

ИССЛЕДОВАНИЕ *in vitro* ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ БАКТЕРИОФАГОВ В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСНЫХ ГИДРОГЕЛЕВЫХ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ

DOI: 10.17691/stm2021.13.2.03

УДК 576.8:616–001.4–089.193

Поступила 17.09.2020 г.

**В.В. Бесчастнов**, д.м.н., доцент, старший научный сотрудник Университетской клиники¹;**М.Г. Рябков**, д.м.н., доцент, ведущий научный сотрудник Университетской клиники¹;**А.Е. Леонтьев**, к.м.н., доцент, старший научный сотрудник Университетской клиники¹;**А.А. Тулупов**, младший научный сотрудник Университетской клиники¹;**Т.Н. Юданова**, д.х.н., зав. лабораторией²;**И.Ю. Широкова**, к.м.н., руководитель отдела лабораторных исследований Университетской клиники¹;**Н.А. Белянина**, младший научный сотрудник Университетской клиники¹;**О.В. Ковалишена**, д.м.н., профессор, зав. кафедрой эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины¹¹Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005;²ООО «Новые Перевязочные Материалы», д. Жучки, 2и, Сергиево-Посадский район, Московская область, 141351

Одно из направлений исследований по преодолению нарастающей антибиотикорезистентности микроорганизмов — изучение возможности использования с этой целью бактериофагов. В связи с этим приоритетной задачей является создание и поддержание достаточной концентрации бактериофагов в зоне клинического интереса. При этом важное значение имеет не только исследование использования гидрогелей для создания депо бактериофагов, но и изучение возможности их комбинирования с антиоксидантом и обезболивающим веществом с целью стимуляции репаративного процесса.

Цель исследования — оценить жизнеспособность и литическую активность бактериофагов *in vitro* при введении их в комплексное гидрогелевое раневое покрытие, в состав которого входят поливиниловый спирт как основа, фосфатный буфер, а также препараты лидокаин и янтарная кислота.

Материалы и методы. Предложена методика введения бактериофагов в состав комплексного гидрогелевого раневого покрытия *ex tempore*. На стандартных питательных средах с газом культуры тест-штамма *Staphylococcus aureus* определяли литическую активность бактериофагов в гидрогелевом раневом покрытии при следующих вариантах комбинации лекарственных средств: бактериофаги + янтарная кислота, бактериофаги + лидокаин и бактериофаги + янтарная кислота + лидокаин. Исследования литической активности бактериофагов проводили в срок от 1 до 7 сут с момента формирования гидрогеля.

Результаты. Во всех вариантах образцов гидрогелевой пластины, созданной на основе раствора, содержащего бактериофаги, в период от 1 до 7 сут отмечено наличие жизнеспособных и литически активных бактериофагов, о чем свидетельствовали участки негативной колонии тест-культуры при микробиологическом исследовании. В первые трое суток при анализе образцов всех вариантов зафиксирована прозрачная зона лизиса тест-культуры без колоний вторичного роста. При анализе образца гидрогеля, содержащего вместе с бактериофагами янтарную кислоту и лидокаин, в тест-культурах начиная с четвертых суток отмечено наличие вторичных колоний микроорганизмов, т.е. литическая активность сохранялась, но была несколько снижена.

Заключение. Использование бактериофагов в составе гидрогелей обеспечивает возможность их иммобилизации в зоне клинического интереса (раневой поверхности) с сохранением жизнеспособности и литической активности, в частности и при комбинации с янтарной кислотой и лидокаином.

Ключевые слова: бактериофаги; гидрогель; раневое покрытие; янтарная кислота; лидокаин.

Как цитировать: Beschastnov V.V., Ryabkov M.G., Leontiev A.E., Tulupov A.A., Yudanov T.N., Shirokova I.Yu., Belyanina N.A., Kovalishena O.V. Viability of bacteriophages in the complex hydrogel wound dressings *in vitro*. *Sovremennyye tehnologii v medicine* 2021; 13(2): 32–39, <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.2.03>

Для контактов: Тулупов Александр Андреевич, e-mail: tulupov.a.a@yandex.ru

Viability of Bacteriophages in the Complex Hydrogel Wound Dressings *in vitro*

V.V. Beschastnov, MD, DSc, Associate Professor, Senior Researcher, University Clinic¹;

M.G. Ryabkov, MD, DSc, Associate Professor, Leading Researcher, University Clinic¹;

A.E. Leontiev, MD, PhD, Associate Professor, Senior Researcher, University Clinic¹;

A.A. Tulupov, Junior Researcher, University Clinic¹;

T.N. Yudanova, DSc, Head of the Laboratory²;

I.Yu. Shirokova, MD, PhD, Head of the Laboratory Research Department, University Clinic¹;

N.A. Belyanina, Junior Researcher, University Clinic¹;

O.V. Kovalishena, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based Medicine¹

¹Privolzhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

²LLC "New Dressing Materials", 2i Sergiev Posad District, Zhuchki, Moscow Region, 141351, Russia

Using bacteriophages to overcome the increasing resistance of microorganisms to antibiotics is a novel research venue of clinical importance. Among other challenges, this technique is expected to create and maintain an adequate local concentration of bacteriophages at the site of application. In addition, the possibility of combining the phage preparation with antioxidants and anesthetics may provide new options for stimulating the reparative process.

