** Anti-phage antibody response in phage therapy against healthcare-associated infections (HAIs) / **S.S. Bochkareva**, A.V. Aleshkin, O.N. Ershova, L.I. Novikova, A.V. Karaulov, I.A. Kiseleva, E.R. Zul'karneev, E.O. Rubal'skiy, M.V. Zeigarnik // *Inf. Dis.* – 2017. – V.15, N.1. – P.35-40. **IF PИИЦ 0,780, SJR 0,832 (Цит. 11)**

4. Aleshkin, A. Concept of individualized medicine based on personalized phage therapy for intensive care unit patients suffering from healthcare-associated infections / A. Aleshkin, A. Shkoda, **S. Bochkareva**, O. Ershova, S. Mitrkhin, I. Kiseleva, E. Zul'karneev, E. Rubal'sky, L. Novikova // *Inf. Dis.* – 2017. – V.15, N.4. – P.49-54. **IF PИИЦ 0,780, SJR 0,832 (Цит. 2)**

5. Karaulov, A.V. The role of innate immunity receptors in infectious diseases and maintenance of organism homeostasis / A.V. Karaulov, S.S. Afanasiev, V.A. Aleshkin, N.L. Bondarenko, E.A. Voropaeva, M.S. Afanasiev, Yu.V. Nesvizhsky, A.V. Aleshkin, O.Yu. Borisova, A.L. Pylev, Yu.N. Urban, **S.S. Bochkareva**, O.V. Rubalsky, A.D. Voropaev // *Inf. Dis.* – 2018. – V.16, N.1. – P.70-78. **IF PИИЦ 0,780, SJR 0,832 (Цит. 2)**

6. **Бочкарева, С.С.** Методические подходы к оценке некоторых параметров гуморального и клеточного иммунного ответа на бактериофаги / **С.С. Бочкарева**, А.В. Караулов, А.В. Алешкин, Л.И. Новикова, И.М. Федорова, М.С. Бляхер, С.И.

Котелева, И.В. Капустин // **Клин. Лаб. Диагн.** – 2019. – Т.64, №4. – С.237-242. **IF PИИЦ 0,749 (Цит. 4)**

7. **Бочкарева, С.С.** Изучение фармакокинетики суппозиторных форм препаратов бактериофагов / **С.С. Бочкарева, А.В. Караулов, А.В. Алешкин, Л.И. Новикова, И.А. Киселева, Е.О. Рубальский, Э.Р. Мехтиев, А.О. Стышнев, Э.Р. Зулкарнеев, М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, А.В. Летаров** // **Бюлл. Экспер. Биол. Мед.** – 2019. – Т.168, №12. – С.707-711. **IF PИИЦ 0,666, SJR 0,6 (Цит. 1)**

8. Rubalskii, E. Fibrin glue as a local drug-delivery system for bacteriophage PA5 / E. Rubalskii, S. Ruemke, C. Salmoukas, B. Mashaqi, E.C. Boyle, D. Boethig, C. Kuehn, A. Haverich, A. Aleshkin, **S. Bochkareva, E. Zulkarneev, E. Modin, M. Rubalsky** // **Sci. Rep.** – 2019. – V.9, N.1. – P. 2091. **SJR 1,01 (Цит. 22)**

9. Bakhrushina, E.O. Development of the composition and pharmacokinetic studies of suppositories with combined substance of bacteriophages / E.O. Bakhrushina, M.N. Anurova, N.B. Demina, A.V. Aleshkin, I.A. Kiseleva, **S.S. Bochkareva, A.M. Vorobev, K.M. Bagandova** // **J. Drug Deliv. Sci. Technol.** - 2020. - V. 59. - P. 101841. **SJR 0,69 (Цит. 0)**

10. Rubalskii, E. Bacteriophage therapy for critical infections related to cardiothoracic surgery / E.S. Rubalskii, S. Reumke, C. Salmoukas, E.C. Boyle, G. Warnecke, I. Tudorache, M. Shrestha, J.D. Schmitto, A. Martens, S.V. Rojas, C. Kuehn, A. Haverich, S. Ziesing, **S. Bochkareva** // **Antibiotics.** – 2019. – V.9, N.5. – P.232. **SJR 0,79 (Цит. 22)**

