

Зурабов А.Ю.¹, Жиленков Е.Л.¹, Попов Д.В.¹,
Попова В.М.¹, Панова О.С.², Гурочкина Л.П.²

Современное состояние и перспективы использования фагового препарата «Фагодерм» в клинической практике

¹ НПЦ «МикроМир», Москва

² ЦКБ РАН, Москва

Гнойно-воспалительные заболевания (ГВЗ) кожи и мягких тканей продолжают оставаться одной из актуальных проблем современной медицины, в том числе и косметологии. Риск инфекционных осложнений сопутствует каждой косметологической процедуре, связанной с применением инвазивных методик (пилингов, инъекций, различных видов шлифовок и т. д.). Этиологическими агентами заболеваний являются условно патогенные микроорганизмы. Отмечена мировая тенденция к возрастанию ГВЗ микробной этиологии [2, 13, 14]. К настоящему времени задача разработки эффективных средств профилактики и лечения ГВЗ еще не решена. Патогенные микроорганизмы, как правило, устойчивы к большинству антибиотиков. Неэффективность антибиотикотерапии ГВЗ побуждает к поиску альтернативных методологий. Одна из них – применение вирулентных бактериальных вирусов (бактериофагов). Обзорные публикации последних лет свидетельствуют об увеличении числа сторонников фаготерапии бактериальных инфекций [16, 18, 19].

Бактериофаги (далее – фаги) в сравнении с антибиотиками и другими антибактериальными агентами имеют следующие преимущества:

- фаги лизируют только клетки патогенов и не подавляют рост представителей нормофлоры,
- фаги лизируют антибиотикоустойчивые формы патогенов,
- концентрация фагов в инфекционном очаге нарастает за счет их репродукции и быстро снижается после ликвидации популяции патогена,
- фаги не оказывают отрицательно-го влияния на эукариотические клетки.

В России разработкой и производством препаратов для фаготерапии занимаются в Научно-производственном центре «МикроМир» [6]. Созданы лечебно-профилактические фаговые препараты для применения в различных об-

ластях медицины – стоматологии, хирургии, отоларингологии, урологии, гинекологии.

Цель настоящего исследования – конструирование универсального фагового препарата на гелевой основе с антибактериальной активностью по отношению к основным возбудителям ГВЗ кожи и мягких тканей и проведение его клинико-лабораторных испытаний.

Материалы и методы

На начальном этапе исследования предусмотрено проведение мониторинга бактериальных возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний (ГВЗ) кожи и мягких тканей. Задача следующего этапа работы – выделение фагов с литической активностью по отношению к определенным возбудителям ГВЗ.

У больных в десяти областях России были взяты 500 клинических образцов на основе унифицированной методологии [1, 12].

Исследовались мазки, пунктаты и биоптаты ран у пациентов с ГВЗ различного генеза и локализации, такими как флегмоны, абсцессы, осложнения термических травм и др.

Культуральные, морфологические и биохимические характеристики чистых культур возбудителей изучали с использованием традиционных методов [11, 12, 20]. Наряду с этим патогены идентифицировали на основе метода MALDI-TOF масс-спектрометрии [7, 17]. Фаготипирование бактерий проводили в сочетании с электроориентационной спектроскопией, флуориметрией и электронной микроскопией [3, 4].

Вирулентные бактериофаги были выделены из различных природных источников методами, разработанными в НПЦ «МикроМир». Исследования свойств изолированных бактериофагов проведены с учетом рекомендаций Международного комитета по таксономии вирусов [15].

Клинические испытания фагового препарата выполнены согласно Единым

санитарно-эпидемиологическим и гигиеническим требованиям к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю), 2010 г. (глава II, раздел 4), а также Инструкции по экспериментально-клинической апробации косметических средств, 1986 г. и ГФ XI, вып. 2, 1987 г. и МУК 4. 2. 801–99 «Методы микробиологического контроля парфюмерно-косметической продукции».

