

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**Зурабов Федор Михайлович**

**Исследование и оценка терапевтического потенциала комбинации  
бактериофагов *Klebsiella pneumoniae***

1.5.10 – Вирусология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в научно-исследовательской лаборатории научно-производственного центра «Микромир» и на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

- Научный руководитель** – Попова Валентина Михайловна, кандидат медицинских наук
- Официальные оппоненты** – Мирошников Константин Анатольевич, доктор химических наук, член-корреспондент РАН, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН), главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии;
- Тикунова Нина Викторовна, доктор биологических наук, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, заведующая лабораторией молекулярной микробиологии;
- Кулабухов Владимир Витальевич, кандидат медицинских наук, Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова, доцент кафедры анестезиологии, реаниматологии и неотложной медицины, Научно-исследовательский институт скорой помощи им Н.В. Склифосовского, ведущий научный сотрудник отделения неотложной хирургии, эндоскопии и интенсивной терапии.

Защита диссертации состоится 21 марта 2024 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/2889>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В настоящее время одной из важных медицинских и социальных угроз является растущий уровень резистентности к антибиотикам среди бактерий-патогенов человека и животных, особенно это касается грамотрицательных бактерий. Бесконтрольное использование антибактериальных химиотерапевтических препаратов по всему миру привело к появлению резистентных к антибиотикам штаммов микроорганизмов, некоторые из которых обладают полирезистентностью, что ограничивает успешность лечения вызванных ими инфекций. В 2009 году в мире от бактериальных инфекций в отсутствие эффективных лекарств умерло более 100 тысяч человек (Rohde *et al.*, 2018). Ситуация ухудшается, и в 2019 году число ежегодных смертей в мире, связанных с резистентными к антибиотикам бактериями, достигло 4,95 миллионов (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). Антибиотики не только становятся все менее эффективными, но их применение также может вызвать дисбиоз: было показано, что чрезмерное повторное использование антибиотиков уничтожает большую часть естественной кишечной флоры (Langdon *et al.*, 2016). Поэтому в настоящее время требуется разработка альтернативных методов контроля бактериальных популяций.

Среди множества противомикробных средств, предлагаемых для замены или дополнения традиционных антибиотиков, бактериофаги являются перспективными кандидатами. В Российской Федерации разработка и внедрение препаратов на основе бактериофагов, а также регламентов их применения, входят в Стратегию предупреждения распространения антимикробной резистентности до 2030 года (Правительство РФ, 2017). Национальный институт здравоохранения (НИН, США) также отметил потенциал этих биологических агентов в борьбе с бактериями, устойчивыми к антибиотикам (НИН, 2014). Использование этих агентов в антимикробной терапии основано на их способности адсорбироваться и размножаться только на специфических бактериальных штаммах, вызывая их лизис (Loc-Carrillo and Abedon, 2011). Было показано, что фаготерапия безопасна и практически не имеет побочных эффектов (Miedzybrodzki *et al.*, 2012). В России бактериофаги успешно применяются на протяжении уже восьми десятилетий (Алешкин, 2015).

Впервые бактериофаги были упомянуты в 1915 году Фредериком Туортом (Twort, 1915), а терапевтическое применение было предложено Феликсом Д'Эреллем, который выделил их в 1917 году из фекалий больных дизентерией, работая в Институте Пастера в Париже (D'Herelle, 2007). Д'Эрелль сразу же использовал свое открытие для лечения пациентов, страдающих бактериальными инфекциями, и сообщил о больших успехах (Summers, 2011). После этого фаготерапия получила быстрое развитие в Европе и США, где

фаги производились несколькими американскими фармацевтическими компаниями, однако с 1940-х годов началось массовое производство антибиотиков, которые в тот момент обладали более понятным и универсальным действием, и интерес к терапии фагами постепенно угас (Summers, 2012). Практика использования бактериофагов сохранилась и получила развитие в странах СССР, а также в Польше, в том числе по причине ограниченности доступа к антибиотикам в то время (Summers, 2012; Myelnikov, 2018). В настоящее время интерес к фаготерапии вновь начал возрастать из-за проблемы устойчивости микроорганизмов к антибиотикам. Фаги все чаще используются учеными и клиницистами для борьбы с антибиотикорезистентными штаммами бактерий, существует множество случаев успешного применения фагов для лечения различных бактериальных инфекций (Brives and Pourgaz, 2020). Однако за последние 20 лет так и не появилось ни одного нового коммерческого лечебного фагового препарата, так как их невозможно зарегистрировать в соответствии с актуальными правовыми нормами, что связано с особенностями самих бактериальных вирусов (Fernández *et al.*, 2018). Из-за сложностей с регистрацией готовых лекарственных форм с бактериофагами фаготерапия в мире стала развиваться по пути изготовления персонализированных препаратов. В Бельгии существует практика изготовления магистральных фаговых препаратов в соответствии с назначением врача для отдельного пациента (Pirnay *et al.*, 2018). Процесс изготовления включает производство отдельной субстанции с использованием банка бактериофагов и изготовление конечной смеси фагов в госпитале на основании проведенной фагограммы. В Российской Федерации развивается концепция адаптивной фаготерапии, отличающаяся тем, что «коктейль» бактериофагов изготавливают не для отдельного пациента, а для конкретного лечебного учреждения или отделения (Белобородова *и др.*, 2021). Бактерии *Klebsiella pneumoniae* ассоциируются с такими заболеваниями человека, как пневмония, урогенитальная инфекция, абсцесс печени, инфекция кровотока и др. Это одна из наиболее часто выявляемых бактерий при инфекциях дыхательных путей человека, особенно у госпитализированных пациентов с пневмонией, связанной с лечением в отделениях интенсивной терапии (ОИТ), включая вентилятор-ассоциированную пневмонию (ВАП) (Zhang *et al.*, 2014). Несмотря на актуальность проблемы, полноценных клинических испытаний фаговых препаратов, направленных на *K. pneumoniae*, не было проведено. Однако отдельные клинические случаи и исследования (Kuipers *et al.*, 2019; Corbellino *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2019; Rubalskii *et al.*, 2020; Rostkowska *et al.*, 2020; Cano *et al.*, 2020) свидетельствуют о безопасности и эффективности применения бактериофагов в борьбе с инфекциями, ассоциированными с *K. pneumoniae*. Таким образом, поиск и подробная характеристика бактериофагов, а также разработка регламентов их применения в различных областях здравоохранения является актуальной задачей настоящего времени.

## **Цель и задачи исследования**

**Цель** исследования заключалась в выделении и характеристике новых вирулентных бактериофагов *Klebsiella pneumoniae*, изучении их терапевтического потенциала и оценке возможности использования комбинации бактериофагов в клинической практике.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Выделить ряд бактериофагов *Klebsiella pneumoniae* из природных источников.
- 2) Изучить биологические характеристики выделенных бактериофагов.
- 3) Изучить эффективность комбинации выделенных бактериофагов против клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae in vitro*.
- 4) Охарактеризовать выделенные фаги с помощью полногеномного секвенирования.
- 5) Оценить безопасность и перспективность комбинации бактериофагов *Klebsiella pneumoniae* на основе полученных данных.
- 6) Изучить влияние выбранной комбинации бактериофагов на биопленки, образованные антибиотикорезистентными клиническими штаммами *Klebsiella pneumoniae*.
- 7) Исследовать возможность внедрения выбранной комбинации бактериофагов в клиническую практику.

## **Объект исследования**

Бактериофаги vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnS\_FZ41, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14, активные в отношении бактерий вида *Klebsiella pneumoniae*.

## **Научная новизна исследования**

В работе впервые выделено 4 ранее не изученных бактериофага *Klebsiella pneumoniae*, исследованы их морфологические характеристики, температурная стабильность, устойчивость к различным значениям pH среды и литические свойства на клинических изолятах *K. pneumoniae*, в том числе на штаммах, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Проведено полногеномное секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей ДНК выделенных бактериофагов, установлено отсутствие генов устойчивости к антибиотикам, вирулентности или лизогенности. Изучен синергизм в составе комплексного фагового препарата и показано, что комплексный препарат более эффективен, чем отдельные выделенные бактериофаги. Установлено, что использование комплексного фагового коктейля позволяет расширить литический спектр и значительно снизить вероятность возникновения фагорезистентных форм бактерий. Показана способность комбинации бактериофагов, кодирующих полисахарид-деполимеразы, эффективно разрушать биопленки клинических штаммов *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью. Впервые разработан новый метод визуализации лизиса бактериальной

культуры бактериофагами в режиме реального времени. Исследованные бактериофаги vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14 были включены в фаговый препарат широко спектра действия и впервые была произведена оценка безопасности применения у пациентов, находящихся в хроническом критическом состоянии, а также впервые изучена безопасность и эффективность применения ингаляционных и пероральных форм комплексных фаговых препаратов, включавших выделенные бактериофаги vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14, в реабилитации пациентов, перенесших COVID-19. Продемонстрированы безопасность, отсутствие побочных эффектов и нежелательных явлений при ингаляционном введении комплексного препарата бактериофагов в лечении хронических реанимационных пациентов с рецидивирующими пневмониями. Эффективность подтверждена результатами лечения, сопоставимыми с традиционной антибиотикотерапией. Результаты применения ингаляционных и пероральных форм фаговых препаратов широкого спектра действия, включавших выделенные бактериофаги vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14, в реабилитации пациентов, перенесших COVID-19, показали безопасность такого применения и отсутствие побочных эффектов. В группе пациентов, получавших фаговую терапию, наблюдалось статистически значимое улучшение показателей сатурации и частоты дыхания, а также снижение маркеров воспаления, таких как скорость оседания эритроцитов (СОЭ) и соотношение *Bacteroides fragilis group*/*Faecalibacterium prausnitzii* по данным ПЦР-анализа микробиоты кишечника.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Полученные результаты указывают на необходимость поиска и выделения новых бактериофагов *K. pneumoniae*, а также на целесообразность и перспективность дальнейшего применения исследованных бактериофагов в медицинской практике и изучения эффектов фаготерапии как перспективной альтернативы антибиотикам у пациентов, находящихся в хроническом критическом состоянии. Результаты работы свидетельствуют о значимости бактериофагов в восстановлении микробиоты пациентов, перенесших COVID-19 и получавших антибиотикотерапию. Один из исследованных бактериофагов был зарегистрирован в составе первой в Российской Федерации фаговой фармацевтической субстанции и будет использован для изготовления персонализированных препаратов бактериофагов в производственных аптеках Российской Федерации.

### **Личный вклад автора**

Личный вклад автора заключается в работе с литературными источниками, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных результатов, подготовке к печати публикаций и написании диссертации. Основные результаты диссертационной работы получены лично автором или при его непосредственном участии.

