

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный
медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных
заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Лапенкова Марина Борисовна

**Новые перспективы применения микобактериофагов для диагностики и
лечения туберкулёзной инфекции**

03.02.03 «микробиология»

диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

д.м.н., профессор Владимирский М.А

МОСКВА 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность проблемы.....	6
Цель исследования:.....	9
Задачи исследования:.....	10
Научная новизна исследования	10
Научно-практическая значимость исследования.....	11
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	12
Личный вклад автора	13
Внедрение в практику.....	14
Соответствие диссертации паспорту научной специальности.....	14
Структура и объем диссертации.....	14
Публикации.....	14
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Классификация микобактериофагов.....	15
1.2 Бактериофаги. Фаготерапия.....	20
1.3 Фаговый дисплей	23
1.4 Микобактериофаги – окно в туберкулез?.....	24
1.5 Фаготерапия туберкулеза	27
1.6 Микобактериофаги для ускоренного первичного обнаружения МБТ в образцах мокроты и фенотипического определения лекарственной чувствительности МБТ в клинических изолятах.....	29
1.7 Лекарственная чувствительность	30
1.8 Липосомы и перспективы использования препаратов литических микобактериофагов для лечебного противотуберкулезного применения	35
1.9 Липосомы для лечения туберкулеза	37

1.10 Дормантность микобактерий туберкулеза и применение микобактериофагов	38
1.11 Туберкулезная гранулема <i>in vitro</i>	40
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	42
2.1 Культура перевиваемых макрофагов	42
2.2 Микобактериальные культуры	42
2.3 Микобактериофаг D29	43
2.4 Размножение и определение биологической активности микобактериофага D29	43
2.5 Получение концентрированного высокоочищенного препарата микобактериофага D29	44
2.6 Получение липосомального препарата микобактериофага D29	45
2.7 Электронно-микроскопическое изучение липосомального микобактериофага D29	45
2.8 Выделение ДНК микобактериофага D29 из исследуемых образцов	46
2.9 Выделение ДНК из культур МБТ	46
2.10 Количественное определение ДНК микобактериофага D29 и ДНК МБТ методом ПЦР в реальном времени	47
2.11 Модель перевиваемой линии мышинных макрофагов	48
2.12 Модель туберкулезной гранулемы <i>in vitro</i> , образуемой мононуклеарами крови человека, инфицированными МБТ	49
2.13 Гистологическое исследование гранулемы	50
2.14 Определение дормантности и реактивации МБТ	50
2.14.1 Подготовка опытного образца культуры МБТ	50
2.14.2 Подготовка супернатанта растущей культуры МБТ, содержащего белок Rpf	50
2.14.3 Реактивация дормантных клеток МБТ	51

2.15 Технология ускоренного фенотипического метода определения лекарственной чувствительности клинических штаммов МБТ с использованием количественного анализа ДНК микобактериофага D29	51
2.15.1 Подготовка культур МБТ	51
2.15.2 Выделение общей ДНК (МБТ и фага D29).....	52
2.16 Статистическая обработка результатов	52
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	53
3.1 Разработка набора для одновременного количественного анализа микобактериофага D29 и МБТ методом ПЦР-РВ.....	53
3.2 Оптимизация технологии получения концентрированного высокоочищенного препарата литического микобактериофага D29	59
3.3 Получение липосом с включенными частицами микобактериофага D29 .	62
3.4 Литическое действие микобактериофага D29 в клинических изолятах МБТ	64
3.5 Исследования антимикобактериальной активности липосомальной формы литического микобактериофага D29 в отношении внутриклеточно культивируемых МБТ с использованием перевиваемой линии мышинных макрофагов RAW 264.7	68
3.5.1. Разработка модели внутриклеточно инфицированных макрофагов.....	68
3.5.2. Исследование внутриклеточного транспорта липосомального микобактериофага D29 на модели внутриклеточной туберкулезной инфекции перевиваемых макрофагов RAW 264.7	70
3.5.3. Исследование литического эффекта микобактериофагов на модели внутриклеточно инфицированных макрофагов.....	72
3.6 Оптимизация модели туберкулезной гранулемы мононуклеаров крови человека <i>in vitro</i>	74
3.7 Сравнительные исследования эффективности применения литических микобактериофагов для ускоренного определения лекарственной чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам в клинических изолятах.....	78

3.8 Быстрое определение dormантности МБТ с помощью анализа ДНК литического микобактериофага D29	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ВЫВОДЫ ДИССЕРТАЦИИ	96
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Туберкулез является одной из самых актуальных проблем здравоохранения в мире. Несмотря на предпринимаемые меры, ситуация по туберкулезу остается весьма напряженной. Туберкулез является одной из 10 самых частых причин смерти. По статистике ВОЗ, ежегодно от этой болезни погибает около 2 млн. человек. Способы ранней и достоверной диагностики туберкулеза чрезвычайно важны для выбора правильного лечения и предупреждения распространения заболевания.

Одной из важнейших проблем фтизиатрии является распространение лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ). В связи с этим происходит снижение эффективности лечения больных, что приводит к дальнейшему распространению туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) – резистентностью к основным препаратам первого ряда (изониазид и рифампицин) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ) – резистентностью к изониазиду, рифампицину, фторхинолонам и к одному из аминогликозидов или полипептидному антибиотику (Km/Am или Cm).

В настоящее время уровень МЛУ среди ранее не леченных больных составляет 27,4%, а среди ранее лечившихся пациентов – 54% (по данным Федерального Центра мониторинга по туберкулезу mednet.ru).

Повышение эффективности лечения туберкулеза и предотвращение дальнейшего распространения лекарственно-устойчивых штаммов МБТ требует постоянного совершенствования лабораторных методов быстрого определения лекарственной чувствительности МБТ, выделяемых больными туберкулезом.

Несмотря на развитие молекулярно-генетических методов диагностики туберкулезной инфекции и определения мутаций ДНК МБТ, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, фенотипические методы сохраняют свою востребованность, в том числе, из-за наблюдаемых различий между молекулярно-

генетическими и фенотипическими методами. Таким образом, речь идет о более низкой (на 10-30%) чувствительности определения лекарственной устойчивости в отношении некоторых препаратов группы аминогликозидов и этамбутола при использовании молекулярно-генетических методов, даже с применением технологии секвенирования генома МБТ.

Поэтому и фенотипические методы также требуют усовершенствования – сокращения времени исследования и повышения экономической эффективности их применения.

Применение микобактериофагов в качестве способа оценки уровня метаболизма МБТ в жидкой питательной среде и его ингибирования при воздействии антибактериальных препаратов, в отношении которых определяется лекарственная чувствительность, может быть одним из эффективных подходов для сокращения времени анализа и разработки методов, позволяющих заменить дорогостоящие импортные наборы реагентов.

Проблема снижения бремени туберкулеза в странах с высоким уровнем его распространенности связана также, помимо лекарственной устойчивости, и со спецификой возбудителя, с самим характером туберкулезного процесса, что обуславливает очень большую длительность химиотерапевтических курсов. Прекращение бактериовыделения, даже через 12 месяцев лечения, достигается, в среднем, лишь в 70,7% случаев (mednet.ru). Для эффективного лечения больных туберкулезом, выделяющих МБТ с МЛУ, в соответствии с принятыми стандартами, необходимые курсы химиотерапии достигают 2 лет. Продолжение лечения больного туберкулезом в амбулаторных условиях требует больших усилий, в том числе, мер социальной поддержки, поскольку значительная часть больных прекращает лечение, вследствие чего переходит в число больных с хроническими формами туберкулеза (10-15%).

Таким образом, накапливается число неэффективно леченных больных, которые служат резервуаром туберкулезной инфекции и источником инфицирования лекарственно-устойчивыми штаммами МБТ для вновь заболевших пациентов. Эта проблема, к сожалению, не может быть решена

только за счет разработки и применения новых противотуберкулезных препаратов, так как в отношении некоторых из них, например, к группе фторхинолоновых антибиотиков, лекарственная устойчивость МБТ развивается еще быстрее.

Для снижения резервуара туберкулезной инфекции необходимо создать новые дополнительные методы лечения пациентов, позволяющие сократить сроки лечения и прекратить бактериовыделение больных туберкулезом, что невозможно только с помощью антибиотиков. Именно длительность лечения способствует селекции микобактерий, устойчивых к лекарственным препаратам.

Таким альтернативным решением в условиях широкого распространения лекарственной устойчивости МБТ и относительно низкой эффективности лечения антимикробными препаратами представляется использование микобактериофагов, которые обладают литическими свойствами, независимо от их устойчивости к традиционным противотуберкулезным препаратам. Применение бактериофагов для лечения бактериальных инфекций является одним из нередко обсуждаемых трендов в связи с общей проблемой лекарственной устойчивости (Kutateladze M. et al., 2010; Ido Y. et al., 2014). Перспективы применения микобактериофагов для лечения туберкулезной инфекции до сих пор не определены. Ученые из Китая изучают возможности аэрозоль-ингаляционной терапии с использованием препаратов микобактериофага, а также исследуют возможности ингибирования внутриклеточных микобактерий на модели макрофагов мышей (Xiong X. et al., 2014). Наиболее известный исследователь микобактериофагов Graham Hatfull подчеркивает необходимость избирательного транспорта в гранулематозные очаги легких больных туберкулезом и рассматривает возможность использования препаратов литического микобактериофага для профилактики туберкулеза у родственников больных туберкулезом (Hatfull G., 2014).

В то же время наибольшее число исследований по проблеме микобактериофагов связано с их применением для быстрого определения лекарственной чувствительности.

Наиболее близкими к нашей работе в этом направлении являются работы группы авторов: Pholwat S. et al, 2012, а также Foonglada S. et al., 2014, в которых на материале большого числа клинических штаммов МБТ был использован метод ПЦР анализа размножения микобактериофагов в клетках МБТ для ускоренного определения лекарственной чувствительности и была показана его эффективность. Хорошо известно, что ингибирование метаболизма МБТ антибактериальными препаратами соответственно ингибирует размножение микобактериофага. На этой основе был разработан метод определения лекарственной чувствительности/устойчивости клинических штаммов МБТ с определением результатов исследования при количественной оценке ДНК фага с помощью ПЦР в реальном времени. Эти же авторы показали и обратную зависимость минимальных ингибирующих концентраций (МИК) антибактериальных препаратов от величины измеряемого в количественной ПЦР ингибирования метаболизма микобактерий. Развиваются также исследования с использованием флуоресцентных микобактериофагов как для раннего определения роста МБТ в жидкой питательной среде, так и для ускоренного определения лекарственной чувствительности МБТ (Piuri M., William R. et al, 2009).

Тем не менее, указанные работы не привели к созданию диагностических наборов реагентов для применения их в практике фтизиатрии.

Цель исследования:

Разработка лабораторных методов и экспериментальных препаратов для повышения эффективности диагностики и лечения туберкулезной инфекции на основе применения микобактериофагов.

Задачи исследования:

1. Разработка липосомальной формы литического микобактериофага D29 и характеристика его биологической активности.
2. Исследование антимикобактериальной активности липосомальной формы литического микобактериофага D29 в отношении внутриклеточной инфекции микобактерий туберкулеза на модели перевиваемой линии мышинных макрофагов RAW-264 и туберкулезной гранулемы на основе мононуклеаров человека *in vitro*.
3. Разработка и оптимизация ускоренного фенотипического метода определения лекарственной чувствительности клинических штаммов МБТ в отношении широкого спектра противотуберкулезных препаратов на основе использования литического штамма микобактериофагов.
4. Применение литического микобактериофага D29 для быстрого определения дормантности МБТ.

Научная новизна исследования

1. Новизна исследования состоит в исследовании антимикобактериального действия литического микобактериофага D29 на модели внутриклеточно инфицированной культуры макрофагов перевиваемой линии RAW 264-7 (АТСС). Разработана модель и оригинальный метод получения культуры перевиваемых макрофагов, содержащих фагоцитированные МБТ.
2. Впервые антимикобактериальная активность микобактериофагов изучена на модели туберкулезной гранулемы *in vitro*, формируемой мононуклеарными клетками крови человека в присутствии МБТ.
3. Оптимизирован метод наработки микобактериофага, позволяющий получить значимые количества этого препарата, хроматографически очищенного для включения в липосомы.

4. Разработан метод получения препарата липосомального микобактериофага с размером фаговых липосом 0,4 мк и представлены его характеристики, в том числе с помощью электронной микроскопии.

5. Впервые проведены исследования и продемонстрирована преимущественная, по сравнению с микобактериофагом, не включенным в липосомы, эффективность липосомального препарата литического микобактериофага для лизиса внутриклеточных МБТ на модели перевиваемых макрофагов RAW 264, а также на модели туберкулезной гранулемы мононуклеаров человека *in vitro*. Ингибирующий МБТ эффект микобактериофага коррелирует с его внутриклеточным транспортом при использовании липосомальной формы.

6. Оптимизирован метод ускоренного (до 5-ти дней), по сравнению с системой Bactec MGIT, фенотипического определения лекарственной чувствительности клинических изолятов МБТ на основе применения литического микобактериофага D29 с количественным анализом ДНК фага с помощью ПЦР в реальном времени. В частности, оптимизирован, по сравнению с ранее описанным методом, формат исследований с использованием 24-луночного планшета, что обеспечивает благоприятные возможности применения метода в практических лабораториях.

7. Продемонстрирована эффективность применения препарата микобактериофага для быстрого, по сравнению с культуральным исследованием, определения дормантности и реактивации МБТ на основе количественного анализа ДНК фага с помощью ПЦР в реальном времени. Продемонстрировано также связывание (адсорбция) микобактериофага с клетками дормантных МБТ.

Научно-практическая значимость исследования

Разработка липосомальной формы литических микобактериофагов, эффективно разрушающих внутриклеточные МБТ, позволит создать

принципиально новый биопрепарат для лечения больных туберкулезом, в том числе больных-бактериовыделителей с множественной лекарственной устойчивостью.

Разработка нового быстрого, по сравнению с культуральным исследованием, метода определения дормантности МБТ, образующейся в процессе лечения больных туберкулезом, который в будущем может стать важным критерием выбора оптимальной комбинации противотуберкулезных препаратов для персонализированной химиотерапии туберкулеза.

Оптимизирование экономичной и ускоренной технологии, по сравнению с культуральным исследованием в системе Bactec MGIT, на основе применения микобактериофагов для фенотипического определения лекарственной чувствительности клинических изолятов МБТ позволит разработать соответствующий набор реагентов.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. При исследовании двух моделей туберкулезного воспаления *in vitro* с внутриклеточной инфекцией МБТ – перевиваемой линии макрофагов и туберкулезной гранулемы, формируемой лимфоцитами и моноцитами крови человека с латентной инфекцией в присутствии микобактерий туберкулеза, препарат микобактериофага D29 при краткосрочной инкубации оказывает сильный бактерицидный эффект.

2. Липосомальный препарат литического микобактериофага обладает кратно более высокой эффективностью бактерицидного эффекта в отношении внутриклеточной популяции МБТ, по сравнению с внелипосомным препаратом микобактериофага.

3. Применение литического микобактериофага D29 с использованием количественного анализа ДНК для фенотипического определения лекарственной чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам первой и второй

линии позволяет получать результаты не менее, чем в 95% случаев совпадающие с данными Bactec MGIT, что обеспечивает возможности создания ускоренной и экономичной тест-системы и нового набора реагентов.

4. Использование литического микобактериофага позволяет провести ускоренный анализ дормантности и реактивации МБТ после их обработки противотуберкулезными лекарственными веществами.

Личный вклад автора

Научные результаты, содержащиеся в диссертации, получены при личном участии автора и представляют собой законченное самостоятельное научное исследование. Автор принимала непосредственное участие в постановке задач, планировании, выполнении экспериментов и обработке данных. Автор оптимизировала модель внутриклеточного культивирования МБТ с использованием перевиваемой линии мышинных макрофагов RAW 264-7 и модель туберкулезной гранулемы мононуклеаров человека *in vitro*. Автор проанализировала результаты исследования эффективности липосомального препарата литического микобактериофага и микобактериофага, не включенного в липосомы, обладающих литическими свойствами в отношении внутриклеточных МБТ на данных моделях; принимала непосредственное участие в наработке микобактериофага и включения его в липосомы; проводила сравнительные исследования лекарственной чувствительности/устойчивости клинических изолятов МБТ в системе Bactec MGIT и разрабатываемой технологии на основе применения микобактериофага D29; принимала активное участие в разработке метода быстрого определения дормантности МБТ с помощью анализа ДНК литического микобактериофага D29, обрабатывала полученные результаты, участвовала в написании статей и готовила рукопись диссертационной работы.

Внедрение в практику

Результаты исследований используются в работе лаборатории инфекционной иммунологии, патологии и биотехнологии ФГБУ НМИЦ ФПИ Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальностей 03.02.03 - «микробиология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальностей, конкретно – пунктам 2, 10 паспорта специальности «микробиология».

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 108 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, общего заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 109 источников, в том числе 7 отечественных и 102 зарубежных. Работа содержит 14 таблиц, 20 рисунков.

Публикации

По результатам исследований опубликованы 5 научных статей, в том числе: 2 статьи, рекомендованные ВАК Минобрнауки России, 1 статья в SCOPUS, 4 тезисов и 1 патент на изобретение № 2691439 от 16.08.2018.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Классификация микобактериофагов

Бактериофаги – это вирусы, которые заражают исключительно бактериальные клетки, известные уже более века. Из-за распространения лекарственной устойчивости к антибиотикам, во всем мире вновь появился интерес к бактериофагам. Теперь их рассматривают как потенциальную альтернативу и / или дополнение к антибиотикам, главным образом из-за их высокой специфичности и уникальных свойств для борьбы с многорезистентными бактериальными штаммами (Summers W., 2012; Rios A. et al., 2016). Бактериофаги – биологические образования, полностью лишённые какого-либо метаболического аппарата, поэтому являются внутриклеточными паразитами, нуждающимися в бактериях для репликации через свой генетический материал, захватывающими биохимический механизм бактериальных клеток (Human P. et al, 2010; Hermoso J. et al., 2007; Skurnik M. et al., 2006; Kokjohn T. et al., 1991). Благодаря тому, что бактериофаги сильно влияют на процесс эволюции бактериальных геномов, также вызывая развитие бактериальной патогенности, эти метаболически инертные частицы могут дать потенциальную возможность противостоять устойчивости к антибиотикам (Chibani-Chennoufi S. et al., 2004). В течение последних нескольких лет можно наблюдать явный переход от редуccionистского подхода, ориентированного на отдельные бактериофаги в тщательно контролируемых лабораторных условиях, на изучение многих различных бактериофагов в сложных ситуациях в реальной жизни. Действительно, бактериофаги позволяют получить потенциал, который можно использовать во многих различных биотехнологических задачах, от антибиотикотерапии человека до дезинфекции окружающей среды. Подавляющее большинство бактериофагов, обнаруженных на данный момент, взаимодействуют с бактериальными клетками, которые экспрессируют специфические мембранные

поверхностные рецепторы. Однако, если бактериальная клетка не представляет конкретный рецептор конкретному бактериофагу на его поверхности, то бактериофаг не может заразить клетку, что демонстрирует естественную высокую специфичность бактериофага к конкретному бактериальному хозяину. Известно, что для каждой бактериальной клетки существует около десятка различных бактериофагов. Некоторые из них являются высокоспецифичными для их бактериального хозяина – монофаги (признающие только один тип рецептора), либо полифаги (демонстрирующие более широкий диапазон хозяев и признающий более одного типа рецептора) (Skurnik M., Strauch E., 2006; Hyman P., Abedon S., 2010; Chan B., Abedon. S, 2012).

Первые морфологические исследования бактериофагов появились в результате развития методов электронной микроскопии (Ford M., 1998). (Рисунок 1 А, В).

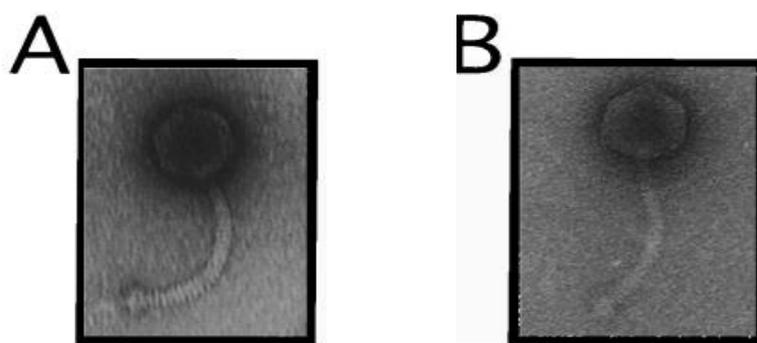


Рисунок 1 – А. Электронная микроскопия вириона D29. В. вирион L5 (Взято из Michael E Ford (1998))

С морфологической точки зрения, частицы бактериофага обладают четко определенной трехмерной структурой. Подавляющее большинство представляет собой икосаэдрический белковый капсид, охватывающий генетический материал в его ядре, спиральную сократительную оболочку (или хвост) и, как правило, шесть хвостовых волокон, соединенных с опорной плитой, содержащей рецепторные белки связывания, отвечающие за распознавание специфических молекул на поверхности бактериальной мембраны (Рисунок 2).

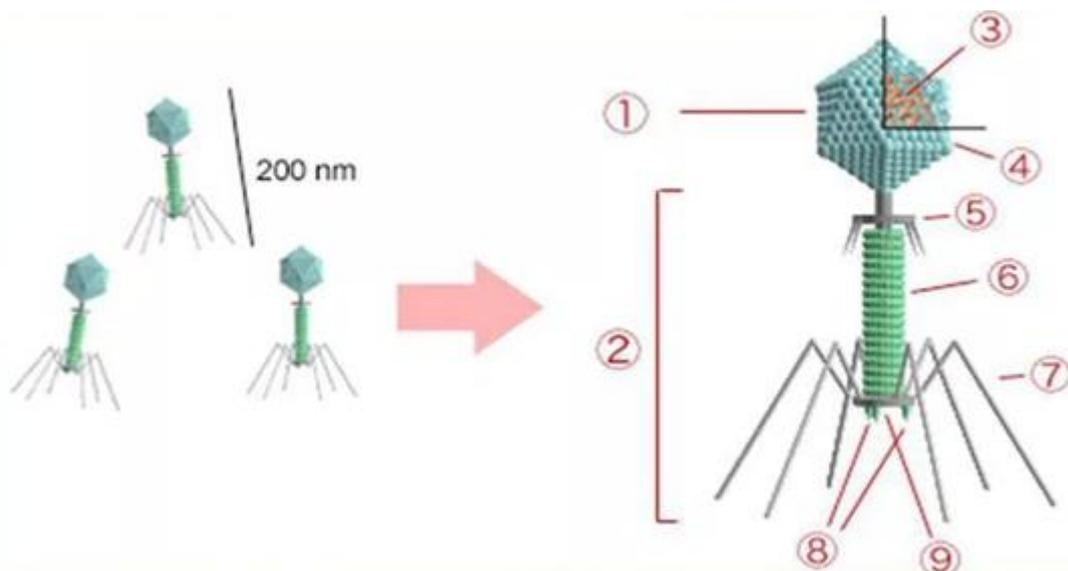


Рисунок 2 – 1 - голова, 2 - хвост, 3 - нуклеиновая кислота, 4 – капсид, 5 – «воротничок», 6 – белковый чехол хвоста, 7 – фибрилла хвоста, 8 – шипы, 9 – базальная пластинка

По типу генетического материала, используемого в сердцевине капсида, частицы бактериофага можно разделить на четыре основные группы (Рисунок 3): одноцепочечные ДНК-фаги (ssDNA), двухцепочечные ДНК-фаги (dsDNA), одноцепочечные РНК фаги (ssRNA) и двухцепочечные РНК-фаги (dsRNA).

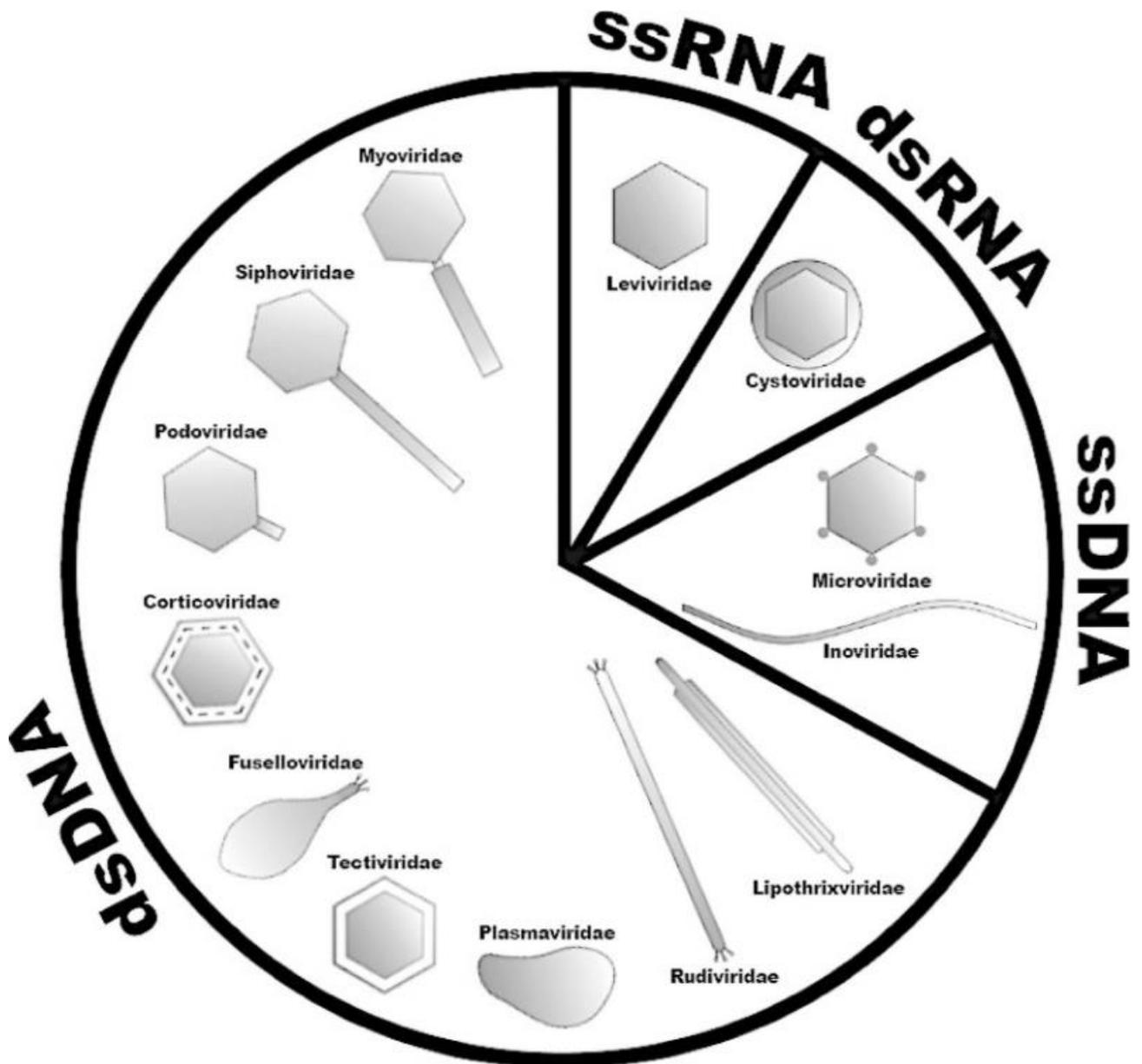


Рисунок 3 – Классификация бактериофагов по их морфологии, генетическому материалу и основным характеристикам (Взято из Ackermann (2007) и Hanlon (2007))

За последние пятьдесят лет было выявлено и изучено более 5100 бактериофагов, причем более 90% из них имеют хвосты и принадлежат к семействам Myoviridae, Siphoviridae и Podoviridae (Wittebole X., et al., 2014; Ackermann H., 2007; Hanlon G., 2007; Dąbrowska K., et al., 2005). Такое большое количество выделенных и изученных вирусов требует систематизации. Этим занимается Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV). На данный

момент, согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов, бактериофаги разделяют в зависимости от типа нуклеиновой кислоты и морфологии (Таблица 1).