Результаты исследования

Состав микробных популяций в клинических материалах

Изучение этиологической структуры различных ГВЗ кожи и мягких тканей позволило выявить наиболее значимые патогены. Установлено, что ведущая роль в развитии ГВЗ принадлежит стафилококкам (*Staphylococcus*). Этот вид идентифицирован в 50% всех исследованных клинических образцов. Вместе с тем к числу наиболее часто верифицируемых возбудителей ГВЗ следует отнести патогены *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter aerogenes*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Actinomyces* spp., *Propionibacterium acnes* и *Corynebacterium* spp. (изолированы из 10–25% образцов).

Микробный пейзаж практически всех проанализированных клинических материалов представлен патогенами нескольких видов. В смешанных популяциях, как правило, идентифицированы от 2 до 5 видов патогенов в различных сочетаниях и в разных количественных соотношениях. Так, в биоптатах глубоких ожоговых ран часто выявляются анаэробы *Clostridium perfringens* и *Bacteroides fragilis*. В образцах гнойного отделяемого огнестрельных ран идентифицируются сочетания патогенов *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Proteus mirabilis*. В клинических материалах, полученных от

Таблица 1.

Характеристики фагов Р&еиЛотопа& аегидпо\$а

Фаг	Морфо-тип фага	Константа адсорбции фага на клетке, мл/мин.	Параметры инфекционного процесса в системе фаг-клетка		Резистентность		Особенности взаимодействия фага с клеткой
			Латентный период, мин.	Выход, част./кл.	pH	t°	
Pa1	A1	1,1x 10 ^{'''}	45	80-100	5,5-8,0	50	Рецепторы фага - белки клеточной поверхности
Pa2	B2	0,2x 10 ^{'''}	40	170-190	5,5-7,5	55	Фаг адсорбируется на пиллях (фимбриях) клетки
Pa3	A1	1,5x 10 ^{'''}	37	150-180	5,5-7,5	50	Фаг адсорбируется на 0-цепях поверхностного липополисахарида
Pa4	C1	7,8x 10 ^{'''}	35	200-210	5,5-8,5	55	Фаг адсорбируется на коровой части липопо-лисахарида

больных фурункулезом, обнаруживается смесь стафилококков, коринебактерий и кишечных палочек. При гнойном гидрадените в микробных ассоциациях доминируют стафилококки, бактериоиды, псевдомонады и актиномицеты. Указанные примеры – частные случаи среди многочисленных подобных вариантов смешанных популяций в изученных клинических материалах.

Конструирование комбинированного лечебно-профилактического фагового препарата. На этом этапе работы ставилась задача – выделить фаги с литической активностью по отношению к изолированным возбудителям ГВЗ. Первоначально из различных источников (почвы, сточных вод, клинических материалов и т. п.) было изолировано несколько сотен фагов и сформировано 14 коллекций приведенных выше основных возбудителей ГВЗ кожи и мягких тканей. Каждая коллекция включала 20–30 изолятов конкретного вида патогена. При выделении фагов применялись методики, разработанные в НПЦ «Микромир».

Биологические, физико-химические и иммунохимические свойства бактериальных вирусов детально изучались, и полученная информация служила базовым началом для последующего скрининга фагов для лечебно-профилактического препарата.

Наиболее перспективные формы фагов отбирались с ориентацией на следующие требования:

- каждый бактериальный вирус должен быть строго вирулентным (то есть способным полностью разрушать клет-

ку-хозяина в конце инфекционного процесса);

- каждый фаг должен обладать широким литическим спектром по отношению к штаммам конкретного патогена;

- фаг не должен взаимодействовать с клетками нормофлоры;

- фаг должен быстро лизировать клетку патогена с высоким выходом (урожайностью) дочерних фаговых частиц;

- фаг должен быть устойчивым к экстремальным воздействиям физико-химических факторов окружающей среды (pH, температуре и т.д.);

- фаг должен сохранять литическую активность при длительном хранении фаголизата;

- для каждого патогена необходимо отобрать 3–4 вида фагов, существенно отличающихся друг от друга по механизму взаимодействия с клеткой. При

использовании таких сочетаний фагов значительно уменьшается вероятность генерации фагоустойчивых форм в популяции патогена.