## Методы и методология научного исследования

Исследования выполнены с использованием современных методов молекулярной биологии, вирусологии и микробиологии. Анализ морфологических характеристик проводился методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Биофизическая стабильность и литические свойства были исследованы с применением общепринятых культуральных методов. Для выделения и рестрикционного анализа ДНК бактериофагов были использованы спектрофотометрический и электрофоретический методы. Проведено полногеномное секвенирование, сборка, аннотация и депонирование в GenBank геномов всех исследуемых бактериофагов. Для анализа воздействия комбинации бактериофагов на культуру клеток *K. pneumoniae* в реальном времени впервые был использован голоотомографический микроскоп. Анализ воздействия комбинации бактериофагов на биопленки *K. pneumoniae* проводился методом световой микроскопии и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Оценка таксономического состава бронхоальвеолярного лаважа и состава микробиоты кишечника проводилась с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для анализа результатов компьютерной томографии органов грудной клетки была использована методика автоматического расчета объема поврежденной легочной ткани по типу матового стекла. Измерение содержания биомаркеров сыворотки крови проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе с применением оригинальных реагентов.

## Положения, выносимые на защиту

- 1) Впервые выделены и охарактеризованы бактериофаги *Klebsiella pneumoniae*, названные vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnS\_FZ41, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14, устойчивые в широких диапазонах температур и pH, а также обладающие высокой продуктивностью.
- 2) Проведено полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnS\_FZ41, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14, в результате анализа нуклеотидных последовательностей установлено, что все исследованные фаги не несут генов устойчивости к антибиотикам, вирулентности или лизогенности, а бактериофаги vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14 кодируют полисахарид-деполимеразы.
- 3) Комбинация исследуемых бактериофагов способна эффективно ингибировать рост клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae in vitro*.
- 4) Применение комбинации исследуемых бактериофагов повышает литическую активность и снижает частоту генерации фагоустойчивых форм бактерий, по сравнению с их отдельным применением.

5) Комбинация бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14 с полисахарид-деполимеразной активностью способна эффективно предотвращать рост биопленок *Klebsiella pneumoniae in vitro*, а также разрушать зрелые биопленки.

6) Ингаляционное применение бактериофагов vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14 в составе фагового препарата широко спектра действия при лечении хронических реанимационных пациентов с рецидивирующими пневмониями демонстрирует безопасность, а эффективность подтверждена результатами лечения, сопоставимыми с традиционной антибиотикотерапией.

7) Пероральное и ингаляционное применение комплексных фаговых препаратов, включающих фаги vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14, при реабилитации пациентов, перенесших COVID-19, показало отсутствие побочных эффектов, привело к улучшению клинико-лабораторных показателей и к снижению коэффициента анаэробного дисбаланса.

### **Степень достоверности и результаты апробации**

Результаты были получены с использованием современных методик и качественных расходных материалов на исправно работающем оборудовании. По теме диссертационной работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.10 – вирусология, и 1 патент РФ.

Результаты диссертационной работы были представлены на XXIV-ой Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 10-14 апреля 2017); XXIV Всероссийской конференции с международным участием "Жизнеобеспечение при критических состояниях" (Москва, 11-12 ноября 2022); 6-ом Международном конгрессе «Targeting Phage Therapy 2023» (Париж, 1-2 июня 2023); 11-ом Международном конгрессе «Weimar Sepsis Update» (Веймар, 6-8 сентября 2023); XXV Всероссийской конференции с международным участием "Жизнеобеспечение при критических состояниях" (Москва, 10-11 ноября 2023).

Бактериофаг vB\_KpnM\_FZ14, исследованный в настоящей диссертационной работе, был зарегистрирован в составе первой в Российской Федерации фаговой фармацевтической субстанции «Бактериофаги специфичные к *Klebsiella pneumoniae*».

### **Структура и содержание работы**

Диссертационная работа состоит из введения, трех разделов (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 169 страницах. Содержит 18 таблиц и 19 рисунков. Список цитируемой литературы включает 265 источников.

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

### 1. Выделение и изучение морфологии бактериофагов

Было выделено 4 бактериофага. Их морфологические особенности были изучены с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (**Рисунок 1**).

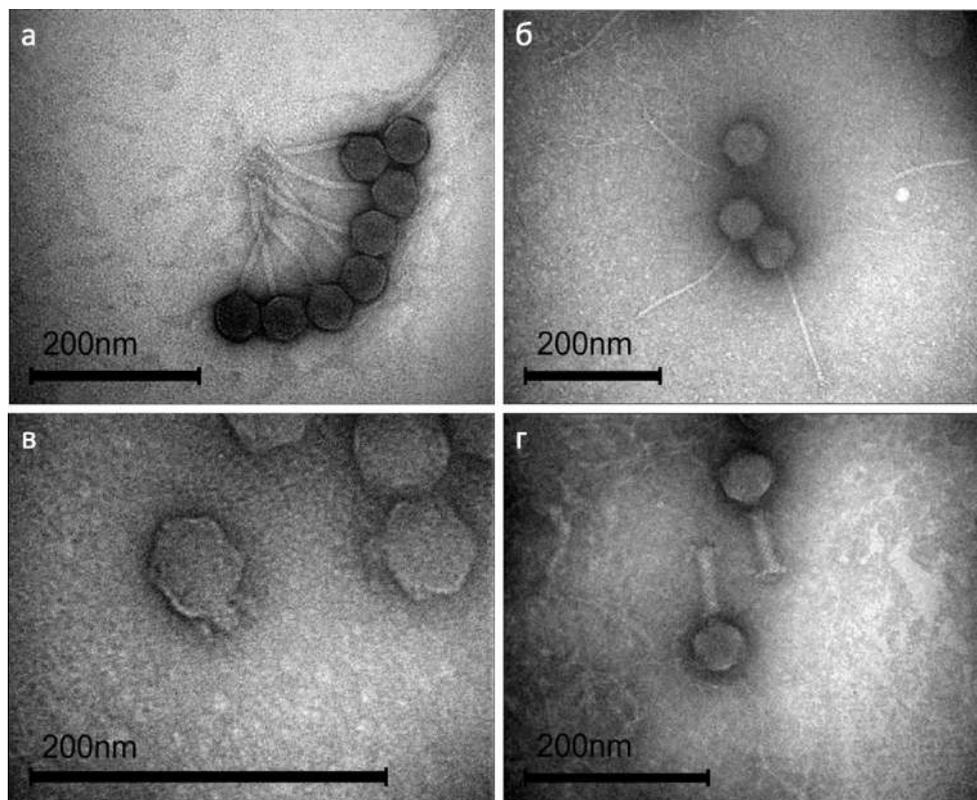


Рисунок 1. Электронные микрофотографии бактериофагов *vB\_KpnS\_FZ10* (а), *vB\_KpnS\_FZ41* (б), *vB\_KpnP\_FZ12* (в) и *vB\_KpnM\_FZ14* (г). Контрастирование 1% раствором уранилацетата в дистиллированной воде. Увеличение  $\times 250k$  для микрофотографии а,  $\times 200k$  для б,  $\times 600k$  для в и  $\times 300k$  для г.

Фаги были названы *vB\_KpnS\_FZ10*, *vB\_KpnS\_FZ41*, *vB\_KpnP\_FZ12*, *vB\_KpnM\_FZ14* в соответствии с предложенной Kropinski *et al.* (2009) системой наименований. Бактериофаги *vB\_KpnS\_FZ10* и *vB\_KpnS\_FZ41* имеют изометрические капсиды и длинные несокращающиеся хвосты и могут быть отнесены к сифовирусам (siphovirus) на основании морфологических характеристик. *vB\_KpnP\_FZ12* имеет изометрический капсид и короткий несокращающийся хвост и может быть отнесен к подовирусам (podovirus) на основании морфологических характеристик. *vB\_KpnM\_FZ14* имеет изометрический капсид и длинный сокращающийся хвост и может быть отнесен к миовирусам (myovirus) на основании морфологических характеристик. Морфологические характеристики и морфология бляшек описаны в **таблице 1**.

Таблица 1. Морфологические характеристики и морфология бляшек выделенных бактериофагов *K. pneumoniae*.

	Бактериофаг vB_KpnS_FZ10	Бактериофаг vB_KpnS_FZ41	Бактериофаг vB_KpnP_FZ12	Бактериофаг vB_KpnM_FZ14
<b>Морфология</b>	Изометрический капсид, длинный несокращающийся хвост	Изометрический капсид, длинный несокращающийся хвост	Изометрический капсид, короткий несокращающийся хвост	Изометрический капсид, длинный сокращающийся хвост
<b>Средний диаметр головки (<math>\pm</math>CO), нм</b>	61 $\pm$ 2	71 $\pm$ 5	49 $\pm$ 3	55 $\pm$ 3
<b>Длина хвоста (<math>\pm</math>CO), нм</b>	158 $\pm$ 13	227 $\pm$ 25	-	79 $\pm$ 5
<b>Размер прозрачной бляшки, мм</b>	1-2	0,3-0,5	0,7-2	0,7-1,5
<b>Гало</b>	+	-	+	+

Оценка морфологии бляшек показала, что бактериофаг vB\_KpnS\_FZ41 образует полностью прозрачные зоны лизиса. Все остальные исследованные фаги (vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14) образуют гало. Такие бляшки всегда имели центральную прозрачную часть, а размер гало увеличивался со временем инкубации.

## 2. Определение литического спектра бактериофагов

Литическую активность каждого бактериофага исследовали на 14 клинических штаммах *K. pneumoniae*, полученных из различных больниц Московской области, Россия (Таблица 2). Кроме того, была протестирована литическая активность различных комбинаций фагов. Все тесты проводили в трех повторностях.

Таблица 2. Литические спектры бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnS\_FZ41, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14.

Штамм <i>Klebsiella pneumoniae</i>	FZ10	FZ41	FZ12	FZ14	Комбинация (Все 4 фага)	Комбинация (FZ10+FZ12+FZ14)	Комбинация (FZ12+FZ41)
KI A1265	-	-	+	-	+	+	+
KI 43816	+	-	+	+	+	+	+
KI 315	+	-	+	+	+	+	+
KI 3-53	+	-	+	+	+	+	+
KI 610	-	-	+	-	+	+	+
KI 7880	+	-	+	-	+	+	+
KI 327	+	-	+	-	+	+	+
KI 12-1	+	+	+	-	+	+	+
KI 27-89	-	+	-	-	+	-	+
KI 293	-	+	-	-	+	-	+
KI 263	-	-	+	+	+	+	+

<b>KI 3273</b>	+	-	+	-	+	+	+
<b>KI T-14</b>	+	-	-	-	+	+	-
<b>KI 325</b>	-	+	-	-	+	-	+
<b>Всего «+»</b>	8/14	4/14	10/14	4/14	14/14	11/14	13/14

" + " означает наличие чувствительности бактериального штамма к действию бактериофага. "-" указывает на отсутствие чувствительности бактериального штамма к действию бактериофага.

Идентичные результаты были получены в 3 повторностях.