Таблица 1 – ICTV классификация вирусов бактерий

Семейство	Морфология	Нуклеиновая кислота	Пример
Myoviridae	Без оболочки, сократительный хвост	Линейная dsДНК	ФагТ4
Siphoviridae	Без оболочки, несократительный хвост (длинный)	Линейная dsДНК	Фаг λ, Т5, L5, D29
Podoviridae	Без оболочки, несократительный хвост (короткий)	Линейная dsДНК	Фаг Т7, фаг Т3,
Microviridae	Без оболочки, изометрические	Кольцевая ssДНК	φX3D5, X174
Corticoviridae	Без оболочки, изометрические	Кольцевая dsДНК	PM2
Tectiviridae	Без оболочки, изометрические	Линейная dsДНК	PRD1
Leviviridae	Без оболочки, изометрические	Линейная ssРНК	MS2
Cystoviridae	В оболочке, сферические	Сегментированная dsРНК	φX3D5,6
Inoviridae	Без оболочки, нитевидные	Кольцевая ssДНК	fd
Plasmaviridae	В оболочке, плеоморфные	Кольцевая dsДНК	MVL2

Взаимодействие бактериофага с клеткой происходит в соответствии с основными типами взаимодействия, характерными для всех вирусов —

продуктивная (литическая), abortивная вирусная и латентная (лизогения, вирогения) инфекция, а также вирус-индуцированная трансформация.

По характеру взаимодействия фага с клеткой все бактериофаги делятся на: вирулентные (литические), вызывающие продуктивную инфекцию и лизис бактериальной клетки; умеренные, вызывающие латентную инфекцию и ассоциацию генома вируса с бактериальной хромосомой.

Умеренные фаги, в отличие от вирулентных, не вызывают гибели бактериальных клеток и при взаимодействии с ней переходят в неинфекционную форму фага, называемую провирусом. Умеренные фаги, неспособные ни при каких условиях переходить из провируса в вегетативный фаг (образовывать зрелые фаговые частицы), называются дефектными, чаще это происходит в результате нарушения стадии сборки вирусных частиц. Некоторые умеренные фаги называются трансдуцирующими, поскольку с их помощью осуществляется один из механизмов генетической рекомбинации у бактерий — трансдукции. Такие фаги могут использоваться, в частности, в генной инженерии в качестве векторов для получения рекомбинантных ДНК и/или при приготовлении рекомбинантных (генно-инженерных) вакцин. В последнее время перспектива фаготерапии стала особенно актуальной в связи с распространением лекарственной устойчивости патогенных бактерий (Summers W., 2012; Rios A. et al, 2016).

1.2 Бактериофаги. Фаготерапия

Felix D'Herelle в 1917 г. назвал бактериофагами предполагаемый вирус, который вызывал быструю смерть бактерий. Хотя вирусная природа фага утвердилась только в 40-х годах, попытки лечения фагами бактериальных инфекций начались довольно рано. В СССР, в частности в Грузии, в тбилисском Институте микробиологии и эпидемиологии, который в 30-х годах назывался Институтом бактериофагов, а также на Украине эти исследования проводились и бактериофаги использовались, например, для лечения дизентерии и профилактики

холеры. После большого числа исследований в 30-е годы, в период Отечественной войны, бактериофаги также использовались, в том числе, в военной медицине для лечения раневой инфекции, хотя большие надежды не совсем сбылись. Интерес к фаготерапии снизился после открытия пенициллина в конце Отечественной войны. С появлением антибиотиков использование бактериофагов, особенно в западной медицине, было несколько заброшено до возрождения надежд последнего времени в связи с кризисом распространившейся антибиотикорезистентности. Тем не менее, в послевоенный период в Советском Союзе и странах Восточной Европы был накоплен значительный опыт применения бактериофагов для лечения бактериальных инфекций. Фаготерапия с успехом использовалась для лечения стафилококковых септицемий, эндокардитов с введением бактериофагов перикардially; пульмонологических заболеваний с введением интраплеврально при эмпиеме, абсцессах легкого, а также при бактериальном кератите, хроническом пиелонефрите и хроническом остеомиелите.

В настоящее время, по данным международной литературы, интерес к фаготерапии существенно обновляется (Reardon S., 2014).

Особенности и проблемы фаготерапии.

Для терапии чаще всего используются литические фаги, при этом необходимо использовать комбинацию, то есть коктейли бактериофагов, которые не должны быть серологически перекрестными. Лечение должно обеспечивать непосредственный контакт бактериофагов с инфекцией, т.е. терапия *in situ*. Необходимо также учитывать, что бактериофаги могут обеспечивать лечение в достаточно узком специфическом диапазоне действия и, наконец, образование специфических антител против бактериофагов не позволит проводить длительную терапию (Ido Y., 2014). Однако умеренные фаги, которые могут встраиваться в геном хозяина, могут также изменять генетические свойства с возможностью изменить лекарственную устойчивость на чувствительность к некоторым препаратам (Edgar R. et al, 2012).

В наше время возродившийся интерес к бактериофагам сопровождается работами фундаментального характера в связи с развитием молекулярной биологии. Значительное число исследований носит фундаментальный характер. Бактериофаги в современной науке представляются факторами эволюции микроорганизмов и исследования фагов с помощью новой генерации методов секвенирования обозначают метагеномикой. Нитчатые бактериофаги используются для ДНК рекомбинирования с встраиванием ДНК различных пептидов с последующей их экспрессией и получением таких, в том числе иммуногенных белков, которые могут использоваться для создания вакцин (Кузьмичева Г., Белявская В., 2016).

В то же время фаготерапия широко обсуждается также с заголовками «бактериофаги – антибиотики будущего»; «вирусы спасут человечество от лекарственно-устойчивых бактерий»; «фаги – это герои в постантибиотиковую эру» (Lin D., 2017). Антибиотикорезистентность действительно приобрела глобальный характер. По данным правительства Великобритании около 700 тыс. человек ежегодно умирают во всем мире от лекарственно-устойчивых инфекций. По прогнозам, к 2050 г. количество смертей может возрасти до 10 млн. человек и прогнозируемая стоимость их лечения, по этим подсчетам, составит 100 триллионов долларов (Laxminarayan R., 2013). В настоящее время в США от инфекции метициллин-резистентного *S. Aureus* умирает больше людей, чем от ВИЧ/СПИДа и туберкулеза вместе взятых (Boucher H., 2009). Наиболее актуальной задачей для фаготерапии является необходимость получения высоковирулентных фагов в отношении *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*, лекарственная устойчивость к которым является исключительно высокой (Nilsson A., 2014). При обсуждении перспектив фаготерапии, наряду с их вероятной инактивацией антителами, отмечается отсутствие значимых токсических побочных эффектов, в отличии от антибиотиков.

Эффективность терапии, сравнимая с эффективностью антибиотиков, может быть достигнута только в случае амплификации литического действия фагов,

когда образующиеся после лизиса микробов фаговые частицы атакуют следующие бактерии. Обсуждается, также, возможность генетического рекомбинирования микобактериофагов для получения новых свойств, в том числе, с помощью редактирования генома (CRISPR/CAS) с целью их применения для диагностических задач (Pire D. et al., 2016). Одной из главных проблем в борьбе с устойчивыми патогенными бактериями является, в частности, *Pseudomonas aeruginosa* – возбудитель легочного кистозного фиброза у детей, обладающий множественной лекарственной устойчивостью, против которого литические бактериофаги могут стать спасительным средством (Rossito M. et al. 2018).

Предполагается, однако, что широкое применение бактериофагов возможно только в комбинации с антибиотиками.

1.3 Фаговый дисплей

Еще одно важное направление в использовании бактериофагов для лечения различных заболеваний – это так называемый «фаговый дисплей». За развитие этой технологии была присуждена нобелевская премия по химии в 2018 г. Смысл ее состоит в том, что с помощью клонирования в геном ДНК белков, представленных на поверхности фагов (чаще всего нитчатых фагов) минимальных, даже случайных, изменений в кодирующие последовательности ДНК, образуется огромное переменное число пептидов, с помощью которых могут быть отобраны специфические антитела, а также различных антигенов, на которые при введении в организм животных нитчатых фагов с экспонированными антигенами образуются специфические антитела (Henry K. et al., 2011) и даже специфические цитотоксические лимфоциты (Henry M. et al., 2013). В связи с этим предполагается, что такие фаги могут быть платформой для создания различных вакцин.

1.4 Микобактериофаги – окно в туберкулез?

Наиболее широко известные микобактериофаги – D29 и TM4, для которых, помимо патогенного *M.tuberculosis*, непатогенных *M.smegmatis*² 155, *Mycobacterium bovis* BCG, хозяевами являются также условно патогенные *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium fortuitum*, и *Mycobacterium chelonae*. Кроме того, *M.ulcerans* рассматривается как патоген для тропических стран, для которого эти микобактериофаги также являются хозяином. Фаговое инфицирование и быстро, и медленно растущих микобактерий может быть быстро определено с помощью анализа амплификации фагов по числу «плаков» – зон лизиса на плотной среде в чашках Петри культуры *M.smegmatis*. Оба микобактериофага – D29 и TM4 могут инфицировать и *M.smegmatis*, и *Mycobacterium avium*, и субштаммы *paratuberculosis* (MAP) в условиях роста с аэрацией. Однако, когда культуры растут в условиях ограничения кислорода, только TM4 может продуктивно инфицировать приведенные штаммы микобактерий. Фаг D29 может связываться с поверхностью микобактерий, однако, он не может завершить литический цикл. Эта способность быстро восстанавливается при доступе кислорода, который необходим для синтеза РНК. Способность микобактериофага D29 связываться со стенкой МБТ в неблагоприятных условиях с последующей амплификацией в благоприятных условиях позволила разработать метод определения числа живых микобактерий, которое соответствовало числу плаков при их переносе в культуру *M.smegmatis* на среде 7H10 Миддлбрук (Swift B. et al, 2014).

Способность микобактериофагов размножаться в микобактериях, как патогенных, так и относительно непатогенных, позволяет их использовать для определения микобактерий, их дифференцирования, определения лекарственной устойчивости к рифампицину, в частности, для *M.ulcerans*, анализа их генетики и для определения лекарственной чувствительности к микобактериям туберкулеза. С этой целью с помощью методов геной инженерии были созданы так называемые репортерные микобактериофаги.

Более 500 штаммов микобактериофагов, которые размножаются в *M. smegmatis*, выделены из окружающей среды и полностью секвенированы (Hatfull G., 2014). Для ДНК микобактериофагов характерным является высокое содержание GC нуклеотидов (гуанин-цитозина), в среднем, 64%; у главного хозяина – *M. smegmatis* mc^2 155 – 67,3%. Не все микобактериофаги инфицируют *M. smegmatis* и только небольшая часть эффективно инфицируют *M. tuberculosis*. 45% генов микобактериофагов не реализуют литические свойства в отношении микобактерий. Микобактериофаги могут использоваться для различных генетических манипуляций с *M. tuberculosis*: для генетической трансформации, для создания транспозонов и библиотек транспозонов в микобактериях, а также для создания репортерных микобактериофагов с использованием люциферазы или флуоресцентных микобактериофагов в качестве маркера размножения МБТ, которые могут использоваться для диагностики туберкулеза. ДНК микобактериофагов может также интегрироваться в геном микобактерий, и в таких лизогенных микобактериях может изменяться их физиология. Исследование геномной структуры фага D29 в сравнении с умеренным (лизогенным) фагом лямбда L5 показало, что неспособность фага D29 образовать лизогены связана с делецией размером 3,6 килобаз, что объясняет отсутствие репрессорного гена (Ford M. et al, 1998). По данным Hatfull G. только несколько (3-6) видов микобактериофагов обладают литическими свойствами в отношении МБТ, что несколько ограничивает перспективу их терапевтического применения.

Литический микобактериофаг D29 имеет головку величиной 65 нм правильной формы и вариабельный хвост около 100 нм, липиды отсутствуют, однако инактивируется хлороформом; устойчив при pH 7-9, содержит шесть полипептидов. Основной хозяин *M. tuberculosis* и *M. smegmatis* mc^2 155, в котором фаг размножается в растворе Tris-HCl с 2 mM CaCl₂, при концентрации 5×10^7 оптическая плотность суспензии при 610 нм – 0.3.

Литический микобактериофаг вводит свою ДНК в бактериальную клетку хозяина при использовании структурных белков фага. Но затем, под контролем ДНК фага, синтезируются эндолизины, называемые холинами и разрушающие

пептидогликаны и миколовые кислоты плотной оболочки микобактерий, с освобождением фагов из них. Интересны попытки использовать доменные участки эндолизина А микобактериофага D29 для создания антибактериального препарата широкого спектра действия, разрушающего протеогликины как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Для этого определяют специфические последовательности ДНК, кодирующие доменные участки эндолизина, и, клонируя их в *E.Coli*, получают белковые или пептидные антимикробные продукты (Pohane A., et al., 2015).

В 2016 г. группа Natfull из Питтсбургского университета доложила о полностью секвенированном 61 штамме микобактериофагов, выделенных из окружающей среды с помощью *M.smegmatis* mc²155, распределенных в различные кластеры, с нуклеотидной последовательностью каждого – около 52 тыс. нуклеотидов (Gr. Natfull et al., 2016).

Лабораторное приготовление микобактериофагов, в частности, препаратов литического микобактериофага для их применения в культуре клеток или для экспериментов *in vivo*, а также, очевидно, для терапевтического применения, связано, прежде всего, с необходимостью удаления бактериальных эндотоксинов (липополисахаридов) и эндолизинов. Традиционные способы концентрирования фагов путем преципитации с помощью полиэтиленгликоля, высокоскоростного центрифугирования, выделения в градиенте плотности хлористого цезия для приготовления препаратов микобактериофага непригодны, поскольку они приводят к их нежизнеспособности (Bonilla N. et al, 2016). В связи с этим, старые работы по применению литического микобактериофага, в том числе, в экспериментальных исследованиях (Курунов Ю.Н., 2001), вызывают много вопросов. В частности, ультрацентрифугирование микобактериофага, полученного из лизата *M.smegmatis* при 40 тыс. обор/мин, приводит к потере им своих биологических свойств. В связи с этим, разработано хроматографическое выделение микобактериофага (Liu K. et al, 2012).

Эндотоксины (ЛПС) при введении в макроорганизм, вызывают широкий спектр патофизиологических процессов: токсический шок, повреждение клеток,

индукцию цитокинов. Эффект эндотоксинов оценивается в единицах эндотоксина; одна единица которого соответствует действию 100 пг ЛПС E.Coli. Растворы, которые можно вводить людям, ограничиваются 20 ед. /мл. В недавно опубликованных работах способы размножения фагов с их очисткой от эндотоксинов сопровождаются обработкой препаратов хлороформом. Однако, наш объект – микобактериофаг D29 не мог быть обработан хлороформом, поскольку при этом он теряет жизнеспособность. Поэтому, после наработки фагового бактериального лизата *M.smegmatis*, используется преципитация микобактериофага с помощью насыщенного раствора сульфата аммония с последующим центрифугированием при 20 тыс. об/мин и хроматографической очистке на колонке DEAE-sepharose (Liu K. et al, 2012) с элюцией микобактериофага в фаговом буферном растворе при повышающем градиенте до 1 М хлорида натрия.

1.5 Фаготерапия туберкулеза

Публикации о применении микобактериофагов для лечения экспериментальной туберкулезной инфекции мы находим в работах советских авторов начала 70-х годов, а также ссылки на несколько работ иностранных ученых 50-60-х годов. В работе Б.Н. Козьмин-Соколова и соавторов (Козьмин-Соколов Б.и др., 1975) были использованы литические микобактериофаги В1 и АG1, которые, по данным этих авторов, обладали весьма широким спектром литического действия в отношении туберкулезных микобактерий человеческого и бычьего типа, а также на кислотоупорные сапрофиты. Микобактериофаги в дозе 10^8 - 10^9 вводили подкожно беспородным белым мышам, инфицированным внутривенно вирулентной культурой МБТ однократно сразу после инфицирования или многократно 3 раза в неделю в разных группах. В некоторых группах для предотвращения образования антифаговых антител, лечение с помощью микобактериофагов комбинировали в сочетании с кортизоном. Изучали сроки гибели животных и патоморфологические признаки туберкулеза в легких с

оценкой индекса пораженности. Многократное введение микобактериофагов статистически достоверно увеличивало среднюю продолжительность жизни животных и приводило к ограничению распространенности туберкулезного поражения в легких.

В работе Гельберга С.И. и Шарова Г.И. (1975) экспериментальное исследование действия микобактериофагов штаммов Leo и 176 Л (последний был выделен из культуры МБТ) проводили на морских свинках и белых беспородных мышах. Морских свинок инфицировали подкожно 0,0002 мг свежей культуры вирулентного штамма Ravenel, в опытной группе вместе с инфицирующей дозой МБТ вводили 10^8 фаговых частиц. Это повторяли через 7 дней. Было показано уменьшение падежа животных и достоверное снижение индекса пораженности лимфоузлов и легких. В опытах на мышах, инфицированных внутривенно культурой H37Rv, микобактериофаг Leo вводили внутривенно в дозе 2×10^5 фаговых частиц, а также интраназально. В опытных группах показано уменьшение числа павших животных к месяцу после инфицирования, а также значительное уменьшение количества МБТ в органах животных по критериям бактериоскопии и культуральных исследований.

В работе Земсковой З.С. и Дорожкой И.Р. (1991) использовали литический в отношении вирулентного штамма МБТ H37Rv микобактериофаг DS6A для исследования его действия на инфицированных микобактериями H37Rv морских свинок. Известно, что этот вид животных является высокочувствительным к туберкулезной инфекции. Микобактериофаг вводили подкожно, примерно, по 10^5 фаговых частиц 2 раза в неделю. Исследовали сравнительные патоморфологические изменения у контрольных и опытных животных. Было установлено, что лечение микобактериофагом блокирует экссудативно-некротические изменения в тканях инфицированных свинок и приводит к развитию фибропластических процессов, т.е., в целом, оказывает благоприятный эффект на течение туберкулезного поражения у морских свинок, что, по мнению авторов, напоминает картину саркоидоза. Однако,

противотуберкулезный эффект микобактериофагов был менее эффективным, чем длительное лечение изониазидом.

В последние годы интерес к лечению туберкулеза с помощью микобактериофагов значительно вырос и обсуждаются аспекты транспорта фагов к зонам туберкулезного воспаления, а также возможная инактивация микобактериофагов в результате образующихся специфических антител.

Trigo G. и соавторы (Trigo G. et al., 2013) при экспериментальной инфекции *M. ulcerans* на лапке мышей линии BALB/с показали эффективность применения литических микобактериофагов D29 для ликвидации специфического гранулематозного воспаления, а также распространение микобактериофага в регионарные лимфоузлы, что предполагало отсев инфекции *M. ulcerans*.

Китайские ученые изучают возможности применения микобактериофага D29 для ингаляционного применения, в связи с чем изучается оптимизация состава среды, в которой планируется проведение ингаляций микобактериофагами (Liu K. et al, 2012).

1.6 Микобактериофаги для ускоренного первичного обнаружения МБТ в образцах мокроты и фенотипического определения лекарственной чувствительности МБТ в клинических изолятах

Группа китайских ученых в 2011 г. показала высокую эффективность использования литического микобактериофага D29 для обнаружения МБТ в образцах мокроты. Метод определял МБТ в течение 2-х дней и был специфичным и более чувствительным по сравнению с культуральным методом на среде Левенштейн-Йенсена (Zhu C. et al., 2011). Принцип метода состоял в культивировании осадков мокроты в течение 24 часов, с последующим добавлением фага D29, инкубацией в течение 1 часа, инактивацией фага, не включившегося в микобактерии, и анализом зон лизиса (бляшкообразующих единиц) в культуре *M. Smegmatis* на чашке Петри.

1.7 Лекарственная чувствительность

Несмотря на развитие молекулярно-генетических методов быстрого определения лекарственной чувствительности МБТ в клинических образцах больных туберкулезом, генотипический анализ ДНК мутаций, ассоциированных с лекарственной устойчивостью для целого ряда инъекционных препаратов, в частности аминогликозидных антибиотиков, эти методы недостаточно эффективны, поскольку чувствительность определения ДНК мутаций составляет 80-90%, а для этамбутола – ниже 80%. Кроме того, для таких препаратов, как ПАСК, циклосерин, линезолид и др. эти методы не разработаны.

Показано, что полногеномное секвенирование некоторых фенотипически устойчивых в отношении аминогликозидов и этамбутола штаммов МБТ не выявляет ДНК мутаций, т.е., очевидно, эти случаи устойчивости имеют эпигеномный характер (Huang W. et al. 2011).

Таким образом, фенотипические методы не теряют свою актуальность и необходимо развитие новых, эффективных и экономичных фенотипических методов для определения лекарственной чувствительности/устойчивости МБТ в клинических изолятах.

В связи с этим размножение микобактериофагов использовали в качестве маркеров метаболизма МБТ и его ингибирование в присутствии антибактериальных агентов. Группа исследователей в Англии под руководством Drobniowski A. в 1999 г. показала возможность определения лекарственной чувствительности клинических изолятов МБТ путем количественного подсчета числа бляшкообразующих единиц, микобактериофага D29 – зон лизиса в чашках Петри на микробном «газоне» быстрорастущих нетуберкулезных микобактерий *M. Smegmatis* (Eltringham I. et al., 1999).

Английская компания BIOTEC предложила набор реагентов FAST Plaque TV для быстрого (48 часов) определения лекарственной чувствительности к рифампицину на основе использования литического микобактериофага (Рисунок 4).

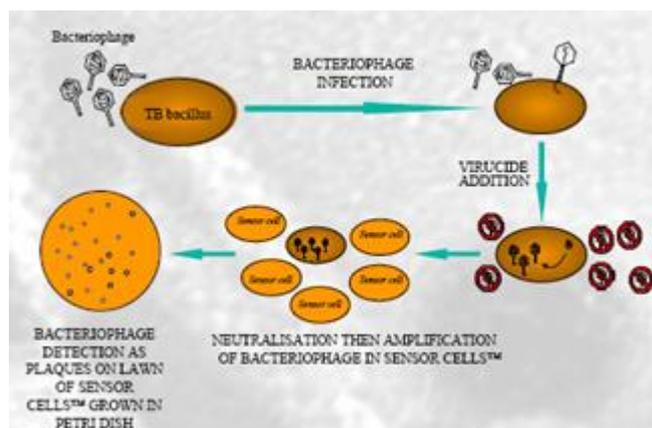


Рисунок 4 – Схема анализа для определения активности микобактериофага на микобактериях, устойчивых к действию антибиотика

Микобактерии инфицируются фагом, далее не связавшийся фаг нейтрализуется вируцидом, после чего микобактерии с фагом переносят на чашку Петри с посеянными микобактериями *M. Smegmatis*.

Микобактериофаг размножается в устойчивых МБТ и вокруг каждой образуется зона лизиса («плаков») *M. Smegmatis* на чашках Петри.

На основе этого же принципа разработан метод определения живых микобактерий *M. bovis*, который был использован для определения условий пастеризации молока (Swift B. et al., 2014). Было установлено, что число «плаков» почти точно соответствует числу колониеобразующих единиц (КОЕ) при посевах на плотные питательные среды. Очевидно, что этот метод требует всего 1-2 дня.

В последнее время появились разработанные тест-системы с использованием так называемых репортерных микобактериофагов, которые стали альтернативой традиционным культуральным исследованиям, встроенный в микобактериофаг ТМ4 ген люциферазы (Banaiee N., et al., 2001). На этой основе была разработана тест-система быстрой идентификации и определения лекарственной чувствительности клинических изолятов МБТ к препаратам первой линии (Banaiee N., et al., 2003). После 2-х и 4-х суточной инкубации с антибактериальными препаратами и 6 часов в присутствии микобактериофага,

экспрессирующего люциферазу, микроколичества образцов переносили в специальную кювету с субстратом люциферазы – люциферинном и результат измеряли с помощью люминометра. Люцифераза репортерный микобактериофаг сокращает время анализа лекарственной чувствительности МБТ, в среднем, до 3-х дней вместо 8-9 дней при использовании Bactec 460 и Bactec 960. Однако, несмотря на разработанное устройство для таких исследований эта технология не получила дальнейшего развития. Затем был разработан флуоресцирующий репортерный микобактериофаг на основе встроенного в микобактериофаг гена *phsp*, экспрессирующего зеленый флуоресцирующий белок GFP – green fluorescing protein. Возможность встраивания в геном литического фага D29 с помощью электропорации фрагмента ДНК, экспрессирующего флуоресценцию, была показана Da Silva J. et al., 2013.

