

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Ван Юэци

**Особенности структурной организации и взаимодействия хвостатых
бактериофагов с биопленкообразующими бактериями**

1.5.2 Биофизика

1.1.10 Биомеханика и Биоинженерия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва — 2026

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и в Научно-исследовательском институте вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова

Научный руководитель – *Соколова Ольга Сергеевна*, доктор биологических наук, профессор РАН

Официальные оппоненты – *Ермолаева Светлана Александровна* - доктор биологических наук, Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи, руководитель лаборатории экологии возбудителей инфекций;

Шитиков Егор Александрович - доктор биологических наук, отдел биомедицины и геномики, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. Лопухина Федерального медико-биологического агентства России, зав. лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов;

Гольшев Сергей Александрович - кандидат биологических наук, отдела электронной микроскопии, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, старший научный сотрудник.

Защита диссертации состоится «21» мая 2026 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, ауд. «Новая». E-mail: fursova@biophys.msu.ru

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/3845>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

П.В. Фурсова

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Экологические и нозокомиальные инфекции, вызванные бактериями с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), сегодня представляют собой серьезную угрозу для общественного здравоохранения. Устойчивость к противомикробным препаратам является причиной более 700 000 смертей в год (Tassonelli et al, 2021). Лекарственная устойчивость настоятельно требует поиска новых антибактериальных препаратов. В этой связи бактериофаги, особенно из класса Caudoviricetes, становятся объектом внимания как альтернатива антибиотикам (Nathwani et al, 2014). В последнее десятилетие разработка приложений фаговой терапии (ФТ) стала весьма актуальным направлением.

Бактериальные вирусы считаются безопасными для организмов человека и животных, способны эффективно проникать в сложную структуру биопленки, создаваемой бактериями. Кроме того, бактериофаги характеризуются высокой специфичностью к определённым бактериям (Chibeu et al, 2012). Уже более 90 лет в Советском Союзе и РФ проводится лечение бактериофагами, которые в основном вводятся в жидком виде перорально или поверхностно. Используются как моновалентные препараты, так и комбинированные, содержащие несколько фагов (Алешкин, 2015). В то же время, до сих пор не разработаны биосовместимые и биоразлагаемые системы для доставки и пролонгированного высвобождения бактериофагов в месте инфекции. Нет сравнительных данных о взаимодействии бактериофагов с биопленками, образованными грамм отрицательными и грамм положительными бактериями.

Хвостатые бактериофаги имеют характерную структуру, включающую головку и хвост (Askermann, 1998), что обуславливает их способность эффективно связываться с бактериальными клетками. Мультипротеиновый комплекс (коннектор) между головой и хвостом обеспечивает надежное соединение двух структур, что критически важно для успешного заражения бактерий. Исследование структуры коннектора поможет понять, как фаги

эффективно заражают клетки хозяина и как можно модифицировать эти процессы для практического применения.

Настоящее исследование посвящено изучению особенностей взаимодействия трёх бактериофагов класса Caudoviricetes с грамм отрицательными бактериями *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*, отнесенным ВОЗ к числу критических угроз из-за их способности образовывать биопленки и повышенной резистентности к антибиотикам (Borcan et al, 2025), и грамм положительными бактериями *Bacillus subtilis*, способными также образовывать биоплёнки (Arnaouteli et al, 2021). Было исследовано с высоким разрешением 3D строение коннектора голова-хвост фага TaPaz и показано образование везикул ранней фаговой инфекции (ВРФИ) фагом phiKZ. Были разработаны новые биосовместимые субстраты для доставки бактериофагов к месту инфекции, а также проведён поиск новых хвостатых фагов, разрушающих биопленки, образованные клиническими изолятами. Исследования с потенциальным фокусом на разработку ФТ распространённых бактериальных заболеваний являются актуальными и одними из важнейших задач с практической точки зрения.

Степень разработанности темы исследования

Задача ФТ - уничтожить патогенные штаммы бактерий, не нарушая баланс естественной микрофлоры пациента, проходящего лечение. Чаще всего для этого используются литические и модифицированные фаги (Hibstu et al, 2022), фаговые белки (Pорова et al, 2021) или сочетание фагов с антибиотиками. Ключевые факторы, влияющие на фармакокинетику препаратов бактериофагов, включают адсорбцию фага, биораспределение, метаболизм и элиминацию (Nang et al, 2023). Адсорбция в основном зависит от способа введения фага (Luong et al, 2020), его структуры и размера (Bichet et al, 2021). Гигантские фаги (имеющие диаметр капсида ~150 нм) могут инфицировать широкий спектр хозяев (включая как грамотрицательные, так и грамположительные бактерии). Обнаружено, что некоторые из гигантских фагов образуют псевдоядерные структуры в

бактериях, защищающие их геномы от бактериальных нуклеаз (Mendoza et al, 2019). Однако, как ДНК фага в первые минуты после инфекции доставляется к фаговому ядру, не было установлено. На метаболизм фагов может влиять pH окружающей среды (Febvre et al, 2019). Фармакодинамика, в свою очередь, связана с антибактериальной активностью фаговых препаратов. Она основана на анализе множественности инфекции (МОИ). Это является важным фактором для предотвращения развития резистентности фагов (Torres-Barceló, 2018).

В больницах биопленки, образованные болезнетворными бактериями, представляют собой главную проблему при использовании имплантов. В частности, *P. aeruginosa* чаще всего инфицирует венозные и мочевые катетеры, а также искусственные протезы бедра (Richter et al, 2021). Биопленки формируются за счёт внеклеточного матрикса (ВМ) образуемого бактериальной популяцией клеток. Это полифункциональная структура, формирующаяся на основе капсул, псевдокапсул и внеклеточной слизи, синтезируемых отдельными клетками. Компоненты ВМ состоят из экзополисахаридов (ЭПС), а также липополи- и липоолигосахаридов, циклических глюканов и липопротеинов. ВМ защищает бактериальные клетки и образуемые ими биопленки от неблагоприятных условий окружающей среды и воздействия различных абиотических и биотических факторов, поэтому бактерии внутри биопленок более устойчивы к различным дезинфицирующим и антимикробным средствам (Mirghani et al, 2022). На данный момент изменения в структуре биоплёнки и отдельных бактериальных клеток в результате воздействия бактериофагов на антибиотикорезистентные клинические изоляты *P. aeruginosa* еще не достаточно хорошо изучены.