Бактериофаги vB\_KpnS\_FZ10 и vB\_KpnP\_FZ12 были активны против высокого процента бактериальных штаммов (57% и 71%, соответственно). В то время как литическая активность фагов vB\_KpnS\_FZ41 и vB\_KpnM\_FZ14 была ниже (по 29%). Бактериофаг vB\_KpnS\_FZ41, который не образует гало, имел значительно отличающийся спектр хозяев от бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14, образующих гало. Комбинация 4 бактериофагов лизировала все исследованные штаммы *K. pneumoniae*. Кроме того, для подтверждения факта образования пятен лизиса в результате литического действия бактериофагов было проведено титрование по Грациа.

### 3. Оценка чувствительности бактериофагов к температуре и pH

Для изучения температурной устойчивости были выбраны следующие значения температур: 25, 40, 45, 50, 55, 60, 65 и 70 °C. Для оценки устойчивости анализировали титр вируса после 1 ч инкубации в Трис-HCl буфере. Данные представлены на **Рисунке 2**.

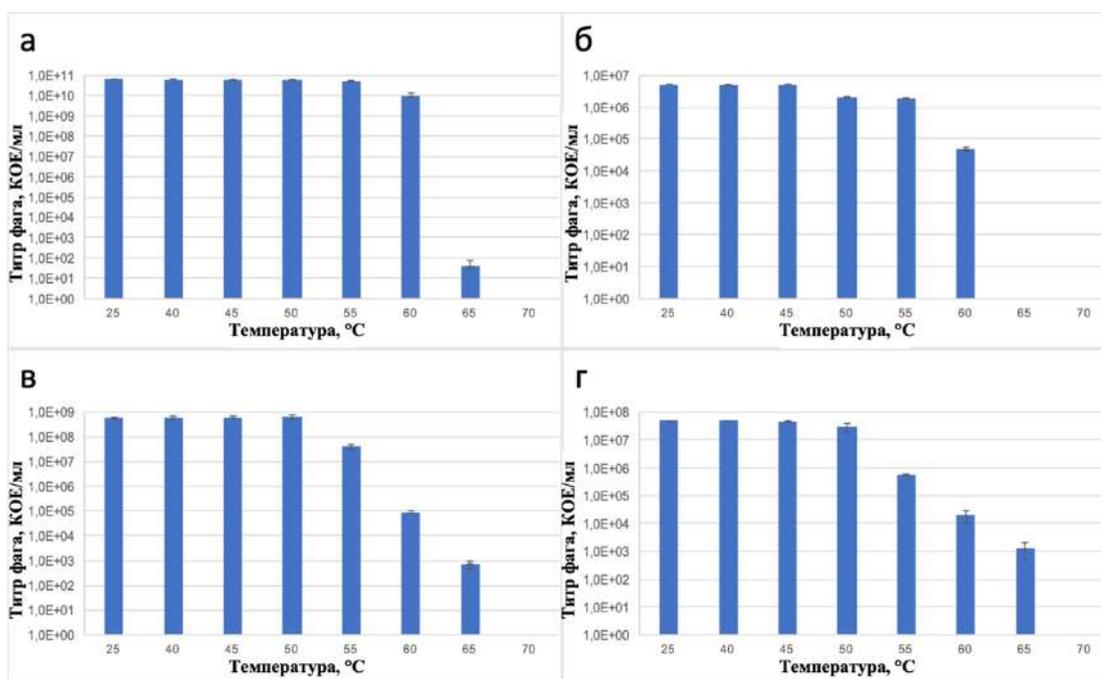
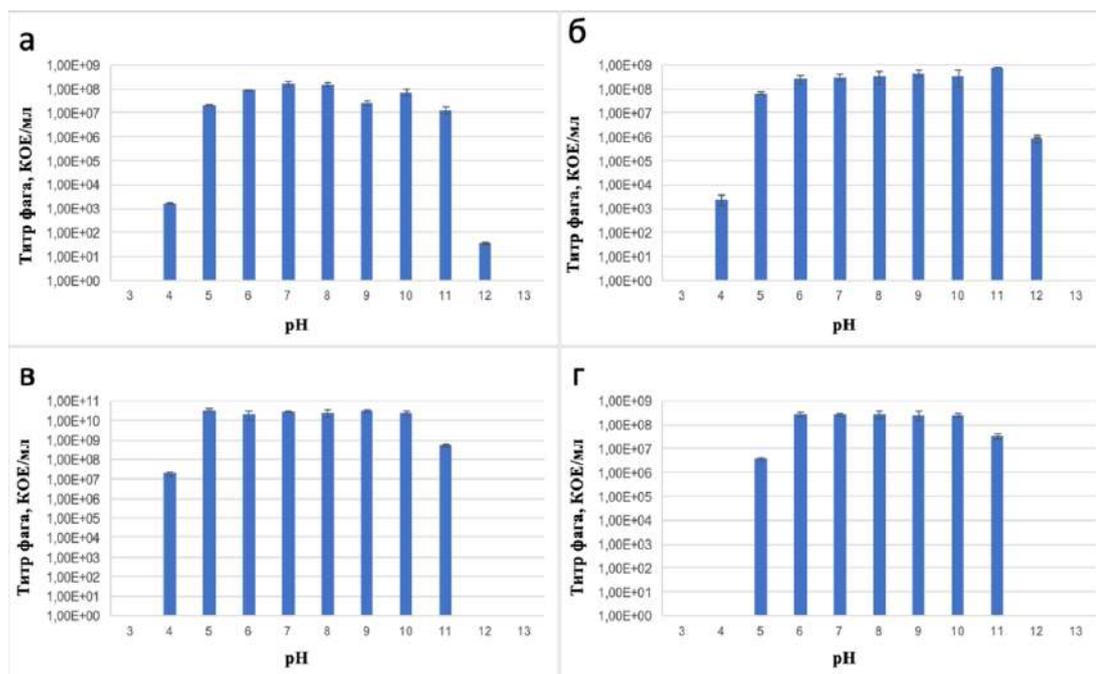


Рисунок 2. Зависимость биологического титра бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10 (а), vB\_KpnP\_FZ12 (б), vB\_KpnM\_FZ14 (в) и vB\_KpnS\_FZ41 (г) от температуры инкубации. Инкубация в течение 1 ч при температурах 37, 50, 55, 60, 65 и 70 °C. Результаты основаны на трех повторностях. Отклонение от среднего значения указано на графике.

При 65 °C наблюдалось значительное снижение титра бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnS\_FZ41 и vB\_KpnM\_FZ14, а фаг vB\_KpnP\_FZ12 был полностью инактивирован.

Для изучения устойчивости к рН были выбраны следующие значения: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13. Для оценки стабильности титр вируса анализировали после инкубации в течение 18 ч. Все бактериофаги были стабильны после инкубации при значениях рН от 5 до 11. При рН 4 наблюдалось снижение титра бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14, а vB\_KpnS\_FZ41 был полностью инактивирован. При рН 12 наиболее стабильным оказался vB\_KpnP\_FZ12, у фага vB\_KpnS\_FZ10 было зафиксировано значительное снижение титра, бактериофаги vB\_KpnM\_FZ14 и vB\_KpnS\_FZ41 были полностью инактивированы. Данные представлены на **Рисунке 3**.



*Рисунок 3. Зависимость биологического титра бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10 (а), vB\_KpnP\_FZ12 (б), vB\_KpnM\_FZ14 (в) и vB\_KpnS\_FZ41 (г) от значений рН. Инкубация в течение 18 ч при значениях рН от 3 до 13. Результаты основаны на трех повторениях. Отклонение от среднего значения указано на графике.*

#### 4. Оценка скорости адсорбции бактериофагов на клетке-хозяине

В ходе эксперимента было установлено, что за 5 мин на клетках хозяев адсорбируется от 79% (vB\_KpnS\_FZ41) до 93% (vB\_KpnP\_FZ12) вирусных частиц в зависимости от фага. На основании полученных данных была посчитана константа адсорбции для каждого бактериофага. Данные представлены в **таблице 3**.

*Таблица 3. Зависимость титров бактериофагов, не адсорбированных на клетках K. pneumoniae, от времени инкубации в системе фаг-клетка. Среднее значение ( $\pm$  CO) рассчитано по результатам трех повторений. Снижение титра отражало количество фагов, адсорбированных на клетках. Рассчитаны проценты адсорбированных на клетках вирусов и константа адсорбции.*

Бактериофаг	Титр бактериофага, БОЕ/мл		% адсорб. фагов	Константа адсорбции, <i>k</i>
	Время инкубации, 0 мин	Время инкубации, 5 min		
vB_KpnS_FZ10	$2,8 \times 10^7 \pm 8,2 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^5$	89	$4,3 \times 10^{-9}$

vB_KpnS_FZ41	$1,1 \times 10^7 \pm 1,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^5$	79	$3,1 \times 10^{-9}$
vB_KpnP_FZ12	$3,9 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6 \pm 1 \times 10^5$	93	$5,3 \times 10^{-9}$
vB_KpnM_FZ14	$2,3 \times 10^7 \pm 2 \times 10^6$	$3 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^5$	87	$4 \times 10^{-9}$

## 5. Единичный цикл размножения бактериофагов

На основании данных единичных циклов размножения бактериофагов были рассчитаны латентный период и размер выхода для каждого фага (Рисунок 4).