В отличие от люцифераза репортерного микобактериофага *phspGFP*, микобактериофаг не требует использования специального субстрата, его размножение в МБТ может определяться с помощью флуоресцентной микроскопии. Однако и этот рекомбинантный микобактериофаг ТМ4 имеет недостаток, заключающийся в том, что он может инфицировать и непатогенные штаммы микобактерий.

Был создан флуоресцирующий микобактериофаг ТМ4 с высоким уровнем флуоресценции, который позволял визуализировать флуоресценцию МБТ и определить ее относительное ингибирование после 12 часов инкубирования в присутствии антибактериальных препаратов для чувствительных к ним МБТ (Jain P. et al., 2012). Анализ флуоресцирующих МБТ может быть проведен с помощью флуоресцентной микроскопии или с помощью проточной цитометрии.

В 2016 г. группа авторов доложила об использовании флуоресцентного красителя, позволяющего дифференцировать живые и мертвые микобактерии, что также может позволить проводить быстрое определение активности противотуберкулезных препаратов при сохранении лекарственной чувствительности МБТ с помощью проточной цитометрии исследуемой популяции микобактерий (Hendon-Dunn C.L. et al., 2016).

Эта же группа авторов из медицинского колледжа им. Альберта Эйнштейна в 2016 г. опубликовала работу, в которой была показана возможность использования флуоресцирующего рекомбинантного микобактериофага TM4 с двойной репортерной функцией (Jain P. et al., 2016). В этой системе один из генов, кодирующих экспрессию зеленого флуоресцирующего белка (GFP), экспрессировался соответственного росту МБТ, тогда как другой ген, кодирующий красный флуоресцирующий белок, экспрессировался только под влиянием стрессорных генов МБТ, вызванных действием изониазида. Флуоресценция красного цвета обнаруживалась только в дормантных клетках (так называемые микобактерии – персистеры), которые возникали после достаточно длительной инкубации в присутствии 1 мкг изониазида.

В 2012 г. Pholwat S. и сотрудники (Pholwat S. et al., 2012) опубликовали первую работу, в которой использовали количественную ПЦР в реальном времени для определения ДНК микобактериофага D29 при анализе размножения микобактериофага в клетках МБТ, в том числе в клинических изолятах МБТ, с целью определения их лекарственной чувствительности или устойчивости в отношении 12 противотуберкулезных препаратов первой и второй линии. Инкубацию музейного штамма H37Rv и клинических изолятов с противотуберкулезными препаратами проводили в течение 48 часов в 96-луночных культуральных планшетах с последующей 24-часовой инкубацией с микобактериофагом D29. Количественный анализ ДНК фага проводили после центрифугирования культивируемых планшет и их температурного прогревания при 100 °С с использованием 5 мкл супернатанта для проведения ПЦР-анализа.

Была исследована лекарственная чувствительность от 10 до 30 изолятов в отношении 12 различных препаратов, которая была сопоставлена с культуральным исследованием этих изолятов на агаровой среде Миддлбрук 7H10 традиционным методом пропорций. Большинство полученных сравнительных результатов исследуемой технологии с использованием микобактериофага, которая требовала не более 4-х суток, совпадало с результатами определения лекарственной чувствительности/устойчивости культурального исследования

методом пропорций. Относительно недостаточный уровень совпадений (82%) отмечался в отношении исследований чувствительности к этамбутолу. Подобное сравнительное изучение минимальных ингибирующих концентраций с помощью предложенной технологии 4-х противотуберкулезных препаратов (изониазид, этамбутол, этионамид и ПАСК) подтвердило совпадение получаемых результатов с данными, полученными при использовании культурального исследования на агаровой среде.

Наконец, в 2014 г. той же группой авторов (Foongladda S. et al., 2014) была опубликована работа, в которой было изучено более 300 образцов клинических изолятов, полученных после культивирования в пробирках MGIT (ВАСТЕС) с последующим субкультивированием в системе Bactec MGIT и концентрированием культуры с помощью центрифугирования и исследованием лекарственной чувствительности/устойчивости к 10 противотуберкулезным препаратам первой и второй линии с использованием литического микобактериофага D29 с количественным анализом ДНК фага с помощью ПЦР в реальном времени. При этом критерием чувствительности изолята к препаратам в критических концентрациях стал прирост числа циклов порогового уровня флуоресценции (ΔC_t) в образцах с антибиотиком, по сравнению с контролем фага, более чем на 3 цикла. Результаты исследований сравнивались с результатами определений лекарственной чувствительности/устойчивости при использовании культивирования изолятов на агаровой среде методом пропорций. Результаты исследований лекарственной чувствительности в исследованных изолятах на основе применения микобактериофага по критериям совпадающих с результатами методом пропорций по большинству препаратов были на уровне 98%. В то же время, для ПАСК и этионамида уровень совпадений составлял 85% и 88% процентов, соответственно.

1.8 Липосомы и перспективы использования препаратов литических микобактериофагов для лечебного противотуберкулезного применения

Липосомы – это бислойные (моноламеллярные) или многослойные искусственные везикулы, состоящие из фосфолипидов, открытые в 1960 г. и используемые, в основном, в экспериментальной медицине, начиная с 70-х - 80-х годов прошлого столетия, для направленного транспорта лекарств. При диспергировании фосфолипидов в водной среде, везикулярные структуры образуются спонтанно, за счет гидрофильных головок, обращенных к водной среде, и гидрофобных частей молекулы, обращенных друг к другу. В результате физического дробления многослойных молекул, например, при ультразвуковой обработке или последовательной экструзии через миллиметровые фильтры до 0,1 мк (100 нм), образуются моноламеллярные или однослойные структуры (Рисунок 5 А, В).

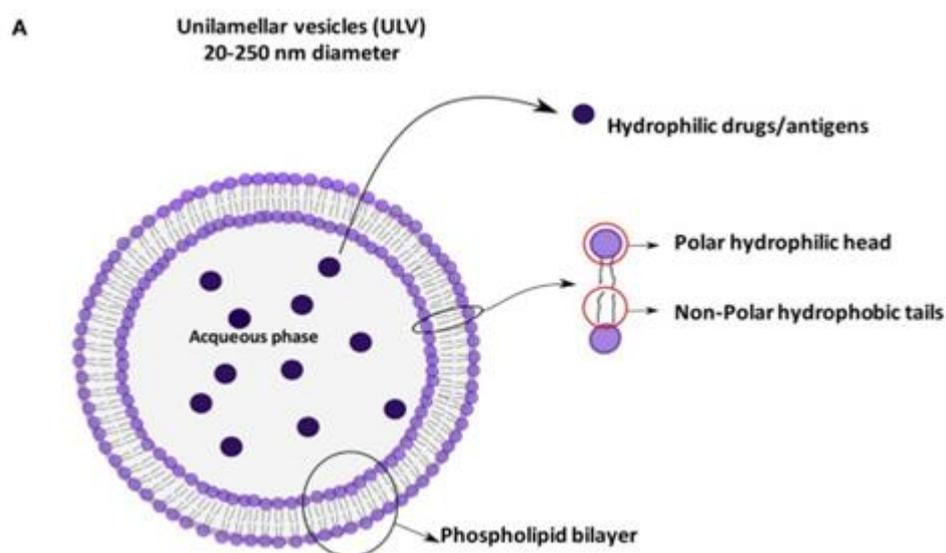


Рисунок 5 – А. Бислойная моноламеллярная везикула с гидрофильным «лекарством»

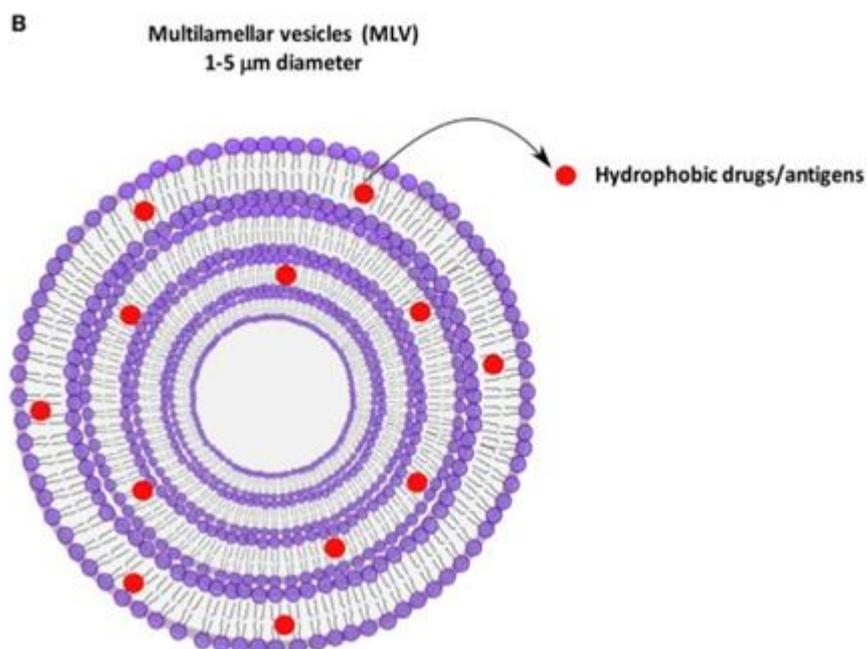


Рисунок 5 – В. Многослойная везикула, в мембрану которой включен гидрофобный (жирорастворимый) агент

Несмотря на длительную историю исследований по липосомам, интерес к ним, как к средству лекарственного транспорта, не угас и в конце 90-х и в последние годы (Abu Lila A.S., Ishida T., 2017). В связи с высокой биосовместимостью, биodeградебельностью и низкой токсичностью, возможностью инкорпорирования внутрь липосомных везикул гидрофильных веществ, защищенных от свободных радикалов и протеолитических ферментов, тропностью к макрофагальным элементам, возможностями придать им адресный характер с помощью связывания с антителами (иммунолипосомы), они стали очень популярным средством лекарственного транспорта в фармацевтике и, в зависимости от включаемых в состав липосом лекарств, при лечении различных вирусных, грибковых заболеваний, а также, в перспективе при лечении онкологических заболеваний. Липосомы могут включать в свой состав не только гидрофильные вещества, но и жирорастворимые, которые могут быть в составе гидрофобной мембраны. В зависимости от целей применения липосом, они могут быть катионными или анионными, Ph – чувствительными, т.е. освобождать содержимое в кислой среде. Липосомы могут быть достаточно вариabельными по

размеру: от 50-100 нм до 1000 нм, которые могут включаться в фагосомы. Для повышения стабильности мембраны липосом, наряду с различными фосфолипидами, чаще всего используются фосфотидилхолин, добавляется до 25% холестерина. Липосомы используются в молекулярной медицине для трансфекции в клетки *E. Coli* ДНК структур (плазмид) (Oskuee R. et al., 2016; Meisel J. And Gokel G., 2016). Липосомы рассматриваются в качестве носителя антигенов для разработки различных вакцин, в том числе терапевтических. В то же время недостатком липосом считается короткое время циркулирования (Nisini R. et al., 2018). Известны методы с использованием липосом с инкорпорированным потенциально флуоресцентным маркером для визуализации воспалительных очагов в организме экспериментальных животных (Tansi F. et al., 2015).

1.9 Липосомы для лечения туберкулеза

Это же касается и проблемы лечения туберкулеза. Первая работа по применению противотуберкулезного препарата – стрептомицин при экспериментальной туберкулезной инфекции была опубликована в 1982 г. (Vladimirsky M., Ladigina G., 1982). В этой работе, а также в следующей (Владимирский М. и др., 1983) были показаны результаты сравнительного терапевтического эффекта липосомального стрептомицина (липосомы размером 40-80 нм), при генерализованном экспериментальном туберкулезе у мышей BALB/c. Достоверно более выраженное ингибирование числа МБТ в тканях легких, печени и селезенки, а также существенное удлинение времени жизни пораженных животных при использовании липосомального стрептомицина по сравнению с равной дозой растворимой формы стрептомицина. В дальнейшем (Vladimirsky M., Ladigina G., 1986), при изучении фармакокинетики растворимого и липосомального стрептомицина с оценкой включенного на гранулематозные ткани изотопно-меченого стрептомицина, было показано примерно трехкратное превышение включения в ткани пораженных легких и селезенки при

использовании липосомальной формы по сравнению с раствором антибиотика. При этом резко измененные гранулематозные ткани этих органов обладали высоким уровнем включения липосомальных препаратов. Подобные данные были также получены при исследованиях липосомального изониазида. В последующих публикациях различных авторов такого рода тропность липосомальных препаратов была подтверждена при исследовании липосомального рифампицина и изониазида (Deol P. et al., 1997). Основной проблемой при использовании липосомальных препаратов, которая рассматривалась в международной литературе, считалось высокое накопление этих относительно гепатотоксичных препаратов в печени. Однако, затем появились разработки липосом-содержащих лекарств, обработанных полиэтиленгликолем, что обеспечивало значительное уменьшение включения липосом в ткани печени - так называемые stealth (стелс) - невидимые для печени липосомы. В 2000-е годы интерес к использованию липосом для лечения туберкулеза вырос. Было предложено ингаляционное введение липосомальных антибиотиков (Justo O., Moraes A., 2003), в частности, канамицина (Justo O., Moraes A., 2005), а также изониазида (Nkanga C. et al., 2017). Первые попытки включения микобактериофагов в липосомы были представлены в 2015 г. (Nieth A. et al., 2015).

Авторы включали в липосомы не литический (умеренный) микобактериофаг TM4 и показали, что при включении бактериофага в липосомы, его транспорт в клетки эукариотов выше, чем при использовании свободного (не включенного) бактериофага.

1.10 Дормантность микобактерий туберкулеза и применение микобактериофагов

Установлено, что от одной четвертой до одной трети населения Земли инфицировано микобактериями туберкулеза, но не являются больными туберкулезом, т.е. туберкулезная инфекция у этих людей находится в латентной форме. Это означает, что МБТ могут выживать и без их размножения (Dye S.,

Williams B., 2010; Barrios-Payán J. et al., 2012). Дормантность МБТ была продемонстрирована на мышах – так называемая Cornell модель дормантности. В соответствии с этой моделью, мышей инфицировали внутривенно вирулентным штаммом МБТ, туберкулезная инфекция активно развивалась, затем мышей лечили противотуберкулезными препаратами до тех пор, пока МБТ в тканях больше не определялась. Однако, после обработки мышей иммуносупрессивными препаратами, в частности, кортикостероидами, туберкулезная инфекция реактивируется (McCune R.M. et al., 1966). Эта модель близка к человеческой картине заболевания. Другие модели дормантности МБТ *in vitro* связаны с их инкубацией в условиях голодания (отсутствие источников углерода) или при длительной инкубации (5-6 мес.) при пониженном содержании кислорода (модель Wayne). Реаэрация микобактерий приводит к восстановлению их метаболизма. Показана возможность реактивации МБТ у людей через десять лет после начального инфицирования (Lillebaek T. et al., 2003). Показано также, что не размножающиеся МБТ могут находиться в образцах мокроты больных активной формой туберкулеза, но они могут быть реактивированы под влиянием белков Rpf (resuscitation promoting factor), которые индуцируются растущими микобактериями и, соответственно, могут присутствовать в супернатантах растущих культур (Mukamolova G. et al., 2010). Эта реактивация не размножающихся (дормантных) МБТ достигается также с помощью рекомбинантных белков группы Rpf (Nikitushkin V., Demina G., Kaprelyants A., 2016). Мукамоловой Г.В. и соавторами также показано, что возникновение дормантных МБТ в мокроте обусловлено действием противотуберкулезных препаратов, в частности, обсуждается действие основных препаратов первой линии. В то же время, возможно, очень незначительная часть популяции (менее 1%) может быть источником продукции Rpf белков, реактивирующих латентную (дормантную) популяцию МБТ, что и приводит к реактивации туберкулезного процесса.

Очевидно, что к дормантность МБТ обусловлена, возможно, в процессе первичного инфицирования активностью иммунной системы макроорганизма

(Gengenbacher M. and Kaufmann S., 2012), которая ингибирует метаболизм микобактерий, приводя их к дормантности. Эти авторы называют этот процесс выживания микобактерий как «успех через дормантность».

В научной литературе также обсуждаются новые пути и проводятся исследования с целью предупреждения реактивации МБТ в течении химиотерапии туберкулеза.

Анализ реактивации дормантных МБТ реализуется при их культивировании только в жидкой питательной среде (традиционно в Миддлбрук 7Н9) и тестируется при образовании колоний в лунках планшета с питательной средой. В последние годы альтернативой оценки реактивации дормантных МБТ стала возможность применения микобактериофагов с двойным сигналом флуоресценции для быстрого определения восстановления метаболизма микобактерий при использовании Rpf белков (Jain P. et al., 2016).

1.11 Туберкулезная гранулема *in vitro*

Туберкулезное инфицирование, начиная с легочных альвеол, сопровождается аккумуляцией – инфильтрацией вокруг инфекта клеток туберкулезного воспаления, которое представляет собой ответ хозяина, для того чтобы инактивировать микобактерии и ограничить распространение инфекции. Образование специфических гранул в тканях различных органов является процессом, отображающим различные стороны и стадии взаимодействия между макроорганизмом и микобактериями туберкулеза. В классическом виде у человека туберкулезная гранулема представляет собой вал макрофагов, окруженный лимфоцитами с некротическим центром, содержащим МБТ (М.М. Авербах, 2010).

Клетки такого микроинфильтрата, состоящие из макрофагов и окружающих их лимфоцитов, представляют собой микрогранулему туберкулезного инфицирования. В результате дальнейшего взаимодействия возбудителя и иммунного ответа клеток макроорганизма с активацией макрофагов и иммунных

T-лимфоцитов, развитие процесса может закончиться ингибированием метаболизма микобактерий с их трансформацией в персистирующую форму или с распространением инфицирующего агента за пределами микрогранулемы. Группой авторов (Seitzer U. And Gerdes J. 2003; Kapoor N. et al., 2013) была разработана модель туберкулезной гранулемы *in vitro* при использовании мононуклеарных клеток периферической крови людей, инфицированных МБТ.

Эта модель была предназначена для исследования динамики развития туберкулезной гранулемы с возможностями оценить эффективность иммунной системы хозяина с анализом различных факторов иммунного ответа и исходами в дормантность или распространение инфекции. В работах Fitzgerald L.E. et al. 2014; Guirado E. et al. 2015 обсуждается и исследуется клеточный состав гранулемы и индукция иммунологически значимых цитокинов (индуцированных интерферона-гамма, фактора некроза опухолей и спектра интерлейкинов) в динамике, определяемых в туберкулезной гранулеме *in vitro*, характерные при использовании мононуклеаров, полученных от инфицированных лиц с латентной инфекцией, в отличие от неинфицированных, а также экспрессия спектра генов МБТ.

В работах (Kiran D. et al., 2016) были описаны различные условия получения гранулемы человека *in vitro*, которые, в основном, состояли в культивировании от 500 тыс до 1 млн лимфоцитов и моноцитов периферической крови с инфицированием вирулентным штаммом МБТ – H37Rv в соотношении 1 микобактерия на 10 лимфоцитов или до равных соотношений.

В нашей работе были воспроизведены условия получения человеческой туберкулезной гранулемы *in vitro* с целью анализа возможностей исследования эффективности действия литических микобактериофагов на МБТ в присутствии большого количества лимфоцитов и моноцитов крови. При этом одной из целей исследования было сравнение эффективности действия микобактериофагов, включенных и не включенных в липосомы.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Культура перевиваемых макрофагов

В исследовании использовали культуру перевиваемых мышинных макрофагов RAW 264.7 (ATCC) из банка клеточных культур НИИ экспериментальной кардиологии РКНПК МЗ РФ (Российского кардиологического научно-производственного комплекса Минздрава РФ). Клетки макрофагов после размораживания заседали на поверхность 75см² в питательной среде RPMI 1640 (20% Fetal Bovine Serum (FBS), L-Glutamine 2mM, Pen Strep, Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids (MEMNEAA), MEM Vitamins, Sodium Pyruvate 1 mM (Gibco)) и культивировали в CO₂ инкубаторе фирмы NuAire (США) с 5% CO₂ при 37⁰С.

2.2 Микобактериальные культуры

В работе использовали следующие штаммы: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, полученный из Государственного института стандартизации и контроля биопрепаратов (ГИСК) им. Л.А. Тарасевича; *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 из коллекции ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи. Культуры клинических изолятов МБТ получали из лаборатории микробиологии клиники ФГБУ НМИЦ ФПИ МЗ РФ и бактериологической лаборатории ГБУЗ Московской области «Московский областной клинический противотуберкулезный диспансер» после их первичного культивирования в жидкой питательной среде с использованием автоматизированной системы Bactec MGIT.

2.3 Микобактериофаг D29

В работе использовали микобактериофаг D29, любезно предоставленный проф. Gr.Hatfull Института бактериофагов Питтсбургского университета (США).

2.4 Размножение и определение биологической активности микобактериофага D29

Для размножения литического микобактериофага D29 использовали *M.smegmatis*. *M.smegmatis* культивировали в жидкой питательной среде Миддлбрук 7Н9 с 10% Oleicacid Albumin Dextrose Catalase (OADC) и 1 мМ CaCl₂. Для размножения микобактериофага использовали культуру оптической плотностью 1,0 (плотность бактериальной суспензии на спектрофотометре при длине волны 600 нм). Затем на чашки для культивирования вносили смесь: 250 мкл суспензии *M.smegmatis*, 100 мкл фага 10⁵ бляшкообразующих единиц в мл (БОЕ/мл) и 3 мл полужидкого агара. Инкубировали в термостате при 37⁰С в течение суток, после чего добавляли по 5 мл фагового буферного раствора и делали надсечки наконечником в слое полужидкого агара. Затем инкубировали 4 часа при 4⁰С. После инкубации буферный раствор, содержащий фаговые частицы, фильтровали через стерильный миллипоровый фильтр 0,22 мк. Титр микобактериофага определяли при десятикратном титровании на чашках с *M.smegmatis*. Биологическую активность фага определяли, умножая число получаемых плаков (зоны лизиса) на чашках с газоном *M.smegmatis* на соответствующее разведение.

2.5 Получение концентрированного высокоочищенного препарата микобактериофага D29

Готовили суспензию *M. smegmatis* после ее роста на плотной питательной среде Миддлбрук 7Н10 в объеме 10 мл жидкой среды 7Н9 с 2мМ CaCl₂ с оптической плотностью 1,0. Затем инкубировали сутки при 37⁰С, после чего добавляли 1 мл микобактериофага D29 с концентрацией 10⁸ БОЕ/мл и инкубировали 72 ч на шейкере (2-3 качаний в мин.) при 37⁰ С. Затем суспензию центрифугировали при 3 тыс. об/мин 15 минут. Супернатант фильтровали через стерильный миллипоровый фильтр 0,22 мк. К полученному раствору фага в концентрации 10⁹ БОЕ/мл добавили насыщенный раствор сульфата аммония в соотношении 1:1,5. Перемешивали полученный раствор и оставляли на 2 часа в холодильнике при 4⁰С. После этого разливали в центрифужные пробирки и центрифугировали при 20 тыс. об/мин 30 минут. После центрифугирования аккуратно удаляли супернатант. Осадок был распластанным по стенкам пробирок, неустойчивым. Весь осадок объемом 1,5 мл растворяли в 4,5 мл фагового буфера с 1мМ хлоридом кальция. Полученный коллоидный раствор диализовали на магнитной мешалке против 0,05М Tris-HCl, 100mMNaClpH 7,5 буферного раствора в течение 24 ч. при 4⁰С.

Полученный микобактериофаг после размножения в культуре *M. smegmatis* и определения его биологической активности очищали от лизата микобактерий, содержащего комбинацию липаз, протеаз и разрушенных молекул ДНК, с помощью ионно-обменной хроматографии на колонке DEAE-sepharose (Adriaenssens E., Lehmand S., Vandersteegen K. et al, 2012). Препарат фага с колонки во время хроматографии в процессе последовательного увеличения ионной силы буферного раствора до 0,5-1 М NaCl. Собирали второй пик белка при промывании колонки 1М NaCl. Препарат микобактериофага диализовали против фагового буферного раствора Tris-HCl pH 7,5 (Tris50 mM, MgSO₄x7H₂O 8,5 mM, CaCl₂ 1mM, NaCl 100 mM), сохраняли при 4⁰С и стерилизовали с помощью фильтрации через 0,22 мк фильтры (Millex GP 0,22 m Millipore).

Биологическая активность концентрированного высокоочищенного препарата микобактериофага D29 сохранялась в течение полугода без изменения.

2.6 Получение липосомального препарата микобактериофага D29

Для получения фосфолипидной пленки брали 40 мг яичного фосфатидилхолина (фирма Lipoid, Германия), 7 мг холестерина (Sigma) и 8,8 мг твин 80. Все компоненты растворяли в 3 мл 96% этанола, затем высушивали на роторном испарителе до получения липидной пленки. После полного высыхания фосфолипидную пленку снимали путем добавления 3 мл очищенного препарата микобактериофагов D29 в концентрации фаговых частиц не менее 10^9 БОЕ/мл. Колбу с фосфолипидной пленкой встряхивали в течение 5-10 минут. Полученные многослойные липосомы подвергали последовательной экструзии через фильтры с размером пор 5 микрон однократно. Затем проводили 20-кратную экструзию через фильтры с размером пор 0,4 мк. Далее препарат центрифугировали при 20 тыс. об/мин. в течение 30 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость максимально удаляли. К осадку добавляли 1 мл стерильного раствора фагового буфера. Концентрацию микобактериофага, включенного в липосомы, измеряли с помощью количественной ПЦР-РВ. Полученный стерильный раствор фаговых липосом хранили при 4⁰С.

2.7 Электронно-микроскопическое изучение липосомального микобактериофага D29

Полученный материал липосомального микобактериофага D29 исследовали методом электронной микроскопии с использованием формвар-углеродных подложек. На медные сетки наносили формваровую пленку, а затем в вакуумной установке напыляли углерод. Препараты готовили двумя способами: а) материал наносили непосредственно на формвар-углеродные подложки и контрастировали

1% водным уранил-ацетатом; б) материал наносили на формвар-углеродные подложки, предварительно обработанные в газовом разряде, что позволяло приобрести гидрофильность (смачиваемость) подложки. В первом случае происходило положительное контрастирование с черным окрашиванием ДНК головки микобактериофага. В случае гидрофильности подложки получали негативное контрастирование, хорошо определяемое при гидрофобности оболочки самих липосом.