Чтобы использовать бактериофаги в качестве антимикробных препаратов с повышенной эффективностью, в последние годы их пытаются иммобилизовать на различных субстратах (Faroq et al, 2020). Этого можно добиться с помощью прямой физической адсорбции (Richter et al, 2021) или химической/ковалентной иммобилизации (Mojtabavi et al, 2022).

Структура бактериофагов с высоким разрешением исследуется с помощью криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) (Ayala et al, 2023). В настоящее время получен ряд структур отдельных частей хвостатых бактериофагов с высоким разрешением, однако их разнообразие приводит к тому, что постоянно выявляются новые структурные особенности. Особенно разнообразен отдел, соединяющий капсид с хвостом, включающий портал, который регулирует перемещение ДНК в капсид при сборке инфекционного вириона и в клетку-хозяина при инфекции (Rao et al, 2021).

Цель и задачи работы:

Цель данной работы заключалась в определении особенностей структурной организации и антибактериального действия хвостатых бактериофагов, а также разработке биоинженерных конструкций для их контролируемой доставки.

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

1. Изучить особенности структуры и взаимодействия хвостатых фагов с бактериальными клетками методами криоэлектронной микроскопии и томографии;
2. Исследовать влияние выбранных бактериофагов на архитектуру и жизнеспособность биоплёнок, образованных клиническими изолятами и референсными штаммами;
3. Разработать и охарактеризовать новые биосовместимые субстраты/носители для иммобилизации, стабилизации и контролируемой доставки бактериофагов.

Научная новизна

Новизна работы заключается в том, что эффективность взаимодействия фагов с биопленками, зависит от особенностей структурной организации. Разработанный интегративный подход, применённый к критическим биоплёнкообразующим патогенам, позволяет не только раскрыть фундаментальные механизмы антибактериального действия, но и разработать новые практические стратегии для преодоления антибиотикорезистентности.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в углублении фундаментальных представлений о структурно-функциональной организации бактериофагов и механизмах их взаимодействия с бактериальными биопленками. Практическая значимость состоит в разработке новых, основанных на фагах, стратегий и биоматериалов для борьбы с хроническими инфекциями, вызываемыми антибиотикорезистентными патогенами, что вносит вклад в решение проблемы глобальной антимикробной резистентности.

Методология исследования

1. Биоинженерия: инженерия функционализированных с помощью ПЭИ и бактериофагов субстратов/носителей из фиброина шелка для направленной доставки бактериофагов;

2. Биофизика: с помощью крио-ЭМ получена реконструкция портального комплекса фага ТаPaz, электронная томография применялась для исследования ВРФИ; биопленки и биоматериалы (субстраты) были охарактеризованы с помощью СЭМ, просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), субстраты были изучены с помощью анализа набухания/деградации, Рамановской спектроскопии и ИК спектроскопии;

3. Микробиология: количественная оценка эффективности фагов.

Положения, выносимые на защиту

1. Комплексный подход, сочетающий структурный анализ, исследование взаимодействия фагов с биоплёнками и инженерии материалов для доставки, является эффективной стратегией для перехода от фундаментального изучения бактериофагов к разработке практических инструментов для борьбы с антибиотикорезистентными инфекциями.

2. Комплексный подход позволяет эффективно определить высокоразрешающие структуры ключевых белков бактериофага ТаPaz, визуализировать динамику ранней инфекции бактериофага phiKZ, создать инновационные биоматериалы для направленной доставки фагов.

Степень достоверности данных

Достоверность результатов, представленных в диссертационной работе, определяется репрезентативным объёмом проведённых экспериментальных исследований, комплексным применением современных методов исследования и подтверждается статистической обработкой полученных данных.

Личный вклад автора

Автору диссертационного исследования принадлежит значительная роль в постановке целей и формулировке задач, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке данных, подготовке тезисов и публикаций по теме исследования. В публикации Osire, **Wang** et al, 2024 соискатель изучила влияние среды и температуры на рост и структуру биопленок. В публикации Antonova, Nichiporenko, Sobinina, **Wang** et al, 2024 автор исследовала ранние стадии инфекции методом электронной томографии. В публикации **Wang** et al, 2025 автор провела работу по формированию биопленок и изучению воздействия на них бактериофагов при разном pH. В публикации Osire, **Wang**, et al, 2024 автор разработала функционализированные бактериофагами субстраты и изучила их с помощью ТЭМ и СЭМ.

Апробация диссертации

Полученные в ходе работы результаты были доложены на 8 российских и зарубежных международных конференциях, таких как Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2024», 4й Микробиологический конгресс, Microscopy and Microanalysis и др. Результаты докладывались на научных семинарах группы структурной биотехнологии кафедры биоинженерии и кафедры биофизики биологического факультета МГУ.

Публикации

По материалам работы опубликованы 4 печатные работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования “eLibrary Science Index”.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, 6 глав результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка литературы. Список литературы включает 124 источника.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ВВЕДЕНИЕ

Во Введении сформулированы цели и задачи исследования, обоснована актуальность и практическая значимость работы.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

В начале Литературного обзора рассмотрены разнообразие и классификация бактериофагов. Далее подробно описаны антимикробные применения бактериофагов. Также приводятся методики изучения структуры фагов и взаимодействия фагов с бактериями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данном разделе описаны материалы, включая используемые бактериальные штаммы и бактериофаги, а также экспериментальные процедуры работы: подготовка образцов для крио-ЭМ и СЭМ, получение изображений и построение трёхмерной реконструкции комплекса «голова-хвост» и томографическое исследование ВРФИ. Получение субстратов из фиброина шелка и функционализация их ПЭИ и бактериофагами, изучение их биофизических свойств. Применение методик исследования бактериальных плёнок.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Структурные основы инфекции хвостатых бактериофагов

1) Мы изучили структуру комплекса «голова-хвост», фага *A. baumannii* ТаРаз с помощью крио-ЭМ макромолекул. Реконструкция с высоким разрешением (3,18Å) (рис. 1А), полученная с использованием программы RELION (Scheres et al, 2012), позволила построить атомную модель (рис. 1Б) на основе известной первичной последовательности белков бактериофага

(Shchurova et al, 2021), свёрнутых с использованием AlphaFold и уточненных в COOT (Emsley, & Cowtan, 2004).

Портальный комплекс является ключевой структурой, обеспечивающей как упаковку геномной ДНК в капсид, так и её последующую инъекцию в клетку бактерии. Высокое разрешение полученной модели позволило определить ключевые связи между белками в комплексе. Взаимодействия между порталом и адаптерным белком характеризуются значительным присутствием электростатических взаимодействий, водородных связей и солевых мостиков. Именно эти взаимодействия обеспечивают механическую стабильность соединения «голова-хвост», необходимое для упаковки ДНК под высоким давлением.