В таблице 1 приведены свойства 4 фагов *Pseudomonas aeruginosa*, отобранных с учетом перечисленных критериев и включенных в комбинированный препарат. На рисунке 1 представлены электронные микрофотографии этих бактериальных вирусов, адсорбирующихся на клетке. По аналогичной схеме отобраны подгруппы фагов и для других 13 патогенов. В целом комбинированный препарат включает фаги 43 видов. Бактериальные вирусы включены в гель, приготовленный на основе полимера карбопол. Концентрация (титр) каждого фага в препарате составляет 10⁵–10⁶ БОЕ/мл. Дополнительный ингредиент препарата – экстракт календулы. В отдельных экспе-

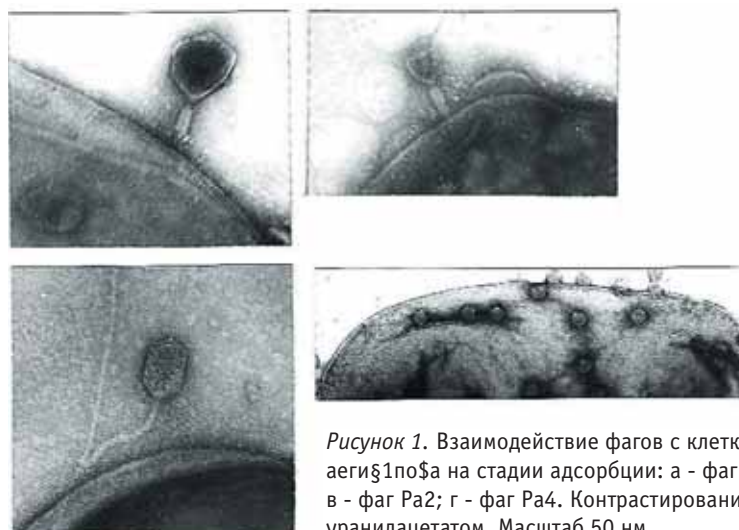


Рисунок 1. Взаимодействие фагов с клеткой *Pseudomonas aeruginosa* на стадии адсорбции: а - фаг Pa1; б - фаг Pa2; в - фаг Pa2; г - фаг Pa4. Контрастирование 1%-ным уранилацетатом. Масштаб 50 нм