The aim of the study was to assess the viability and lytic activity of bacteriophages incorporated into a hydrogel-based wound dressing that contains polyvinyl alcohol, phosphate buffer, with optional additions of succinic acid and lidocaine.

Materials and Methods. A technique for incorporating bacteriophages into the complex hydrogel wound dressing *ex tempore* has been proposed. The bacteriolytic activity of phages inside the hydrogel was determined using standard microbiological techniques. Specifically, we used nutrient media with lawn cultures of *Staphylococcus aureus* added with the following antibacterial combinations: bacteriophages + succinic acid, bacteriophages + lidocaine, and bacteriophages + succinic acid + lidocaine. The lytic activity of bacteriophages was assessed within 1 to 7 days after the formation of the hydrogel.

Results. In all samples containing bacteriophages, the presence of viable and lytically active phages was noted within 1 to 7 days, as evidenced by the "negative colonies" on the culture lawns. On days 1 to 3, no secondary growth was recorded in the phage-containing samples. In hydrogel samples containing phages, succinic acid, and lidocaine, secondary bacterial colonies were detected starting from day 4 indicating some reduction in the lytic activity.

Conclusion. The results suggest that bacteriophages immobilized in the hydrogel maintain their viability and lytic activity against *Staphylococcus aureus*, and this activity persists when the phages are combined with succinic acid and lidocaine.

Key words: bacteriophages; hydrogel; wound dressing; succinic acid; lidocaine.

Введение

Хотя апокалиптические заявления об окончании эры антибиотиков и могут рассматриваться как преувеличение, но уже очевидно, что множественная антибиотикорезистентность микроорганизмов становится клинической, эпидемиологической и экономической проблемой. Одним из перспективных и бурно развивающихся направлений исследований по преодолению нарастающей антибиотикорезистентности микроорганизмов является изучение возможностей бактериофагов — вирусов, которые служат природными регуляторами численности бактерий [1–3]. В частности, большое место отводится борьбе с раневой госпитальной инфекцией, которая, с одной стороны, утяжеляет состояние пациента, с другой — препятствует выполнению оперативных вмешательств с целью закрытия дефекта кожных покровов.

Использование бактериофагов для уничтожения патогенных микроорганизмов в области хирургического вмешательства привлекает внимание хирургов всего мира. При этом согласованное мнение экспертов в области свободной кожной пластики заключается в том, что не только профилактика раневой инфекции, но и непосредственная поддержка окислительно-восстановительных реакций и ангиогенеза в области реципиентной раны способствуют увеличению площади приживления аутодермотрансплантата [4]. С целью поддержки активности окислительно-восстановительных реакций и ангиогенеза в составе гидрогелевых раневых покрытий, предназначенных для укрытия аутодермотрансплантата, предлагается использовать янтарную кислоту [5, 6], а в качестве обезболивающего средства — лидокаин [7]. Однако до настоящего времени не проводилось исследований по оценке жизнеспособности таких уникальных биологических

объектов, как бактериофаги, в составе комплексных гидрогелевых раневых покрытий, содержащих янтарную кислоту и лидокаин.

Цель исследования — оценить жизнеспособность и литическую активность бактериофагов *in vitro* при введении их в комплексное гидрогелевое раневое покрытие, в состав которого входят поливиниловый спирт как основа, фосфатный буфер, а также препараты лидокаин и янтарная кислота.

Материалы и методы

Исследования проведены на базе Университетской клиники Приволжского исследовательского медицинского университета (Н. Новгород) в 2019 г. в условиях микробиологической лаборатории. Экспериментальные образцы раневого покрытия представлены ООО «Новые Перевязочные Материалы» (Москва).

Раневое покрытие представляло собой пленку из поливинилового спирта (ПВС), содержащую фосфатный буфер (ФБ) с pH=6,6–7,8 в количестве $(1-3) \cdot 10^{-5}$ моль/г и обладающую свойством превращаться в гель, при этом в состав включаются 0,05–0,20 мл/см² раствора бактериофагов, к которым чувствительны известные госпитальные патогены. ПВС — гидрофильный биосовместимый полимер — служит подходящей матрицей для иммобилизации биоактивных веществ [5, 8] и является основой раневого покрытия. Фосфатный буфер введен в состав пленки с целью создания pH, оптимального для сохранения жизнеспособности бактериофагов.