Картирование электростатического потенциала внутренней части портала показало большую положительно заряженную область в верхней части портала и отрицательно заряженную - в области взаимодействия с адаптором (рис. 1В). Такое распределение заряженных областей предохраняет отрицательно заряженную ДНК от досрочного высвобождения из капсида (Ayala et al, 2024; Cuervo et al, 2019).

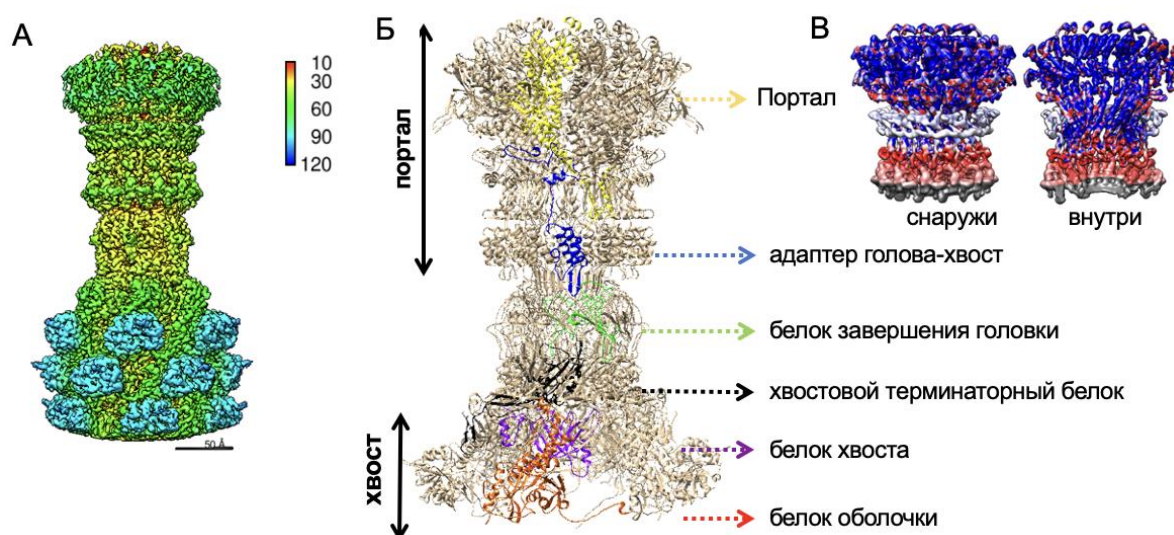


Рисунок 1. Модель интерфейса «голова-хвост» фага TaPaz (Wang et al, 2022). (А) Вид сбоку реконструкции с разрешением 3,18 Å; портал – сверху, хвост – снизу; масштабный отрезок – 50 Å; цветом отмечено расстояние до центра реконструкции, Å. (Б) атомная модель, полученная в результате докинга соответствующих белков. (В) Электростатический поверхностный потенциал портала снаружи (слева) и внутри (справа), красный: -5 kT/e^- , синий: $+5 \text{ kT/e}^-$.

2) В начале инфекции, после высвобождения из капсида через портал, фаговая ДНК устремляется в клетку хозяина. Мы впервые показали, что для ее защиты от бактериальных нуклеаз в первые 2-5 минут после инфекции образуются ВРФИ, окруженные мембранной оболочкой, имеющей толщину 5 нм и содержащие электронно-плотные внутренние структуры (рис. 2). Мы предполагаем, что эти структуры, возможно, являются ДНК с кодируемыми ρ HKZ белками, включая РНК полимеразу (Chen et al, 2026).

Таким образом, ВРФИ выполняют роль безопасной транспортной единицы для генома фага от места инфекции до фагового ядра, где ДНК фага может реплицироваться и быть защищенной от иммунной системы бактерий.

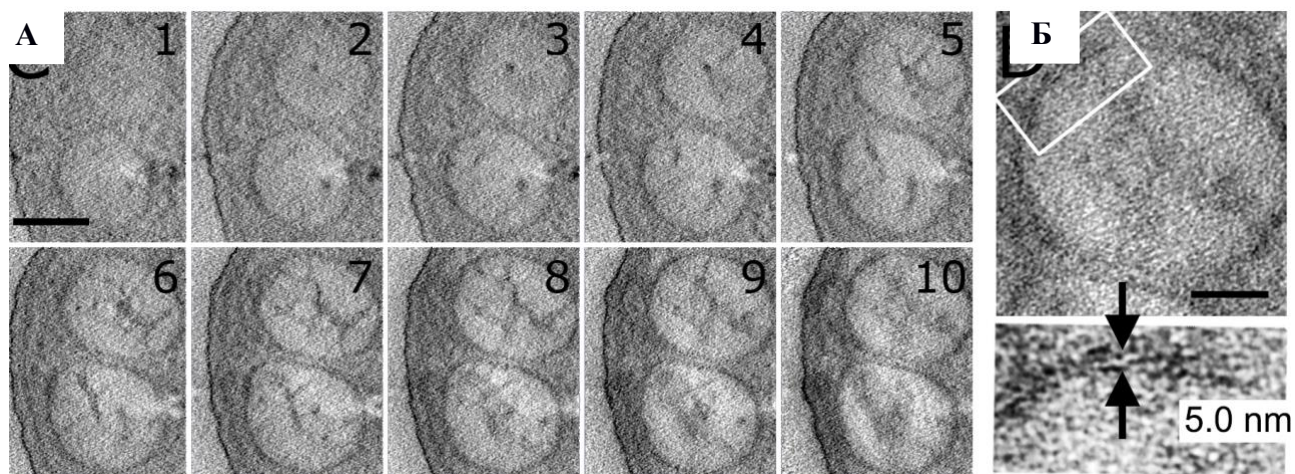


Рисунок 2. Томография ВРФИ в *P.aeruginosa* через 5 мин после инфекции: (А) - в каждой везикуле видна ветвистая электронно-плотная внутренняя структура. (Б) – увеличенное изображение мембраны, образующей ВРФИ. Масштабная линейка — 100 нм (Antonova, ... Wang et al, 2024).