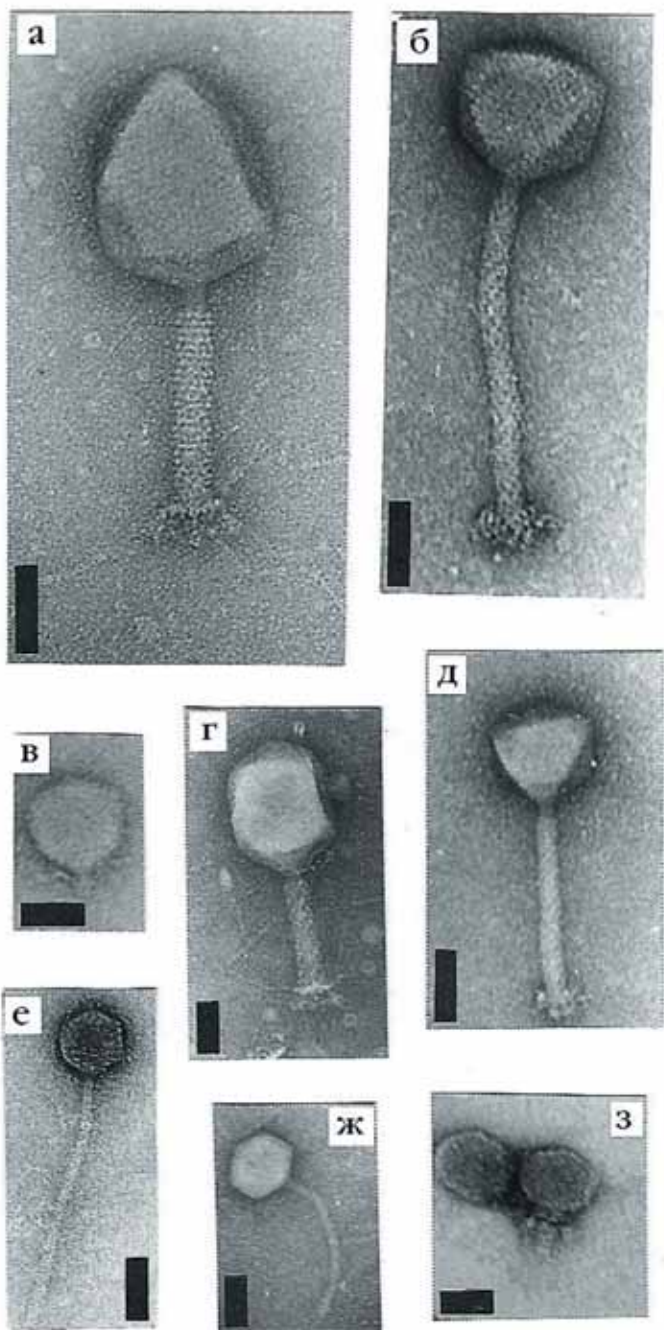


Рисунок 2. Электронные микрофотографии отдельных фагов препарата «Фагодерм»: а – фаг Ec-A2 *Escherichia coli*; б – фаг C1 *Staphylococcus*; в – фаг AZ-1 *Actinomyces spp.*; г – фаг Acp *Acinetobacter baumannii*; д – фаг 293 *Streptococcus pyogenes*; е – фаг Prm5 *Proteus mirabilis*; ж – фаг Bf-B1 *Bacteroides fragilis*; з – фаг Clost-C1 *Clostridium perfringens*. Контрастирование 1%-ным уранилацетатом. Масштаб 50 нм

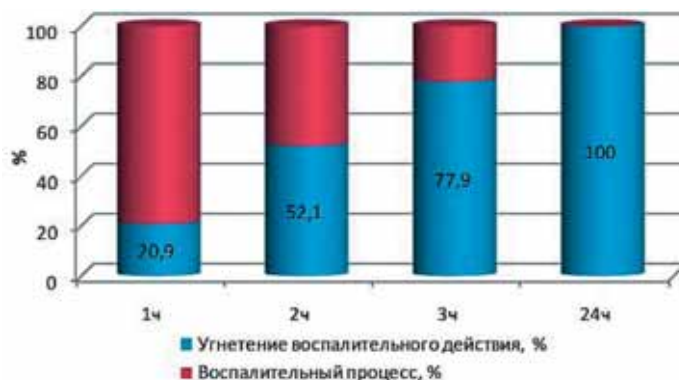


Рисунок 3. Противовоспалительное действие геля «Фагодерм»

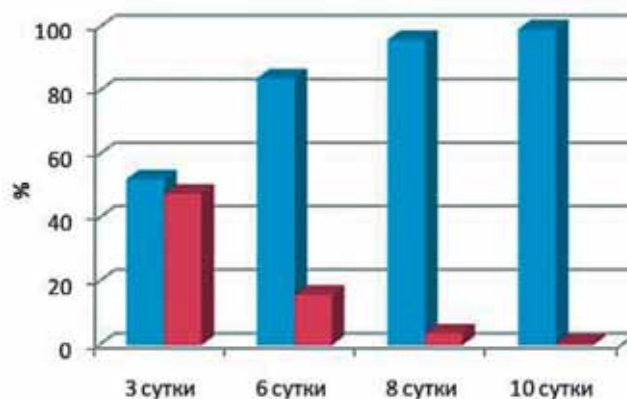


Рисунок 4. Влияние препарата «Фагодерм» на процесс регенерации раневой поверхности кожи

риментах показано, что привнесение данного экстракта не влияет на литическую активность фагов. Сконструированному препарату дано название «Фагодерм». На рисунке 2 представлены электронные микрофотографии нескольких бактериальных вирусов препарата «Фагодерм».