Для выяснения возможности бактериофагов сохранять жизнеспособность и литическую активность в составе комплексного гидрогеля исследовали 4 образца раневого покрытия (табл. 1) в двух сериях. Исходное раневое покрытие представляет собой пленку, которая при нанесении на нее раствора с бактериофагами в течение 30–60 с преобразуется в гель с образованием гелевой пластины; степень набухания пленки — от 500 до 1200%. Образец 1 включал в себя основной состав исследуемого раневого покрытия — ПВС и ФБ в количестве $(1-3) \cdot 10^{-5}$ моль/г (сухой остаток). В образце 2 кроме указанного состава имелся лидокаин в концентрации 4,2 мг/г ПВС. В образцах 1 и 2 pH составил 7,6. В образцах 3 и 4 ФБ обеспечивал pH 7,2, так как в образце 3 содержа-

лась янтарная кислота в концентрации 0,26 мг/г ПВС, а в образце 4 — как янтарная кислота (0,26 мг/г ПВС), так и лидокаин (4,2 мг/г ПВС).

Толщина пленки составляла 90 ± 10 мкм. Пленка упаковывалась в индивидуальные пакеты из воздухо- и водонепроницаемых материалов и подвергалась радиационной стерилизации дозой 20 ± 5 кГр.

Для исследования использовали водный раствор бактериофагов «Пиобактериофаг комплексный» (НПО «Микроген», Н. Новгород), который, по описанию производителя, обладает способностью специфически лизировать следующие микроорганизмы: стафилококки, стрептококки, энтерококки, протеи (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*), клебсиеллы (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*), а также синегнойную и кишечную палочки.

Методика определения жизнеспособности и литической активности бактериофага в исследуемой среде основывалась на федеральных клинических рекомендациях [9] и включала:

- приготовление питательных сред;
- приготовление суспензий исследуемых микроорганизмов;
- посев микроорганизма на питательные среды;
- формирование образцов различных вариантов гидрогелевого раневого покрытия путем добавления раствора бактериофага к образцам полимерной пленки;
- размещение образцов гидрогелевого раневого покрытия, содержащих бактериофаги, на газонах культуры тест-штаммов;
- инкубацию;
- учет и интерпретацию результатов, формулировку заключения по определению жизнеспособности и литической активности бактериофага.

В работе использовались стандартные питательные среды, на которых исследуемый микроорганизм через минимальное для данного вида время инкубации при оптимальной температуре дает хороший, видимый глазом рост. Питательная среда готовилась из сухой среды промышленного производства в соответствии с инструкцией изготовителя. После автоклавирования среду разливали в стерильные чашки Петри слоем не более 4 мм. Чашки оставляли при комнатной температуре для застывания и подсушивания, чтобы хорошо впитывался фаголизат и испарялся конденсат. На сухую поверхность питательной среды наносили бактериологической петлей бактериальную культуру. Концентрация микроорганизмов в инокуляте составляла $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Приготовление инокулята осуществлялось в соответствии с методическими указаниями МУК 4.12.1890-04.

Для получения образцов раневого покрытия каждую пленку стерильными ножницами разрезали на равные квадраты 1×1 см, нарезанные таким образом кусочки пленки каждого образца помещали в маркированную чашку Петри и заливали раствором бактериофага. Через 60 с пленка переходила в состояние геля. Жизнеспособность, биологическую доступность (высвобождение) и литическую активность бактериофагов

Т а б л и ц а 1

Состав образцов гидрогелевых раневых покрытий

Образцы	pH	Содержание в сухой пленке, мг/г ПВС	
		янтарной кислоты	лидокаина
1	7,6	0	0
2	7,6	0	4,2
3	7,2	0,26	0
4	7,2	0,26	4,2

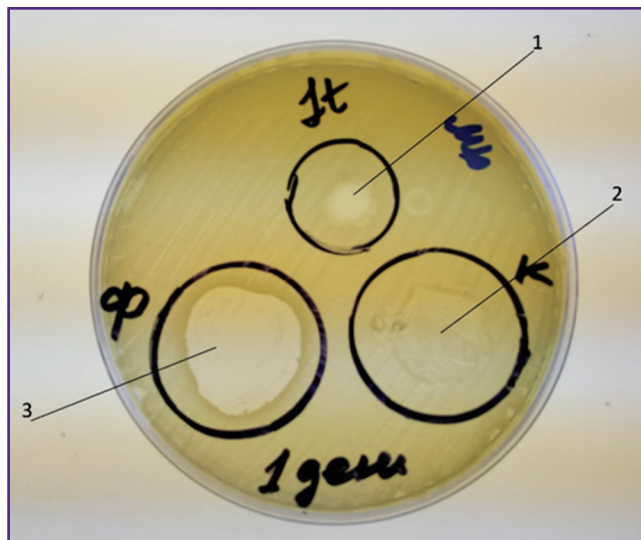
из гелевой повязки определяли на газонах культуры тест-штамма.