2. Изучение взаимодействия хвостатых фагов с биопленками, образованными референсными штаммами и клиническими изолятами

1) Некоторые хвостатые бактериофаги могут эффективно разрушать биопленки. Биоплёнки референсного штамма *P. aeruginosa* PAO1 секретируют ЭПС, которые участвуют в адгезии бактерий к поверхности. рН среды может изменять заряд аминокислот в капсидах бактериофагов, а также воздействовать на секрецию ЭПС бактериальными клетками, что может привести с одной стороны к лучшему проникновению фагов в толщу биопленки, а с другой - к

уменьшению содержания ЭПС. Структуру биоплёнок PAO1 при различных pH изучали с помощью СЭМ (рис. 3).

2) Биопленка, подвергнутая воздействию бактериофагов PB1 в SM буфере с нейтральным pH, содержала меньше экзополисахаридов (ЭПС), клетки были меньше и более рыхло упакованы, по сравнению с биопленкой, подвергнутой воздействию фагов PB1 в слабокислых условиях, что указывает на большую чувствительность к антимембранному действию фага при нейтральном pH. Таким образом, при разработке ФТ следует учитывать условия pH среды.

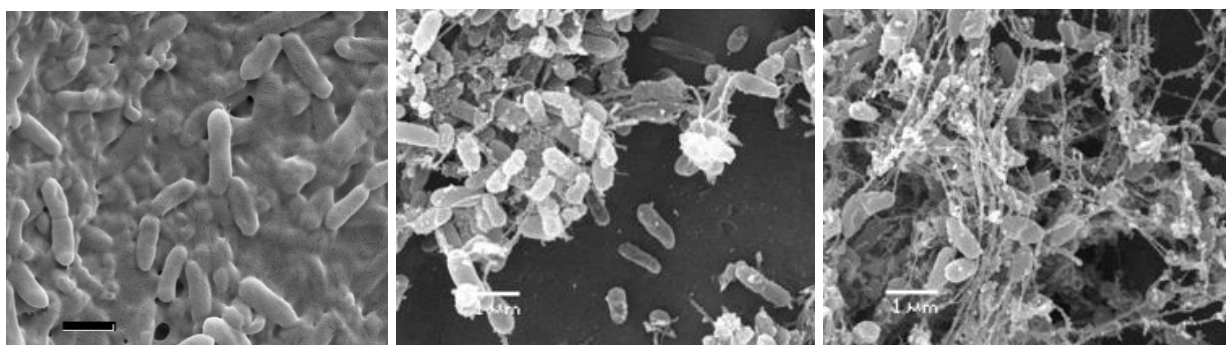


Рисунок 3. СЭМ-исследование деградации биопленки *P. aeruginosa* PAO1 в зависимости от pH после 24 часовой инкубации. (А) контрольная биопленка; (Б) обработка PB1 фагом в SM буфере (нейтральный pH); (В) обработка PB1 фагом в PBS (слабокислый pH); Увеличение 10000х. Размер масштабного отрезка - 1 мкм (Wang et al, 2025). Масштабный отрезок – 1 мкм.

3) Мы исследовали устойчивые к антибиотикам клинические изоляты, выделенные из бактерий *P. aeruginosa*, вызывающих хронические легочные (20 штаммов с общим названием Lu) и урологические (20 штаммов с названием Ur) инфекций. Образцы были получены из коллекции лаборатории генетики бактериофагов НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. Для сравнительных исследований были выбраны 2 штамма с умеренной (Ur1, Lu9) и 2 с сильной способностью к биоплёнкообразованию (Ur14, Lu3). Биопленки, образованные штаммами Ur1 и Lu9 с умеренным биопленкообразованием, характеризовались высокой вязкостью и низкой эластичностью. Эти биопленки легко деформировались при приложении внешней силы. Биопленки штаммов Ur14 и Lu3 с сильным биопленкообразованием, наоборот, отличались низкой вязкостью, были более тонкими, но формировали жесткую структуру, устойчивую к механическим воздействиям.

Мы проверили антимикробную активность шести бактериофагов, принадлежащих к двум родам - Phikzvirus (фаги phiKZ, NN и phiOP) и Pbunavirus (phi10/2, PB1, phi14/1) с помощью OD₅₉₀-тестов с окрашиванием кристаллическим фиолетовым (табл. 1) при различной множественности инфекции (MOI = 0,001, 0,01 и 0,1). Бактериофаги обоих исследуемых родов успешно разрушали более 50% биопленки клинических изолятов, как с сильной (Lu3), так и с умеренной (Lu9) способностью к образованию биопленки.

Очень важным параметром активности бактериофагов является множественность инфекции – MOI (табл. 1). Биопленка Lu3 активно разрушалась при воздействии фага phi10/2 при MOI=0,001. Биопленку штамма Lu9 эффективно разрушал фаг phiKZ при MOI=0,01.

Таблица 1. Эффективность воздействия фагов (% биопленки, оставшейся после обработки фагами) в зависимости от множественности инфекции (MOI)

| Штамм | Phikzviruses | | | Pbunaviruses | | |
|-------------|--------------|----------|----------|--------------|----------|----------|
| | MOI | | | MOI | | |
| | 0,001 | 0,01 | 0,1 | 0,001 | 0,01 | 0,1 |
| Lu3 | phiOP | | | phi10/2 | | |
| % | 49,1±5,7 | 45,9±8,9 | 39,5±4,1 | 28,4±5,2 | 45,5±4,6 | 44,5±7,9 |
| Lu9 | phiKZ | | | phiPB | | |
| % | 47,0±8,8 | 24,6±8,2 | 50,7±8,2 | 46,7±3,8 | 42,3±5,2 | 34,3±3,7 |
| Ur1 | phiKZ | | | phi14/1 | | |
| % | 20,4±1,1 | 28,7±3,0 | 36,1±6,5 | 18,5±2,7 | 42,2±7,9 | 41,7±9,0 |
| Ur14 | phiKZ | | | phi10/2 | | |
| % | 67,8±0,5 | 66,4±3,4 | 61,7±1,3 | 86,1±6,0 | 67,1±9,2 | 79,8±9,5 |
| Ur14 | NN | | | | | |
| % | 67,3±4,3 | 63,6±3,7 | 54,5±3,7 | | | |

Мы использовали СЭМ для визуализации морфологических изменений в биоплёнках после заражения фагами в течение 2 ч и 24 ч. Признаки разрушения биопленки можно было обнаружить уже через 2 часа после заражения фагами (рис. 4). После обработки фагами ЭПС образовывали плотные фибриллярные сети, пронизывающие матрикс биопленки. Эти структуры, практически

отсутствовавшие в контроле, имели две различные морфологии - тонкие, похожие на паутину нити (например, у бактерий Ur1) и более толстые, аморфные (например, у Lu3), что свидетельствует не только о секреции ЭПС, но и о высвобождении ДНК при разрушении клеток.