2.8 Выделение ДНК микобактериофага D29 из исследуемых образцов

Клеточный материал, содержащий микобактериофаг D29, собирали с поверхности лунок планшета, помещали в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5мл и центрифугировали в течение 15 мин. при 16000g. Надосадочную жидкость удаляли. Затем к осадку добавляли 200 мкл ddH₂O, тщательно перемешивали и выдерживали в термостате при 95⁰С в течение 30 мин. Полученный раствор ДНК хранили при минус 20⁰С в течение года.

2.9 Выделение ДНК из культур МБТ

Для выделения ДНК из культур МБТ использовали набор «Экспресс-Туб» (ООО «Синтол»). 100 мкл клеточного материала, собранного с поверхности лунок планшета, помещали в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл и центрифугировали в течение 10 мин. при 16000g. Надосадочную жидкость удаляли. Затем к осадку добавляли 50 мкл лизирующего раствора В. Содержимое пробирок тщательно перемешивали на микроцентрифуге-встряхивателе и выдерживали в термостате при 80⁰С в течение 15 мин, периодически перемешивая. К образцам добавляли 800 мкл элюирующего раствора,

перемешивали и выдерживали в термостате в течение 5 мин. при 80⁰С. Полученный раствор ДНК хранили при минус 20⁰С в течение года.

2.10 Количественное определение ДНК микобактериофага D29 и ДНК МБТ методом ПЦР в реальном времени

Праймеры и зонды для ПЦР-РВ были синтезированы фосфитамидным методом на олигонуклеотидном синтезаторе ASM - 2000 (Россия, Новосибирск) с использованием реактивов ООО «Синтол» (Россия, Москва) и очищены в ПААГ и с помощью ВЭЖХ.

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали приборы CFX96 («Bio-Rad», США) и АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия). Реакционная ПЦР-смесь объемом 25 мкл включала в себя: разбавитель (в составе: 10x ПЦР-буфер (KCl, 500 mM; Трис-HCl, pH 8,8); MgCl₂, 25 mM; глицерол, 50 %; вода для ПЦР), эквимольную смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP) по 250 мкМ каждого, флуоресцентный зонд Pb_D29_up_FAM в количестве 3 пмоль, праймеры D29-F и D29-R в количестве по 5 пмоль каждого праймера, смесь праймеров и зонда СПЗ «regX_MTB_ROX» (ООО «Синтол», Россия), смесь праймеров и зонда СПЗ «ВПК_R6G» (ООО «Синтол», Россия), ВПК (рекомбинантная плазида pGem-T со встроенным специфическим фрагментом ДНК (конечная концентрация при разведении составляет 100 копий·мкл⁻¹) (ООО «Синтол», Россия)), 2,5 ед. Таq-полимеразы (ООО «Синтол», Россия) и 5 мкл образца ДНК. Амплификацию проводили по программе: 2 мин. – 95⁰С; 40 циклов: 15 сек. - 95⁰С, 40 сек. – 63⁰С.

2.11 Модель перевиваемой линии мышинных макрофагов

В данной модели использовали культуру перевиваемых мышинных макрофагов RAW 264.7 (ATCC), клетки которой после размораживания заседали на поверхность 75см^2 в питательной среде RPMI 1640 с добавками (20% Fetal Bovine Serum (FBS), L-Glutamine 2mM, Pen Strep, Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids (MEMNEAA), MEM Vitamins, Sodium Pyruvate 1mM (Gibco)) и культивировали в CO_2 инкубаторе с 5% CO_2 при 37°C . После кратковременной адаптации и предварительного культивирования макрофагальных клеток в течение 7 дней их подсчитывали с помощью счетчика клеток Scepter и инфицировали размножающимися МБТ вирулентного штамма H37Rv, количество микробных клеток которых было предварительно измерено с помощью количественного анализа ДНК МБТ по однокопийному гену *regX3*, в соотношении 15 микобактерий на один макрофаг. Инфицированные макрофагальные клетки сутки инкубировали в CO_2 инкубаторе с 5% CO_2 при 37°C . После суточной инкубации отмывали один раз средой RPMI 1640 без добавок, затем клетки снимали в 8 мл среды RPMI 1640 и аккуратно пипетировали. Далее в пробирки объемом 15 мл вносили 3 мл Ficoll-Paque (GEHealthcare) и добавляли по 4 мл клеток. Центрифугировали при 2000 об/мин 20 мин. Собирали интерфазу в 50 мл пробирку, после чего доливали среду RPMI 1640 без добавок до 50мл для отмывки, центрифугировали при 1500 об/мин 15 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость удаляли путем декантирования. К полученному осадку добавляли 3 мл среды RPMI 1640 с добавками, перемешивали. Засевали по 500 мкл в лунки 6-луночного планшета фирмы Eppendorf в концентрации $1,5 - 1,7 \times 10^5/\text{мл}$. В лунки планшета вносили по 1,5 мл питательной среды RPMI 1640 с биодобавками и сутки инкубировали в CO_2 инкубаторе с 5% CO_2 при 37°C . После инкубации в две опытные лунки планшета добавляли по 100 мкл липосомального препарата микобактериофага D29, в две другие лунки – по 100 мкл очищенного фага с биологической активностью 10^8 БОЕ/мл на 1 мл фагового буферного раствора, в две контрольные

лунки вносили по 100 мкл фагового буферного раствора. Планшет инкубировали сутки. На следующий день максимально удаляли среду. Во все лунки добавляли по 200 мкл среды RPMI 1640. Клетки макрофагов из опытных и контрольных лунок снимали с поверхности в объеме 200 мкл среды RPMI 1640 с помощью специальных скребков, дважды замораживали при минус 20⁰С и оттаивали при 37⁰С, после чего засеивали на чашки с агаром Миддлбрук 7Н10 в объеме 100 мкл. Чашки культивировали в СО₂ инкубаторе с 5% СО₂ при 37⁰С в течение 3 недель с подсчетом числа колоний МБТ. Из остального объема клеточного материала (100 мкл), полученного с поверхности лунок планшета, выделяли ДНК МБТ и ДНК фага и проводили количественный анализ методом ПЦР-РВ.

2.12 Модель туберкулезной гранулемы *in vitro*, образуемой мононуклеарами крови человека, инфицированными МБТ

10 мл венозной крови от пациента с латентной инфекцией разводили 1:1 физиологическим раствором, перемешивали. В пробирки объемом 15 мл разливали по 3 мл раствора препарата Ficoll-Paque, на который наслаивали по 4мл разведенной крови. Центрифугировали при 2000 об/мин 20 мин. Затем собирали клеточную интерфазу, образуемую на границе раздела сред в 50 мл пробирку. Отмывали 2 раза: первый раз – физиологическим раствором (30 мл), второй раз – средой RPMI 1640 без добавок (20 мл). Центрифугировали при 3000g 15 мин, удаляли надосадочную жидкость. Просчитывали количество клеток с помощью счетчика клеток Scepter или с помощью камеры Горяева. Полученную суспензию мононуклеаров доводили до концентрации не менее чем 5,0 x10⁵/мл и разливали в 24-луночный планшет по 500 мкл суспензии. В каждую лунку планшета вносили по 500 мкл среды RPMI 1640 с 10% FBS. Через двое суток производили смену среды. Контроль за культурой клеток проводили с помощью инвертированного микроскопа Leica DMIL при увеличении 1:200 с камерой Leica DFC 420. Образование гранулемы происходило на 12-14-й день.

2.13 Гистологическое исследование гранулемы

После образования гранулемы на 13 сутки, из одной лунки максимально удаляли супернатант. К клеточному материалу добавляли 1 мл 4% раствора формалина, инкубировали 30 мин. Затем аккуратно переносили весь объем в 1,5 мл пробирки и центрифугировали 10 минут при 13000 об/мин. После центрифугирования удаляли супернатант. Дважды отмывали раствором PBS с последующим центрифугированием в течение 10 минут при 13000 об/мин. Образец гранулемы закладывали в парафин и делали срезы через 5 мк.

2.14 Определение дормантности и реактивации МБТ

2.14.1 Подготовка опытного образца культуры МБТ

Готовили суспензию микобактерий из вирулентного штамма H37Rv с оптической плотностью 1,0. В подготовленную суспензию в объеме 3-х мл добавляли 30 мкл рифампицина для получения конечной концентрации 5 мкг/мл и часть МБТ суспензии оставляли без рифампицина. 3-е суток инкубировали в термостате при 37⁰С на шейкере. После 3-х суточной инкубации МБТ в присутствии рифампицина (5 мкг/мл), пробирку центрифугировали 15 мин на 3000 об/мин. Удаляли надосадочную жидкость. К осадку добавляли 2 мл воды, перемешивали и еще раз центрифугировали 15 мин. при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, к осадку добавляли 3 мл среды 7H9, перемешивали, после чего разливали в 48-луночный планшет (Eppendorf).

2.14.2 Подготовка супернатанта растущей культуры МБТ, содержащего белок Rpf

Из пробирки MGIT (ВАСТЕС) с вирулентным штаммом H37Rv после получения первичного роста, отбирали верхнюю, жидкую часть. Центрифугировали 15 мин. при 3000 об/мин. Фильтровали через фильтры с размером пор 0,22 мк.

2.14.3 Реактивация dormantных клеток МБТ

Образцы подготовленных культур были разделены на 3 группы:

1. 100 мкл вирулентного штамма H37Rv, 500 мкл жидкой питательной среды Миддлбрук 7H9 с 10% Olicacid Albumin Dextrose Catalase (OADC) и 1 мМ CaCl₂.
2. 100 мкл вирулентного штамма H37Rv с рифампицином, 500 мкл жидкой питательной среды Миддлбрук 7H9 с 10% OADC и 1 мМ CaCl₂.
3. 250 мкл супернатанта растущей культуры, содержащей Rpf белок, 100 мкл вирулентного штамма H37Rv с рифампицином, 250 мкл жидкой питательной среды Миддлбрук 7H9 с 10% OADC и 1 мМ CaCl₂.

Образцы культивировали в 48-луночном планшете в течение 3-5 суток. После чего в опытные группы вносили по 25 мкл микобактериофага D29 в концентрации 10⁸ БОЕ/мл, инкубировали сутки. Исследуемые образцы переносили в 1,5 мл пробирки, выделяли ДНК фага и проводили количественный анализ методом ПЦР-РВ.

2.15 Технология ускоренного фенотипического метода определения лекарственной чувствительности клинических штаммов МБТ с использованием количественного анализа ДНК микобактериофага D29

2.15.1 Подготовка культур МБТ

Для метода использовались культуры МБТ после культивирования в пробирках MGIT (ВАСТЕС) с положительным результатом роста.

Культуры клинических штаммов МБТ вносили по 200 мкл в лунки 24-луночного культурального планшета. Количество лунок зависело от количества используемых антибактериальных препаратов, к которым определялась чувствительность: (N+1), где N – количество проверяемых антибактериальных

препаратов, 1 – контрольная лунка. В каждую лунку, содержащую 200 мкл культуры клинического штамма МБТ, добавляли 800 мкл жидкой питательной среды Миддлбрук 7Н9, содержащей 10% ростовой добавки OADC и 1 mM хлорида кальция, 10 мкл субстанций антибактериальных препаратов, содержащих критические концентрации исследуемых противотуберкулезных препаратов, кроме контрольной пробы. Культуры МБТ инкубировали в присутствии антибактериальных препаратов в течение 48 ч. После инкубации, во все лунки, включая контрольную, вносили по 50 мкл микобактериофага D29 с активностью 10^8 БОЕ/мл и продолжали инкубирование культур еще в течение 48 ч.

2.15.2 Выделение общей ДНК (МБТ и фага D29)

На 5-е сутки культивирования образцы переносили в пробирки типа Eppendorf объемом 1,5 мл. Образцы центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин. Аккуратно удаляли супернатант и к осадку добавляли по 200 мкл деионизированной воды, затем перемешивали содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе. Образцы инкубировали в термостате при 95°C в течение 30 мин. После инкубирования раствор ДНК использовали для дальнейшего исследования с помощью ПЦР-РВ.

2.16 Статистическая обработка результатов

Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Excel (Microsoft Office). Для оценки статистической значимости различий средних величин применяли критерий t-тест Стьюдента. Статистически достоверными считались различия при $p < 0,05$.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Разработка набора для одновременного количественного анализа микобактериофага D29 и МБТ методом ПЦР-РВ

Для одновременного количественного анализа микобактериофага D29 и МБТ мы разработали мультиплексную ПЦР-РВ систему, содержащую три независимые реакции в одной пробирке, позволяющие одновременно выявлять ДНК микобактериофага D29 и ДНК МБТ.

Для обнаружения микобактериофага D29 использовали специфический фрагмент из последовательности полного генома микобактериофага D29 (GenBank AF022214.1):

```

1  ggtcggttat gcggccgagc catcctgtac gggttccaа gccgatcaga agcacgggсc
61  gacgctagag gcctcgccc aggcgctgtg agccaccagg agccacgaac tegcgaccca
121 cggggagtta tacccccgga atcggctacg ggccatacag gcccggtatc tgtcaaggтg
181 atctacgcca ctccgtgggg тggctgtcaa acgcagactc cttccctatt aatgaggggc
241 tgaaggcccc tctaagagc cgcttcaggc ggctcgctaa gagegccttt cgggcgctcc
  
```

Из этой последовательности были выбраны праймеры (выделены желтым цветом) и зонд (выделен синим цветом) для ПЦР-РВ амплификации 225 н.п.-фрагмента (Таблица 2). Зонд был сконструирован по типу TaqMan, т.е. включал на 5'-конце флуорофор, на 3'-конце – гаситель, а разобщение флуорофора и гасителя происходило за счет 5'-экзонуклеазной активности Taq-полимеразы.

Таблица 2 – Праймеры и зонды, специфичные микобактериофагу D29

Обозначение	Последовательность 5' – 3'
D29-F	agc-cga-tca-gaa-gca-cgg-gc
D29-R	agc-ggc-tct-tag-gag-ggg-cc
Pb_D29_up_FAM	(FAM)-ag-cca-cga-act-cgc-gac-cca-cgg-(RTQ1)

Для обнаружения и количественного анализа МБТ использовали специфические праймеры и зонд из последовательности фрагмента

однокопийного гена *regX3* МБТ из ПЦР-РВ мультиплексной системы для обнаружения и определения количества МБТ ООО «Синтол».

Для исключения ложноположительных результатов, в систему добавили реакцию внутреннего положительного контроля (ВПК), представляющую собой рекомбинантную плазмиду pGem-T с химерной последовательностью (ООО «Синтол»).

Разработанная мультиплексная специфичная ПЦР-РВ система «Фаг-МБТ-ВПК» содержит три независимые реакции в одной пробирке. Она позволяет одновременно выявлять ДНК микобактериофага D29, ДНК МБТ и ДНК ВПК с высокой чувствительностью и эффективностью 90-100% для каждой реакции.

Для количественного анализа микобактериофага D29 использовали рекомбинантную плазмиду размером 3015 н.п., содержащую 225 н.п. специфический фрагмент микобактериофага D29. Спектрофотометрически измеренную при A_{260} концентрацию рекомбинантной плазмиды в мкг/мкл использовали для расчета концентрации плазмиды в копиях специфического фрагмента микобактериофага D29 на 1 мкл (копий/мкл) по формуле:

$$C = \frac{K \times N_A}{l \times 600}$$

где C – концентрация плазмиды в копиях специфического фрагмента D29 на 1 мкл (копий/мкл);

K – измеренная при A_{260} концентрация плазмиды в г/мкл;

N_A – постоянная Авогадро ($6,023 \times 10^{23}$ моль⁻¹);

l – длина плазмиды (н.п.);

600 – молекулярная масса 1 п.н.

$$C = \frac{2,65 \times 10^{-6} \times 6,023 \times 10^{23}}{3015 \times 600} = 8,85 \times 10^{11} \text{ копий/мкл}$$

Так как количество образца ДНК, добавляемое в реакцию, составляет 5 мкл, то для получения калибровочной прямой с последовательными 10-кратными разведениями плазмидной ДНК, содержащими целые значения копий фрагмента D29, кратные 10, исходную плазмиду в расчетной концентрации $C=8,85 \times 10^{11}$ копий/мкл разводили в $4,425 \times 10^4$ раза до получения концентрации 2×10^8 копий/мкл. Серия 10-кратных разведений составила 8 порядков, начиная с 2×10^8 копий/мкл и заканчивая 20 копий/мкл. Калибровочная прямая, полученная с помощью приготовленных разведений, показана на Рисунке 6.

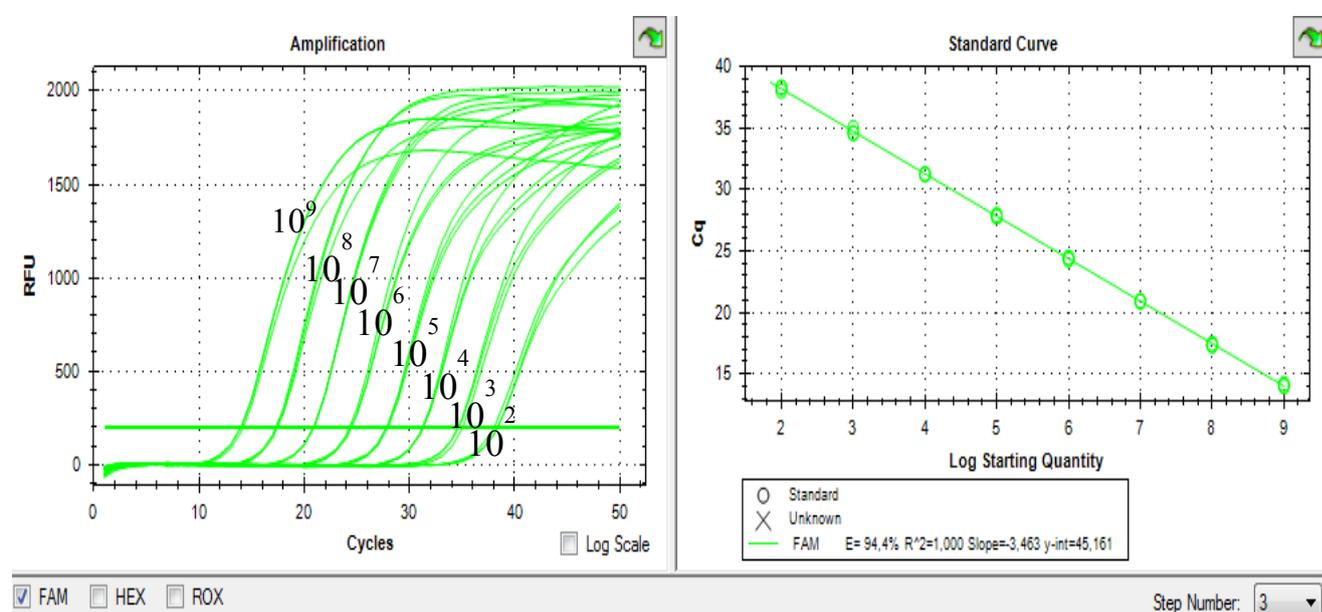


Рисунок 6 – Калибровочная прямая, полученная на основе 10-кратных разведений плазмиды D29: уравнение прямой $y = -3,463x + 45,161$; коэффициент корреляции $R^2 = 1$, эффективность ПЦР $E = 94,4\%$

Число копий для неизвестных образцов рассчитывается автоматически по построенной калибровочной прямой по уравнению: $y = Ax + B$, где x – lg начального количества D29 копий/реакцию; y – пороговый цикл амплификации по каналу FAM для образца. Для достоверного количественного анализа для калибровочной прямой должны выполняться следующие условия: коэффициент корреляции R^2 должен быть не ниже 0,99; эффективность ПЦР-РВ должна

составлять не менее 90%. При получении иных значений этих параметров для калибровочной прямой количественные результаты считались недостоверными.

Для определения соотношения между активностью фага и количеством копий ДНК использовали последовательные 10-кратные разведения фага D29, начиная с активности 2×10^6 БОЕ/мкл (Рисунок 7).

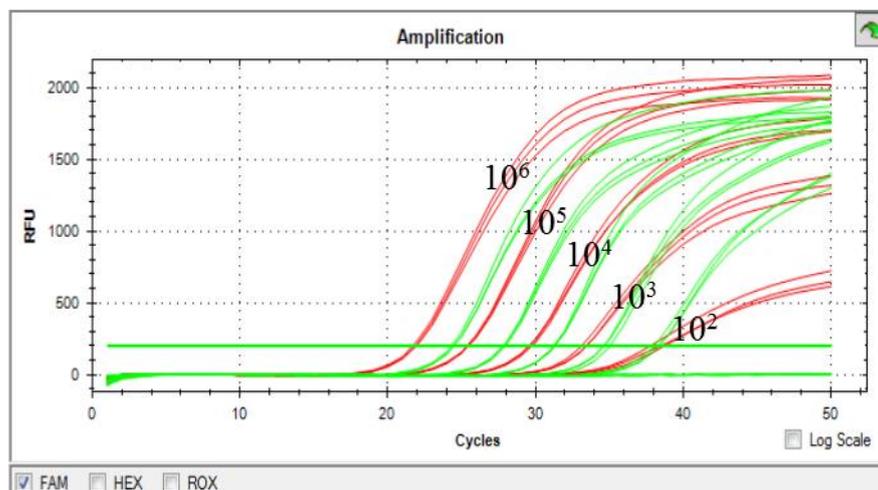


Рисунок 7 – Соотношение активности фага D29 к количеству копий.

Зеленым цветом показаны 10-кратные разведения рекомбинантной плазмиды D29, красным цветом показаны 10-кратные разведения фага D29

Количество копий ДНК D29, соответствующее активности фага, рассчитывали по калибровочной прямой плазмиды. Полученные соотношения указаны в Таблице 3.

Таблица 3 – Соотношение между активностью (БОЕ) и количеством копий ДНК фага D29

Активность фага БОЕ/реакцию	Рассчитанное среднее значение копий/реакцию
10^6	$5,5 \times 10^6$
10^5	$5,1 \times 10^5$
10^4	$3,1 \times 10^4$
10^3	$2,6 \times 10^3$
10^2	$1,0 \times 10^2$

Количественный анализ микобактериофага D29 с использованием рекомбинантной плазмиды показал практически равное соотношение биологической активности фага с количеством копий ДНК фага.

Для оценки количества выявленной ДНК МБТ использовали калибровочные образцы с известной концентрацией, полученные из рекомбинантной плазмиды, содержащей специфический фрагмент однокопийного гена *regX3* МБТ (ООО «Синтол»). Калибровочная прямая, полученная с помощью калибраторов в концентрациях 10^7 , 10^5 и 10^3 копий/реакцию, показана на Рисунке 8.

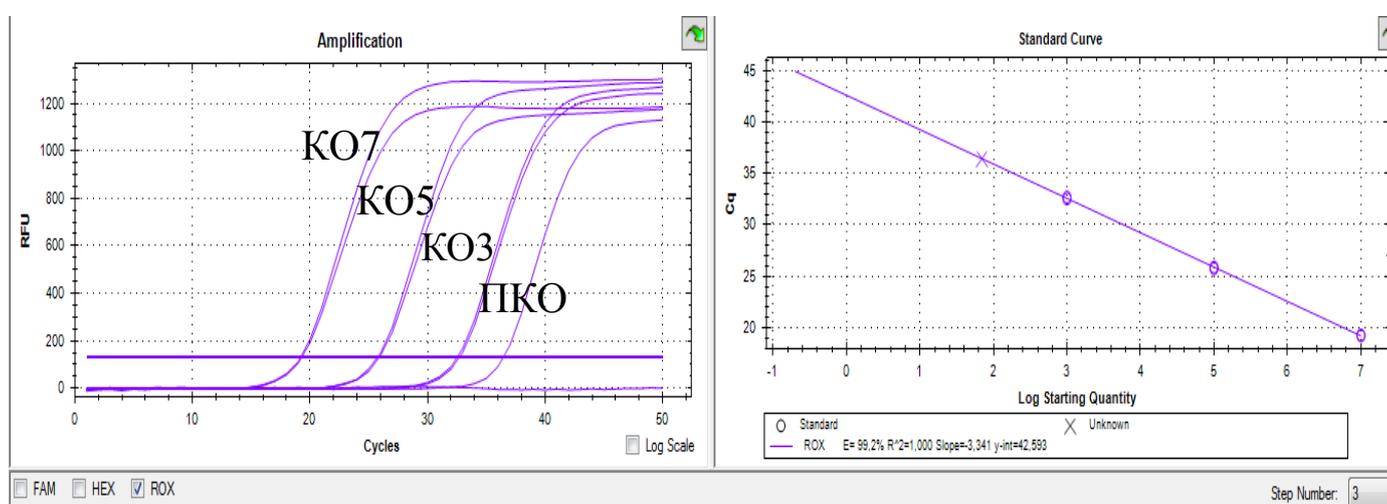


Рисунок 8 – Калибровочная прямая, полученная на основе калибраторов *regX3* в концентрациях 10^7 , 10^5 и 10^3 копий/реакцию: уравнение прямой $y = -3,341x + 42,593$; коэффициент корреляции $R^2 = 1$, эффективность ПЦР $E = 99,24\%$

Число копий для неизвестных образцов рассчитывается автоматически по построенной калибровочной прямой по уравнению: $y = Ax + B$, где x – lg начального количества *regX3* копий/реакцию; y – пороговый цикл амплификации по каналу ROX для образца. Для достоверного количественного анализа для калибровочной прямой должны выполняться следующие условия: коэффициент корреляции R^2 должен быть не ниже 0,99; эффективность ПЦР-РВ должна составлять не менее 90%. При получении иных значений этих параметров для калибровочной прямой количественные результаты считались недостоверными.

Пример работы мультиплексной ПЦР-РВ системы «Фаг-МБТ-ВПК», содержащей три независимые реакции в одной пробирке, представлен на Рисунке 9.