В качестве тест-штамма использовали панрезистентный штамм *Staphylococcus aureus*, полученный от пациента ожогового центра ПИМУ. Культура засеивалась газоном на всю чашку. Через несколько минут после подсыхания культуры на поверхность каждой чашки наносили исследуемые образцы раневого покрытия. После фиксации образцов на поверхности агара чашки переворачивали агаром вверх (крышкой вниз) и инкубировали в термостате при 32°C.

С целью предварительной калибровки литической активности бактериофагов и чувствительности метода ее исследования на чашку Петри с газоном культуры тест-штамма *Staphylococcus aureus* в качестве контроля наносили каплю раствора, содержащего бактериофага (контроль 1); образец раневого покрытия, полученного нанесением на пленку физиологического раствора (контроль 2); опытный образец раневого покрытия, полученный путем нанесения на пленку раствора бактериофага (контроль 3), а затем инкубировали при температуре 32°C (см. рисунок).

Кроме того, перед выполнением основной части эксперимента на пленку всех исследуемых образцов наносили физиологический раствор вместо раствора бактериофагов и выполняли микробиологическое исследование для выявления возможной литической активности компонентов раневого покрытия, не связанной с жизнеспособностью в гидрогеле бактериофагов.

Для определения длительности периода жизнеспособности бактериофагов в геле его образцы площа-



Чашка Петри с негативными колониями (зонами лизиса) на газонах культуры тест-штамма *Staphylococcus aureus* в местах нанесения:

1 — свежего раствора, содержащего бактериофаг (контроль 1); 2 — геля, полученного из 0,9% раствора хлорида натрия (контроль 2); 3 — геля, полученного из раствора бактериофага (контроль 3)

дью 1 см² наносили на газоны тестовых культур сразу же после формирования гелевой пластины (0-е сутки), а затем на 1-, 2-, 3-, 4-, 7-е сутки после формирования гелевой пластины. Учет и интерпретацию результатов, формулировку заключения по определению жизнеспособности и литической активности бактериофага проводили через 24 ч. Посевы просматривали и при наличии в исследуемой среде жизнеспособного бактериофага на месте капли фага отмечали появление «стерильного пятна». Реакции лизиса (полное подавление видимого роста бактериальной культуры) учитывали невооруженным глазом при прямом освещении или под углом в 45°. В зависимости от полученных результатов в заключении указывали степень лизиса тест-штамма микроорганизма под действием конкретного бактериофага [9]:

1) исследуемый материал содержит жизнеспособный и литически активный бактериофаг — в месте нанесения исследуемого материала наблюдается сплошная негативная колония фага;

2) исследуемый материал содержит жизнеспособный, но литически слабый бактериофаг — в месте нанесения фага наблюдаются отдельные негативные колонии фагов или рост отдельных колоний бактерий на фоне негативной колонии фага;

3) исследуемый материал не содержит бактериофага — полное отсутствие следов лизиса.

Литическую активность фага оценивали по пятибалльной шкале (по количеству «крестов»):

«-» — отсутствие литической активности;

«+» — низкая активность;

«++» — образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерий;

«+++» — зона лизиса с единичными колониями вторичного роста;

«++++» — прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста.

Результаты

При проведении калибровочных испытаний отмечено наличие негативных колоний (зон лизиса) на газонах культуры тест-штамма *Staphylococcus aureus* в местах нанесения свежего раствора, содержащего бактериофаг (контроль 1), и геля, полученного из раствора бактериофага (контроль 3). В области нанесения геля, полученного из 0,9% раствора хлорида натрия (контроль 2), наблюдалась сплошная негативная колония, т.е. отсутствие литической активности субстрата, содержащего гель на основе ПВС и ФБ, янтарной кислоты и лидокаина в отношении используемой тест-культуры.

Во всех контрольных образцах, т.е. при добавлении к полимерной пленке физиологического раствора, участков негативных колоний не отмечено, рост культуры под гелевой пластиной сохранялся (литическая активность — «-»).