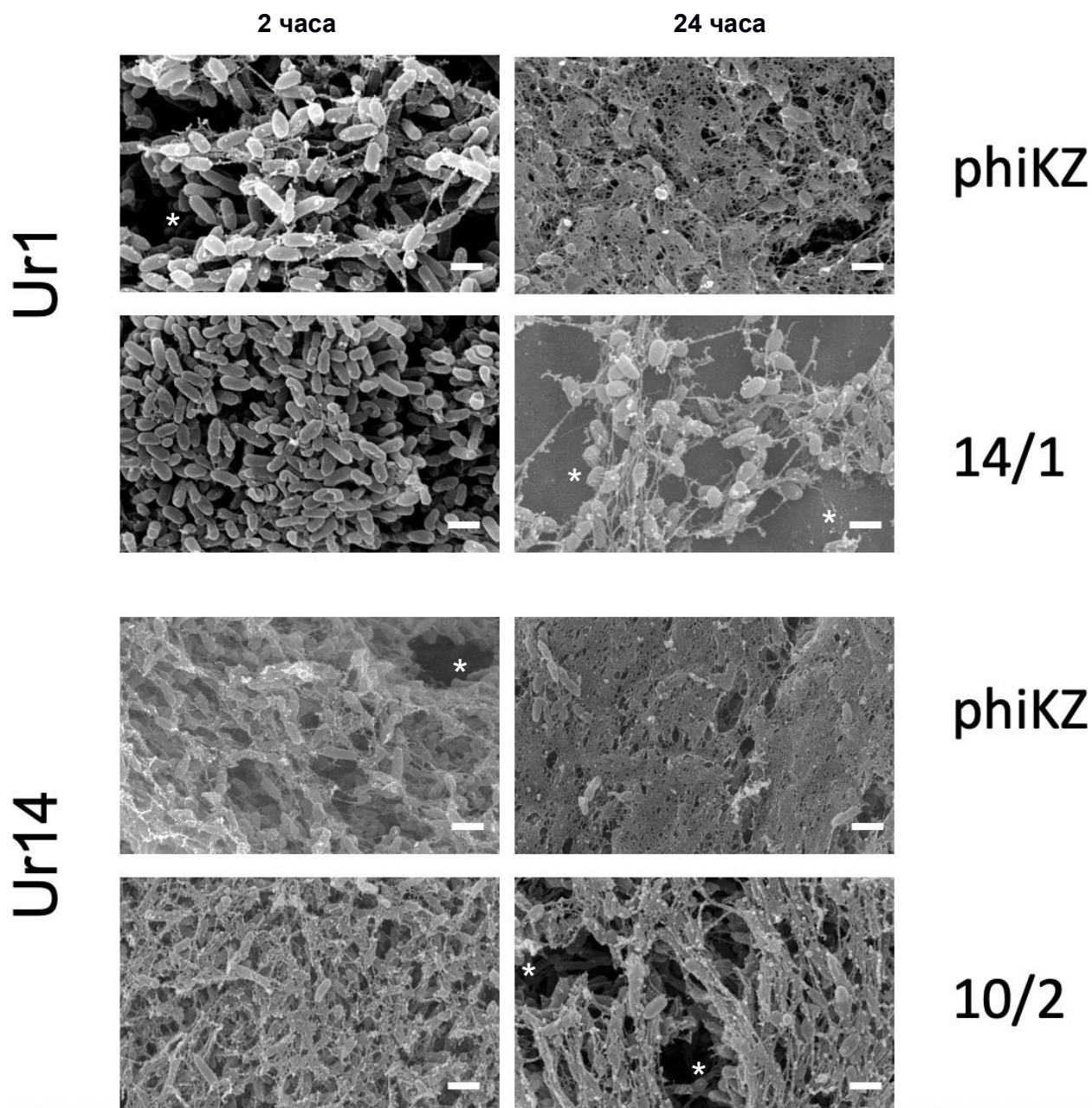


Рисунок 4. СЭМ-визуализация результатов воздействия фагов на биопленки, продуцируемые клиническими изолятами *P. aeruginosa* Ur1 (средняя способность к биоплёнкообразованию) и Ur14 (сильная способность к биоплёнкообразованию). Увеличение 10000×. Масштабный отрезок - 1 мкм. Звёздочки – пустоты в биоплёнке. (Wang et al, 2026)

Увеличение секреции ЭПС - защитный механизм в ответ на стресс при инфекции, увеличивающий вязкость биопленки для поддержания целостности ее

структуры и ограничения диффузии фагов через физический барьер. ЭПС почти полностью покрывали биопленки штаммов с сильной способностью к биоплёнкообразованию - Lu3 и Ur14, в то время как у Lu9 и Ur1 после обработки фагами оставалось меньше ЭПС. Примечательно, что биопленки Ur14 отличались наиболее компактной и упорядоченной организацией, в то время как биопленки Ur1 демонстрировали значительно более рыхлую упаковку клеток по сравнению с другими штаммами. Через 24 часа воздействия фагов в биоплёнках были обнаружены обширные пустоты (звёздочки на рис. 4), а количество клеток уменьшилось.

3. Инженерия субстратов/носителей с антимикробными свойствами на основе фиброина шелка

Для доставки исследуемых бактериофагов к месту инфекции были разработаны биосовместимые субстраты/носители на основе фиброина шелка (ФС) (рис. 5А) (Osire, Wang et al, 2025).