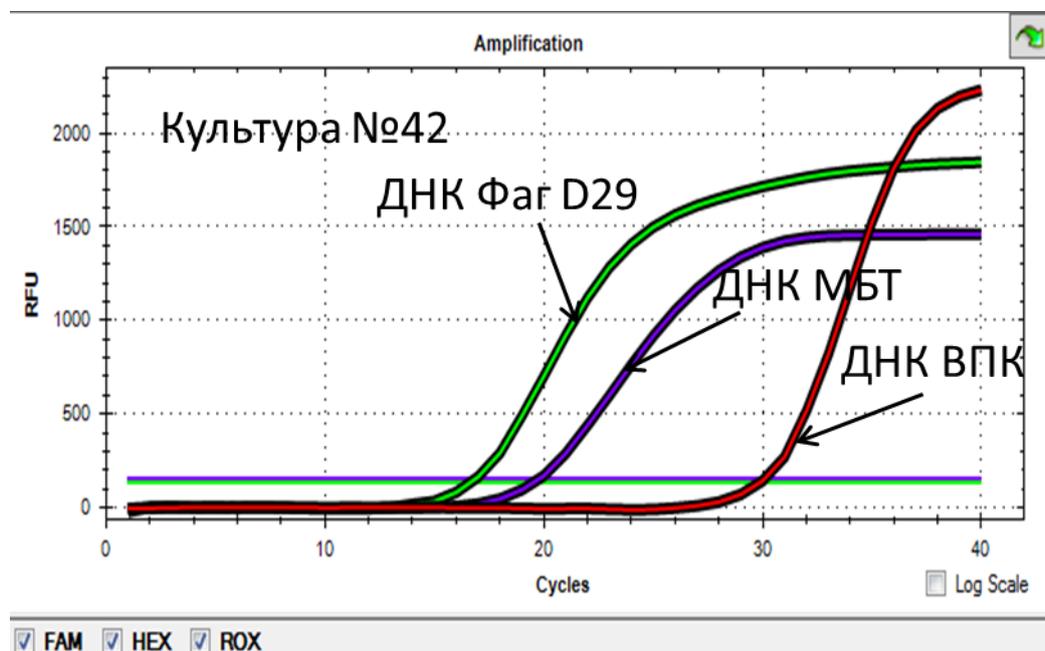


Рисунок 9 – Пример работы мультиплексной ПЦР-РВ системы «Фаг-МБТ-ВПК» на культуре №42. Подъем флуоресценции по каналу FAM (зеленый цвет) свидетельствует о наличии ДНК фага D29, по каналу ROX (фиолетовый цвет) – ДНК МБТ, по каналу R6G (красный цвет) – ДНК ВПК

Разработана мультиплексная специфичная ПЦР-РВ система «Фаг-МБТ-ВПК» для одновременного количественного выявления ДНК микобактериофага D29 и ДНК МБТ. Она обладает высокими аналитическими характеристиками по специфичности, чувствительности и эффективности. Эту систему мы использовали для решения исследовательских задач в нашей работе.

3.2 Оптимизация технологии получения концентрированного высокоочищенного препарата литического микобактериофага D29

Для наших исследований микобактериофага D29 на модели внутриклеточной туберкулезной инфекции перевиваемых макрофагов RAW 264.7 и модели туберкулезной гранулемы мононуклеаров крови человека, было необходимо использование микобактериофага D29 в стабильных концентрациях больше чем 10^8 БОЕ/мл. Основной задачей разработки модификации технологии было получение высоких титров микобактериофага D29, до 10^9 - 10^{11} БОЕ/мл, так как при использовании стандартного метода, получаемая концентрация фага составляла 10^8 БОЕ/мл. Для этого мы провели оптимизацию технологии получения концентрированного препарата литического микобактериофага D29 (Таблица 4).

Таблица 4 – Сравнение стандартного и модифицированного методов получения микобактериофага D29

Этапы получения фага	Стандартный метод	Модифицированный метод
1. Начальная концентрация фага	10^5 БОЕ/мл	10^8 БОЕ/мл
2. Инкубирование фага с <i>M.smegmatis</i>	1 сутки	3 суток
3. Концентрирование фага	—	Осаждение и концентрирование в насыщенном растворе сульфата аммония
4. Очистка фага	—	Ионно – обменной хроматографией на колонке DEAE-sepharose

Увеличение начальной концентрации фага, времени инкубирования фага с *M.smegmatis* и добавление этапа концентрирования позволили более эффективно нарабатывать фаг.

Полученный концентрированный фаговый препарат выделяли с помощью ионно-обменной хроматографии на колонке DEAE-sepharose с использованием хроматографа в соответствии методом (Adriassence et al., 2012). Метод очистки фага с помощью ионно-обменной хроматографии основан на разнице сил взаимодействия фаговых частиц с поверхностью сорбента в зависимости от ионной силы раствора. Для очистки использовали исходный препарат фага с концентрацией $5 \cdot 10^9$ БОЕ/мл в объеме 9 мл. Препарат фага при низком уровне ионной силы (0,1 М NaCl) сорбировался на DEAE-сефарозе, а при повышении концентрации NaCl элюировался с колонки в процессе последовательного увеличения ионной силы буферного раствора до 0,5-1 М NaCl. Очищенный препарат микобактериофага выделялся с колонки в качестве второго пика при ионной силе 1М хлорида натрия фагового буферного раствора (Рисунок 10).

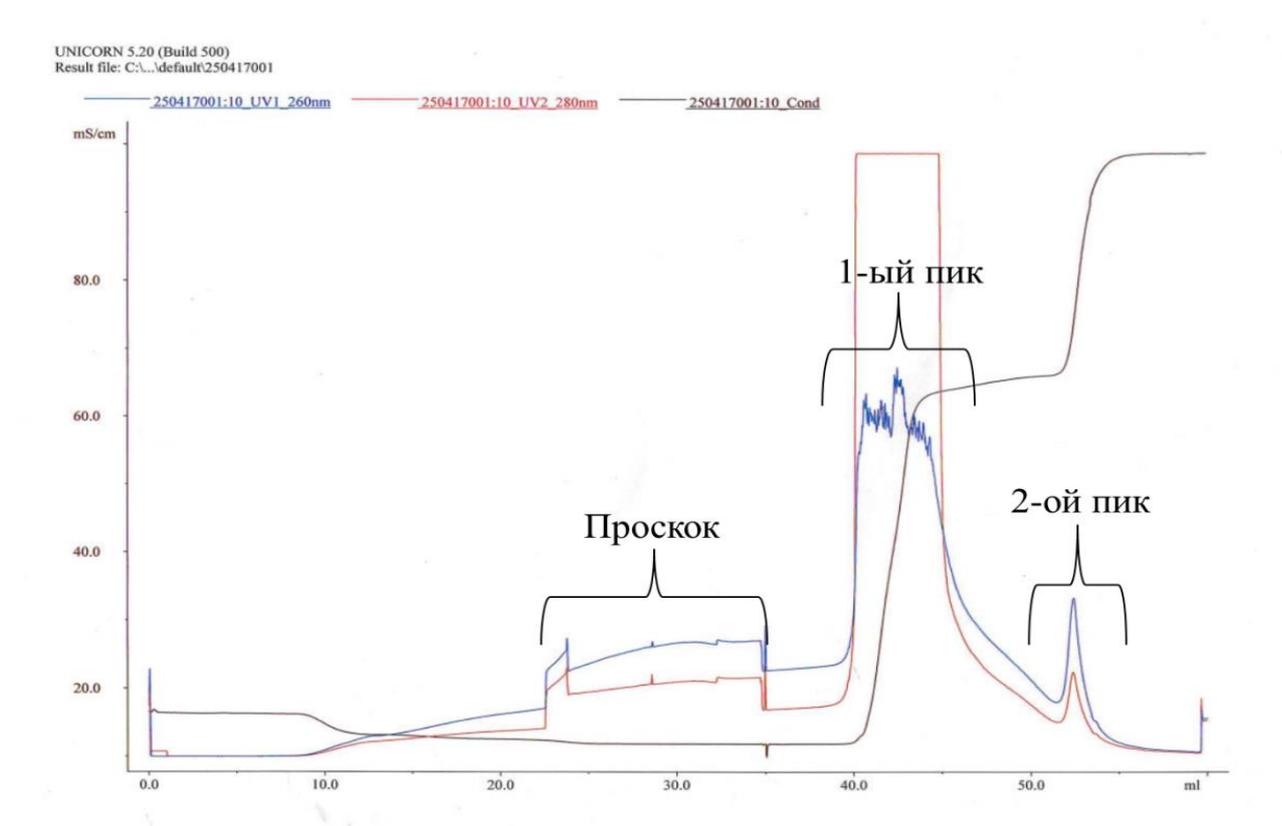


Рисунок 10 – Хроматограмма выделения и очистки микобактериофага D29: синяя линия – оптическая плотность при A_{260} (в mAU); красная линия – оптическая плотность при A_{280} ; коричневая линия – проводимость (mS/cm). Единицы по оси абсцисс – миллилитры

После проведения хроматографии получали 10 мл препарата с концентрацией $2 \cdot 10^9$ БОЕ/мл. В этом случае было получено около 70% сохранения биологической активности фагового препарата. Добавление этапа очистки концентрированного раствора фага ионно-обменной хроматографией позволило не только очистить препарат от лизата микобактерий, протеаз и разрушенных молекул ДНК, но и получить раствор фага, не токсичный для макрофагальных клеток.

Титр микобактериофага D29 после проведенных этапов подтверждали при десятикратном титровании на чашках с *M. smegmatis*. Кроме этого, контролировали количество ДНК фага на разных этапах получения концентрированного фагового препарата с помощью ПЦР-РВ в разработанной мультиплексной системе для одновременного количественного анализа ДНК МБТ и ДНК фага D29 (Таблица 5).

Таблица 5 – Определение пороговых циклов ДНК фага после разных этапов наработки фага

Этапы получения фага	Значения пороговых циклов, St_{cp}^* , по каналу FAM	Количество ДНК фага		Активность фага, БОЕ/мл
		копии/реакцию	копии/мл	
Исходный фаг D29	23,5	$10^{6,25}$	$3,56 \times 10^8$	10^8
После этапа осаждения и концентрирования	20,1	$10^{7,24}$	$3,48 \times 10^9$	5×10^9
После этапа очистки на DEAE-сефарозе	21,3	$10^{6,89}$	$1,55 \times 10^9$	2×10^9

*средние значения пороговых циклов по 5-ти опытам.

Таким образом, для решения основных задач нашей работы по получению липосомального биопрепарата литических микобактериофагов, позволяющего его применение для антимикобактериального бактерицидного действия, разработана технология получения высокоочищенного препарата литического микобактериофага D29 в концентрациях 10^9 БОЕ/мл и выше.

3.3 Получение липосом с включенными частицами микобактериофага D29

Одной из задач исследования было получение препарата на основе литического штамма микобактериофага, инактивирующего внутриклеточные микобактерии туберкулеза. Препарат для инаktivации (лизиса) внутриклеточных микобактерий туберкулеза представляет собой микобактериофаг D29, включенный в бислойную фосфолипидную липосому размером 0,4 микрон. Получение препарата заключается в выделении и очистке фаговых частиц из бактериальных лизатов *M.smegmatis* с помощью ионно-обменной хроматографии на колонке DEAE-sepharose с последующим инкубированием с фосфолипидной пленкой. Для концентрирования и отделения липосом с включившимися микобактериофагами от не включившихся частиц микобактериофага, а также для освобождения препарата от мелких липосомальных частиц применяли центрифугирование.

При выделении микобактериофага D29 из бактериального лизата *M.smegmatis*, в суспензии которых производится размножение микобактериофага, используется технология выделения и очистки микобактериофага, которая позволяет сохранить жизнеспособность частиц бактериофага. В ходе опытов были получены липосомальные частицы с включенными микобактериофагами оптимального размера – в основном с размером частиц около 400 нм, что обеспечивает возможность их фагоцитоза макрофагами, что, в свою очередь, позволяет в полном объеме реализовать противотуберкулезный эффект препарата. Таким способом достигается 15% эффективность включения частиц микобактериофага в липосомы.

Размер и морфология получаемых бислойных липосом продемонстрированы с помощью электронной микроскопии при негативном и позитивном контрастировании уранил-ацетатом (Рисунок 11 А, В, С, D).

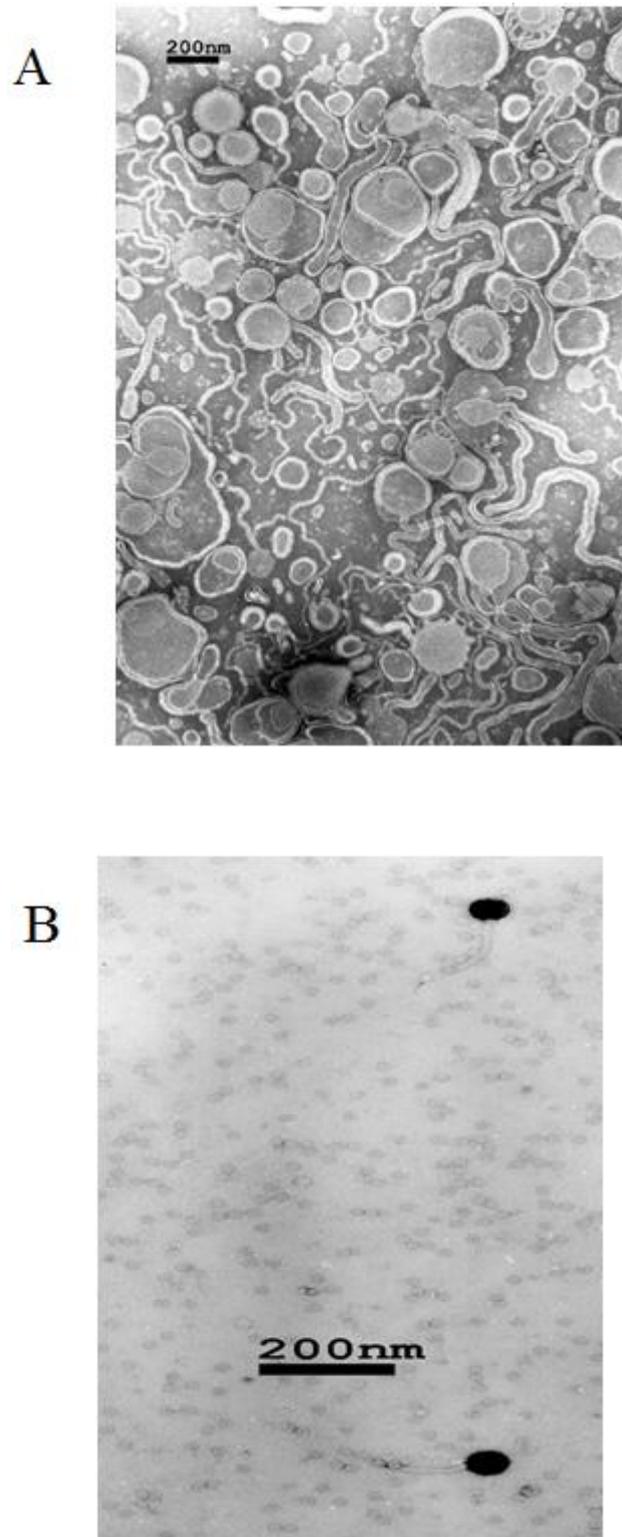


Рисунок 11 – А. Негативное контрастирование бислойных липосом без фага. В. Позитивное контрастирование контрольного образца микобактериофага уранил-ацетатом

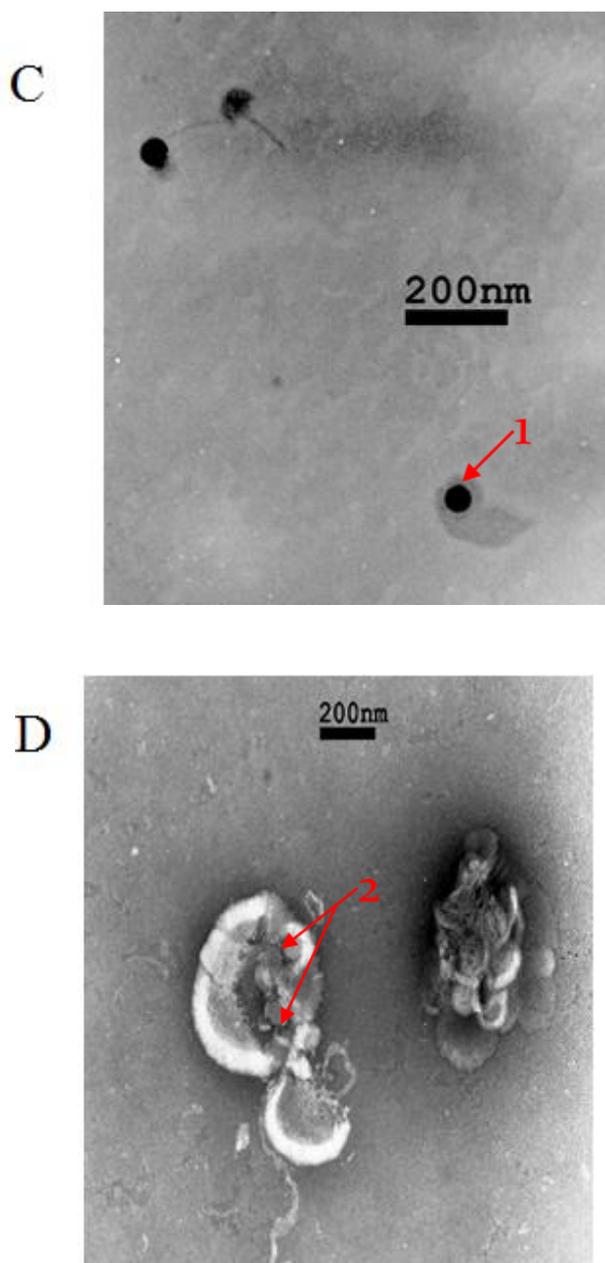


Рисунок 11 – С. Позитивное контрастирование. 1– головка фага, включенного в липосому. D. Негативное контрастирование разрушенной липосомы; 2 - головки фагов при затекании контрастирующего вещества

3.4 Литическое действие микобактериофага D29 в клинических изолятах МБТ

Для подтверждения литического действия фага было исследовано 15 клинических изолятов, из них 5 культур, чувствительных к четырем препаратам

первого ряда (S, I, R и E) и к пяти препаратам второго ряда (Am, Mox, Lef, Kan, Cap) по данным культуральных исследований в системе Bactec MGIT, и 10 культур с различной устойчивостью к препаратам 1 и 2 ряда (Таблица 6).

Таблица 6 – Клинические изоляты МБТ, использованные для подтверждения литического действия микобактериофага D29

№ образца	S	I	R	E	Am	Mox	Lef	Kan	Cap
321	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2083	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2301	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2487	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5354	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1117	R	R	R	S	S	S	S	S	S
1121	R	R	R	R	R	S	S	R	R
1122	R	R	R	R	R	R	R	R	S
1466	R	R	R	R	S	R	R	R	R
1575	R	R	R	R	R	R	R	R	S
2480	R	R	R	S	S	S	R	S	S
2481	R	R	R	R	S	S	S	R	S
2646	R	R	R	R	S	S	S	S	S
2921	R	R	R	S	S	S	R	R	S
5120	R	R	R	R	R	S	R	R	R

После получения первичного роста в системе Bactec MGIT образцы вновь культивировали в жидкой питательной среде Миддлбрук 7H9, содержащей 10% ростовой добавки OADC и 1 mM хлорида кальция в 24-луночной планшете. Все образцы были посеяны в трех повторах (1 – контрольная лунка, 1 – для инкубации с фагом в течение суток, 1 – для инкубации с фагом в течение 3 суток). Схема опыта показана на Рисунке 12. Результаты посева представлены в Таблице 7.



Рисунок 12 – Схема опыта по подтверждению литического действия микобактериофага D29

**Таблица 7 – Результаты посева клинических изолятов МБТ,
инкубированных с микобактериофагом D29**

№ образца	Контроль МБТ на 21 день	Инкубирование образцов с фагом 1 день (21 день)	Инкубирование образцов с фагом 3 дня (21 день)
321	Массивный рост МБТ	Роста нет	Роста нет
2083		Роста нет	Роста нет
2301		Роста нет	Роста нет
2487		Роста нет	Роста нет
5354		Роста нет	Роста нет
1117		Роста нет	Роста нет
1121		Роста нет	Роста нет
1122		Роста нет	Роста нет
1466		*Рост (5 нетуберкулезных колоний)	Роста нет
1575		Роста нет	Роста нет
2480		Роста нет	Роста нет
2481		Роста нет	Роста нет
2646		Роста нет	Роста нет
2921		Роста нет	Роста нет
5120		*Рост (1 колония нетуберкулезных МБ)	Роста нет

*Рост НТМБ подтверждали с помощью набора реагентов для ПЦР-РВ «АмплитубРВ+НТМБ» (ООО «Синтол»).

Таким образом, по результатам из таблицы 7 видно, что при исследовании 15 штаммов клинических изолятов МБТ, инкубирование с микобактериофагом D29 в течение минимум 1 суток ликвидировало рост МБТ во всех клинических изолятах, в том числе в 10 изолятах с лекарственной устойчивостью к различным препаратам. Это подтверждает литическое действие используемого в работе микобактериофага D29 в клинических изолятах МБТ.

3.5 Исследования антимикобактериальной активности липосомальной формы литического микобактериофага D29 в отношении внутриклеточно культивируемых МБТ с использованием перевиваемой линии мышинных макрофагов RAW 264.7

3.5.1. Разработка модели внутриклеточно инфицированных макрофагов

Для исследования литического (антибактериального) действия микобактериофага D29, включенного в липосомы, в отношении внутриклеточных МБТ, использовали модель внутриклеточно инфицированных макрофагов. Модель представляла собой выделение макрофагов с фагоцитированными МБТ при центрифугировании в градиенте плотности Ficoll-Raque.

Кроме этого, изучали эффективность проникновения липосомного микобактериофага в клетки макрофагов, по сравнению с микобактериофагом, не включенным в липосомы, при аналогичной фаговой активности. Литическое (антибактериальное) действие МБТ измеряли при посевах инфицированных макрофагов после их двукратного замораживания и оттаивания на агаровую питательную среду 7Н10 Миддлбрук.

При добавлении очищенного фага, количество ДНК в лунках с макрофагами, инфицированными МБТ, значительно ниже, чем при использовании липосомального препарата.

При исследовании макрофагов линии RAW 264.7, инфицированных МБТ, необходимо было уточнить вопрос внутриклеточного характера инфекции МБТ. В статьях, описанных в литературе ранее китайскими авторами, не фагоцитированные МБТ (не включенные в макрофаги) отмывались трехкратно с помощью фосфатно-солевого буферного раствора. Для того чтобы проверить эффективность этого отмывания макрофагов от не включенных в макрофаги МБТ, мы провели следующее исследование. В 3 лунки 6-луночного планшета вносили 100 мкл культуры H37Rv в концентрации $1,66 \times 10^7$ /мл и 1 мл среды RPMI1640. В 3

другие лунки добавляли 500 мкл культуры макрофагов RAW 264.7; 100 мкл культуры H37Rv, 500 мкл среды RPMI1640. Планшет инкубировали в течение 2 ч, затем удаляли среду и трижды промывали 1 мл среды RPMI1640. После этого клетки с помощью специальных скребков снимали с поверхности лунок в объеме 200 мкл, дважды замораживали при минус 20⁰С и оттаивали при 37⁰С. Затем выделяли ДНК набором «Экспресс-Туб» (ООО «Синтол») и проводили количественный анализ ДНК МБТ с помощью разработанной мультиплексной ПЦР-РВ системы (Таблица 8).

Таблица 8 – Количество ДНК МБТ после отмывок, определенное с помощью ПЦР-РВ

Название образцов	Количество МБТ/образец
H37Rv+среда RPMI1640 1 лунка	1,19x10 ⁵
H37Rv+среда RPMI1640 2 лунка	4,05x10 ⁵
H37Rv+среда RPMI1640 3 лунка	2,48x10 ⁵
RAW 264+H37Rv+среда RPMI1640 1 лунка	3,83x10 ⁵
RAW 264+H37Rv+среда RPMI1640 2 лунка	4,05x10 ⁵
RAW 264+H37Rv+среда RPMI1640 3 лунка	4,73x10 ⁵

Как видно из таблицы 8, ДНК МБТ определяется и в лунках, где присутствуют, и в лунках, где отсутствуют макрофаги. Количество ДНК МБТ в лунках с макрофагами по сравнению с количеством ДНК МБТ в лунках без макрофагов после отмывок в среднем отличалось в 1,6 раза.

Таким образом, результаты проведенных исследований, показали, что суспензия МБТ, которая инфицирует макрофаги, в значительной степени остается на поверхности лунок культурального планшета даже после трехкратных отмывок культуры. Следовательно, эффект антимикобактериального действия микобактериофагов не может быть признанным как эффект на внутриклеточные МБТ.

В связи с этим, нами был разработан собственный метод получения культуры макрофагов с внутриклеточным инфицированием.

Для разделения внутриклеточных МБТ от внеклеточных, мы использовали Ficoll-Paque. После инфицирования макрофагальных клеток RAW 264.7, через сутки их отмывали средой и выделяли на Ficoll-Paque. После центрифугирования собирали только интерфазу, где находятся макрофаги. Затем клетки рассеивали в 6-луночные планшеты для дальнейшей работы. Результаты проведенных исследований представлены в Таблице 9.

Таблица 9 – Количество ДНК МБТ после выделения на Ficoll-Paque, определенное с помощью ПЦР-РВ

Название образцов	Количество МБТ/образец
H37Rv	$1,96 \times 10^6$
Дно после Ficoll-Paque	$4,46 \times 10^3$
Контроль 1 лунка	$4,95 \times 10^4$
Контроль 2 лунка	$4,39 \times 10^4$
Контроль 3 лунка	$4,93 \times 10^4$

Таким образом, было показано, что после разделения инфицированных макрофагов от МБТ, не включенных в макрофаги, с помощью центрифугирования в градиенте Ficoll-Paque, фиксация внутриклеточной инфекции МБТ достоверно определена и оценена.

3.5.2. Исследование внутриклеточного транспорта липосомального микобактериофага D29 на модели внутриклеточной туберкулезной инфекции перевиваемых макрофагов RAW 264.7

Для изучения эффективности фагоцитирования или транспорта микобактериофагов в клетки инфицированных макрофагов, было проведено сравнительное исследование ДНК микобактериофага D29 в клетках

инфицированных макрофагов при использовании микобактериофага в свободной форме и микобактериофага, включенного в липосомы.