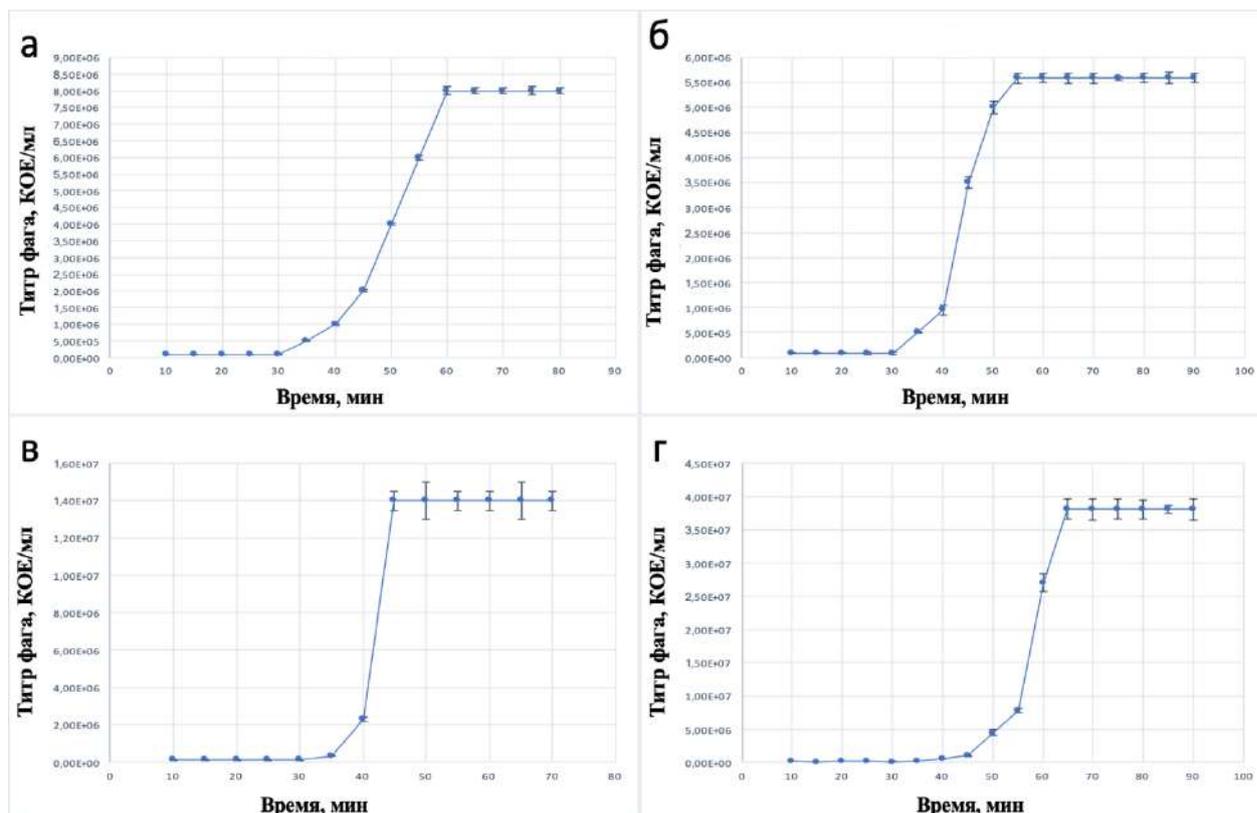


Рисунок 4. Кривые единичного цикла размножения бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10 (а), vB\_KpnP\_FZ12 (б), vB\_KpnM\_FZ14 (в) и vB\_KpnS\_FZ41 (г). Показана зависимость титра бактериофага от времени инкубации в системе фаг-клетка с клетками *K. pneumoniae*. Результаты основаны на трех повторениях. Отклонение от среднего значения указано на графике.

Латентный период составил 30 мин для фагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14, а для vB\_KpnS\_FZ41 - 35 мин. Размер выхода фага составил приблизительно 80 частиц на бактериальную клетку для vB\_KpnS\_FZ10 ( $80 \pm 2$ ) и vB\_KpnP\_FZ12 ( $80 \pm 7$ ) и 120 частиц на бактериальную клетку для vB\_KpnS\_FZ41 ( $118 \pm 3$ ) и vB\_KpnM\_FZ14 ( $120 \pm 5$ ).

## 6. Оценка частоты генерации фагоустойчивых форм

Частота образования фагоустойчивых форм была исследована для каждого выделенного бактериофага и для комбинации фагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14. В коллекции бактерий НПЦ «Микромир» нет штамма, чувствительного сразу ко всем 4 фагам, поэтому коктейль для определения частоты генерации устойчивых к фагам форм бактерий состоял из 3 бактериофагов. Эксперимент проводился в трех повторностях.

Были получены следующие данные:

- Бактериофаг vB\_KpnS\_FZ10 –  $F = \frac{8 \pm 3}{2,3 \times 10^7} = (3,5 \pm 1,3) \times 10^{-7} \approx 4 \times 10^{-7}$ ;
- Бактериофаг vB\_KpnS\_FZ41 –  $F = \frac{90 \pm 16}{10^8} = (9 \pm 1,6) \times 10^{-7} \approx 9 \times 10^{-7}$ ;
- Бактериофаг vB\_KpnP\_FZ12 –  $F = \frac{50 \pm 10}{10^8} = (5 \pm 1) \times 10^{-7} \approx 5 \times 10^{-7}$ ;
- Бактериофаг vB\_KpnM\_FZ14 –  $F = \frac{72 \pm 9}{10^8} = (7,2 \pm 0,9) \times 10^{-7} \approx 7 \times 10^{-7}$ ;
- Комбинация фагов (FZ10 + FZ12 + FZ14) –  $F = \frac{0}{10^8} = 0$ .

После инкубации с коктейлем из 3 бактериофагов не было обнаружено фагоустойчивых колоний. Таким образом, использование фаговых коктейлей в терапии позволяет не только повысить литическую эффективность препарата, но и значительно снизить риск образования фагорезистентных форм.

### **7. Размножение фагов в жидкой питательной среде и последующая оценка титра бактериофагов.**

Спустя 18 ч инкубации наблюдалось помутнение питательной среды в колбе с культурой клеток *K. pneumoniae*. Среда в колбах с добавлением фагов оставалась прозрачной. Концентрация наработанных фагов составила:

Средняя концентрация ( $\pm$ CO) размноженных бактериофагов по данным 3 титрований методом Грация составила:

- Бактериофаг vB\_KpnS\_FZ10 –  $2,5 \times 10^{10} \pm 3,3 \times 10^9$  БОЕ/мл;
- Бактериофаг vB\_KpnS\_FZ41 –  $2,5 \times 10^9 \pm 4,2 \times 10^8$  БОЕ/мл;
- Бактериофаг vB\_KpnP\_FZ12 –  $5 \times 10^9 \pm 1,6 \times 10^9$  БОЕ/мл;
- Бактериофаг vB\_KpnM\_FZ14 –  $9 \times 10^9 \pm 2,4 \times 10^9$  БОЕ/мл.

Полученные титры при выращивании фагов в жидкой питательной среде позволяют сделать вывод, что исследованные значения константы адсорбции, латентного периода и выхода фага обеспечивают эффективное ингибирование роста культуры *K. pneumoniae* и свидетельствуют о достаточной продуктивности вирусов для получения высоких концентраций в конечном препарате.

### **8. Рестрикционный анализ ДНК бактериофагов**

ДНК фага vB\_KpnS\_FZ10 гидролизуются ферментами рестрикции HaeIII, SspI, BamHI, EcoRV, EcoRI и не чувствительна к ферментам рестрикции HindIII, SmaI, NotI и KpnI. Таким образом, можно сделать вывод, что бактериофаг vB\_KpnS\_FZ10 адаптирован к системам рестрикции-модификации бактерий-хозяев.

ДНК фага vB\_KpnS\_FZ41 гидролизуются ферментами рестрикции EcoRI (O), VspI, NdeI, BglII, BglIII, EcoRV, PvuI, KpnI, EcoRI (RI), HinfI, BamHI и не чувствительна к ферменту

рестрикции MspI. Для остальных рестрикционных ферментов полученные результаты соответствуют предсказанными.

Бактериофаг vB\_KpnP\_FZ12 также представляет собой пример адаптации к системам рестрикции-модификации хозяина путем потери сайтов рестрикции. ДНК фага vB\_KpnP\_FZ12 гидролизуется ферментами рестрикции HinfI, EcoRV, MspI, KpnI и не чувствительна к ферментам рестрикции HindIII, SspI, BamHI и EcoRI.

ДНК фага vB\_KpnM\_FZ14 гидролизуется ферментами рестрикции HindIII, EcoRV, EcoRI, SmaI, SalI, BamHI, KpnI, DraI, HinfI, MspI и не чувствительна к ферменту рестрикции NdeI. Для остальных ферментов рестрикции полученные результаты совпадают с предсказанными. Результаты представлены на **Рисунке 5**.

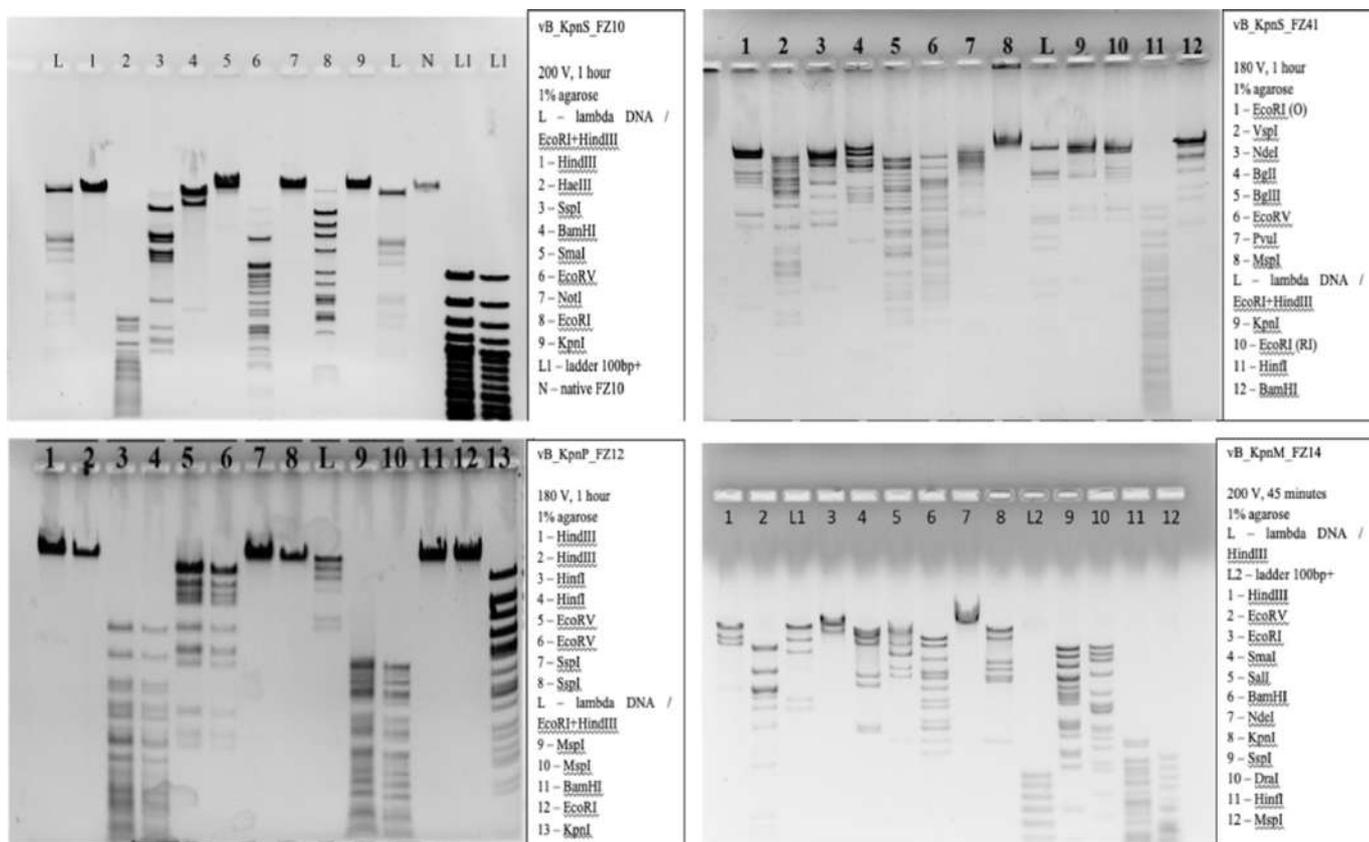


Рисунок 5. Электрофорез ДНК бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnS\_FZ41, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14 после обработки ферментами рестрикции. Ферменты, маркеры и параметры электрофореза указаны в приложениях к рисункам.