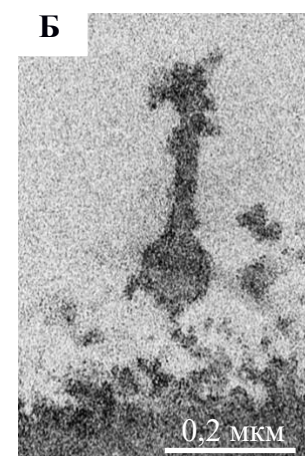
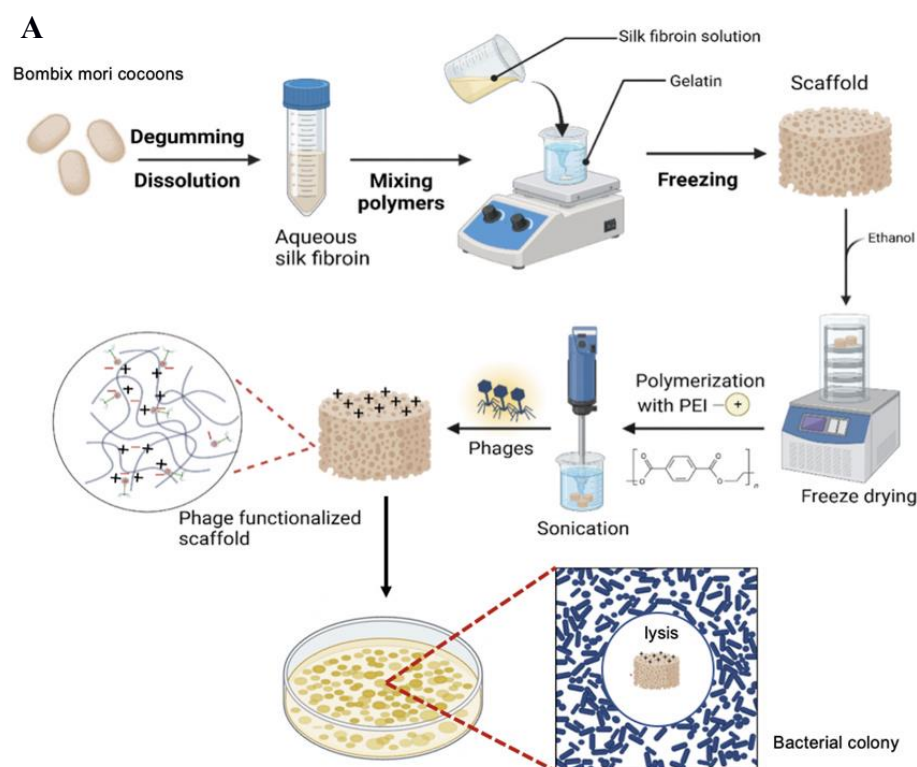


Рисунок 5. (А) Схема получения подложек из фиброина шелка и их функционализация бактериофагами; (Б) ПЭМ ультратонкого среза подложки с иммобилизованным бактериофагом. (Osire, Wang et al, 2025)

Полиэтиленимин (ПЭИ) - катионный полимер - использовался для обработки ФШ подложек (образец ФШ-ПЭИ). ФШ-ПЭИ подложки были функционализированы бактериофагами AR9 (образец ФШ-ПЭИ-AR9) и PB1 (образец ФШ-ПЭИ-PB1).

Для характеристики субстратов/носителей изучали следующие их **биофизические характеристики**:

- 1) Взаимодействие между капсидами фагов и поверхностью субстратов/носителей было визуализовано с помощью ПЭМ (рис. 5Б).
- 2) Структура фиброина в составе субстратов/носителей: Рамановская спектроскопия¹ (рис. 6А) выявила характерные признаки фиброина, среди которых выделяются полосы, связанные с тирозином.

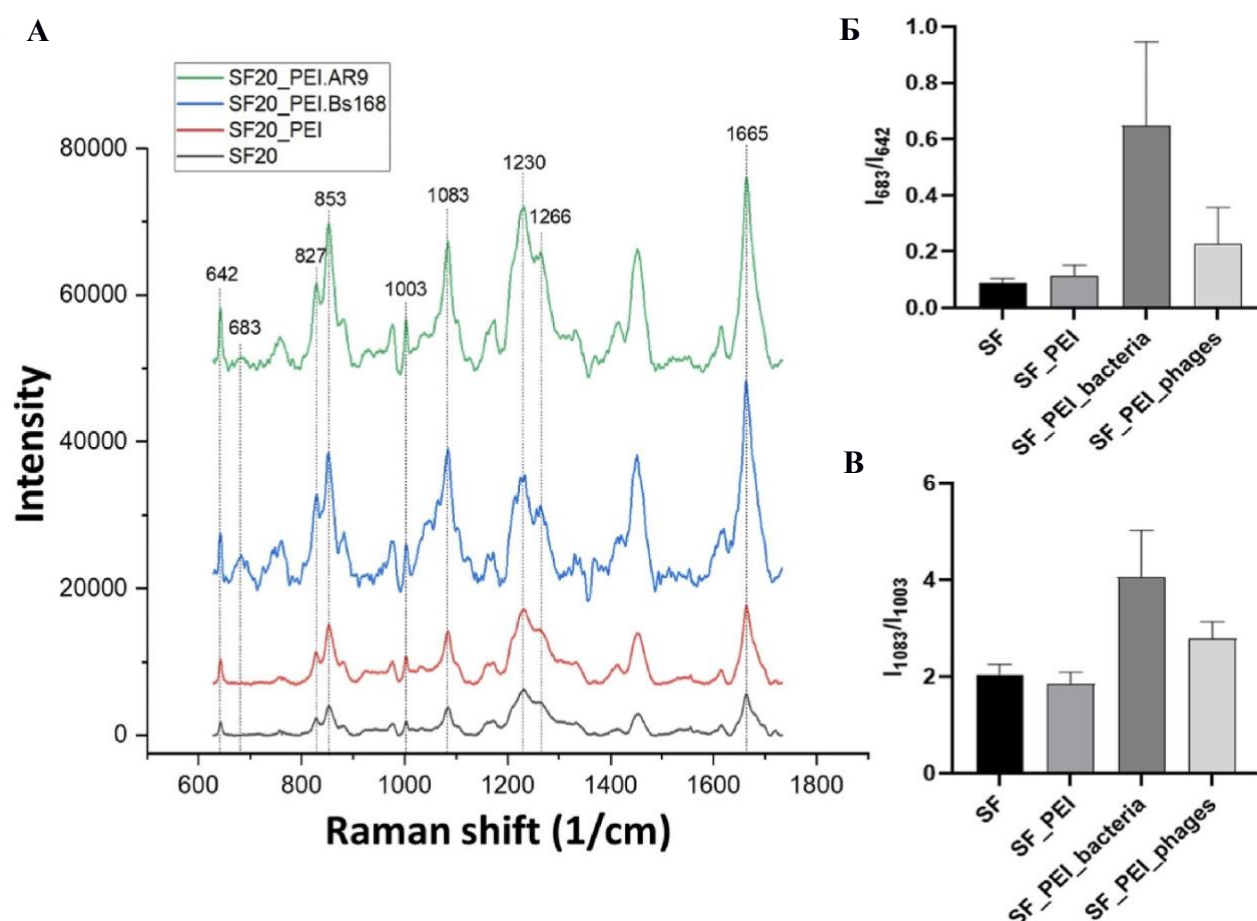


Рисунок 6. Рамановские спектры и характеристика функциональных групп субстратов/носителей. А, усредненная интенсивность рамановских спектров, Б, параметры интенсивности рамановских спектров I_{683}/I_{642} , и В, I_{1083}/I_{1003} . $p < 0,05$ (Osire, Wang et al, 2025).