Результаты клинических испытаний препарата «Фагодерм»

Расширенные клинические испытания геля с бактериофагами были проведены в Испытательном лабораторном центре ЦКБ РАН (Москва). Ниже представлены результаты отдельных серий экспериментов.

Противовоспалительное действие препарата исследовано в эксперименте на лабораторных животных (белых крысах) по общепринятой методике. Контролем служили интактные животные, которые в стандартном режиме вивария не получали кожные аппликации геля «Фагодерм». На рисунке 3 приведены полученные результаты в виде гистограммы.

Препарат «Фагодерм» активно снижает воспалительный процесс. Через сутки после применения геля противовоспалительный эффект составил 100% по сравнению с контролем.

Ранозаживляющее действие препарата «Фагодерм» изучено на экспери-

ментальных животных с визуальной и планиметрической оценкой заживления ран в динамике до формирования рубца (рисунком 4). Результаты опытов показали, что под действием препарата процесс заживления ран протекал быстрее, чем в контрольной группе.

При проведении клинических исследований под наблюдением находилось более 100 пациентов: с угревой сыпью, после пилинга, после лазерной шлифовки, с избыточным потоотделением, с различными видами нарушения кожного покрова (рубцы, порезы, царапины).

Специалистами, проводившими клинические испытания, а также самими

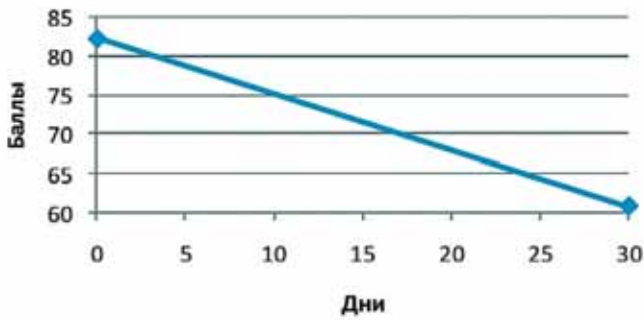


Рисунок 5. Показатель общей угревой нагрузки у пациентов под действием препарата «Фагодерм»

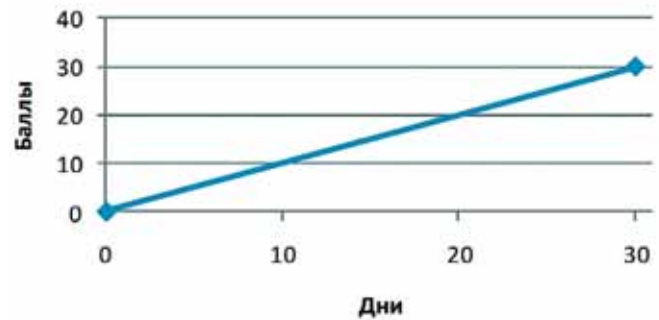


Рисунок 6. Результаты изучения дезодорирующего действия препарата «Фагодерм»

пробантами было отмечено, что гель косметический с бактериофагами «Фагодерм» имеет нежную консистенцию, быстро впитывается после нанесения на кожу лица, удобен в применении. После его использования наблюдается значительное ускорение процесса регенерации на проблемных участках кожи; признаки воспаления уменьшаются практически сразу после нанесения препарата; наблюдается полное восстановление кожи в короткие сроки.

Применение геля с бактериофагами приводит к элиминации патогенов на обрабатываемой поверхности, что подтверждается результатами проведенного параллельно бактериологического анализа.

Одна из групп включала 20 пациентов в возрасте от 16 до 29 лет с угревой сыпью лица. Гель наносился 2 раза в день утром и вечером в течение одного месяца. Результаты наблюдений показали, что после применения геля «Фагодерм» общая угревая нагрузка уменьшилась на 26,1% по сравнению с исходным уровнем (рисунок 5).