Во всех образцах в основной части эксперимента


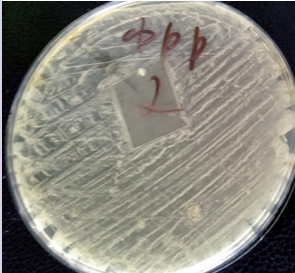
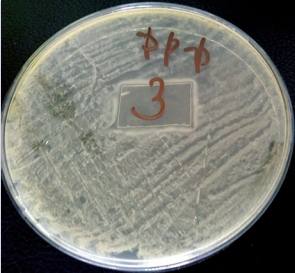

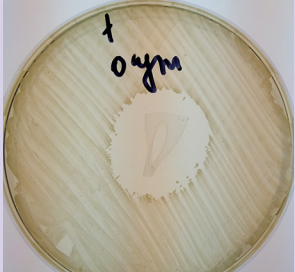


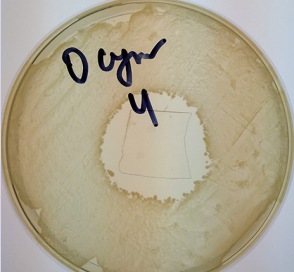
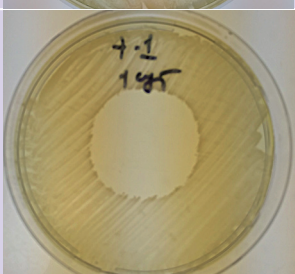
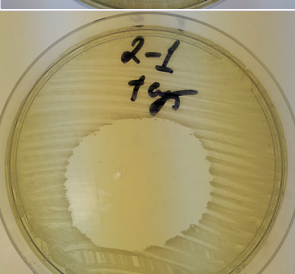

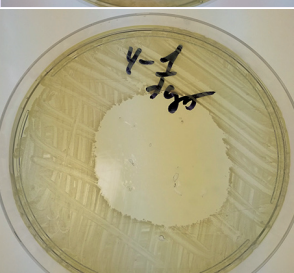
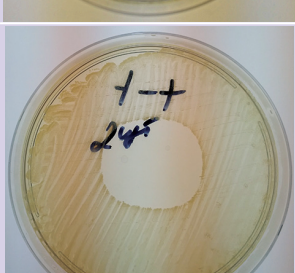

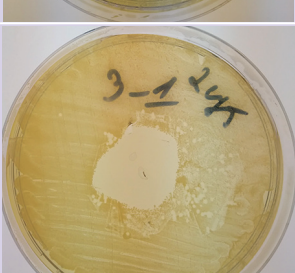
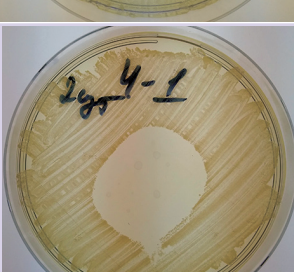
(табл. 2) на 0-е сутки, т.е. сразу же после формирования гидрогелевой пластины, при помощи раствора, содержащего бактериофаги, отмечено наличие жизнеспособного и литически активного бактериофага. В области гидрогелевой пластины и вокруг нее наблюдались участки негативной колонии тест-культуры, в связи с чем литическая активность оценена во всех образцах как «++++».

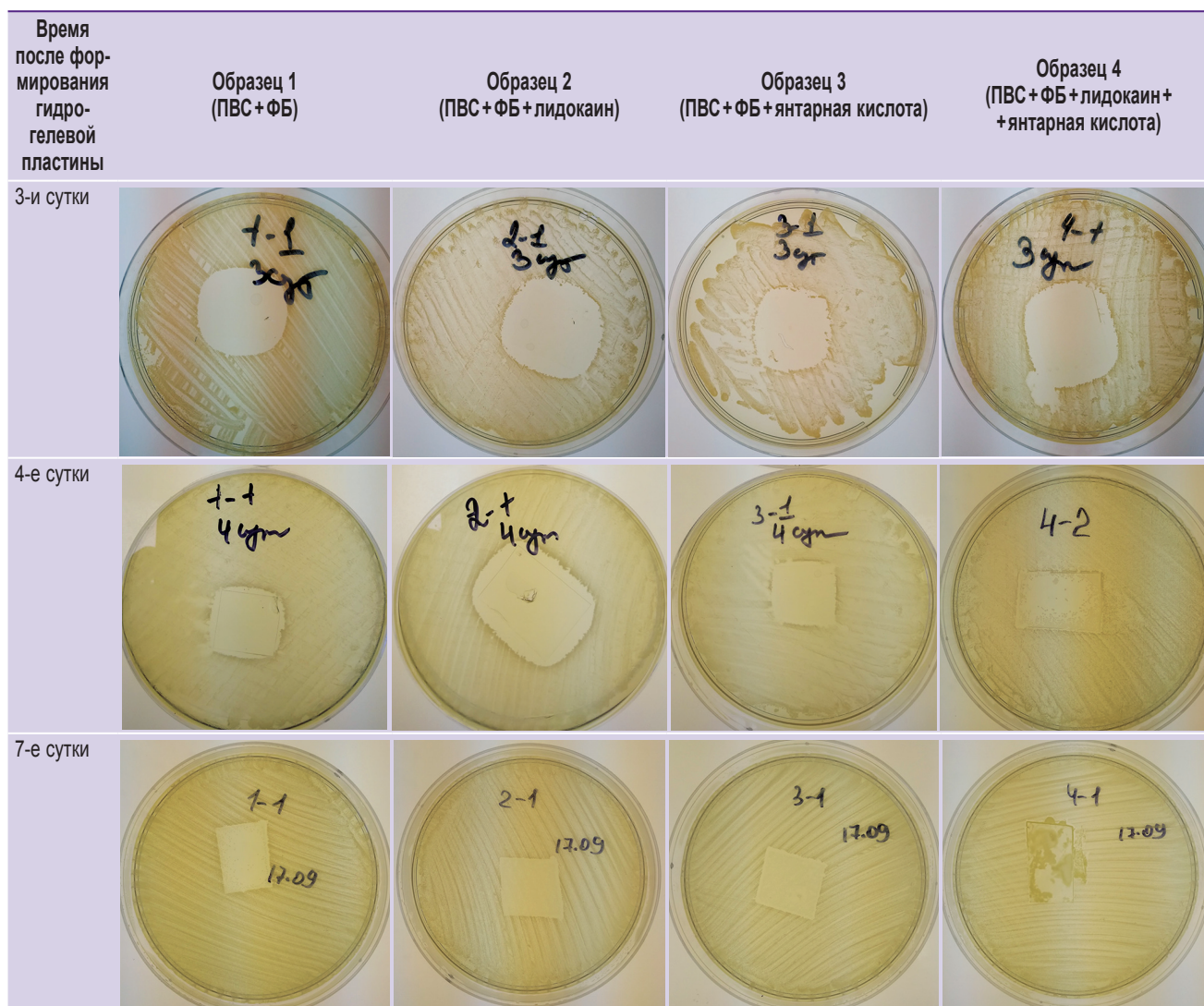
Через сутки после формирования гидрогелевого