Были поставлены опыты при 24-часовой инкубации образцов свободных микобактериофагов и микобактериофагов, включенных в липосомы, равными по биологической активности и количественному анализу ДНК микобактериофага, с клетками культуры инфицированных макрофагов в лунках 6-луночного планшета. Схема опыта показана на Рисунке 13. Результаты количественного определения ДНК фага с помощью ПЦР-РВ представлены в Таблице 10.



Рисунок 13 – Схема опыта по исследованию внутриклеточного транспорта липосомального микобактериофага D29

Таблица 10 – Эффективность включения (проницаемости) микобактериофагов в клетки эукариотов клеточной культуры. Результаты ПЦР-РВ анализа образцов при использовании микобактериофагов свободных и инкорпорированных в липосомы

Название образцов	Пороговые циклы, $C_{t_{ср}}$, по каналу FAM	Количество ДНК фага, копии/реакцию	Количество ДНК фага, копии/образец
Свободный фаг 1	32,0	$6,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$
Свободный фаг 2	32,0	$6,3 \times 10^3$	$1,1 \times 10^6$
Включенный в липосомы 1	29,0	$4,68 \times 10^4$	$8,4 \times 10^6$
Включенный в липосомы 2	29,4	$3,55 \times 10^4$	$6,4 \times 10^6$

Полученные результаты свидетельствовали, что пороговые циклы подъема кривых флуоресценции в лунках с микобактериофагами, включенными в липосомы были на 2-5 циклов ниже, чем при использовании свободных микобактериофагов, что свидетельствовало о многократно (в 4-10 раз) более эффективном проникновении микобактериофагов, включенных в липосомы.

Полученные нами данные коррелируют с данными Nieth Anita et al. 2015, которые также отмечали более высокий уровень проникновения липосомального микобактериофага TM4 в эукариоты, по сравнению со свободным микобактериофагом.

3.5.3. Исследование литического эффекта микобактериофагов на модели внутриклеточно инфицированных макрофагов

Количество колоний МБТ на чашках, полученных при посевах инфицированных макрофагов, представлено в Таблице 11.

Таблица 11 – Количество колоний МБТ, полученных при посевах инфицированных макрофагов RAW 264.7

Группы	Среднее количество колоний МБТ, включая стандартную ошибку	Критерий t-тест Стьюдента
1. Контроль МБТ	62±2,6	
2. МБТ+очищенный фаг	17±1	P<0,01
3. МБТ+липосомальный препарат	7±0,33	P<0,05

Наименьшее количество колоний МБТ наблюдалось при посевах макрофагов, внутриклеточно инфицированных H37Rv с липосомальной формой микобактериофага D29, что говорит о наилучшем литическом эффекте при использовании липосомального препарата по сравнению с очищенной формой фага.

Результаты бактерицидного эффекта фага D29 на внутриклеточные микобактерии представлены на Рисунке 14.

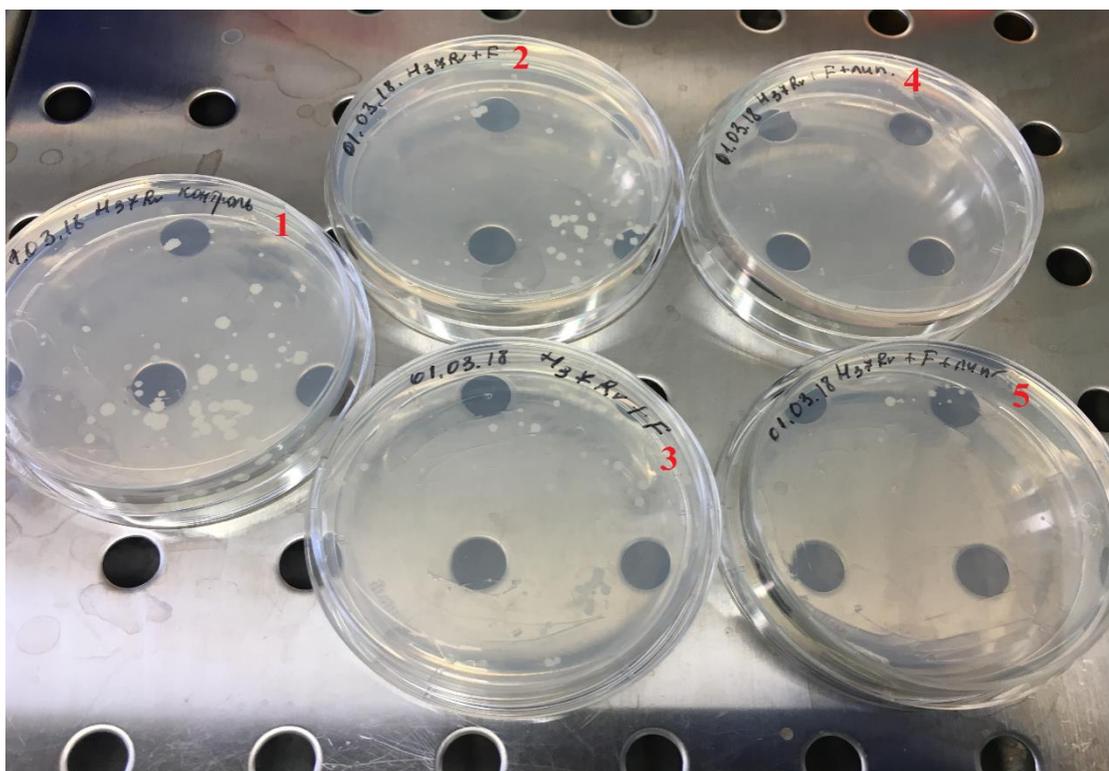


Рисунок 14 – Результаты посева инфицированных макрофагов через 3 недели: №1. Контроль МБТ, 2-3 – МБТ + очищенный фаг, 4-5 МБТ + липосомальный препарат

Таким образом, на разработанной модели была показана, во-первых, наилучшая эффективность проникновения липосомального препарата в макрофаги, по сравнению со свободным фагом, и, во-вторых, наилучший бактерицидный эффект липосомального препарата.

3.6 Оптимизация модели туберкулезной гранулемы мононуклеаров крови человека *in vitro*

Исследования эффективности действия литических микобактериофагов на МБТ проводили также на модели туберкулезной гранулемы мононуклеаров крови человека *in vitro*. Для данной модели использовали культуру мононуклеаров периферической крови человека с латентной инфекцией. Согласно литературным

данным, для инфицирования культуры мононуклеаров используются МБТ в соотношении (мононуклеары:МБТ) 1:1 или 10:1. После проведения серии опытов мы выяснили, что при соотношении 1:1 культура мононуклеаров гибнет через сутки, а при соотношении 10:1 гранулема не образуется. Мы установили, что при соотношении 6:1 гранулема образуется к 12-15 дню (Рисунок 15 А, В).

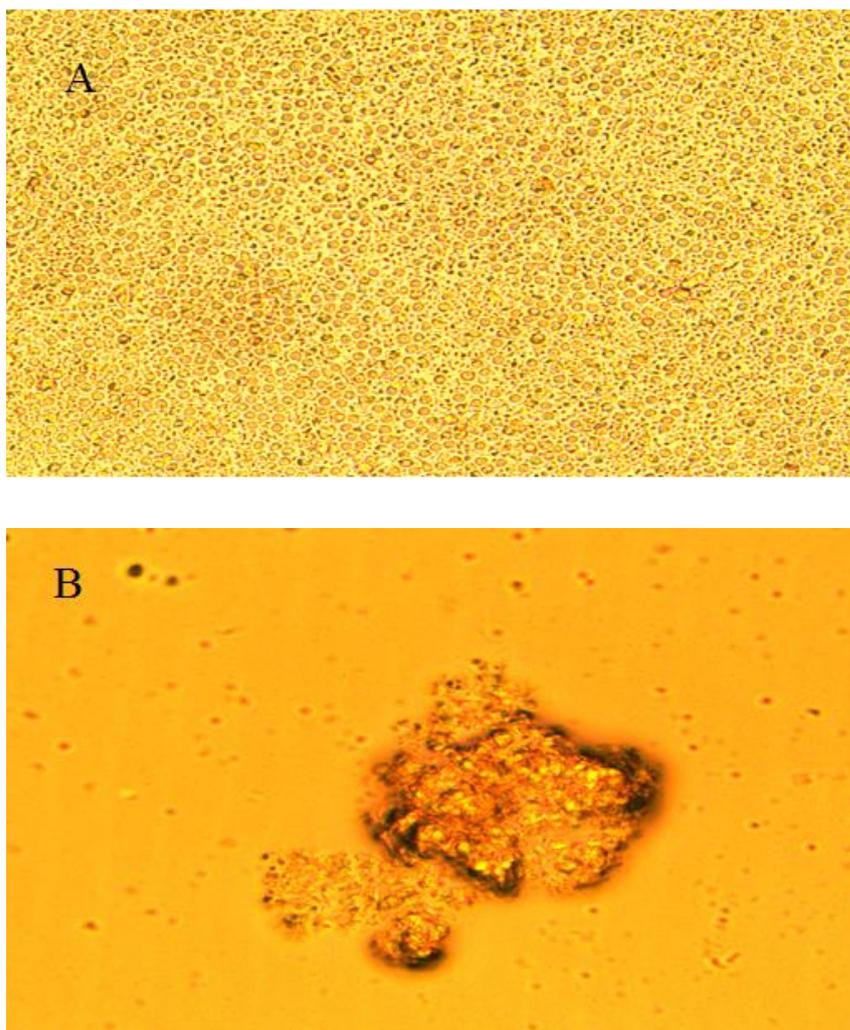
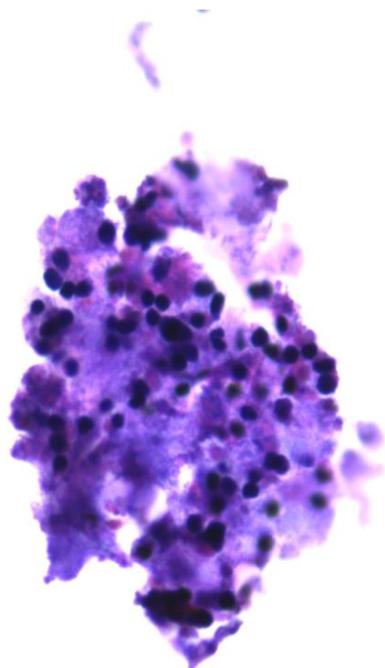


Рисунок 15 – А. Фотография культуры мононуклеаров периферической крови с латентной инфекцией 1 день. Световая микроскопия (1:200). В. Фотография образование гранулемы на 13 день. Световая микроскопия (1:200)

После образования гранулемы на 13 день, из одной лунки, были сделаны гистологические срезы (Рисунок 16 А, В).

А



В

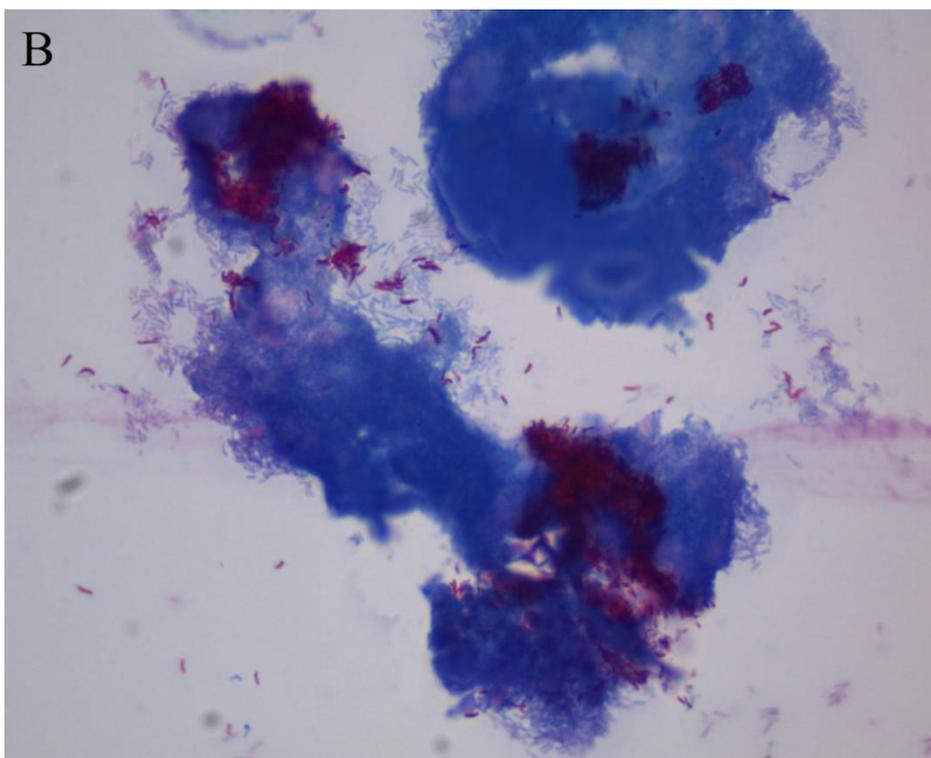


Рисунок 16 – А. Скопление макрофагов и лимфоцитов на периферии с некрозом в центре гранулемы. Гистологический срез. Окраска гематоксилином. (1:200). В. Гранулема (большое количество палочек МБТ). Гистологический срез. Окраска по Цилю-Нильсену (1:1000)

После образования гранулемы исследовали эффективность действия литических микобактериофагов на МБТ. Для этого в опытные лунки с образовавшимися гранулемами добавляли очищенный фаг и липосомальный препарат в одинаковой концентрации – 10^8 БОЕ/ мл. Бактерицидный эффект липосомального препарата литического микобактериофага в сравнении с очищенным фагом изучен на модели туберкулезной гранулемы, показан на Рисунке 17.

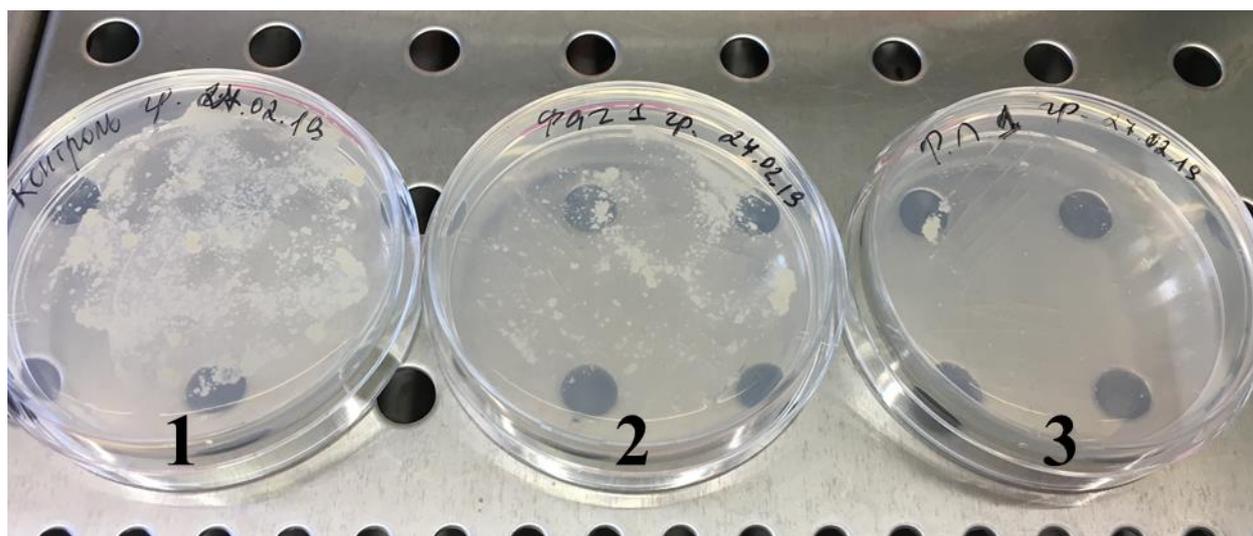


Рисунок 17 – Результаты посева на плотной питательной среде 7Н10: № 1. Контроль МБТ, 2. МБТ + очищенный фаг, 3. МБТ + липосомальный препарат

Число колоний МБТ в чашках, полученных при посевах материала туберкулезной гранулемы в контрольной группе, составило более 1000, в группе с очищенным фагом – $583 \pm 24,4$, а в группе с липосомальным препаратом – $64 \pm 3,2$. Критерий t-тест Стьюдента $P < 0,01$.

Таким образом, подтвердили лучший бактерицидный эффект липосомальной формы микобактериофага D29 по сравнению с очищенным фагом на модели туберкулезной гранулемы мононуклеаров крови человека *in vitro*.

3.7 Сравнительные исследования эффективности применения литических микобактериофагов для ускоренного определения лекарственной чувствительности МБТ к противотуберкулезным препаратам в клинических изолятах

Для исследования эффективности разрабатываемой нами технологии применения литического микобактериофага D29 для ускоренного определения лекарственной чувствительности МБТ к ПТП использовали культуры клинических изолятов МБТ после их первичного культивирования в жидкой питательной среде с применением системы Bactec MGIT. Культивирование МБТ проходит в 24-луночном планшете. Схема технологии показана на Рисунке 18.

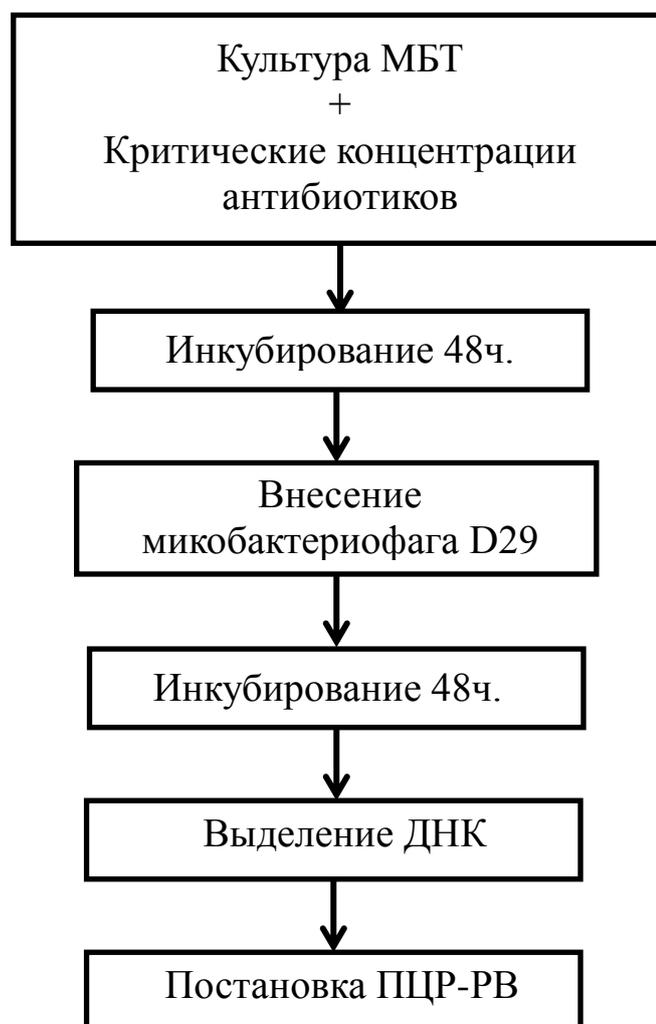
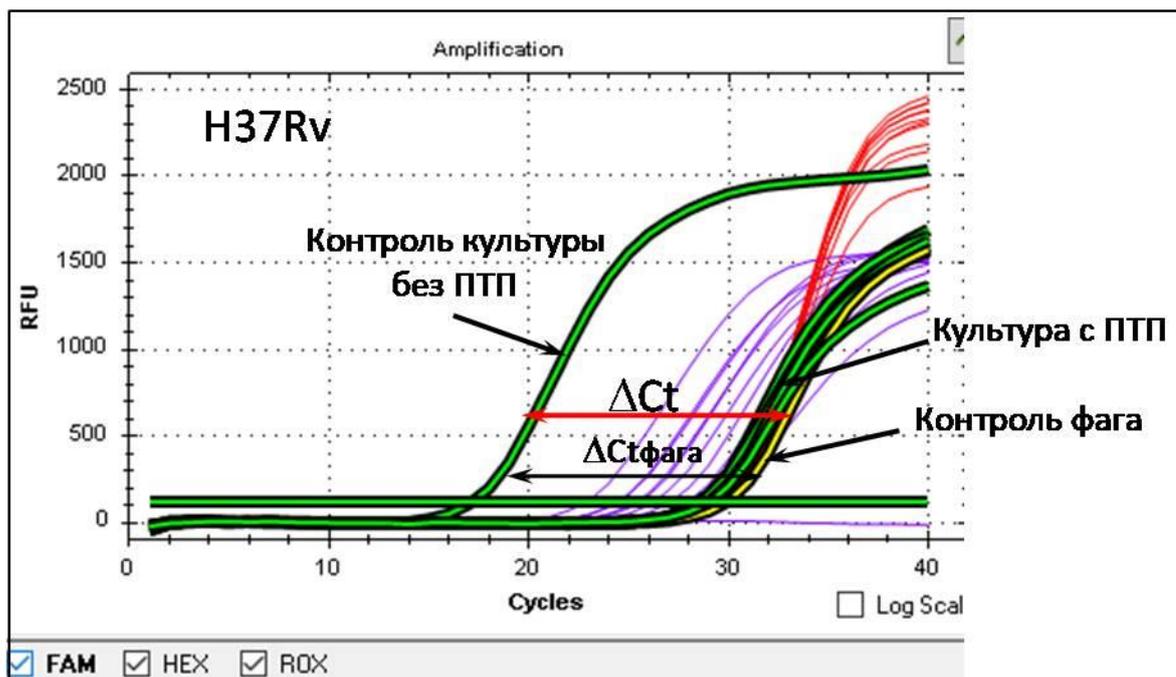


Рисунок 18 – Схема технологии ускоренного определения лекарственной чувствительности МБТ к ПТП с помощью микобактериофага D29

Согласно этой технологии лекарственная чувствительность/устойчивость МБТ к любому противотуберкулезному препарату (ПТП) определяется путем сравнения значений пороговых циклов флуоресценции в ПЦР-РВ, соответствующих количеству микобактериофага в образцах, между контрольной пробой (без антибиотика) и опытной – с использованием критической концентрации антибиотика. В процессе наших исследований было установлено, что образец считается чувствительным к ПТП при получении разницы в пороговых циклах ПЦР-РВ (ΔC_t) между контролем и опытной пробой в присутствии антибиотика составляет 3 и более циклов ($\Delta C_t \geq 3$). Если разница в циклах ПЦР-РВ менее 3 циклов ($\Delta C_t < 3$), то образец считается устойчивым. Для исключения недостоверных результатов в каждый опыт обязательно включен контроль размножения фага, т.е. начальное количество фага, добавляемое к культуре МБТ. Результаты опыта считаются достоверными только при получении разницы в пороговых циклах ПЦР-РВ (ΔC_t) между контролем фага и контрольной пробой образца (без антибиотика) не менее 3-3,5 циклов. Такая разница обусловлена формулой расчета количества продукта, получаемого при ПЦР-РВ-амплификации ($Q_n = Q_0 * (1+E)^n$, где Q_0 – исходное количество ДНК-матрицы, E – эффективность амплификации, n – число циклов амплификации) и аналитическими характеристиками ПЦР-РВ системы для количественного анализа фага и МБТ. Эффективность амплификации всех реакций мультиплексной системы «Фаг-МБТ-ВПК» равна 0,90-1 (90-100%), что соответствует увеличению продукта за один цикл амплификации в 1,9-2 раза. Следовательно, разница между пороговыми циклами для образцов в 3,5 цикла ($\Delta C_t = 3,5$) будет соответствовать разнице в количестве исходной ДНК в 10 раз, то есть свидетельствовать о размножении фага в контрольной пробе образца. Примеры интерпретации результатов анализа показаны на Рисунке 19 и Таблице 12.

