

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-68

ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКИ АКНЕ**CHARACTERIZATION AND DEVELOPMENT OF A TECHNOLOGY FOR CULTURING BACTERIOPHAGES PROMISING FOR THE TREATMENT AND PREVENTION OF ACNE**

А. А. Воробьева¹, Е. С. Зубкова¹, А. М. Воробьев¹, М. А. Пасивкина¹, И. А. Киселева¹,
А. Т. Запечалов¹, М. Н. Анурова², А. Н. Блинцов³, Д. Л. Исаев³, А. В. Алешкин⁴

¹Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова

³ООО «Натура Сиберика», Москва

⁴ООО «Орфан-Био», Сочи

A. A. Vorobeva¹, E. S. Zubkova¹, A. M. Vorobev¹, M. A. Pasivkina¹, I. A. Kiseleva¹,
A. T. Zapevalov¹, M. N. Anurova², A. N. Blintsov³, D. L. Isaev³, A. V. Aleshkin⁴

¹G. N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology

²I. M. Sechenov First Moscow State Medical University

³Natura Siberica LLC, Moscow

⁴Orphan-Bio LLC, Sochi

✉ a-nastya@yandex.ru

Аннотация

Акне — воспалительное заболевание кожи, ассоциированное с чрезмерным ростом бактерий *Cutibacterium acnes*. Частое и неконтролируемое применение противомикробных средств при акне ведет к распространению антибиотикорезистентности и усугублению заболевания. Бактериофаги, активные в отношении резистентных *C. acnes*, могут стать эффективной альтернативой в терапии акне.

Abstract

Acne is an inflammatory skin disease associated with the overgrowth of *Cutibacterium acnes* bacteria. Frequent and uncontrolled use of antimicrobial agents for acne leads to the spread of antibiotic resistance and aggravation of the disease. Bacteriophages active against resistant *C. acnes* may become an effective alternative in acne therapy

Проблема акне остается одной из наиболее актуальных в современной дерматологии. Частота встречаемости заболевания у взрослого населения составляет 25 %, в то время как у подростков — 85 % [1]. Основным патогенетическим фактором акне является анаэробная бактерия *C. acnes*, которая играет основную роль в развитии воспалительного процесса в сально-волосяных фолликулах. Стандартные методы лечения акне предполагают использование противовоспалительных средств и антибактериальных препаратов, которые приводят к возникновению многочисленных нежелательных реакций и побочных явлений. Ключевой проблемой является развитие антибиотикорезистентности микроорганизмов при неконтролируемом использовании антибиотиков, вследствие чего традиционная терапия становится неэффективной.

Применение бактериофагов является перспективным решением в борьбе с акне ввиду их высокой специфичности, способности действовать на антибиотикорезистентные штаммы, отсутствия побочных эффектов.

Целью данного исследования является разработка технологии культивирования бактериофагов и создание эффективных фаговых лечебно-профилактических продуктов в форме геля и крема для терапии и профилактики акне.

В ходе исследования у пациентов с диагнозом «акне» были выделены 25 штаммов *C. acnes* — основного бактериального этиологического агента акне — и два литических бактериофага NS-ph1 и NS-ph2, проявляющих специфическую литическую активность в отношении данных штаммов. Выделение чистых линий бактерий и бактериофагов осуществлялась из клинического материала, взятого с поверхности воспалительных элементов кожи.

Подтвержден 100%-й спектр литической активности выделенных бактериофагов в отношении изучаемых штаммов. С помощью биоинформатического анализа было определено таксономическое положение бактериофа-

гов (класс *Caudoviricetes*, род *Pahexavirus*), подтверждена их вирулентная природа, выявлено отсутствие нежелательных генов (интеграз, антибиотикорезистентности и т. д.).

Была определена физико-химическая стабильность бактериофагов на протяжении 6 месяцев: устойчивы при pH 5,5–7,5, температурах от –80 до +25 °С. Не инактивируется при воздействии хлороформа.

Определены оптимальные параметры культивирования выделенных бактериофагов, обеспечивающие получение фаголизата с высоким титром вирусных частиц: глубинное культивирование штамма-хозяина в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой с добавлением 1 % дрожжевого экстракта, 1 % глюкозы, 1 % сахарозы и 1 % лактозы; заражение бактериальных клеток при достижении логарифмической фазы роста при MOI = 0,01–0,1. Титр бактериофагов в вирусном сборе, полученном по данной технологии через 8–12 ч после заражения, достигал 10^9 БОЕ/мл. Затем с помощью глубинной фильтрации (фильтр с мембраной из полиэфирсульфона и диаметром пор 0,2 мкм; скорость потока 120 мл/мин, давление не более 1,0 бар) проводилась очистка фаголизата от клеточного дебриса и неразрушенных клеток. С целью дальнейшей очистки от остаточных белков и ДНК культуры клеток, а также от белков питательной среды проводили ультрафильтрацию в тангенциальном потоке (кассета с мембраной из полиэфирсульфона и пределом отсеивания 100 кДа, давление на входе не более 1,0 бар, скорость потока 250 мл/мин) с последующей финальной стерилизующей фильтрацией. В результате многоступенчатой технологии культивирования и очистки фаголизата концентрация вирусных частиц составила 10^{10} БОЕ/мл. Таким образом, полученный очищенный фаголизат может быть применен в качестве активной субстанции в антибактериальных средствах для местного применения от акне.

Также в ходе исследования была проведена комплексная оценка совместимости бактериофагов NS-ph1 и NS-ph2 с 40 вспомогательными веществами, необходимыми для разработки косметического средства с лечебно-профилактическим эффектом. После хранения на протяжении 6 месяцев при +4 °С было определено 16 совместимых компонентов, не влияющих на литическую активность бактериофагов. На основе этих данных разработаны стабильные композиции в форме геля (на основе альгината натрия и целлюлозной камеди) и крема (с гидрогенизированным лецитином), сохраняющие литическую активность бактериофагов при хранении в холодильнике в течение полугода.

Полученные результаты могут стать научной основой для разработки инновационных эффективных и безопасных продуктов против акне в качестве альтернативы существующим антибактериальным средствам.

Литература

1. Lynn D. D., Umari T., Dunnick C. A., Dellavalle R. P. The epidemiology of acne vulgaris in late adolescence // *Adolescent health, medicine and therapeutics*. 2016. Vol. 7. P. 13–25.