11. Воробьев, А.М. Определение спектра бактерицидной активности рекомбинантных эндолизинов бактериофагов ECD7, AM24, AP22, SI3 и ST11 / А.М. Воробьев, М.Н. Анурова, А.В. Алешкин, В.А. Гушин, Д.В. Васина, Н.П. Антонова, И.А. Киселева, Е.О. Рубальский, Э.Р. Зулкарнеев, А.И. Лаишевцев, Э.Р. Мехтиев, В.В. Каминский, Е.О. Бахрушина, **С.С. Бочкарева, А.В. Караулов** // **Бюлл. Экспер. Биол. Мед.** – 2020. – Т.170, №11. – С.597-601. **IF PИИЦ 0,666, SJR 0,6 (Цит. 1)**

12. Vasina, D.V. Efficacy of the endolysin-based antibacterial gel for treatment of anaerobic infection caused by fusobacteriumnecrophorum / D.V. Vasina, N.P. Antonova, A.M. Vorobev, A.I. Laishevtsev, A.V. Kapustin, E.R. Zulkarneev, **S.S. Bochkareva, I.A. Kiseleva, M.N. Anurova, A.V. Aleshkin, A.P. Tkachuk, V.A. Gushchin** // **Antibiotics.** – 2021. – V.10, N.10. –P.1260. **SJR 0,79 (Цит. 0)**

Изобретения

13. Патент 2664681 Российская Федерация, МПКА61К 35/76 (2015.01), А61Р 31/00 (2006.01). Способ лечения инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи, вызванной возбудителем или возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью / В.А. Алёшкин, А.В. Алешкин, О.Н. Ершова, **С.С. Бочкарева, А.С. Шкода, И.И. Вайншток., С.Г. Ведяшкина, С.Д. Митрохин, О.С.**

Калачева, О.Е. Орлова, И.А. Киселева, Е.О. Рубальский, Э.Р. Зулкарнеев; заявитель и патентообладатель Алешкин А.В. - №2017131353; заявл. 06.09.2017; опубл. 21.08.2018; Бюлл. № 24 – 19 с.

Статьи в других изданиях

14. Алешкин, А.В. Бактериофаги в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: алгоритм подбора и механизмы системного действия / А.В. Алешкин, О.Н. Ершова, Е.П. Селькова, Т.А. Гренкова, И.А. Киселева, О.Ю. Борисова, Е.О. Рубальский, Э.Р. Зулкарнеев, Ю.В. Ларина, Л.И. Новикова, С.С. Бочкарева // Журн. МедиАль. – 2016. - №1(18). – С.29. **IF РИНЦ 0,273 (Цит. 2)**

15. Алешкин, А.В. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть I: история исследований до широкого применения антибиотиков / А.В. Алешкин, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, Х.М. Галимзянов, О.В. Рубальский, Д.Л. Теплый, А.Х. Ахминеева, И.А. Киселева, С.С. Бочкарева, Е.Е. Рубальская, Е.О. Рубальский, К.Н. Смирнова, Э.Р. Зулкарнеев, А.Д. Теплый // Астрахан. Мед. Журн. – 2016. – Т.11, №2. – С.8-16. **IF РИНЦ 0,574 (Цит. 5)**

16. Алешкин, А.В. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть II: современная история исследований фагопрофилактики и фаготерапии кишечных инфекций / А.В. Алешкин, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, Х.М. Галимзянов, О.В. Рубальский, Д.Л. Теплый, А.Х. Ахминеева, И.А. Киселева, С.С. Бочкарева, Е.Е. Рубальская, Е.О. Рубальский, К.Н. Смирнова, Э.Р. Зулкарнеев, А.Д. Теплый, А.С. Вихрова // Астрахан. Мед. Журн. – 2016. – Т.11, №3. – С.8-16. **IF РИНЦ 0,574 (Цит. 2)**