раневого покрытия вокруг размещенных на тест-культуре образцов выявлена прозрачная зона лизиса без признаков колоний вторичного роста, что свидетельствовало о сохранении жизнеспособности и литической активности бактериофагов в гидрогеле. Отмечен несколько меньший диаметр зоны лизиса в образце 3 по сравнению с другими образцами. На 3-и и 4-е сутки эта тенденция сохранялась. Кроме того, на 4-е сутки в 1-й серии образца 4 отмечено наличие зоны лизиса

Таблица 2

Чашки Петри с газонами культуры тест-штамма *Staphylococcus aureus* и нанесенными образцами гидрогеля с вариантами комбинаций лекарственных средств

Время после формирования гидрогелевой пластины	Образец 1 (ПВС+ФБ)	Образец 2 (ПВС+ФБ+лидокаин)	Образец 3 (ПВС+ФБ+янтарная кислота)	Образец 4 (ПВС+ФБ+лидокаин+янтарная кислота)
Контроль (0,9% раствор хлорида натрия)				
0-е сутки				
1-е сутки				
2-е сутки				



с единичными вторичными колониями, т.е. литическая активность расценена как «+++», а во 2-й серии этого же образца зона лизиса была без вторичных колоний — «++++». При исследовании образцов раневого покрытия на 7-е сутки после формирования гидрогеля зоны лизиса отмечены во всех чашках, однако они не выходили за пределы контура образца гидрогелевого раневого покрытия. В образце 4, содержащем вместе с бактериофагами янтарную кислоту и лидокаин, отмечены вторичные колонии в обеих сериях эксперимента, т.е. литическая активность составила «+++». В образцах 1, 2, 3 литическая активность составила «++++».

Обсуждение

На фоне множественной лекарственной устойчивости микроорганизмов бактериофаги оказались в центре внимания исследователей и практиков [1].

Приоритетной задачей, которую решают несколько исследовательских групп в странах Европы, Азии и США, становится создание и поддержание достаточной концентрации бактериофагов в зоне клинического интереса. Перспективным направлением ее решения является использование гидрогелей для создания депо бактериофагов. В одном из самых масштабных проектов по изучению возможностей фаготерапии — совместном исследовании французских, бельгийских и швейцарских ученых «PhagoBurn» [3] — сделан вывод, что для успешного применения фаготерапии необходимо добиться устойчивой терапевтической концентрации бактериофагов в зоне клинического интереса. Как оказалось, это является сложной технической задачей ввиду крайне малых (до 100 нм) размеров бактериофагов. С этой целью предложено осуществлять иммобилизацию фагов в структуре полимерных носителей, что позволяет увеличить период их активности на раневой поверхности [10]. Вместе