## 9. Полногеномное секвенирование и анализ нуклеотидной последовательности ДНК бактериофагов

Все бактериофаги содержат линейную двухцепочечную ДНК. Согласно полученным геномным данным, выделенные фаги не несут генов устойчивости к антибиотикам, вирулентности или лизогенности. Установлено, что бактериофаг vB\_KpnS\_FZ10 кодирует собственную аденин-метилтрансферазу (QCG76428.1) и цитозин-метилтрансферазу (QCG76436.1), что является способом защиты от систем рестрикции-модификации хозяина.

Бактериофаги vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14 кодируют полисахарид-деполимеразы, которые участвуют в разрушении биопленок и капсул. Поиск гомологии кодируемых белков с изученными полисахарид-деполимеразами родственных фагов показал, что ORFs (открытые рамки считывания) №14 (QCG76410.1) и №15 (QCG76411.1) vB\_KpnS\_FZ10 гомологичны ORFs №34 и №35 бактериофага KLPN1 (NC\_028760), белковые продукты которого (хвостовые белки) имеют эндосиалидазный домен и, как было подтверждено в проведенном исследовании, обладают полисахарид-деградирующей активностью (Hoyles *et al.*, 2015). ORF №19 (QCG76457.1) vB\_KpnP\_FZ12 гомологичен ORF №31 (YP\_003347549.1) бактериофага KP32 (NC\_013647), белковый продукт которого (хвостовой тубулярный белок А) имеет домен гидролазы пептидогликана и, как было подтверждено в проведенном исследовании, обладают полисахарид-деградирующей активностью (Pyra *et al.*, 2017). ORF №8 (QCO71663.1) vB\_KpnM\_FZ14 гомологичен ORFs №42 (YP\_009597570.1; YP\_009615313.1) бактериофагов KpV52 (NC\_041900), KpV79 (NC\_042041), белковый продукт которых (предполагаемый белок семейства хвостовых фибрилл) имеет домен гиалуронат-лиазы и пектат-лиазы 3 и обладает деградирующей полисахаридами активностью (Соловьева, 2018). Таким образом, результаты аннотации геномов бактериофагов подтвердили связь действия полисахаридных деполимераз с образованием гало, что также было описано во многих работах (Hsu *et al.*, 2013; Hoyles *et al.*, 2015; Pyra *et al.*, 2017; Tabassum *et al.*, 2018).

Подробная информация о полученных геномных данных представлена в **таблице 4**.

Таблица 4. Геномные данные бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12, vB\_KpnM\_FZ14 и vB\_KpnS\_FZ41.

Бактериофаг	Размер генома, по	Г-Ц состав, %	Покрытие	ORFs №	Таксономическое положение (Семейство, род)	Родственный вирус	Идентичность и покрытие
vB_KpnS_FZ10	50381	50.66	65,38	42	<i>Drexlerviridae</i> , <i>Webervirus</i>	<i>Klebsiella</i> phage NJR15, (MH633487)	96,71% (94% покрытие)
vB_KpnP_FZ12	39519	53.06	71,03	43	<i>Autographiviridae</i> , <i>Przondovirus</i>	<i>Klebsiella</i> phage vB_KpnP_KpV 763 (KX591654)	94,43% (93% покрытие)
vB_KpnM_FZ14	49370	48.58	71,60	35	<i>Caudoviricetes</i> , <i>Jedunavirus</i>	<i>Klebsiella</i> phage vB_KpnM_Kp V52 (KX237516)	96,58% (79% покрытие)

<b>vB_KpnS_FZ41</b>	106104	45.22	72,25	103	<i>Demerecviridae, Sugarlandvirus</i>	<i>Klebsiella</i> phages vB_Kpn_IME2 60 and Sugarland (KX845404, NC_042093)	96,77% и 97,52% (93% и 89% покрытие)
---------------------	--------	-------	-------	-----	---	---	--

\*"родственный вирус" означает лучшее совпадение по NCBI BLAST, средняя идентичность и покрытие рассчитывались с помощью BLASTn.

Таксономическую идентификацию проводили с помощью программы GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) на основе схемы филогенетической классификации, используемой в базе данных NCBI Taxonomy Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

На основании полученных данных были построены карты геномов бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnS\_FZ41, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14 (Рисунок 6).

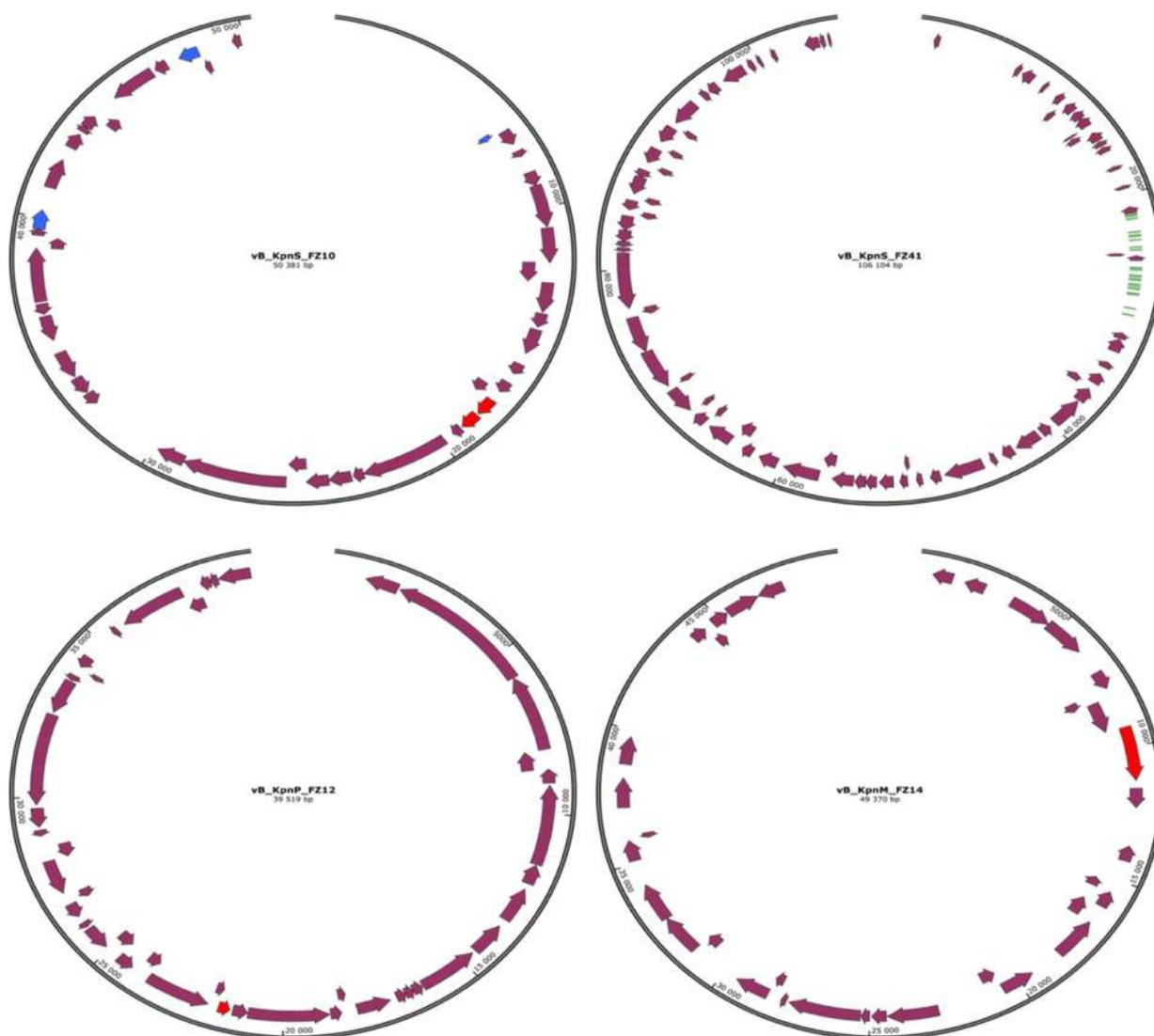
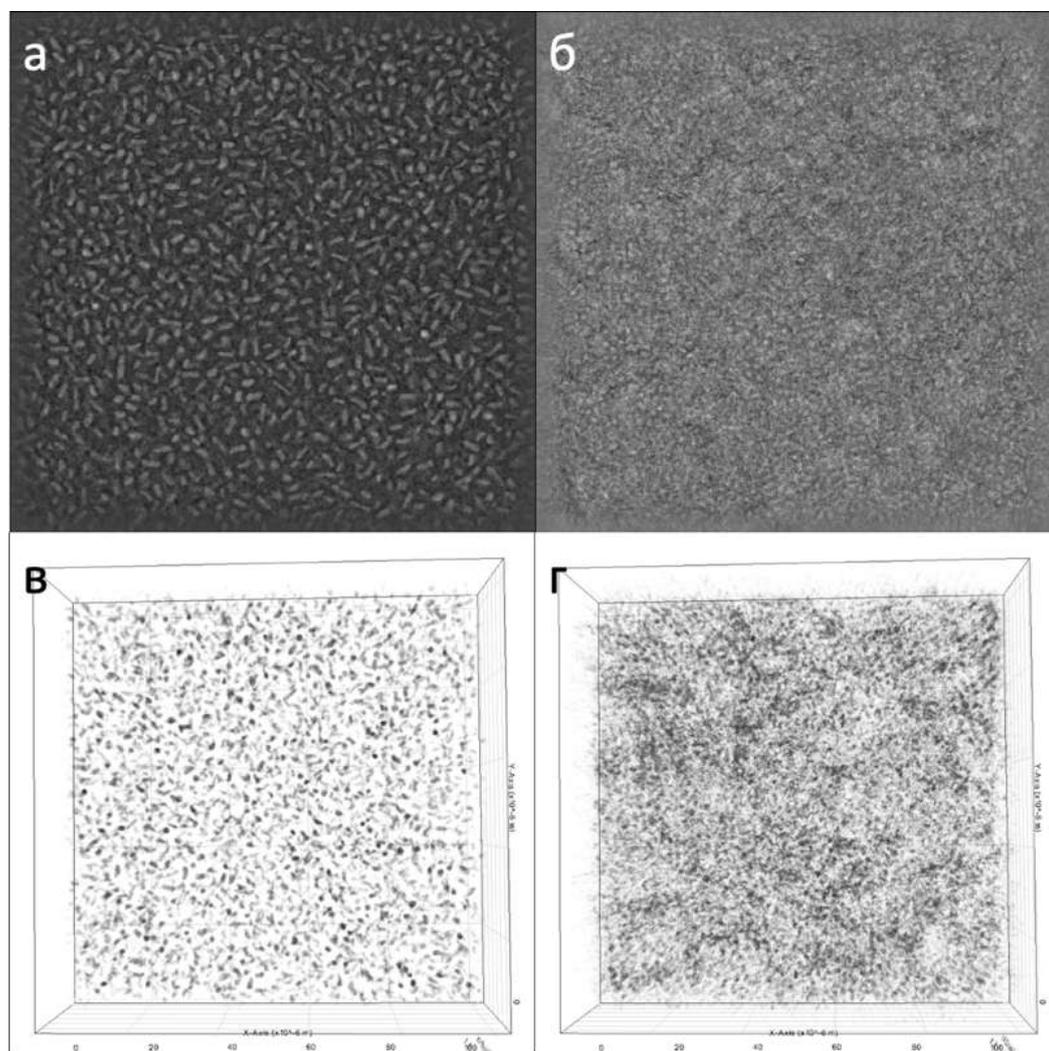


Рисунок 6. Карты геномов бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnS\_FZ41, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14. Синим цветом отмечены рамки, кодирующие метилтрансферазы, красным – полисахарид-деполимеразы, зеленым – тРНК, фиолетовым – все остальные.