17. Киселева, И.А. Бактериофаги в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: пути повышения эффективности / И.А. Киселева, А.В. Алешкин, О.Н. Ершова, Н.В. Воложанцев, Светоч, Э.А. Л.И. Новикова, С.С. Бочкарева // Инф. Иммуно. – 2016. – Т.6, №3. – С.44. **IF РИНЦ 0,676, SJR 0,14 (Цит. 2)**

18. Киселева, И.А. Алгоритм рационального подбора бактериофагов для новой лекарственной формы / И.А. Киселева, А.В. Алешкин, С.С. Бочкарева, О.Ю. Борисова, Е.О. Рубальский, М.Н. Анурова // Инф. Бол. – 2016. – Т.14, №S1. – С.134-135. **IF РИНЦ 0,780, SJR 0,832 (Цит. 0)**

19. Aleshkin, A.V. Bacteriophages in prophylaxis of healthcare-associated infections (HAIs) in a neurosurgical intensive care unit (ICU) / A.V. Aleshkin, E.P. Selkova, O.N. Ershova, N.V. Volozhantsev, E.A. Svetoch, I.A. Kiseleva, L.I. Novikova, S.S. Bochkareva // Abstracts of the Federation of Infection Societies (FIS) Annual Conference and the 10th Healthcare Infection Society (HIS) International Conference, 6-8 November 2016, Edinburgh / **J. Hosp. Inf.** – 2016. – V.94, N. S1. – P. S26. **SJR 1,33**

20. Aleshkin, A.V. Bacteriophages in therapy and prevention of acute intestinal

infections in children / A.V. Aleshkin, M.V. Zeigarnik, **S.S. Bochkareva** // *Clinical Practice in Pediatrics*. – 2016. Т. 11, N.1. С. 52-56. **IF РИНЦ 0,725 (Цит. 4)**

21. Rubalskii, E.O. Integrative approach for control of temperate bacteriophages in phage-based products / E.O. Rubalskii, A.V. Aleshkin, S.S. Afanasiev, V.A. Aleshkin, Kh.M. Galimzyanov, A.R. Umerova, O.V. Rubalsky, O.N. Ershova, E.E. Rubalskaya, I.A. Kiseleva, **S.S. Bochkareva**, E.R. Zul'karneev, A.Kh. Akhmineeva, M.O. Rubalsky, I.O. Lunina, V.V. Uskov, M.M. Karnaukh, O.Yu. Borisova, N.T. Gadua, A.D. Teply // **Astrakh. Med. J.** – 2017. – Т. 12, N. 3. – С. 56-63. **IF РИНЦ 0,574 (Цит. 2)**

22. Алешкин, А.В. Концепция персонализированной фаготерапии пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи / А.В. Алешкин, Е.П. Селькова, О.Н. Ершова, И.А. Савин, А.С. Шкода, **С.С. Бочкарева**, С.Д. Митрохин, И.А. Киселева, О.Е. Орлова, Е.О. Рубальский, Э.Р. Зул'карнеев // **Фундамент. Клин. Мед.** – 2018. – Т.3, №2. – С.66-74. **IF РИНЦ 0,537 (Цит. 6)**

23. Караулов, А.В. Механизмы приобретения вирулентности условно-патогенными микроорганизмами и формирования пула нозокомиальных штаммов в микробиоценозах слизистых открытых полостей / А.В. Караулов, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, Н.Л. Бондаренко, Е.А. Воропаева, М.С. Афанасьев, Ю.В. Несвижский, А.В. Алешкин, О.Ю. Борисова, Е.Г. Овсянникова, О.В. Рубальский, А.Л. Пылев, **С.С. Бочкарева**, В.Г. Сердюков, Е.Е. Рубальская, А.Д. Воропаев, Р.С. Махмудов // **Астрахан. Мед. Журн.** – 2018. – Т.13, №2. – С.17-31. **IF РИНЦ 0,574 (Цит. 4)**