A



B

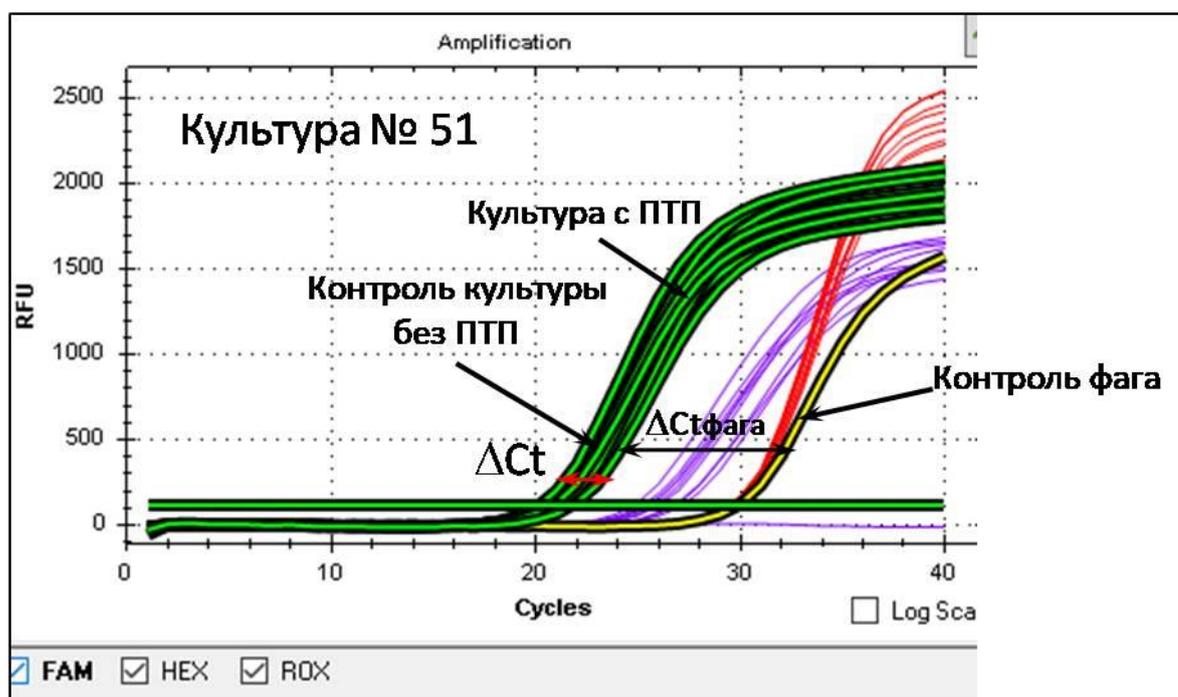
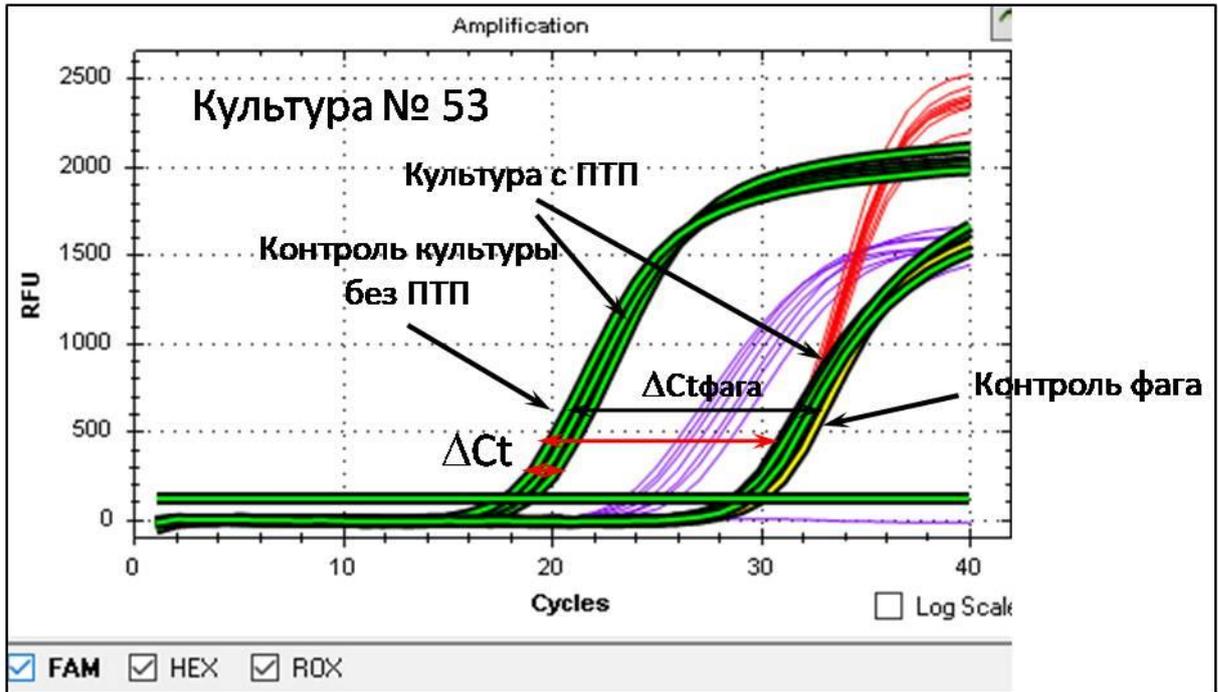


Рисунок 19 – Примеры интерпретации результатов анализа по ускоренному определению лекарственной чувствительности МБТ к ПТП с помощью микобактериофага D29: А – штамм H37Rv (полностью чувствительный); В – культура № 51 устойчива ко всем анализируемым ПТП

C



D

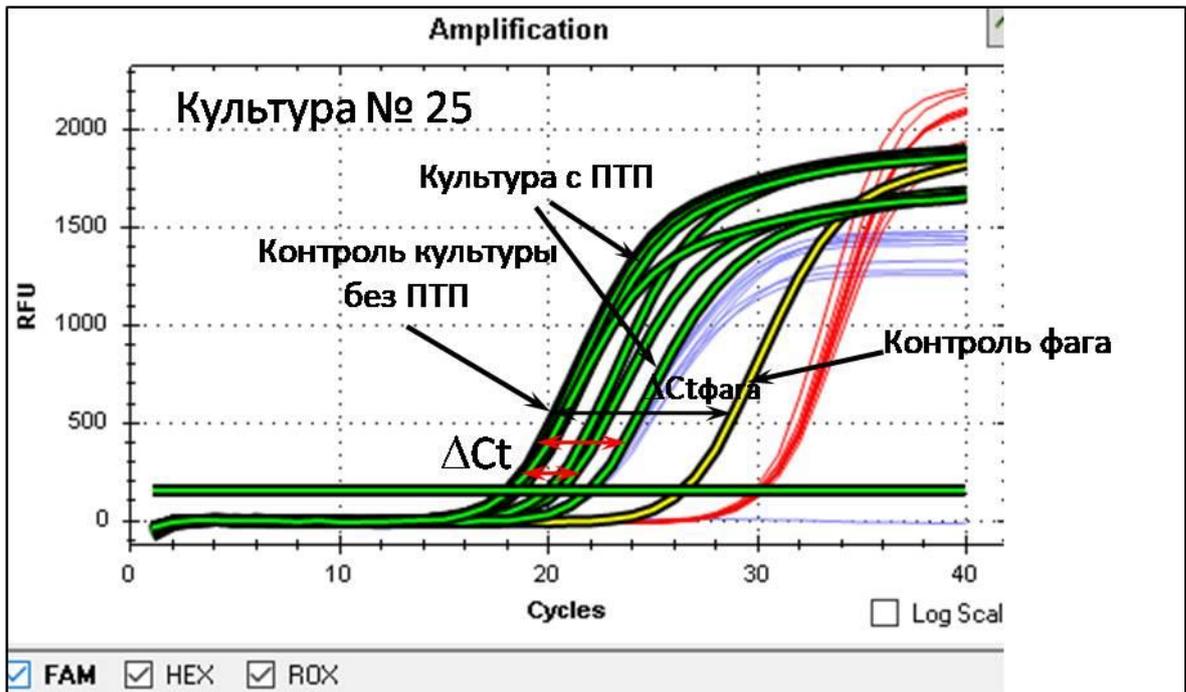


Рисунок 19 – Примеры интерпретации результатов анализа по ускоренному определению лекарственной чувствительности МБТ к ПТП с помощью микобактериофага D29: C – культура № 53 с различной устойчивостью к анализируемым ПТП; D – культура № 25 с различной устойчивостью к анализируемым ПТП

Таблица 12 – Примеры результатов анализа по ускоренному определению лекарственной чувствительности МБТ к ПТП с помощью микобактериофага D29

№ культуры	Контр. фага	Контр. без ПТП	ΔCt фага	ΔCt = Ct _{проба с ПТП} – Ct _{контр}							
				S	I	R	E	Am	Mox	Lef	Kan
H37Rv	30.07	18.19	11.88	+10.54	+10.90	+10.86	+10.46	+10.48	+10.81	+10.80	+10.10
51	30.00	20.67	9.33	+0.54	-0.49	+0.24	+1.17	+0.44	+0.56	+0.91	-0.04
53	30.00	18.88	11.12	-0.71	-0.68	-1.22	+9.79	+9.94	+10.42	+10.51	+10.25
25	26.32	18.17	8.15	+0.30	-0.08	+0.24	+3.73	-0.06	+2.21	-0.18	+1.78

Для штамма H37Rv разница в пороговых циклах ПЦР-РВ между контролем без антибиотика и пробами с ПТП составляет более 10 циклов ($\Delta Ct > 10$) для любого ПТП. Контроль размножения фага, т.е. разница между пороговым циклом контроля фага $Ct_{фага}$, соответствующего количеству фага, добавляемому к образцу, и пороговым циклом контроля культуры без ПТП, составляет 11,88 циклов ($\Delta Ct_{фага} = Ct_{фага} - Ct_{контр.} = 30,07 - 18,19 = 11,88$), что свидетельствует об увеличении количества фага в контрольной пробе без ПТП более чем в 10^3 раз. При этом количество микобактериофага D29 в образцах с ПТП не изменилось относительно начального количества фага, добавленного к образцу ($Ct_{фага} \approx Ct_{ПТП}$). Штамм H37Rv является эталоном чувствительной культуры.

В противоположность штамму H37Rv, культура № 51 устойчива ко всем анализируемым ПТП. Разница в пороговых циклах ПЦР-РВ между пробами с ПТП и контролем без антибиотика составляет от -0,49 до 1,17, при значении контроля размножения фага ($\Delta Ct_{фага}$) равном 9,33 циклам.

Культуры № 53 и № 25 являются полирезистентными культурами, обладающими различной лекарственной чувствительностью к разным ПТП. Культура № 53 чувствительна к этамбутолу, амикацину, моксифлоксацину, левофлоксацину и канамицину ($\Delta Ct > 9$) и устойчива к стрептомицину, изониазиду

и рифампицину ($\Delta Ct = -1,22 \div -0,68$). Культура № 25 чувствительна к этамбутолу ($\Delta Ct=3,73$) и устойчива к остальным ПТП ($\Delta Ct = -0,18 \div 2,21$).

Таким образом, для интерпретации результатов анализа нами были выбраны следующие критерии. Образец считается чувствительным, если разница в значениях пороговых циклов между пробой с ПТП и контролем без ПТП составляет более 3 циклов ($\Delta Ct \geq 3$). Образец считается устойчивым, если разница в значениях пороговых циклов между пробой с ПТП и контролем без ПТП составляет от -3 до 3 циклов ($-3 < \Delta Ct < 3$).

Критериями достоверности полученных результатов являются два контроля: контроль образца без ПТП и контроль размножения фага. Пороговый цикл для контрольной пробы без ПТП должен иметь либо наименьшее значение по сравнению с пробами с ПТП, либо значение не более чем на 3 цикла больше, чем наименьшее значение порогового цикла пробы с ПТП: $Ct_{ПТП} + 3 < Ct_{контр} < Ct_{ПТП}$. Получение значения порогового цикла для контроля без ПТП $Ct_{контр} > Ct_{ПТП} + 3$ будет свидетельствовать о некорректном анализе контрольной пробы без ПТП, и результаты по всем ПТП для этого образца признаются недостоверными. Контроль размножения фага, т.е. разница между пороговым циклом контроля фага $Ct_{фага}$, соответствующего количеству фага, добавляемому к образцу, и пороговым циклом контроля пробы без ПТП, должен составлять более 3 циклов ($\Delta Ct_{фага} = Ct_{фага} - Ct_{контр.} > 3$), что свидетельствует об увеличении количества фага в контрольной пробе без ПТП не менее чем в 10 раз.

Для оценки эффективности технологии применения литического микобактериофага D29 для ускоренного определения лекарственной чувствительности МБТ к ПТП были проведены исследования 70 культур МБТ для анализа лекарственной чувствительности/устойчивости к 4-м противотуберкулезным препаратам первой линии: стрептомицину, изониазиду, рифампицину и этамбутолу, и 40 культур МБТ для анализа лекарственной чувствительности/устойчивости к 4-м противотуберкулезным препаратам второй

линии: амикацину, моксисицилину, лефлуксацину и канамицину. В качестве референтного метода, позволяющего установить фенотипическую ("истинную") чувствительность и устойчивость МБТ к используемым препаратам, был применен метод определения лекарственной чувствительности методом пропорций на жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 в автоматизированной системе ВАСТЕС. Сравнительные результаты представлены в Таблице 13. Данные разброса результатов исследования методом ПЦР-РВ и Vactec MGIT показаны на диаграммах (Рисунок 20).

Таблица 13 – Сравнительные результаты определения лекарственной чувствительности/устойчивости клинических изолятов МБТ к препаратам 1-й и 2-ой линии при использовании изучаемой лабораторной технологии с применением микобактериофага D29 и автоматизированной системы ВАСТЕС

Антибиотики	Критические концентрации, мкг/мл	Число штаммов	Рез-ты Вастес	Число образцов	Результаты фагового метода			Диагностические характеристики фагового метода (%)			
					Средняя ΔC_T	Чувствительные (S)	Устойчивые (R)	Чувствительность	Специфичность	ППЗ	ОПЗ
Стрептомицин	1	70	S	37	8,5	37	0	100	100	100	100
			R	33	0,04	0	33				
Изониазид	0,1		S	41	8,4	41	0	100	100	100	100
			R	29	-0,1	0	29				
Рифампицин	1		S	46	8,6	46	0	100	100	100	100
			R	24	0,1	0	24				
Этамбутол	5		S	50	7,6	48	2	100	96	91	100
			R	20	0,8	0	20				
Амикацин	1		S	32	7,6	32	0	88	100	100	97
			R	8	0,3	1	7				
Моксифлоксацин	1		S	35	8,0	35	0	100	100	100	100
			R	5	0,84	0	5				
Левифлоксацин	1,5		S	34	8,3	34	0	100	100	100	100
			R	6	0,7	0	6				
Канамицин	2,5	S	28	8,3	28	0	100	100	100	100	
		R	12	1.03	0	12					

Как видно из таблицы 13, чувствительность и специфичность исследуемого метода с использованием фага к большинству выбранных антибиотикам составила 100%, за исключением чувствительности к амикацину – 88% и специфичности к этамбутолу – 96%. Также положительное прогностическое значение (ППЗ) и отрицательное прогностическое значение (ОПЗ) составили 100%, за исключением результатов ППЗ по этамбутолу (91%) и ОПЗ по амикацину (97%). Совпадаемость результатов технологии с применением литического микобактериофага D29 и метода пропорций в автоматизированной системе Bactec MGIT составила для препаратов первого ряда 99,3%, для препаратов второго ряда – 99,4%.

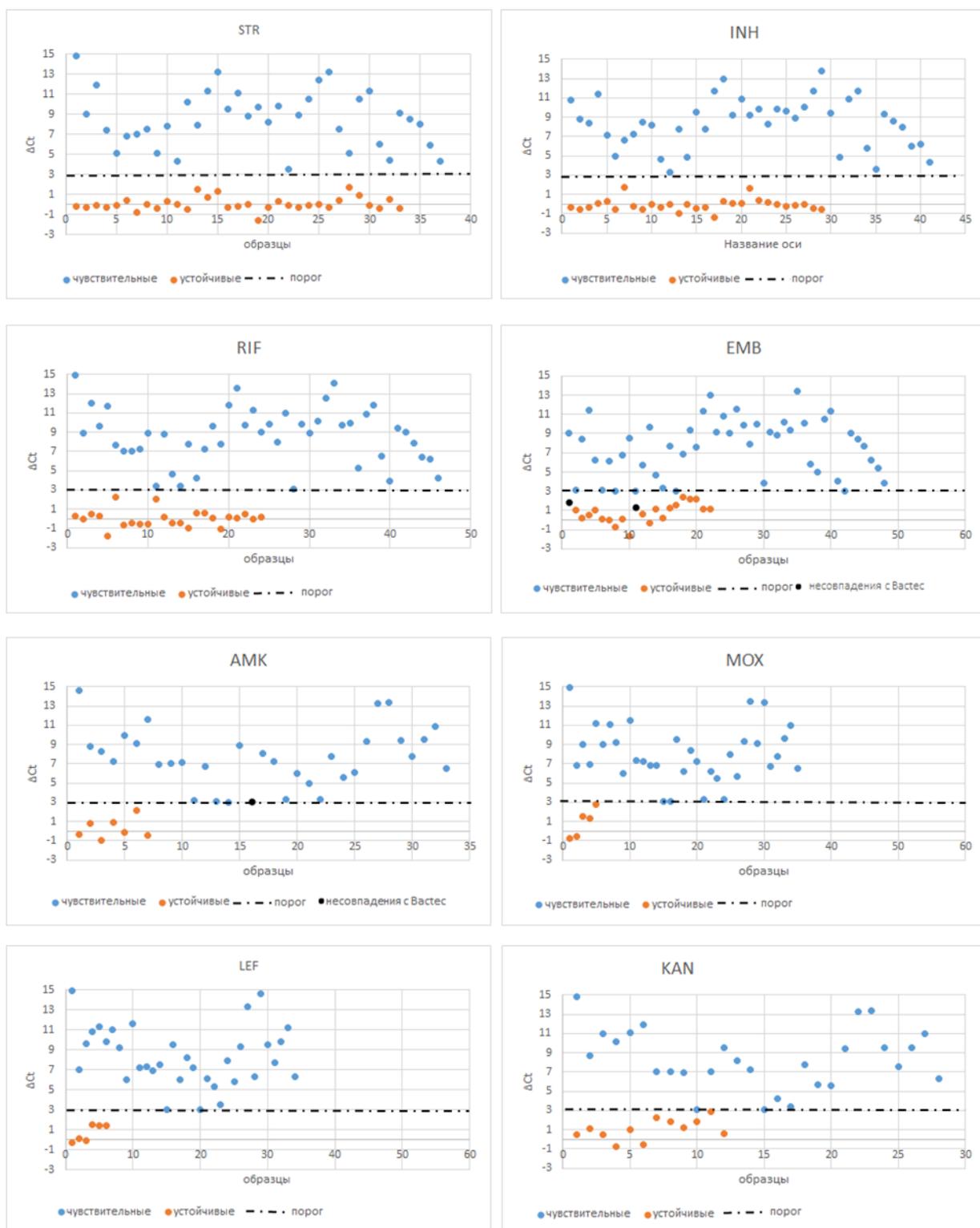


Рисунок 20 – Диаграммы сравнения результатов исследования устойчивости клинических изолятов к ПТБ с помощью технологии с применением литического микобактериофага D29 и автоматизированной системы Vastec MGIT

В представленной выше главе показаны результаты применения микобактериофагов для ускоренного определения лекарственной чувствительности/устойчивости клинических штаммов (изолятов) МБТ, сочетающего фенотипический и молекулярно-генетический методы. Разработанная технология по эффективности и точности не уступает признанному и довольно широко распространенному методу – импортной системе Bactec MGIT, однако, исходя из наших расчетов, является существенно более экономичной.

В частности, эта технология позволяет создать новый отечественный набор реагентов, себестоимость которого, в пересчете на один тест определения лекарственной чувствительности к одному препарату, может быть не менее, чем в 4-5 раз ниже стоимости одной пробирки с флуоресцентным маркером в системе Bactec (800-900 руб). Низкая себестоимость анализа обусловлена меньшим объемом питательной среды (1 мл), использованием отечественной обогащающей биодобавки, а также использованием отечественных реагентов для ПЦР-РВ анализа.

3.8 Быстрое определение дормантности МБТ с помощью анализа ДНК литического микобактериофага D29

Исследование дормантности проводили на культуре H37Rv. Культуру H37Rv инкубировали 3-е суток в присутствии рифампицина 5 мкг/мл в термостате на шейкере. МБТ отмывали от рифампицина и затем культивировали в 48-луночном планшете в среде Миддлбрук 7H9 в течение 3-5 суток. В часть опытных лунок вносили супернатант растущей культуры МБТ, профильтрованный на фильтре 0,22 мк. Этот супернатант содержал белок Rpf, реактивирующий дормантные клетки МБТ. Активацию клеток определяли путем добавления микобактериофага в концентрации 10^8 БОЕ/мл. После суточной инкубации выделяли ДНК и проводили ПЦР-РВ (Таблица 14).

Таблица 14 – Результаты действия супернатанта на дормантные клетки в анализе с помощью ПЦР-РВ

Название образцов	Пороговый цикл, Ct, по каналу FAM
ОКО	≥45
Фаг	19,2
Фаг + среда	26,7
Культура + Фаг	16,5
Культура + R + Фаг 1	26.0
Культура + R + Фаг 2	27.7
Культура + R + Фаг 3	26.6
Культура + R + супернатант + Фаг 1	19,8
Культура + R + супернатант + Фаг 2	18,8
Культура + R + супернатант + Фаг 3	19,4

Из таблицы 14 видно, что значения пороговых циклов, соответствующих ДНК фага в образцах с рифампицином и супернатантом на 7,5 циклов меньше, чем значения пороговых циклов для образцов без супернатанта, что свидетельствует об увеличении количества ДНК фага в 100 раз и, следовательно, о размножении фага. Активное размножение фага доказывает, что Rpf белок, присутствующий в супернатанте растущей культуры, активирует дормантные клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Применение микобактериофагов для лечения туберкулезной инфекции является одной из обсуждаемых в научной литературе тем в общем контексте распространения лекарственно-устойчивых микроорганизмов.

Однако, имеются лишь единичные работы, в которых обсуждаются аспекты практического применения микобактериофагов в качестве антимикобактериальных агентов, и единичные экспериментальные работы на модели культуры клеток.

В нашей работе был использован микобактериофаг D29, который был любезно предоставлен проф. Graham Hatfull из института бактериофагов Питтсбургского университета (США). Мы подтвердили, что литический штамм микобактериофага D29 может лизировать клинические изоляты МБТ вне зависимости от их лекарственной устойчивости к известным противотуберкулезным препаратам. Это было подтверждено при исследовании 15 клинических изолятов, 10 из которых были устойчивыми к различным препаратам. При инкубации достаточно высоких концентраций растущих культур МБТ ($10^5 - 10^6$ /мл) в присутствии литического микобактериофага с последующим отмыванием и посевами на плотной агаровой среде Миддлбрук 7H10 рост не обнаруживался, тогда как в контрольных пробах (не инкубированных в присутствии микобактериофага), рост МБТ был массивным.

Рассматривая возможности литического действия микобактериофага в условиях макроорганизма, мы считали необходимым их применение путем включения фагов в нано-микровезикулы липосомы. Это должно было позволить улучшить доставку микобактериофага к зонам туберкулезного воспаления. Поскольку для получения липосомального препарата микобактериофага, получаемый исходно при размножении фаговых частиц в культуре разрушаемых *M. smegmatis* препарат литического микобактериофага представляет собой клеточный лизат, т.е. содержит липазы (фаговые лизины) и обломки ДНК микобактерий, этот препарат должен быть очищен до включения в липосомы.

При этом, для получения эффективного липосомального препарата, концентрация микобактериофага должна быть достаточно высокой.

В рамках нашей работы были воспроизведены и несколько модифицированы известные методы наработки литического микобактериофага D29. Модификация метода позволила существенно повысить, не менее чем на 2 порядка (до 10^{11} БОЕ/мл), концентрацию микобактериофага, с получением более значимых объемов препарата. После концентрирования фага препарат был очищен с помощью ионно-обменной хроматографии, отдиализован и стерилизован с использованием ультрафильтрации на фильтрах 0,22 мк.

Нами также был разработан метод получения липосомального микобактериофага с размером частиц 0,4 мк. Размер частиц определялся размером микобактериофага – около 200 нм. Получение частиц липосом с включенным микобактериофагом было подтверждено с помощью электронной микроскопии.

Мы получили патент на изобретение «препарат на основе литического микобактериофага и способ его получения» № 2691439 С1 от 16.08.2018 г.

Нами была разработана мультиплексная специфичная ПЦР-РВ система «Фаг-МБТ-ВПК», которая содержит три независимые реакции в одной пробирке. Она позволяет одновременно выявлять ДНК микобактериофага D29, ДНК МБТ и ДНК ВПК. Эта система обладает высокими аналитическими характеристиками по специфичности, чувствительности и эффективности. Систему «Фаг-МБТ-ВПК» мы использовали для решения исследовательских задач в нашей работе.

В условиях клеточных моделей *in vitro* с внутриклеточным инфицированием МБТ необходимо было изучить транспорт микобактериофага в эукариоты клеточных моделей. В связи с этим, для исследований была необходимость получения культуры макрофагов с внутриклеточным инфицированием.

В процессе использования культуры перевиваемых макрофагов линии RAW264.7 (АТСС) нами был значительно модифицирован способ инфицирования клеток, поскольку при ранее описанном методе МБТ прикреплялись к поверхности лунок 6-луночного культурального планшета и не могли быть отмыты обычным образом. Поэтому после инфицирования эукариотов, при

суточной инкубации с МБТ, мы выделяли эукариоты от не фагоцитированных МБТ с помощью центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque. Уровень инфицирования эукариотов был подтвержден с помощью количественного определения ДНК МБТ в клетках эукариотов при проведении ПЦР-РВ. В процессе исследований с помощью количественного анализа ДНК микобактериофага, было установлено, что уровень внутриклеточного проникновения липосомального микобактериофага в 4-10 раз выше, чем проникновение свободного внелипосомного микобактериофага.

При изучении антимикобактериального эффекта этих препаратов в отношении внутриклеточных МБТ была показана их способность ингибировать рост МБТ при посевах лизированных культур на чашках со средой Миддлбрук 7Н10. Антимикобактериальный эффект липосомального микобактериофага был более высоким по сравнению с внелипосомным бактериофагом.

Нами также была изучена модель туберкулезной гранулемы *in vitro*, образуемая мононуклеарами периферической крови в присутствии МБТ при различных соотношениях эукариотов и микобактерий, ранее описанная в публикациях ряда авторов (Kiran D. et al., 2016). При концентрации мононуклеаров периферической крови и МБТ 6:1, туберкулезные гранулемы формировались к 12-14 дню.

На этой модели был изучен антимикобактериальный эффект липосомального микобактериофага, в сравнении с микобактериофагом в свободной форме. Было установлено, что эффект свободного микобактериофага, инкубированного в течение суток в лунках с туберкулезной гранулемой, где содержится большое число МБТ, окруженных клетками очага, содержащего активные макрофаги и дендритные клетки, ингибирование МБТ относительно невелико, и не поддается статистическому подсчету. Однако, использование липосомального микобактериофага в той же концентрации по числу фаговых частиц, оказывало сильный антибактериальный эффект. Число колоний МБТ при посевах материала туберкулезной гранулемы в контрольной группе, составило

более 1000, в группе с очищенным фагом – $583 \pm 24,4$, а в группе с липосомальным препаратом – $64 \pm 3,2$. Критерий t-тест Стьюдента $P < 0,01$.

Другая часть нашей работы посвящена применению микобактериофагов для ускоренного фенотипического определения лекарственной чувствительности/устойчивости МБТ в клинических изолятах.

Основной принцип такого исследования состоит в том, что литические микобактериофаги размножаются в клетках МБТ при сохранении ими активного метаболизма. При сохранении чувствительности микобактерий к ПТП, метаболизм ингибируется, а при устойчивости – не ингибируется. Соответственно, микобактериофаги не размножаются в клетках, чувствительных к конкретным ПТП микобактерий, тогда как они могут размножаться в клетках микобактерий, устойчивых к определенным ПТП.

Применение микобактериофагов в качестве биологического инструмента для определения лекарственной чувствительности/устойчивости клинических изолятов микобактерий туберкулеза было изучено в серии работ, начиная с конца 90-х годов прошлого века. В них была показана эффективность применения литических микобактериофагов для ускоренного анализа лекарственной чувствительности МБТ (Eltringham I., 1999) на основе подсчета бляшкообразующих единиц (зон лизиса на газоне *M. Smegmatis*), количество которых коррелировало с уровнем чувствительности/устойчивости к антибактериальным препаратам в зависимости от угнетения метаболизма исследуемых МБТ и соответствующего угнетения размножения микобактериофага. В 2012 и 2014 гг. были опубликованы работы американских авторов (Pholwat S. et al., 2012; Foonglada S. et al., 2014), в которых учет размножения микобактериофагов проводили с помощью ПЦР в реальном времени, позволяющей провести количественный анализ ДНК фагов.