## 10. Анализ лизиса культуры *Klebsiella pneumoniae* коктейлем бактериофагов в режиме реального времени

В фазе роста культуры, до добавления комплекса бактериофагов, наблюдалось увеличение количества бактерий в поле зрения микроскопа (**Рисунок 7**).



*Рисунок 7. Микрофотографии культуры *K. pneumoniae* (K1 315), сделанные с помощью микроскопа 3D Cell Explorer: (а, в) в начале инкубации; (б, г) после 1 ч 40 мин инкубации. Увеличение  $\times 58$ , размер поля зрения  $100 \times 100$  мкм. Эксперимент проводился в одной повторности.*

В ходе исследования не было возможности наблюдать образование биопленки под микроскопом из-за короткого времени инкубации. Однако первые этапы формирования биопленки – адгезия на стекле и образование микроколоний – были зафиксированы.

Коктейль бактериофагов был добавлен через 1 ч 40 мин после начала инкубации и съемки. В течение 2 ч 30 мин после добавления фагов наблюдалось незначительное снижение количества бактерий в поле зрения, но сформированные бактериальные микроколонии все еще были заметны. Активное снижение количества бактерий в поле зрения началось через 2 ч 30 мин после добавления комплекса бактериофагов, и в течение 30 мин все микроколонии были разрушены (**Рисунок 8**).

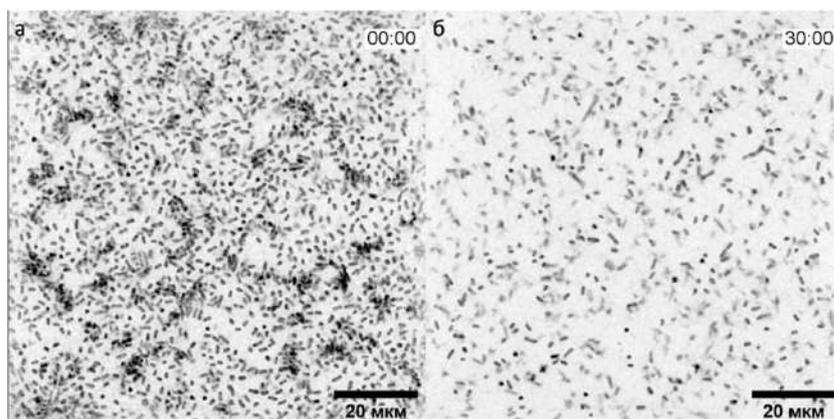


Рисунок 8. Микрофотографии культуры *K. pneumoniae* (K1 315 сделанные с помощью микроскопа 3D Cell Explorer: (а) через 2 ч 30 мин; (б) через 3 ч после добавления коктейля бактериофагов. Увеличение  $\times 58$ . Эксперимент проводился в одной повторности.

### 11. Визуализация воздействия коктейлем бактериофагов на биопленки *Klebsiella pneumoniae* с помощью оптического микроскопа

В ходе настоящего исследования через 24 ч после образования биопленки K1 315 к ней был добавлен коктейль бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14 и проведена дополнительная инкубация в течение 24 и 48 ч. Контрольные стекла инкубировали в течение 48 и 72 ч без добавления фагового коктейля (Рисунок 9).

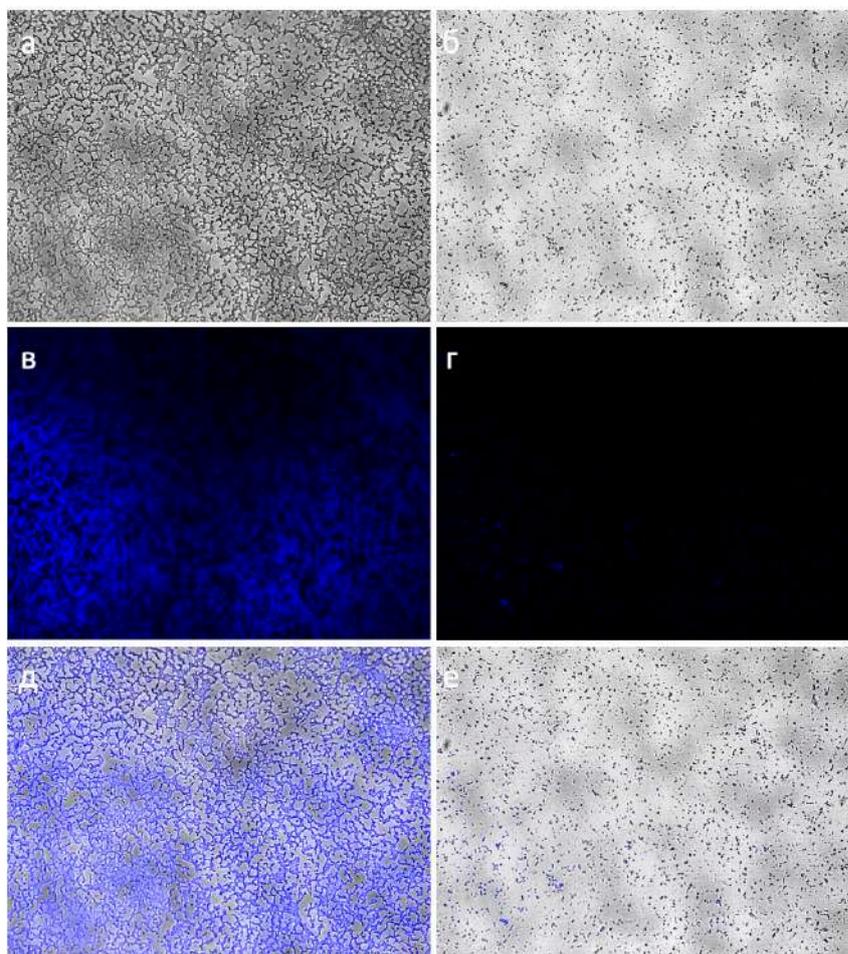


Рисунок 9. Микрофотографии культуры *K. pneumoniae* (K1 315) в световом микроскопе AxioImager A1: (а, в, д) после 48 ч инкубации без фагов; (б, г, е) 24 ч инкубации + 24 ч инкубации после добавления

коктейля бактериофагов; (а, б) микрофотографии в проходящем свете; (в, г) микрофотографии с флуоресценцией DAPI; (д, е) комбинированные микрофотографии в проходящем свете + флуоресценция DAPI. Увеличение  $\times 400$ . Эксперимент проводился как минимум в трех повторениях; представлены репрезентативные слайды.

После 48 ч инкубации на контрольных стеклах наблюдалось образование цепочек и кластеров, что характерно для биопленок всех видов бактерий, в то время как на экспериментальных стеклах с добавлением коктейля фагов наблюдались только одиночные клетки и небольшие колонии.

Через 72 ч инкубации на контрольных стеклах образовалась зрелая биопленка с водными каналами (Рисунок 10; а, в, д). На экспериментальных стеклах с добавлением фагового коктейля наблюдались только одиночные клетки и небольшие колонии (Рисунок 10; б, г, е).

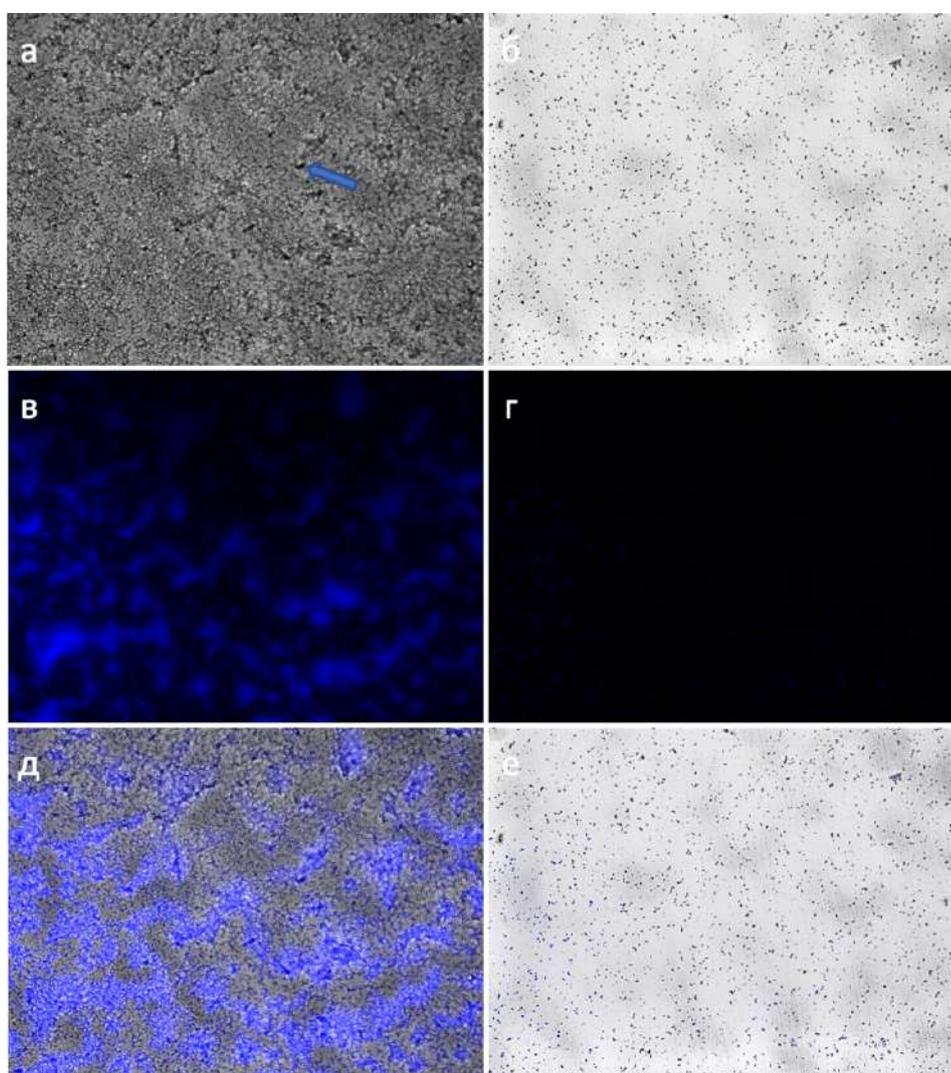


Рисунок 10. Микрофотографии культуры *K. pneumoniae* (KI 315) в световом микроскопе AxioImager A1: (а, в, д) после 72 ч инкубации без фагов; (б, г, е) 24 ч инкубации + 48 ч инкубации после обработки коктейлем бактериофагов; (а, б) микрофотографии в проходящем свете; (в, г) микрофотографии с флуоресценцией DAPI; (д, е) комбинированные микрофотографии в проходящем свете + флуоресценция DAPI; (а) водный канал отмечен синей стрелкой. Увеличение  $\times 400$ . Эксперимент проводился как минимум в трех повторениях; представлены репрезентативные слайды.