24. **Бочкарева, С.С.** Фаготерапия антибиотикорезистентной пневмонии: иммуномодуляция или перераспределение? / **С.С. Бочкарева**, И.М. Федорова, О.Н. Ершова, С.И. Котелева, И.В. Капустин, М.С. Бляхер, Л.И. Новикова, А.В. Алешкин, А.М. Воробьев // **Мед. Иммунол.** – 2021. – Т.23, №1. – С.179-184. **IF РИНЦ 0,827 (Цит. 2)**

25. Бахрушина, Е.О. Разработка и изучение ушных капель с бактериофагами для лечения инфекционных отитов, осложненных *P. aeruginosa* / Е.О. Бахрушина, М.Н. Анурова, **С.С. Бочкарева**, А.М. Воробьев, Ю.О. Щербина, М.А. Пасивкина, Л.О. Крехтунова, Н.Б. Демина, А.В. Алешкин // **Разраб. Регистр. Лек. Средств.** 2022. - Т. 11, N. 2. С. 74-78. **IF РИНЦ 0,539, SJR 0,16 (Цит. 0)**

Методические указания

26. Персонализированная фаготерапия пациентов, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП) / А.С. Шкода, С.Д. Митрохин, А.А. Галицкий, О.Е. Орлова, С.Г. Ведяшкина, Н.В. Шкуратова, С.Ю. Бастрикин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, А.В. Алешкин, Е.П. Селькова, Л.И. Новикова, **С.С. Бочкарева**, И.А. Киселева, Э.Р. Зул'карнеев, Е.О. Рубальский // **Методические рекомендации (№105) – М.: «Династия».** – 2020. – 32 С.

Тезисы научных конференций

27. Алешкин, А.В. Бактериофаги в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: алгоритм подбора и механизм системного действия / А.В. Алешкин, О.Н. Ершова, Е.П. Селькова, Т.А. Гренкова, И.А. Киселева, О.Ю. Борисова, Е.О. Рубальский, Э.Р. Зулькарнеев, Ю.В. Ларина, Л.И. Новикова, С.С. **Бочкарева** // /Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Здоровье медицинского персонала и обеспечение эпидемиологической безопасности медицинской деятельности», 21-23 апреля 2016 г., Омск – МедиАль. – 2016. – №1 (18). – С.29.

28. Анурова, М.Н. Разработка вязко-пластичных лекарственных форм бактериофагов / М.Н. Анурова, А.В. Алешкин, Е.О. Бахрушина, И.А. Киселева, С.С. **Бочкарева**, Э.Р. Зулькарнеев // Материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13-15 октября 2016г., Москва / М:Медицинское маркетинговое агентство, 2016. - С.57-58.

29. Алешкин, А.В. Гуморальный иммунный ответ на бактериофаги в оценке эффективности энтеральной фаготерапии / А.В. Алешкин, Л.И. Новикова, С.С. **Бочкарева**, А.В. Алешкин, О.Н. Ершова, И.А. Киселева, Э.Р. Зулькарнеев // Материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13-15 октября 2016 г., Москва / М:Медицинское маркетинговое агентство, 2016. – С.56-57.

30. Киселева, И.А. Бактериофаги в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: пути повышения эффективности/ И.А. Киселева, А.В. Алешкин, О.Н. Ершова, Н.В. Воложанцев, Э.А. Светоч, Л.И. Новикова, С.С. **Бочкарева** // Материалы II Национального конгресса бактериологов «Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях», 20-22 сентября 2016 г., Санкт-Петербург / Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т.6, № 3. – С.259.

31. Борисова, О.Ю. Применение молекулярно-генетических технологий для индикации фагов в крови пациентов с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи / О.Ю. Борисова, Е.О. Рубальский, А.В. Алешкин, Н.Т. Гадуа, О.Н. Ершова, Н.В. Курдюмова, И.А. Савин, И.А. Киселева, С.С. **Бочкарева** // Материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13-15 октября 2016 г., Москва / М:Медицинское маркетинговое агентство. – 2016. – С.60-61.