После окончания применения геля в большинстве случаев отмечена хорошая переносимость, ощущение комфорта, кожа лица приобретала здоровый и ухоженный вид: значительно сокраща-

лось количество регистрируемых до начала терапии угревых элементов, в короткие сроки регрессировали воспалительные проявления, в том числе и пустулезные (гнойные) высыпания, не оставляя поствоспалительных следов (застойные пятна, рубцы). В момент использования геля практически не отмечено появления новых угревых элементов, что свидетельствует о хорошем профилактическом действии изучаемого косметического средства. Самооценка пациентов во всех случаях была достаточно высокой.

В другой группе под наблюдением находилось 10 человек: женщины в возрасте от 23 до 63 лет с избыточным потоотделением. Дезодорирующее действие геля «Фагодерм» оценивали по общепринятой методике с применением балльной шкалы. В результате исследований установлено, что дезодорирующий эффект составил 30 баллов, что соответствует частичной дезодорации (рисунок 6).

Еще одну группу составили 20 пациентов (женщин) в возрасте от 31 до 64 лет, у которых исследовались показатели доплерометрии и пигментометрии (по сосудистому типу) до и после проведения лазерной шлифовки через 2 часа и через 1 неделю. В одной подгруппе на-

блюдения пациенты применяли на кожу гель «Фагодерм» после проведения процедур. В контрольной подгруппе пациенты использовали традиционное средство – спрей с пантенолом.

Результаты исследований, обобщенные в таблице 2, показывают, что в подгруппе с применением геля «Фагодерм» оба показателя, косвенно отражающие степень гиперемии (эритемы) кожи, через 2 часа и 1 неделю не изменялись и соответствовали исходному значению, что свидетельствует об отсутствии сосудистой реакции со стороны кожи.

В контрольной подгруппе через 2 часа после процедуры показатель гиперемии увеличился на 31,6%, а доплерометрии на 36,7% по сравнению с исходным, что показывает развитие ответной воспалительной реакции кожи после проведения лазерной процедуры. Через 1 неделю оба показателя статистически достоверно соответствовали исходному. Таким образом, гель «Фагодерм» препятствует развитию гиперемии (эритемы) кожи после проведения лазерных процедур.

Результаты клинических испытаний дают основание для положительной оценки геля «Фагодерм» как лечебно-профилактического средства. На основании протоколов исследований выдано

Таблица 2.

Показатели пигменто- и доплерометрии кожи пациентов до и после применения геля «Фагодерм»

Показатели/ группа	Фаговый препарат «Фагодерм»			Контроль		
	до применения	через 2 часа	через 1 неделю	до применения	через 2 часа	через 1 неделю
Пигментометрия (по сосудистому типу, гиперемия)	54,1±2,1	55,3±1,5	51,7±2,5	50,7±6,8	66,7±4,1 (↑ на 31,6%)	55,2±4,0
Допплерометрия	24,5±2,7	24,6±2,5	24,0±3,0	14,7±2,0	20,1±1,1 (↑ на 36,7%)	17,8±1,4



Рисунок 7. Свидетельство о государственной регистрации геля косметического с бактериофагами для проблемной кожи «Фагодерм»

свидетельство о государственной регистрации препарата (рисунок 7).

В дополнение к изложенному отметим, что исследуется также возможность практического использования препарата «Фагодерм» как средства лечения различных ГВЗ кожи и мягких тканей. Исследования проводят специалисты НПЦ «МикроМир» совместно с врачами нескольких медицинских учреждений Москвы и Санкт-Петербурга. По полученным данным, «Фагодерм» эффективен при лечении послеожоговых инфекционных осложнений и раневых инфекций. Детальное описание исследований и его результаты будут представлены позже в отдельной публикации.

Обсуждение результатов исследования

В настоящем исследовании разработан принципиально новый антибактериальный препарат универсального характера. Фаговый препарат «Фагодерм» сконструирован с учетом структуры гнойно-воспалительных заболеваний кожи и мягких тканей.