## 12. Визуализация воздействия коктейлем бактериофагов на биопленки *Klebsiella pneumoniae* с помощью сканирующего электронного микроскопа

После 24 ч инкубации (формирования биопленки K1 315) на покровных стеклах, инкубированных без коктейля бактериофагов, наблюдались небольшие микроколонии и сформировавшиеся филаменты (нити) (Рисунок 11; а). После инкубации в течение дополнительных 24-48 ч в культуре без добавления коктейля бактериофагов наблюдалось формирование биопленки с кластерами и каналами (Рисунок 11; б, в). Инкубация в течение 72 ч привела к образованию зрелой биопленки на поверхности покровных стекол (Рисунок 11; д). В образцах, обработанных коктейлем бактериофагов после инкубации в течение 24 ч и последующей инкубации в течение 24 и 48 ч, наблюдались только отдельные бактериальные клетки и небольшие скопления (Рисунок 11; г, е).

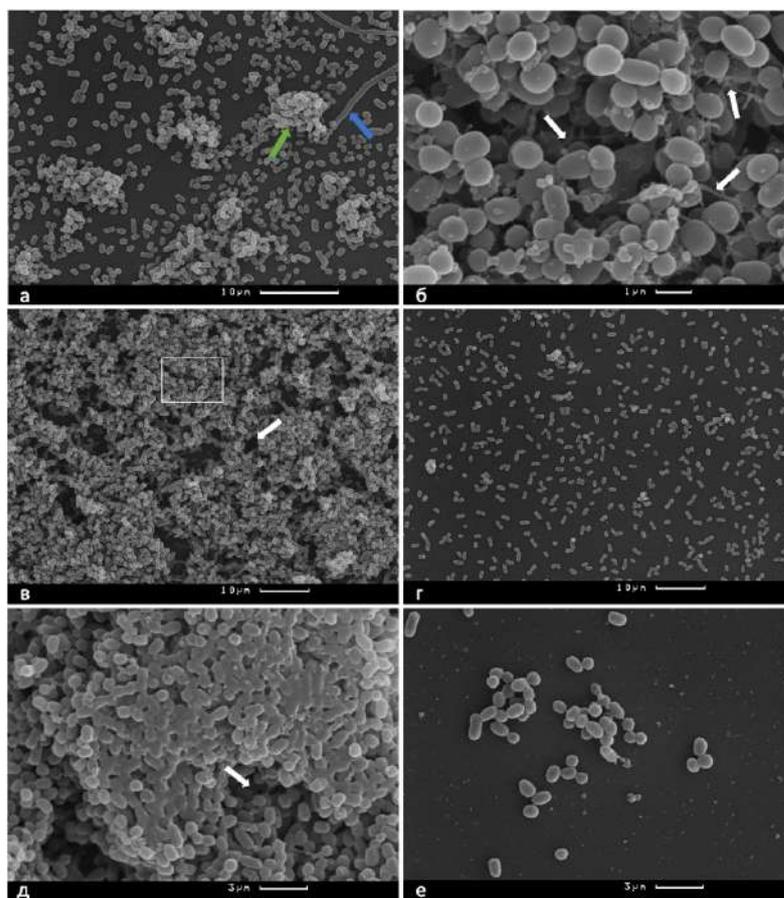


Рисунок 11. Микрофотографии культуры *K. pneumoniae* (K1 315), полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа Camscan S2: (а) после 24 ч инкубации без фагов, зеленой стрелкой отмечена сформировавшаяся микроколония, синей стрелкой отмечены филаменты *K. pneumoniae*, увеличение  $\times 2500$ ; (б) после 48 ч инкубации без фагов, белыми стрелками отмечены экзополисахаридные связи между бактериальными клетками, увеличение  $\times 10000$ , микрофотография представляет собой увеличенную секцию белого поля рисунка 15б; (в) культура *K. pneumoniae* (K1 315) после 48 ч инкубации без фагов, белые стрелки указывают на каналы для жидкости, увеличение  $\times 1500$ ; (г) культура *K. pneumoniae* (K1 315) после 24 ч инкубации + 24 ч после обработки коктейлем бактериофагов, увеличение  $\times 1500$ ; (д) культура *K. pneumoniae* (K1 315) после 72 ч инкубации без фагов, белые стрелки указывают на каналы для жидкости, увеличение  $\times 4800$ ; (е) культура *K. pneumoniae* (K1 315) после 24 ч инкубации + 48 ч после обработки коктейлем бактериофагов, увеличение  $\times 4800$ . Эксперимент проводился как минимум в трех повторениях; представлены репрезентативные слайды.

### 13. Адаптивная фаготерапия пациентов с рецидивирующими пневмониями

Общие характеристики пациентов, включенных в исследование, представлены в **таблице 5**.

*Таблица 5. Общая характеристика пациентов, включенных в исследование. «1А» – группа, получавшая антибиотики + комплекс бактериофагов; «1Б» – группа, получавшая только комплекс бактериофагов; «2» – группа, получавшая антибактериальную терапию без комплекса бактериофагов.*

Показатели	Значения показателей в группах				p 1А+1Б vs. 2
	1, n=43			2, n=40	
	1А, n=29	1Б, n=14	1А+1Б		
Возраст, медиана	62 (39–71)	50 (32–74)	60 (38–72)	64 (54–72)	0,177
Пол муж/жен, n	20/9	10/4	30/13	21/19	0,120
Диагноз, n (%)					
Последствия:					
ОНМК	16 (55)	6 (43)	22 (51)	26 (65)	0,267
ЧМТ	9 (31)	4 (29)	13 (30)	7 (18)	0,206
операции на мозге	1 (4)	2 (14)	3 (7)	4 (10)	0,706
аноксии	3 (10)	2 (14)	5 (12)	3 (7)	0,714
Тяжесть состояния по шкале АРАСНЕ II, 1-е сут., медиана	12 (8–15)	11 (10-16)	12 (10–15)	10 (8–14)	0,287
Потребность в ИВЛ, в 1-е сут., n (%)	14 (48)	5 (36)	19 (44)	24 (60)	0,189
Число антибиотикорезистентных бактерий в первом образце БАЛ, суммарно (в среднем на 1 пациента)	46/29 (1,6)	25/14 (1,8)	71 (1,7)	72 (1,8)	–

Группы были сопоставимы по полу, возрасту, этиологии повреждения головного мозга, тяжести состояния по шкалам и потребности в ИВЛ.

Потребность в проведении ИВЛ имела тенденцию к росту у пациентов, получавших антибиотики (группа 2 и подгруппа 1А) и, напротив, снижалась в подгруппе 1Б, где применяли только бактериофаги. При мониторинге биохимических показателей в группе 2 выявили статистически значимое снижение концентрации альбумина на 7-е сутки. Данные приведены в **таблице 6**.

*Таблица 6. Динамика клинико-лабораторных показателей в первые две недели лечения в группах сравнения. «1А» – группа, получавшая антибиотики + комплекс бактериофагов; «1Б» – группа, получавшая только комплекс бактериофагов; «2» – группа, получавшая антибактериальную терапию без комплекса бактериофагов.*

Клинико-лабораторные показатели	Значения показателей в группах				p (1А+1Б vs. 2)
	1, n=43			2, n=40	
	1А, n=29	1Б, n=14	1А+1Б		
ИВЛ, 1 сутки, n (%)	14/29 (48)	5/14 (36)	19/43 (44)	24/40 (60)	0,189
ИВЛ, 7 сутки, n (%)	18/29 (62)	3/14 (21)	21/43 (49)	25/40 (63)	0,270
ИВЛ, 14 сутки, n (%)	15/27 (56)	2/14 (14)	17/41 (41)	25/39 (64)	0,048
Альбумин, 1 сут., г/л	30 (27–33)	31 (25–35)	30 (26–32)	28 (24–35)	0,549
Альбумин, 7 сут., г/л	30 (28–32)	29 (27–37)	29 (27–31)	26 (24–29)	0,001
Альбумин, 14 сут., г/л	29 (27–31)	31 (25–34)	29 (26–32)	26 (24–30)	0,071

Проводили сравнение групп по числу выявленных случаев превышения референсных значений биохимических показателей печеночной или почечной дисфункции. Было выявлено, что в группе 2 и подгруппе 1А, где применяли антибиотики в течение 2-х недель, доля пациентов с повышенными значениями биохимических показатели печеночной или почечной дисфункции сохранялась или даже возрастала по сравнению с исходной точкой отсчета. В то

же время в подгруппе 1Б, где пациентов лечили только бактериофагами без антибиотиков, такой закономерности не наблюдали, напротив, имела место тенденция к снижению числа случаев с повышенными биохимическими показателями, например АЛТ, АСТ, креатинин.

К концу первой недели от момента включения в исследование в группе 2 сохранялась персистенция антибиотикорезистентных штаммов, таких как *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Escherichia coli*. В то же время у пациентов группы 1, получавших комплекс бактериофагов, наблюдали снижение основных проблемных грамотрицательных микроорганизмов, таких как *Acinetobacter spp.*, *E. coli* и *K. pneumoniae*. Штаммы *Serratia spp.* встречались реже, но хуже поддавались элиминации, а в группе антибиотикотерапии их количество даже нарастало. Данные приведены в **таблице 7**.