¹ Проводились в соавторстве с Е.Ю.Паршиной

Соотношение I683/I642 отражает среду водородных связей тирозина (рис. 6Б). Конформационные изменения в фиброине оценивались по соотношению I1083/I1003 (рис. 5В) (колебания С-С по сравнению с неизменными кольцевыми колебаниями фенилаланина).

3) Анализ методом ИК спектроскопии подтвердил увеличение содержания β -листов и изменение конформации белка в образцах, что может быть связано с образованием новых связей в образце Ф-ПЭИ. Эти структурные модификации могут значительно влиять на целостность субстратов/носителей и кинетику высвобождения фагов и, как результат, воздействовать на антимикробную функциональность.

4) Скорость набухания тесно связана с проницаемостью материала, влияет на адгезию и пролиферацию клеток на материале субстратов/носителей. Все исследованные образцы имели высокие показатели набухания, превышающие 85%.

5) Способность функционализированных субстратов/носителей длительно высвобождать бактериофаги: субстраты Ф-ПЭИ были функционализированы двумя фагами: AR9 (активен на *B. subtilis*) и PB1 (активен на *P. aeruginosa*) для сравнительной оценки кинетики их высвобождения в жидкой среде. Как показано в таблице 2, оба фага демонстрировали сопоставимые скорости диффузии в течение 6 дней, что свидетельствует о стабильной кинетике диффузии. Повышение концентрации фагов на 7 день соответствует результатам энзиматической деградации подложек (рис. 7).

Таблица 2. Высвобождение фагов из материала в жидкой среде (колониеобразующие единицы, КОЕ). Среднее значение из 3х опытов.

| фаг/дни | 0 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 10 |
|---------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| AR9 | $1,0 \cdot 10^9$ | $5,0 \cdot 10^6$ | $2,0 \cdot 10^6$ | $3,0 \cdot 10^6$ | $3,0 \cdot 10^7$ | $4,0 \cdot 10^5$ | $1,0 \cdot 10^6$ |
| PB1 | $1,0 \cdot 10^9$ | $2,4 \cdot 10^6$ | $2,3 \cdot 10^6$ | $3,5 \cdot 10^6$ | $1,0 \cdot 10^7$ | $1,5 \cdot 10^8$ | $3,3 \cdot 10^8$ |

6) Биодеградация субстратов: характеристики биодеградации оценивались в физиологических условиях (37°C, PBS 0,01 M) с использованием ферментов:

лизоцима (2 Ед/мл), проназы Е (5 Ед/мл) и протеазы *Streptomyces griseus* (1 Ед/мл), с интервалами до 14 дней. В PBS происходила постепенная потеря массы, при этом контроль и Ф-ПЭИ сохраняли примерно 95 % и 96 % своего первоначального веса, соответственно (рис. 7). Лизоцим вызывал более существенную деградацию, снижая остаточную массу до 88,65% и 89,28% для этих субстратов через 7 дней (рис. 7Б). Проназа Е вызвала заметно более быстрое снижение, в результате чего остаточная масса составила 68,73 % (К) и 71,34 % (Ф-ПЭИ) (рис. 7В).

Что особенно важно, оба варианта, инкубированные с протеазой *S. griseus* (1 Ед/мл в PBS), демонстрировали практически полную деградацию (~100% потери массы) в течение 12 часов (рис. 7Г).