Данные проведенного мониторинга микрофлоры клинических материалов от больных с ГВЗ согласуются с результатами аналогичных исследований [5, 8, 9, 10]. Показано, что практически

любое инфекционное осложнение в коже и мягких тканях вызывается ассоциацией (микстом) различных патогенов. Ведущая роль в этих микстах принадлежит микроорганизмам *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*. Вместе с тем в архитектонике изученных клинических микробных популяций отмечен ряд особенностей. В образцах гнойного отделяемого ран часто идентифицируются патогены *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*. В анаэробно-аэробных ассоциациях могут доминировать микроорганизмы *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes* и *Cornebacterium spp.* К наиболее значимым этиологическим возбудителям ГВЗ следует отнести и патоген *Actinomyces spp.*

В процессе бактериологических исследований сформированы коллекции изолятов возбудителей ГВЗ 14 видов, которые рассматриваются как основные факторы риска гнойных инфекционных осложнений в косметологии и медицине. Комбинированный многокомпонентный фаговый препарат «Фагодерм» включает вирулентные фаги, лизирующие клетки всех 14 патогенов (по 3–4 вида фагов для каждого патогена). Целесообразность такого конструирования препарата обусловлена следующим:

- «Фагодерм» универсален как антимикробный препарат с широким спектром действия по отношению к различным сочетаниям патогенов в микстовых популяциях;
- на литическую активность каждого фага в препарате и при его использовании не влияет присутствие других бактериальных вирусов, т. е. фаги «не мешают друг другу» в проявлении антимикробного действия;
- использование многокомпонентного фагового препарата предотвращает такое негативное явление, как смена возбудителей в инфекционном очаге.

Препарат «Фагодерм» можно рекомендовать как средство лечения и профилактики большинства ГВЗ кожи и мягких тканей. Этот вывод подтверждается данными клинических ис-

пытаний и результатами начавшегося успешного применения препарата в дерматологии, хирургии, акушерстве и гинекологии. В косметологии препарат «Фагодерм» может использоваться в качестве надежного профилактического средства после вмешательств (операций) самого широкого профиля. При большинстве современных косметологических процедур неизбежны повреждения кожи. Препарат «Фагодерм», предотвращая инфекционные осложнения, оптимизирует процесс регенерации тканей при нарушении целостности кожного покрова. Следовательно, после косметологических операций пациенту целесообразно применять профилактическую маску на основе препарата с бактериофагами «Фагодерм».

В быту гель с фагами эффективен и удобен для обработки участков тела с микротравмами различного происхождения.

Литература

1. Донецкая Э.Г. Клиническая микробиология: Руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики. – М.: Гэотар-Медиа, 2011. – 472 с.
2. Ефименко Н.А., Гучев И.А., Сидоренко С.В. Инфекции в хирургии. Фармакотерапия и профилактика: Монография. – Смоленск, 2004. – 296 с.
3. Жиленков Е.Л., Фомченков В.М., Новиков И.А., Садомов В.Э., Оборотов М.В., Гремякова Т.А. Изучение взаимодействия фагов и микроорганизмов с использованием методов флуориметрии и электроориентационной спектроскопии. // Вестн. РАМН. . – 1999. – № 12. – С. 24–29.
4. Жиленков Е.Л., Шемякин И.Г., Фомченков В.М., Иванов А.Ю., Гаврюшкин А.В., Оборотов М.В. Изучение взаимодействия микобактериофага МТРН11 с клеткой-хозяином на основе электронной микроскопии, флуориметрии и электроориентационной спектроскопии // Микробиология. – 1998. – Т. 67, № 5. – С. 681–686.
5. Жилина С.В., Миронов А.Ю., Поликарпова С.В. Ацинетобактерии при инфекциях кожи и мягких тканей // Курский научно-практич. вестник «Человек и его здоровье». – 2007. – № 4. – С. 45–56.