с тем известно, что улучшает результат лечения и сводит к минимуму нежелательные явления комбинированная лекарственная терапия, т.е. терапия, направленная на несколько терапевтических мишеней [11]. В частности, в мировой медицинской литературе широко обсуждается возможность применения в лечении ран мягких тканей комплексных раневых покрытий. При этом, чтобы обеспечить оптимальное течение раневого процесса, перевязочные материалы, которые используются при лечении ран мягких тканей, должны обладать свойствами биосовместимости, биодеградации и пористой структурой, напоминающей структуру нормальной кожи. В этом отношении одними из наиболее перспективных и активно изучаемых раневых покрытий являются повязки на основе гидрогелей [12], которые представляют собой трехмерную гидрофильную полимерную сеть, способную поглощать большое количество воды или биологических жидкостей [13]. Благодаря этому свойству гидрогели имитируют естественную живую ткань более точно, чем любой другой класс синтетических биоматериалов. Уникальные физические свойства гидрогелей привлекают особое внимание для их использования с целью иммобилизации и последующего постепенного высвобождения лекарств в зоне клинического интереса. Физико-химические свойства гидрогеля позволяют загружать лекарственные вещества в его матрицу и затем высвобождать через гелевую сеть со скоростью, зависящей от коэффициента диффузии конкретной молекулы [14]. Скорость и длительность высвобождения лекарственного средства регулируются пассивными механизмами диффузии и зависят от таких факторов, как размеры сети и емкость гидрогеля [15]. Ранее в исследовании [16] была показана возможность сохранения жизнеспособности бактериофагов в геле на основе альгината кальция до 21 сут, однако наиболее часто для приготовления гидрогелевых раневых покрытий используют хитозан [17] и ПВС [18]. Для представленного исследования был выбран ПВС, поскольку он является биосовместимым полимером и не токсичен для человека [19].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что предложенный состав гидрогелевого раневого покрытия сам по себе не обладает литической активностью в отношении микроорганизмов, однако при использовании для его создания вместо физиологического раствора раствора бактериофагов появляется и сохраняется в течение 7 сут антибактериальная активность.

Особый интерес, с нашей точки зрения, представляет возможность насыщать полимерную пленку, являющуюся заготовкой для гидрогелевого раневого покрытия, раствором, содержащим бактериофаги, которые воздействуют на актуальную в конкретной медицинской организации микрофлору. Это дает врачу возможность своевременно реагировать на появление в области оперативного вмешательства антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов.

Не менее важной представляется возможность

комбинировать бактериофаги с антигипоксантом и обезболивающим веществом. Янтарная кислота является не только важным субстратом, необходимым для тканевого дыхания, но и выполняет роль метаболического регулятора, запускающего адаптационные механизмы, которые нужны для течения раневого процесса [20]. Проведенное исследование показало, что введение в состав гидрогелевого раневого покрытия янтарной кислоты несколько снизило литическую активность бактериофагов к 7-м суткам исследования (до уровня «+++»), однако с учетом того, что в клинической практике срок нахождения повязки на ране редко превышает 4–5 сут, полученный результат клинически значим.

Заключение

Структурные свойства гидрогелей и их средство к определенным биоактивным молекулам могут играть ключевую роль при создании системы одновременной доставки терапевтических агентов в зону клинического интереса: в частности, обеспечивают возможность иммобилизации бактериофагов в комбинации с янтарной кислотой и лидокаином в зоне раневого дефекта.

Финансирование исследования. Работа не имеет источников финансирования.

Конфликт интересов. Конфликта интересов между авторами и иными заинтересованными лицами нет.

Литература/References

1. Huber I., Potapova K., Kuhn A., Schmidt H., Hinrichs J., Rohde C., Beyer W. 1st German phage symposium — conference report. *Viruses* 2018; 10(4): 158, <https://doi.org/10.3390/v10040158>.
2. Pirnay J.P., Verbeken G., Ceysens P.J., Huys I., De Vos D., Ameloot C., Fauconnier A. The magistral phage. *Viruses* 2018; 10(2): 64, <https://doi.org/10.3390/v10020064>.
3. Jault P., Leclerc T., Jennes S., Pirnay J.P., Que Y.A., Resch G., Rousseau A.F., Ravat F., Carsin H., Le Floch R., Schaal J.V., Soler C., Fevre C., Arnaud I., Bretaudeau L., Gabard J. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis* 2019; 19(1): 35–45, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30482-1).
4. Галенко-Ярошевский П.А., Могильная Г.М., Карась А.Ф. Влияние натрия сукцината на гистоморфологические изменения в аутодермотрансплантате крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1998; 126(11): 555–560.
5. Galenko-Yaroshevskiy P.A., Mogilnaya G.M., Karas' A.F. Influence of sodium succinate on histomorphological changes in autodermotransplant of rats. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny* 1998; 126(11): 555–560.
6. Ávila-Salas F., Marican A., Pinochet S., Carreño G., Valdés O., Venegas B., Donoso W., Cabrera-Barjas G., Vijayakumar S., Durán-Lara E.F. Film dressings based

on hydrogels: simultaneous and sustained-release of bioactive compounds with wound healing properties. *Pharmaceutics* 2019; 11(9): 447, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090447>.