32. Рубальский, Е.О. Молекулярно-генетическое типирование бактериофагов *Klebsiella pneumoniae* для фаготерапии и фагопрофилактики / Е.О. Рубальский, А.В. Алешкин, О.Ю. Борисова, Н.Т. Гадуа, И.А. Киселева, С.С. Бочкарева, С.С. Афанасьев, М.О. Рубальский // Материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13-15 октября 2016 г., Москва / М:Медицинское маркетинговое агентство. – 2016. – С.82.

33. Алешкин, В.А. Проблема антифагового иммунного ответа при энтеральной фаготерапии / А.В. Алешкин, Л.И. Новикова, С.С. Бочкарева, А.В. Алешкин, О.Н. Ершова, И.А. Киселева, Э.Р. Зул'карнеев // Материалы научно-практической конференции «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе», 26-27 сентября 2016г., Новосибирск / Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. –2016. – С.177-178.

34. Aleshkin, A. Anti-phage antibody response in intensive care patients receiving phage therapy against hospital acquired infections / A. Aleshkin, S. Bochkareva, O. Ershova, L. Novikova, P. Rurka, S. Kiljunen, M. Skurnik, P. Kuusela, C.H.Künn, I. Kiseleva, E. Zul'karneev, A. Haverich, E. Rubalskii // Centennial Celebration of Bacteriophage research, 24-26 April 2017, Institute Pasteur France / Abstract book. – 2017. – P.125.

35. Aleshkin, A. V. Innovative application of bacteriophages: from phage prophylaxis to sophisticated medical assistance based on phage therapy / A.V. Aleshkin, S.S. Bochkareva, O.N. Ershova, L.I. Novikova, I.A. Kiseleva, E.R. Zul'karneev, E.O. Rubalskii // The 15th Finnish Microbial Pathogenesis Day and 65-Year Anniversary Symposium, Oral presentation & poster abstracts. – 2017. – P.6.

36. Aleshkin, A.V. Phagebiotics in treatment and prophylaxis of healthcare-associated infections / A.V. Aleshkin, Ershova, N. Volozhantsev, E. Svetoch, E. Rubalsky, A. Borzilov, V. Aleshkin, S. Afanasiev, S. Bochkareva // Bacteriophages an overview and synthesis of a re-emerging field. New York. – 2017. – P.105-122.

37. Бочкарева, С.С. Показатели активации лимфоцитов у больных ИСМП на фоне фаготерапии / С.С. Бочкарева, М.С. Бляхер, И.М. Федорова, С.И. Котелева, А.В. Алешкин, Л.И. Новикова, О.Н. Ершова, И.А. Киселева, Э.Н. Зул'карнеев // Материалы X Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», 26-28 февраля 2018 г., Москва / 2018. – С.37.

38. Aleshkin, A. Concept of individualized medicine based on personalized phage therapy for intensive care unit patients suffering from healthcare-associated infections / A. Aleshkin, A. Shkoda, S. Bochkareva, O. Ershova, S. Mitrokhin, I. Kiseleva, E.

Zul'karneev, E. Rubal'sky, L. Novikova // Targeting phage & antibiotic resistance. Phage therapy and other innovative ideas, 17-18 May, 2018, Florence / Abstractbook. – 2018. – P.19.

39. Алешкин, В.А. Иммунологические аспекты фаготерапии / А.В. Алешкин, **С.С. Бочкарева**, О.Н. Ершова, И.А. Савин, М.С. Бляхер, А.В. Алешкин, И.М. Фёдорова, Л.И. Новикова, С.Д. Митрохин, С.И. Котелева, И.А. Киселева, Э.Р. Зул'карнеев, А.С. Шкода // Материалы Четвертой научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 24-26 сентября, 2018, Нижний Новгород / М:Медицинское Маркетинговое Агентство. – 2018. – С.35-36.

40. **Бочкарева, С.С.** Влияние бактериофагов, включенных в лечение больных, находящихся на аппаратной искусственной вентиляции легких (ИВЛ), на продукцию цитокинов клетками крови / **С.С. Бочкарева**, И.М. Федорова, С.И. Котелева, М.С. Бляхер, Л.И. Новикова // Сборник научных материалов XIII Международного научного конгресса «Рациональная фармакотерапия» - Санкт-Петербург – 2018. – С.20-23.