*Таблица 7. Количество случаев выделения микроорганизмов из образцов БАЛ у пациентов в 1-й и 7-й дни от начала лечения в группах сравнения. «1А» – группа, получавшая антибиотики + комплекс бактериофагов; «1Б» – группа, получавшая только комплекс бактериофагов; «2» – группа, получавшая антибактериальную терапию без комплекса бактериофагов.*

Микроорганизмы	Группы					
	1, n=43		2, n=40	1, n=43		2, n=40
	1А, n=29	1Б, n=14		1А, n=29	1Б, n=14	
	1-е сут.			7-е сут.		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	4	11	4	8	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	10	26	16	6	25
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	8	3	13	3	2	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	–	–	3	1	–	1
<i>Staphylococcus aureus/haemolyticus</i>	–	–	5	–	–	4
<i>Escherichia coli</i>	5	1	7	3	–	5
<i>Serratia plymuthica/Serratia marcescens</i>	2	3	3	5	4	6
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	–	2	2	2	–	3
<i>Proteus mirabilis/vulgaris</i>	2	–	6	5	1	9
<i>Providencia stuartii/alcalifaciens</i>	2	–	4	2	2	2
Другие:						
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	1		–	–	–	
<i>Alcaligenes faecalis</i>		1				2
<i>Morganella morganii</i>		1				

## 15. Применение коктейлей бактериофагов в пост-ковидной реабилитации

В настоящем исследовании возраст пациентов составлял от 19 до 82 лет (медиана: 62 (53; 67) года); 16 участников исследования были женщинами (53%), 14 – мужчинами (47%), индекс массы тела (ИМТ) составлял 33 (26; 37). У всех испытуемых были признаки поражения легких на компьютерной томограмме в диапазоне от 10% до 75% (I стадия – 50%, II – 31%, III

– 12, IV – 7%) во время острого COVID-19. Антибактериальная терапия назначалась более чем 25% субъектов во время основного заболевания (цефалоспорины третьего поколения, амоксициллин в комбинации с ингибиторами бета-лактамаз). Группу сравнения составили испытуемые (n = 8), также перенесшие в прошлом COVID-19 и получавшие комплексную программу реабилитации в августе 2022 года, но не получавшие коктейли бактериофагов. Возраст составлял от 21 до 77 лет (медиана: 53 (44; 62) года); 7 участников исследования были женщинами (87%), 1 – мужчиной (13%).

В результате реабилитационной программы, включающей фаговую терапию, у пациентов повысилась сатурация, нормализовалась частота дыхания, а частота сердечных сокращений снизилась в пределах референсных значений. Микробиота обследуемых при поступлении характеризовалась наличием провоспалительных типов микроорганизмов и низким уровнем противовоспалительных микроорганизмов, как у пациентов с пост-ковидным синдромом. После 14 дней применения коктейля бактериофагов было выявлено статистически значимое снижение воспалительного коэффициента (**Рисунок 12**).

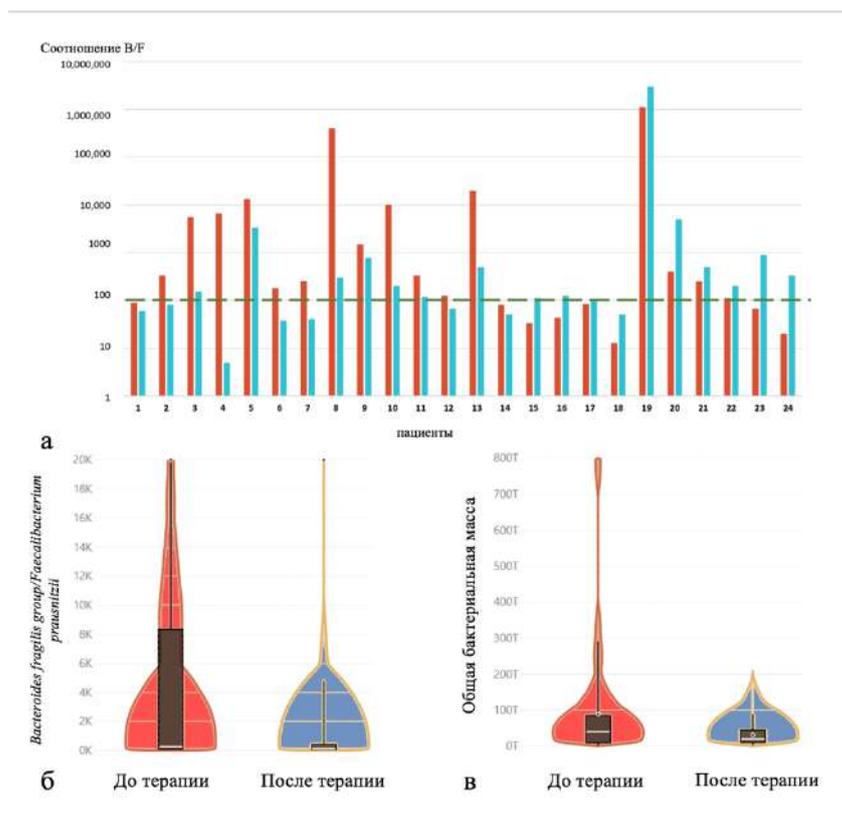


Рисунок 12. (а). Соотношение *Bacteroides fragilis group*/*Faecalibacterium prausnitzii* у субъектов во время терапии коктейлем бактериофагов; красные столбики - до терапии, синие - после. Зеленая пунктирная линия - граница референсного значения. (б). График распределения значений показателя соотношения группы *Bacteroides fragilis*/*Faecalibacterium prausnitzii* во время терапии коктейлем бактериофагов; красный - до терапии, синий - после. (с). График распределения значений показателя общей бактериальной массы во время терапии коктейлем бактериофагов; красный - до терапии, синий - после.

Полученные результаты продемонстрировали потенциал коктейля бактериофагов в модуляции микробиоты кишечника. Применение фаговых коктейлей в течение двух недель не

вызвало побочных эффектов у испытуемых, нормализовался стул и уменьшилась выраженность желудочно-кишечных симптомов. Значимым клиническим эффектом ингаляции бактериофага в ходе пост-ковидной реабилитации можно считать статистически достоверное увеличение сатурации и нормализацию частоты дыхания.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что комбинация выделенных и охарактеризованных бактериофагов обладает высоким потенциалом применения в фаготерапии.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые выделены и охарактеризованы бактериофаги vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnS\_FZ41, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14, активные в отношении бактерий *Klebsiella pneumoniae*.

2. Выделенные бактериофаги устойчивы в широких диапазонах температур и pH, а также обладают высокой продуктивностью.

3. Применение «коктейля» исследуемых бактериофагов повышает литическую активность и снижает частоту генерации фагоустойчивых форм бактерий, по сравнению с их отдельным применением, комбинация исследуемых бактериофагов способна эффективно ингибировать рост клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae in vitro*.

4. Проведено полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnS\_FZ41, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14, в результате анализа нуклеотидных последовательностей установлено, что все исследованные фаги не несут генов устойчивости к антибиотикам, вирулентности или лизогенности, а бактериофаги vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14 кодируют полисахарид-деполимеразы.

5. Комбинация бактериофагов vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14 с полисахарид-деполимеразной активностью способна эффективно предотвращать рост биопленок, а также разрушать зрелые биопленки *Klebsiella pneumoniae in vitro*.

6. Ингаляционное применение бактериофагов vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14 в составе фагового препарата широкого спектра действия при лечении хронических реанимационных пациентов с рецидивирующими пневмониями демонстрирует безопасность, а эффективность подтверждена результатами лечения, сопоставимыми с традиционной антибиотикотерапией.

7. Пероральное и ингаляционное применение комплексных фаговых препаратов, включающих фаги vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12 и vB\_KpnM\_FZ14, при реабилитации пациентов, перенесших COVID-19, показало отсутствие побочных эффектов, привело к улучшению клинико-лабораторных показателей и к снижению коэффициента анаэробного дисбаланса.

### Список публикаций по теме диссертации

1. **Zurabov F.**, Petrova M., Zurabov A., Gurkova M., Polyakov P., Cheboksarov D., Chernevskaya E., Yuryev M., Popova V., Kuzovlev A., Yakovlev A., Grechko A. Adaptive Phage Therapy for the Prevention of Recurrent Nosocomial Pneumonia: Novel Protocol Description and Case Series // *Antibiotics*. 2023. V. 12(12). P. 1734. JIF (Wos) 4,8. Доля участия = 60%. 1,2 п.л.
2. **Zurabov F.**, Glazunov E., Kochetova T., Uskevich V., Popova V. Bacteriophages with depolymerase activity in the control of antibiotic resistant *Klebsiella pneumoniae* biofilms // *Scientific reports*. 2023. V. 13(1). P. 15188. JIF (Wos) 4,6. Доля участия = 80%. 0,8 п.л.
3. **Zurabov F.M.**, Chernevskaya E.A., Beloborodova N.V., Zurabov A.Y., Petrova M.V., Yadgarov M.Y., Popova V.M., Fatuev O.E., Zakharchenko V.E., Gurkova M.M., Sorokina E.A., Glazunov E.A., Kochetova T.A., Uskevich V.V., Kuzovlev A.N., Grechko A.V. Bacteriophage Cocktails in the Post-COVID Rehabilitation // *Viruses*. 2022. V. 14(12). P. 2614. JIF (Wos) 4,7. Доля участия = 60%. 1,5 п.л.
4. **Zurabov F.**, Zhilenkov E. Characterization of four virulent *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages, and evaluation of their potential use in complex phage preparation // *Virology journal*. 2021. V. 18(1). P. 9. JIF (Wos) 4,8. Доля участия = 90%. 2,0 п.л.
5. Beloborodova N.V., Grechko A.V., Zurabov A.Y., **Zurabov F.M.**, Kuzovlev A.N., Petrova M.V., Chernevskaya E.A., Yakovlev A. Prospects of using adaptive phage therapy in the rehabilitation of post-COVID-19 patients // *Physical and rehabilitation medicine, medical rehabilitation*. 2021. V. 3(3). P. 254-259. IF (РИНЦ) 1,1. Доля участия = 30%. 0,6 п.л.
6. Белобородова Н.В., Гречко А.В., Гуркова М.М., Зурабов А.Ю., **Зурабов Ф.М.**, Кузовлев А.Н., Меглей А.Ю., Петрова М.В., Попова В.М., Редкин И.В., Сергеев Н.И., Черневская Е.А., Юрьев М.Ю., Яковлев А.А. Адаптивная фаготерапия пациентов с рецидивирующими пневмониями (пилотное исследование) // *Общая реаниматология*. 2021. Т. 17 (6). С. 4-14. IF (РИНЦ) 1,1. Доля участия = 30%. 1,1 п.л.
7. Глазунов Е.А., **Зурабов Ф.М.**, Павлова И.Б., Толмачева Г.С. Воздействие вирулентными бактериофагами на биопленки *Klebsiella pneumoniae* // *Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии*. 2020. Т. 1(4). С. 480-485. IF (РИНЦ) 1,1. Доля участия = 50%. 0,6 п.л.
8. **Zurabov F.**, Zhilenkov E. Complete Genome Sequences of Lytic Polysaccharide-Degrading *Klebsiella pneumoniae* Bacteriophages vB\_KpnS\_FZ10, vB\_KpnP\_FZ12, vB\_KpnM\_FZ14, and vB\_KpnS\_FZ41 // *Microbiology resource announcements*. 2019. V. 8(39). P. e00914-19. SJR (Scopus) 0,28. Доля участия = 90%. 0,3 п.л.