Такая технология представляется наиболее перспективной, однако, она тоже не получила практического применения.

Результаты размножения микобактериофагов в клетках МБТ могут быть учтены при количественном определении ДНК микобактериофагов в клетках

микобактерий с помощью ПЦР-РВ. Анализ результатов проводится при сравнении контрольных культур МБТ (без присутствия антибиотика) с культурами, в которые вносили ПТП в известных критических концентрациях. Время анализа с использованием нашей тест-системы составляет 5 дней. Инкубация МБТ с ПТП продолжается 48 часов, после чего в культуру вносят микобактериофаг на 48 часов и на 5-й день выделяют ДНК фага и МБТ и исследуют с помощью ПЦР-РВ. При получении разницы в пороговых циклах ПЦР-РВ (ΔCt) между контролем и опытной пробой в присутствии антибиотика составляет 3 и более циклов ($\Delta Ct \geq 3$), образец считается чувствительным к ПТП.

Нами была разработана простая технология проведения такого анализа в формате 24-луночных планшетов. Было проведено сравнительное исследование эффективности таких исследований при сравнении разрабатываемого метода и широко известного метода Bactec MGIT.

Были изучены 70 клинических изолятов, полученных после первичного роста в системе Bactec MGIT, для определения их чувствительности к 4-м противотуберкулезным препаратам 1-й линии и 40 клинических изолятов с определением их чувствительности к 4-м препаратам 2-й линии. Было установлено, что чувствительность нового метода для препаратов 1-й линии составила 100%, специфичность – 98,9% при 99,3% совпадений с результатами Bactec MGIT. Для препаратов 2-й линии число совпадений – 99,4%, чувствительность – 97%, специфичность – 100%.

По нашим расчетам, разрабатываемый набор реагентов может быть в 3 раза более экономичным по сравнению с системой Bactec MGIT.

В последнем разделе диссертационного исследования показана возможность применения литического микобактериофага для быстрой оценки возникновения дормантности МБТ и их возможной реактивации.

Для оценки дормантности МБТ, возникающей *in vitro* в результате 3-суточного культивирования в присутствии рифампицина в концентрации 5 мкг/мл, в культуру вносили микобактериофаг D29 и супернатант растущей культуры H37Rv, содержащий реактивирующие белки Rpf (resuscitation promoting

factor). Поскольку размножение микобактериофага происходит только при восстановлении метаболизма, т.е. реактивации dormantных культур МБТ, то их реактивация с помощью *grf* белка свидетельствовала о наличии dormantности МБТ. В условиях реактивации метаболизма МБТ, измеряемое количество ДНК микобактериофага возрастает через сутки. Его прирост позволяет быстро оценить реактивацию культуры МБТ после выхода из состояния dormantности.

Целесообразность таких исследований диктуется проблемой перехода МБТ в dormantность под воздействием противотуберкулезных препаратов, которые получают больные туберкулезом. При переходе МБТ в dormantность, эффективность химиотерапии существенно снижается.

ВЫВОДЫ ДИССЕРТАЦИИ

1. Разработана мультиплексная ПЦР-РВ система «Фаг-МБТ-ВПК».
2. Разработана модель внутриклеточной туберкулезной инфекции на основе использования перевиваемой культуры макрофагов мышей линии RAW 264-7 (АТСС).
3. Оптимизированы условия получения туберкулезной гранулемы *in vitro* на основе использования моноклеарных клеток периферической крови человека.
4. Оптимизирована технология наработки литического микобактериофага D29 и выделения его очищенного препарата из бактериальных лизатов.
5. Разработан оригинальный метод получения липосомального препарата литического микобактериофага D29.
6. Впервые показана высокая антимиkobактериальная эффективность липосомного препарата микобактериофага D29 по сравнению с использованием свободного (внелипосомного) препарата микобактериофага D29.
7. Оптимизирован метод ускоренного фенотипического определения лекарственной чувствительности клинических изолятов МБТ, полученных после первичного культивирования в системе Bactec MGIT на основе применения микобактериофага D29.
8. Показана возможность быстрого определения дормантности и реактивации МБТ при использовании микобактериофага D29.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АБП – антибактериальные препараты

МБТ – микобактерии туберкулеза

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КОЕ – колониеобразующие единицы

БОЕ – бляшкообразующая единица

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

ВПК – внутренний положительный контроль

ПТП – противотуберкулезные препараты

ППЗ – положительное прогностическое значение

ОПЗ – отрицательное прогностическое значение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авербах М.М. Туберкулезная гранулема. Современный взгляд на иммуногенез и клеточный состав. *Туберкулез и болезни легких*, 2010, № 6, стр. 3-8.
2. Владимирский М.А., Ладыгина Г.А., Тенцова А.И. Эффективность стрептомицина заключенного в липосомы при экспериментальном туберкулезе у мышей. *Антибиотики*, 1983, № 1, стр. 23-26.
3. Гельберг С.И. и Шаров Г.И. Действие микобактериофагов при экспериментальном туберкулезе. *Проблемы туберкулеза*, 1975, № 4б, стр. 70-74.
4. Земскова З.С. Дорожкова И.Р. Патоморфологическая оценка терапевтического эффекта микобактериофагов при туберкулезе. *Проблемы туберкулеза*, 1991, № 11, стр. 63-66.
5. Козьмин-Соколов Б.Н., Вавилин Г.И., Эртевциан Л.Н. и соавторы. Влияние микобактериофагов на течение экспериментальной туберкулезной инфекции у белых мышей. *Проблемы туберкулеза*, 1975, № 4, стр. 75-79.
6. Кузьмичева Г.А., Белявская В.А. Обзоры пептидный фаговый дисплей в биотехнологии и биомедицине. *Биомедицинская химия*, 2016, том 62, вып. 5, стр. 481-495.
7. Курунов Ю.Н и соавторы. «Способ фаготерапии туберкулеза». 2001 г., патент № 2214829.
8. Abedon S. Phage therapy of pulmonary infections. *Bacteriophage*, 2015, 5(1), doi: 10.1080/21597081.2015.1020260.
9. Abedon S., Kuhl S, Blasdel B., Kutter E. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 2011, 1(2), pp. 66-85.
10. Abu Lila A.S., Ishida T. Liposomal delivery systems: design optimization and current applications. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2017, 40(1), pp.1–10.
11. Ackermann H. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of virology*, 2007, 152 (2), pp. 227–243.

12. Adriaenssens E., Lehmand S., Vandersteegen K. et al. CIM® Monolithic Anion-Exchange Chromatography as a Useful Alternative to CsCl Gradient Purification of Bacteriophage Particles. *Virology*, 2012, 434(2), pp. 265–270.
13. Asma Hatoum-Aslan. Phage Genetic Engineering Using CRISPR–Cas Systems. *Viruses*, 2018,10(6), pp.2-11.
14. Banaiee N., et al. Rapid identification and susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from MGIT cultures with luciferase reporter mycobacteriophages. *Journal of medical microbiology*, 2003, 52, pp. 557–561.
15. Banaiee N., Valle B., Udani R. et al. Luciferase Reporter Mycobacteriophages for Detection, Identification, and Antibiotic Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* in Mexico. *Journal of Clinical microbiology*, 2001, 39(11), pp.3883-3888.
16. Barrios-Payán J., Saqui-Salces M., Jeyanathan M., Alcántara-Vazquez A., Castañon-Arreola M., Rook G., Hernandez-Pando R. Extrapulmonary locations of *Mycobacterium tuberculosis* DNA during latent infection. *The Journal infectious diseases*, 2012, 206(8), pp. 1194–1205.
17. Bonilla N., Rojas M., Netto Flores Cruz G. et al. Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. *Peer Journal*, 2016, 4, doi: 10.7717/peerj.2261.
18. Boucher H., Talbot G. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 2009, 48(1), pp. 1-12.
19. Campbell P., et al. Molecular detection of mutations associated with first- and second-line drug resistance compared with conventional drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 2011, 55, pp. 2032–2041.
20. Chan B., Abedon S. Phage therapy pharmacology phage cocktails. *Advances in Applied Microbiology*. 2012, 78, pp. 1–23.
21. Chibani-Chennoufi S., Bruttin A., Dillmann M.-L., Brüssow H. Phage-host interaction: an ecological perspective. *J. Bacteriology*, 2004, 186 (12), pp. 3677–3686.

22. Da Silva J., Joas L., Mariana L, Broussard G., et al. Application of BRED technology to construct recombinant D29 reporter phage expressing EGFP. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 344(2), pp.166-172.
23. Dąbrowska K., Switala-Jelen K., Opolski A., Weber-Dabrowska B., Gorski A. Bacteriophage penetration in vertebrates. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 98 (1), pp. 7–13.
24. Deng L, Linero F, Saelens X. Production and Purification of Recombinant Filamentous Bacteriophages Displaying Immunogenic Heterologous Epitopes. *Methods in molecular biology*, 2016, 1404, pp. 483-495.
25. Deol P., Khuller G., Joshi K. Therapeutic Efficacies of Isoniazid and Rifampin Encapsulated in Lung-Specific Stealth Liposomes against Mycobacterium tuberculosis Infection Induced in Mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1997, 41(6), pp. 1211–1214.
26. d'Hérelle F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Research in microbiology*, 2007, 158(7), pp. 553–554.
27. Domingo-Calap P, Georgel P, Bahram S. Back to the future: bacteriophages as promising therapeutic tools. *HLA*, 2016, 87(3), pp. 133-140.
28. Domingo-Calap P., Delgado-Martínez J. Review Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics*, 2018, 7(3), pp. 1-16.
29. Dye C, Williams B.G. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science*, 2010, 328, pp. 856–861.
30. Edgar R., Friedman N., Molshanski-Mor S., Etgar R., Qimron U. Reversing bacterial resistance to antibiotics by phage-mediated delivery of dominant sensitive genes. *Applied and environmental microbiology*, 2012, 78(3), 744-751.
31. Eltringham I., Wilson S., Drobniowski F. Evaluation of a Bacteriophage-Based Assay (Phage Amplified Biologically Assay) as a Rapid Screen for Resistance to Isoniazid, Ethambutol, Streptomycin, Pyrazinamide, and Ciprofloxacin among Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical microbiology*, 1999, 37(11), pp. 3528–3532.

32. Fitzgerald L.E., Abendano N., Juste R. and Alonso –Hearn M. Three-dimensional in vitro models of Granuloma to study bacteria-host interactions, drug-susceptibility and resuscitation of dormant mycobacteria. Review. *BioMed research international*, 2014, doi: 10.1155/2014/623856.
33. Foongladda S., Klayut W., Chinli R., Pholwat S., Houptb E.R. Use of Mycobacteriophage Quantitative PCR on MGIT Broths for a Rapid Tuberculosis Antibiogram. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(5), pp. 1523-1528.
34. Ford M., Sarkis G., Belanger A. et al. Genome structure of Mycobacteriophage D29: implications for phage evolution. *Journal of molecular biology*, 1998, 279(1), pp. 143-164.
35. Gengenbacher M. and Kaufmann S. Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy. *FEMS Microbiol Rev.* 2012, 36(3), pp. 514–532
36. Górski A., Miedzybrodzki R., Lobočka M. et al. Phage Therapy: What Have We Learned? *Viruses*, 2018, 10(6), pp. 1-28.
37. Guirado Evelin, Mbawuiké U., Keiser T. et al. Characterization of host and microbial determinants in individuals with latent tuberculosis infection using a human granuloma model. *Mbio*, 2015, 6(1), doi: 10.1128/mBio.02537-14.
38. Hanlon G. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2007, 30 (2), pp. 118–128.
39. Harada L., Silva E., Campos W., Del Fiol F., Vila M., et al. Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiological research*, 2018, 212-213, pp. 38-58.
40. Hatfull G. Mycobacteriophages: Windows into Tuberculosis. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(3), e1003953.
41. Hatfull G. Molecular genetics of Mycobacteriophages. *Microbiology Spectrum*, 2014; 2(2), pp. 1–36.
42. Hatfull G. et al. Science Education Alliance Phage Hunters Complete Genome Sequences of 61 Mycobacteriophages. *Genome announcements*, 2016, 4(4), doi: 10.1128/genomeA.

43. Hayes S., Mahony J., Nauta A., van Sinderen D. Metagenomic Approaches to Assess Bacteriophages in Various Environmental Niches. *Viruses*, 2017, 9(6), doi:10.3390/v9060127.
44. Hendon-Dunn C.L., Doris K., et al. Cytometry Method for Rapidly Assessing Mycobacterium tuberculosis Responses to Antibiotics with Different Modes of Action. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(7), 3869–3883.
45. Henry K., Arbabi-Ghahroudi M., Scott J. Beyond phage display: non-traditional applications of the filamentous bacteriophage as a vaccine carrier, therapeutic biologic, and bioconjugation scaffold. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6(755), doi: 10.3389/fmicb.2015.00755.
46. Henry K., Arbabi-Ghahroudi M., Scott J. Beyond phage display: non-traditional applications of the filamentous bacteriophage as a vaccine carrier, therapeutic biologic, and bioconjugation scaffold. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6, doi: 10.3389/fmicb.2015.00755.
47. Henry K., Murira A., van Houten N, Scott J. Developing strategies to enhance and focus humoral immune responses using filamentous phage as a model antigen. *Bioengineered Bugs*, 2011, 2(5), pp. 275-283.
48. Henry M., Lavigne R., Debarbieux L. Predicting in vivo efficacy of therapeutic bacteriophages used to treat pulmonary infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013, 57(12), pp. 5961–5968.
49. Hermoso J., García J., García P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Current Opinion in microbiology*, 2007, 10 (5), pp. 461–472.
50. Huang W., Chi T., Wu M., Jou R. Performance assessment of GenoType MTBDRsl test and DNA sequencing for detection of second –line and ethambutol drug resistance among patients infected with multidrug-resistant M.tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 2011, 49(7), pp. 2502-2508.
51. Hyman P., Abedon S., Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in applied microbiology*, 2010, 70, pp. 217–248.

52. Ido Y., Ruth K. et al. Different approaches for using bacteriophages against antibiotic resistant bacteria. *Bacteriophage*, 2014, 4(1), doi: 10.4161/bact.28491.
53. Jacobs W., Barletta R., Udani R., Chan J., Kalkut G., et al. Rapid assessment of drug susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* by means of luciferase reporter phages. *Science*, 1993, 260, pp. 819–822.
54. Jain P., Hartman T., Eisenberg N., et al. 2GFP10, a High-Intensity Fluorophage, Enables Detection and Rapid Drug Susceptibility Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Directly from Sputum Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(4), pp. 1362-1369.
55. Jain P., Thaler D.S., Maiga M. et al. Reporter Phage and Breath Tests: Emerging Phenotypic Assays for Diagnosing Active Tuberculosis, Antibiotic Resistance, and Treatment Efficacy. *The Journal of Infectious Diseases*, 2011, 204, pp. 1142–1150.
56. Jain P., Weinrick B., Kalivoda E., et al. Dual-Reporter *Mycobacteriophages* (Φ 2DRMs) Reveal Preexisting *Mycobacterium tuberculosis* Persistent Cells in Human Sputum. *mBio*, 2016, 7(5), e01023-16.
57. Joshi H., Pratap S., Suryanarayanan V. et al. Dissecting the Structure-function Relationship in Lysozyme Domain of *Mycobacteriophage* D29-encoded Peptidoglycan. *FEBS Letter*, 2018, 591(20), 3276-3287.
58. Justo O.R., Moraes A.M. Incorporation of antibiotics in liposomes designed for tuberculosis therapy by inhalation. *Drug Delivery*, 2003, 10(3), pp. 201–217.
59. Justo O.R., Moraes A.M. Kanamycin incorporation in lipid vesicles prepared by ethanol injection designed for tuberculosis treatment. *The Journal pharmacy and pharmacology*, 2005, 57(1), pp. 23-30.
60. Kazemi Oskuee R., Mahmoudi A., Gholami L., Rahmatkhah A., Malaekheh-Nikouei B. Cationic Liposomes Modified with Polyallylamine as a Gene Carrier: Preparation, Characterization and Transfection Efficiency Evaluation. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2016, 6(4), pp.515-520.

61. Kiran D., Podell B., Chambers M., Basaraba R.G. Host-directed therapy targeting the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma: a review. *Seminars in Immunopathology*, 2016, 38 (2), pp. 167–183.
62. Kokjohn T., Sayler G., Miller R. Attachment and replication of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages under conditions simulating aquatic environments. *J. Gen. Microbiol*, 1991, 137, pp. 661–666.
63. Kutateladze M., Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(12), pp. 591–595.
64. Ladigina G., Vladimirsky M. The comparative pharmacokinetics of 3H-dihydrostreptomycin in solution and liposomal form in normal and *Mycobacterium tuberculosis* infected mice. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 1986, 40(10), 416-420.
65. Laxminarayan R., Duse A., Wattal C. et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The lancet. Infectious diseases*, 2013, 13(12), pp.1057-1098.
66. Lillebaek T, Dirksen A, Vynnycky E, Baess I, Thomsen V, Andersen A.B. Stability of DNA patterns and evidence of *Mycobacterium tuberculosis* reactivation occurring decades after the initial infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 2003, 188 (7), pp. 1032–1039.
67. Lin D., Koskella B., Lin H. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 2017, 8(3), pp. 162-173.
68. Liu K., Wen Z., Li N., Yang W. et al. Purification and concentration of mycobacteriophage D29 using monolithic chromatographic columns. *Journal of virological methods*, 2012, 186, pp. 7-13.
69. Liu K., Wen Z., Li N., Yang W., Wang J., Hu L., Dong H., Lu J., Li J. Impact of relative humidity and collection media on mycobacteriophage D29 aerosol. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78 (5), pp. 1466–1472.
70. Loc-Carillo C., Abedon S. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage*, 2011, 1(2), pp. 111–14.

71. Lu T., Collins J. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(12), pp. 4629–4634.
72. Mancuso F., Shi J., Malik D. High Throughput Manufacturing of Bacteriophages Using Continuous Stirred Tank Bioreactors Connected in Series to Ensure Optimum Host Bacteria Physiology for Phage Production. *Viruses*, 2018, 10(10), doi: 10.3390/v10100537.
73. McCune R., Feldmann F., Mcdermott W. Microbial persistence. II. Characteristics of the sterile state of tubercle bacilli. *Journal Experimental Medicine*, 1966, 123(3), pp. 469-486.
74. Meisel J., Gokel G. A Simplified Direct Lipid Mixing Lipoplex Preparation: Comparison of Liposomal-, Dimethylsulfoxide-, and Ethanol-Based Methods. *Scientific Reports*, 2016, 6, doi: 10.1038/srep27662.
75. Morozova V., Vlassov V., Tikunova N. Applications of Bacteriophages in the Treatment of Localized Infections in Humans. *Fontiers microbiology*, 2018, 9, doi: 10.3389/fmicb.2018.01696
76. Mukamolova G., Turapov O., Malkin J., Waltmann G., Barer M. Resuscitation-promoting factors reveal an occult population of tubercle bacilli in sputum. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2010, 181 (2), pp. 174–180.
77. Myelnikov D. An Alternative Cure: The Adoption and Survival of Bacteriophage Therapy in the USSR, 1922–1955. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, 2018, 73(4), pp. 385–411.
78. Nieth A., Verseux C., Barnert S., Süß R, Römer W. A first step toward liposome-mediated intracellular bacteriophage therapy. *Expert opinion on drug delivery*, 2015, 12(9), pp. 1411-1424.
79. Nikitushkin V., Demina G., Kaprelyants A. Rpf Proteins Are the Factors of Reactivation of the Dormant Forms of Actinobacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 2016, 81 (13), pp. 1719-1734.

80. Nilsson A. Phage therapy—constraints and possibilities. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 2014, 119(2), pp. 192–198.
81. Nisini R., Poerio N., Mariotti S. De Santis F., Fraziano M. The Multirole of Liposomes in Therapy and Prevention of infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9, pp.1-23.
82. Nkanga C.I., Krause R.W., Noundou X.S, Walker R.B. Preparation and characterization of isoniazid-loaded crude soybean lecithin liposomes. *International journal of pharmaceutics*, 2017, 526(1-2), pp. 466-473.
83. O'Donnell M., Pym A., Jain P., et al. A Novel Reporter Phage to Detect Tuberculosis and Rifampin Resistance in a High-HIV-Burden Population. *Journal of Clinical microbiology*, 2015, 53(7), pp. 2189-2194.
84. Pholwat S., Ehdaie B., Foongladda S., Kelly K., Houpt E. Real-Time PCR Using Mycobacteriophage DNA for Rapid Phenotypic Drug Susceptibility Results for Mycobacterium tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 2012, 50(3), pp.754-761.
85. Pires D., Cleto S., Sillankorva, S. et al. Genetically Engineered Phages: a Review of Advances over the Last Decade. *Microbiology and Molecular biology reviews*. 2016, 80(3), pp. 524-543.
86. Piuri M., Jacobs W. Jr, Hatfull G. Fluoromycobacteriophages for rapid, specific, and sensitive antibiotic susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS one*, 2009, 4(3), doi: 10.1371/journal.pone.0004870.
87. Pohane A., Patidar N., Jain V. Modulation of domain–domain interaction and protein function by a charged linker: A case study of mycobacteriophage D29 endolysin. *FEBS letters*, 2015, 589(6), pp. 695-701.
88. Reardon S. Phage therapy gets revitalized. *Nature*, 2014, 510(7503), pp. 15–16.
89. Rios A., Moutinho C., Pinto F., Del Fiol F., Jozala A., Chaud M., Vila M., Teixeira J., Balcão V. Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art. *Microbiological research*, 2016, 191, pp. 51–80.
90. Rohde C., Wittmann J., Kutter E. Bacteriophages: A therapy concept against multi-drug- resistant bacteria. *Surgical infections*, 2018, 19(8), pp.737-744.

91. Rondón L., Urdániz E., Latini C., et. al. Fluoromycobacteriophages Can Detect Viable Mycobacterium tuberculosis and Determine Phenotypic Rifampicin Resistance in 3–5 Days From Sputum Collection. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9, doi: 10.3389/fmicb.2018.01471.
92. Rossitto M., Fiscarelli E., Rosati P. Challenges and Promises for Planning Future Clinical Research Into Bacteriophage Therapy Against Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis. An Argumentative Review. *Frontiers in microbiology*, 2018, 9, doi: 10.3389/fmicb.2018.00775.
93. Rybniker J., Kramme S., Small P. Host range of 14 mycobacteriophages in Mycobacterium ulcerans and seven other mycobacteria including Mycobacterium tuberculosis – application for identification and susceptibility testing. *Journal of Medical Microbiology*, 2006, 55, pp. 37–42.
94. Schafer R., Huber U., Franklin R. Chemical and Physical Properties of Mycobacteriophage D29. *European Journal Biochemistry*, 1997, 73(1), pp. 239-246.
95. Seitzer U., Gerdes J. Generation and characterization of multicellular heterospheroids formed by human peripheral blood mononuclear cells. *Cell tissue organs*, 2003, 174(3), p. 110-116.
96. Singla S., Harjai K., Katare O., Chhibber S. Encapsulation of Bacteriophage in Liposome Accentuates Its Entry into Macrophage and Shields It from Neutralizing Antibodies. *PloS one*, 2016, 11(4), doi: 10.1371/journal.pone.0153777.
97. Skurnik M., Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int. J. Med. Microbiology*, 2006, 296 (1), pp. 5–14.
98. Soumya K., Vikas J. Mycobacteriophage D29 holin C-terminal region functionally assists in holin aggregation and bacterial cell death. *The FEBS Journal*, 2016, 283(1), 173–190.
99. Summers W., The strange history of phage therapy. *Bacteriophage*, 2012, 2 (2), pp. 130–133.
100. Swift B., Gerrard Z., Huxley J. and Rees C. Factors Affecting Phage D29 Infection: A Tool to Investigate Different Growth States of Mycobacteria. *PLoS one*, 2014, 9(9), e10690.

101. Tansi F., Rüger R., Rabenhold M., Steiniger F., Fahr A., Hilger I. Fluorescence-quenching of a Liposomal-encapsulated Near-infrared Fluorophore as a tool for in vivo optical imaging. *Journal of visualized experiments*, 2015, 95, pp.1-13.
102. Trigo G., Martins T., Fraga A., Longatto-Filho A., Castro A., Azeredo J., Pedrosa J. Phage Therapy Is Effective against Infection by *Mycobacterium ulcerans* Murine Footpad Model. *PLoS neglected tropical diseases*, 2013, 7 (4), pp.1-10.
103. Turapov O., O'Connor B., Sarybaeva A. et al. Phenotypically Adapted *Mycobacterium tuberculosis* Populations from Sputum Are Tolerant to First-Line Drugs. *Antimicrobial agents and chemotherapy reports*, 2016, 60(4), pp. 2476-2483.
104. Vladimirsky M., Ladigina G. Antibacterial activity of liposomal-entrapped streptomycin in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 1982, 36, pp. 375-377.
105. Vladimirsky M.A., Smirnova N., Blagodatskih K., Alekseev J. The rapid phenotypic assay for simultaneously detection MTB susceptibility to drug combination by mycobacteriophage DNA analysis. *Tubercle and lung disease: the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Diseases*, 2014, 18 (11), pp. 347.
106. Wittebole X., De Roock S., Steven M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 2014, 5(1), pp. 226 -235.
107. Xiong X., et al. Titer dynamic analysis of D29 within MTB –infected macrophages and effect on immune function of macrophages. *Experimental Lung Research*, 2014, 40(2), pp. 86-98
108. Yosef I, Kiro R., S. Molshanski-Moret S., Etgar R., Qimron U. Different approaches for using bacteriophages against antibiotic resistant bacteria. *Bacteriophage*, 2014, 4(1), e28491.
109. Zhu C., Cui Z., Zheng R. et al. Multi-Center Study to Evaluate the Performance of Phage Amplified Biologically Assay for Detecting TB in Sputum in the Pulmonary TB Patients. *PLoS one*, 2011, 6(9), pp. 1-6.