41. **Бочкарева, С.С.** Антифаговый иммунный ответ на фоне фаготерапии у больных с ИСМП в отделении реанимации / **С.С. Бочкарева**, Л.И. Новикова, А.В. Алешкин, О.Н. Ершова, М.С. Бляхер, И.М. Федорова, С.И. Котелева // Сборник трудов XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», 1-3 апреля 2019 г., Москва / под ред. академика РАН В.И. Покровского. –М:Медицинское маркетинговое агентство. - 2019. – С.245.

42. Воробьев, А.М. Изучение стабильности геля модифицированного рекомбинантного эндолизина ранозаживляющего действия / А.М. Воробьев, А.В. Алешкин, М.Н. Анурова, Э.Р. Мехтиев, Л.И. Новикова, **С.С. Бочкарева**, К.М. Багандова, Т.Э. Мизаева // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены». Под редакцией А.Ю. Поповой, А.К. Носкова. – 2020. – С.317-318.

43. Воробьев, А.М. Разработка лекарственных форм на основе эндолизинов для терапии раневых инфекций / А.М. Воробьев, А.В. Алешкин, В.А. Гуцин, М.Н. Анурова, Е.О. Бахрушина, И.А. Киселева, Э.Р. Зул'карнеев, А.И. Лаишевцев, О.Г. Ефимова, Э.Р. Мехтиев, Е.О. Рубальский, Л.И. Новикова, **С.С. Бочкарева**, О.Г. Жиленкова, В.В. Каминский, Н.П. Антонова, Д.В. Васина, А.П. Ткачук // Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития» - Москва – 2020. – С.21-23.

44. **Бочкарева, С.С.** Персонализированная фаготерапия у больных в отделениях реанимации и интенсивной терапии, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи / **С.С. Бочкарева, А.В. Алешкин, Л.И. Новикова, М.С. Бляхер, И.М. Федорова** // Материалы VI Национального конгресса бактериологов, 14-16 сентября, 2021, Казань. // Бактериология. – 2021. – Т.6. – №3. – С.23.

Глава в монографии

45. Aleshkin, A. Phagebiotics in treatment and prophylaxis of healthcare-associated infections / A. Aleshkin, E. Rubalsky, V. Aleshkin, S. Afanasiev, **S. Bochkareva**, O. Ershova, N. Volozhantsev, E. Svetoch, A. Borzilov // In: The Encyclopedia of Bacteriology Research Developments. 2021. С. 2753-2766.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БОЕ – бляшкообразующие единицы	ННР – непредвиденная
ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения	нежелательная реакция
ГФ – Государственная Фармакопея	НР – нежелательная реакция
ЕАЭС – Евразийский экономический союз	НЯ – нежелательное явление
ЕЭ/мл – единица эндотоксина в миллилитре	ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии
ИЛ – интерлейкин	ОФС – общая фармакопейная статья
ИРК – индивидуальная регистрационная карта	ПЦР – полимеразная цепная реакция
ИСМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи	ПЭТ-КТ - позитронно-эмиссионная томография, с рентгеновской компьютерной томографией
ИФА – иммуноферментный анализ	РПВМП – раствор для приема внутрь и местного применения
ИФН – интерферон	РФ – Российская Федерация
ИЭФ – иммуноэлектрофорез	СННР – серьезная непредвиденная нежелательная реакция
ИР – инъекционный раствор	СНЯ – серьезное нежелательное явление
КОЕ – колониеобразующие единицы	УФО – ультрафиолетовое облучение
ЛП – лекарственный препарат	ФНО – фактор некроза опухоли
ЛПП – лечебно-профилактический препарат	ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты
ЛС – лекарственное средство	PBS – забуференный фосфатами физиологический раствор
ЛФ – лекарственная форма	PBS-T - забуференный фосфатами физиологический раствор с твином
МЛУ – множественная лекарственная устойчивость	
МПБ – мясопептонный бульон	