6. Галенко-Ярошевский П.А., Чекман И.С., Медведев О.С. Дерматопротекторные свойства натрия сукцината в условиях редуцированного кровообращения. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 1998; 126(10): 420–424.

Galenko-Yaroshevskiy P.A., Chekman I.S., Medvedev O.S. Dermatoprotective properties of sodium succinate in conditions of reduced blood circulation. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny* 1998; 126(10): 420–424.

7. Zhao X., Sun Y., Li Z. Topical anesthesia therapy using lidocaine-loaded nanostructured lipid carriers: tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate-modified transdermal delivery system. *Drug Des Devel Ther* 2018; 12: 4231–4240, <https://doi.org/10.2147/dddt.s187177>.

8. Юданова Т.Н., Алешина Е.Ю., Гальбрайх Л.С., Крестьянова И.Н. Фармакокинетические свойства пленок с комбинированным биологическим действием. *Химико-фармацевтический журнал* 2003; 37(11): 26–28.

Yudanova T.N., Aleshina E.Yu., Galbraykh L.S., Krestianova I.N. Pharmacokinetic properties of films with combined biological action. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal* 2003; 37(11): 26–28.

9. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противозаразительной практике. Федеральные клинические рекомендации. М; 2014.

Ratsionalnoye primeneniye bakteriofagov v lechebnoy i protivoepidemicheskoy praktike. Federalnyye klinicheskiye rekomendatsii [Rational use of bacteriophages in medical and anti-epidemic practice. Federal clinical guidelines]. Moscow; 2014.

10. Nogueira F., Karumidze N., Kusradze I., Goderdzishvili M., Teixeira P., Gouveia I.C. Immobilization of bacteriophage in wound-dressing nanostructure. *Nanomedicine* 2017; 13(8): 2475–2484, <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.08.008>.

11. Bouhadir K.H., Alsberg E., Mooney D.J. Hydrogels for combination delivery of antineoplastic agents. *Biomaterials* 2001; 22(19): 2625–2633, [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00003-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00003-5).

12. Kamoun E., Kenawy E.S., Chen X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing

applications: PVA-based hydrogel dressings. *J Adv Res* 2017; 8(3): 217–233, <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.01.005>.

13. Caló E., Khutoryanskiy V.V. Biomedical applications of hydrogels: a review of patents and commercial products. *Eur Polym J* 2015; 65: 252–267, <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>.

14. Hoare T.R., Kohane D.S. Hydrogels in drug delivery: progress and challenges. *Polymer* 2008; 49(8): 1993–2007, <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.01.027>.

15. Grijalvo S., Mayr J., Eritja R., Díaz D.D. Biodegradable liposome-encapsulated hydrogels for biomedical applications: a marriage of convenience. *Biomater Sci* 2016; 4(4): 555–574, <https://doi.org/10.1039/c5bm00481k>.

16. Boggione D.M.G., Batalha L.S., Gontijo M.T.P., Lopez M.E.S., Teixeira A.V.N.C., Santos I.J.B., Mendonça R.C.S. Evaluation of microencapsulation of the UFV-AREG1 bacteriophage in alginate-Ca microcapsules using microfluidic devices. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017; 158: 182–189, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.06.045>.

17. Ribeiro M.P., Espiga A., Silva D., Baptista P., Henriques J., Ferreira C., Silva J.C., Borges J.P., Pires E., Chaves P., Correia I.J. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair Regen* 2009; 17(6): 817–824, <https://doi.org/10.1111/j.1524-475x.2009.00538.x>.

18. Oliveira R.N., McGuinness G.B., Ramos M.E.T., Kajiyama C.E., Thiré R.M.S.M. Properties of PVA hydrogel wound-care dressings containing UK propolis. *Macromol Symp* 2016; 368(1): 122–127, <https://doi.org/10.1002/masy.201500149>.

19. Marican A., Avila-Salas F., Valdés O., Wehinger S., Villaseñor J., Fuentealba N., Arenas-Salinas M., Argandoña Y., Carrasco-Sánchez V., Durán-Lara E.F. Rational design, synthesis and evaluation of γ -CD-containing cross-linked polyvinyl alcohol hydrogel as a prednisone delivery platform. *Pharmaceutics* 2018; 10: 30, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10010030>.

20. Валеев В.В., Коваленко А.Л., Таликова Е.В., Заплутанов В.А., Дельвиг-Каменская Т.Ю. Биологические функции сукцината (обзор зарубежных экспериментальных исследований). *Антибиотики и химиотерапия* 2015; 60(9–10): 33–37.

Valeyev V.V., Kovalenko A.L., Talikova E.V., Zaplutanov V.A., Delvig-Kamenskaya T.Yu. Biological functions of succinate (a review of foreign experimental studies). *Antibiotiki i khimioterapiya* 2015; 60(9–10): 33–37.