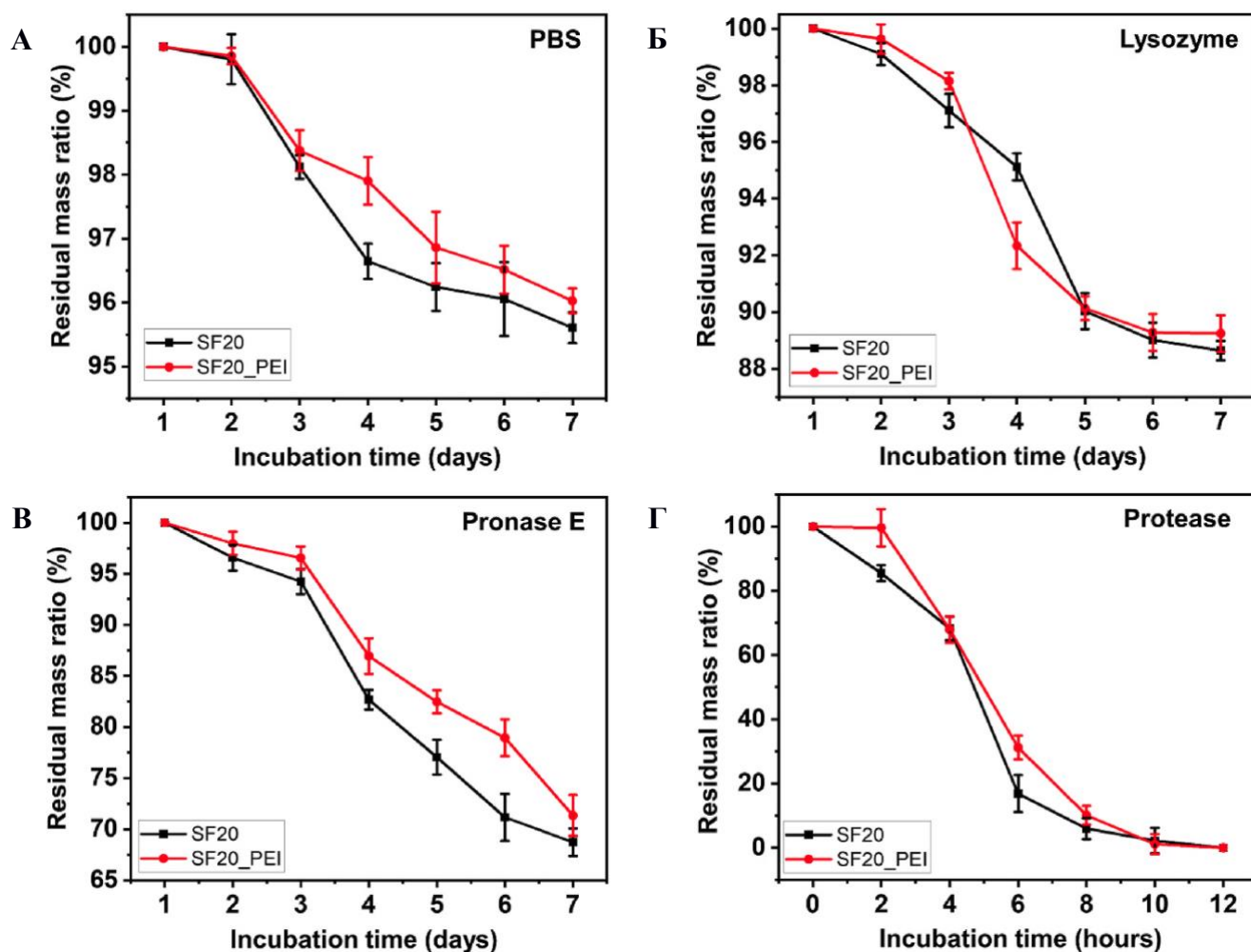


Рисунок 7. Анализ деградации *in vitro* субстратов на основе шелка, функционализированных ПЭИ (красный) и контрольных (чёрный). Профили деградации в растворе PBS (0,01 М) (А), лизоцима (2 Ед/мл) (Б), проназы Е (5 Ед/мл) (В), протеазы *Streptomyces griseus* (1 Ед/мл) (Г) n = 3 (Osire, Wang et al, 2025)

Полученные профили деградации согласуются с наблюдаемой кинетикой диффузии фага, что подтверждает значительный распад субстратов К и Ф-ПЭИ после шести дней экспозиции.

7) Морфология субстратов: с помощью СЭМ была изучена морфология пор. Было показано, что субстраты обладают тонкой волокнистой структурой (рис. 8). Субстраты только из шелка (контроль, К) демонстрировали низкую пористость и неоднородный размер пор. Напротив, субстраты с ПЭИ (Ф-ПЭИ) - высокую пористость и более однообразный размер пор (рис. 8В).

Таким образом, мы показали, что функционализированные субстраты на основе фиброина шелка имеют пористое строение, высокие показатели набухания, они практически полностью деградируют под действием ферментов в течение недели. Иммунизация фагов на функционализированных субстратах/носителях обеспечивает пролонгированное высвобождение фагов в полужидкой среде в течение 6 дней.

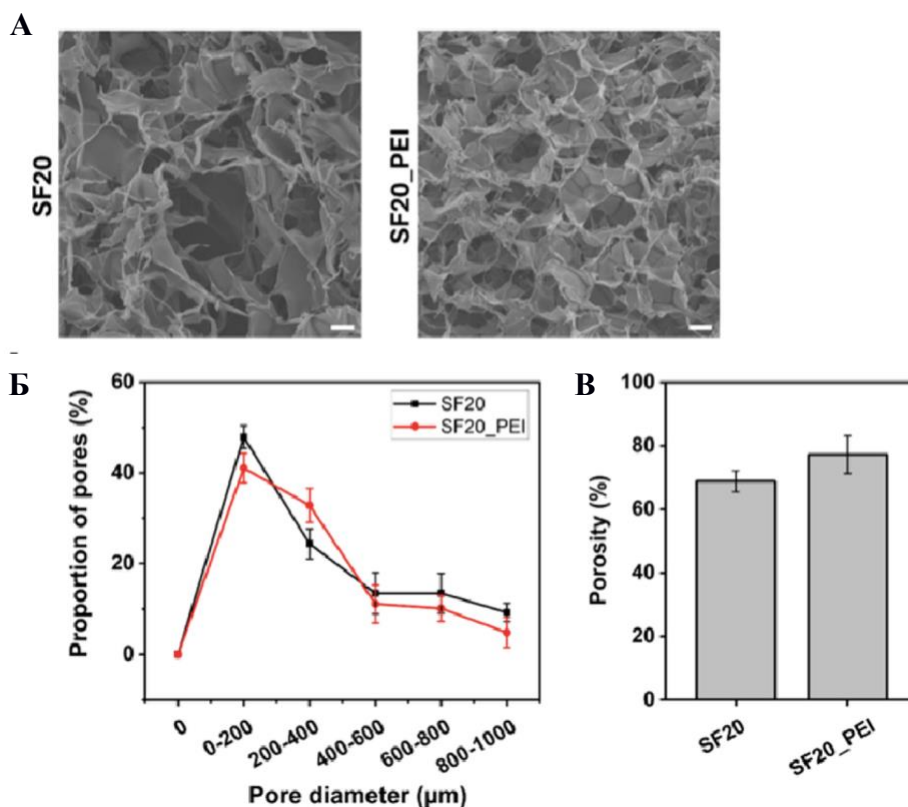


Рисунок 8. (А) СЭМ изучение распределения пор по размерам и пористости полимеризованных субстратов, контрольных (SF20) и Ф-ПЭИ (SF20_PEI). масштабный отрезок - 50 нм. (Б) распределение пор по размерам; (В) пористость субстратов. Среднее ± ст.откл.; n = 3 независимых опыта. (Osire, Wang et al, 2025).

4. Изучение антибактериального действия функционализированных субстратов

Антибактериальные функции полученных субстратов тестировали с использованием грамм положительных бактерий *B. subtilis* (Bs168) и грамм отрицательных *P. aeruginosa* (PAO1).

4) Взаимодействие функционализированных субстратов с бактериями, растущими на твёрдой агаровой среде: после ночной инкубации контрольные субстраты демонстрировали отсутствие зоны ингибирования роста бактерий на чашках Петри с Bs168 и PAO1 (рис. 9), в то время как субстраты, функционализированные бактериофагами, создавали ореолы ингибирования. В отличие от субстратов, функционализированных фагами AR9 (рис. 9.4, образец Ф-ПЭИ-AR9), субстраты с фагами PB1 (Ф-ПЭИ-PB1) демонстрировали увеличенные и более четкие ореолы ингибирования (рис. 9.8), что подтверждает их повышенный потенциал в предотвращении начального развития инфекции.

Стоит заметить, что культура Bs168 активно вырабатывала устойчивость к фагам AR9 (стрелки на рис 9.3 и 9.4) в отличие от PAO1 в отношении фага PB1. В образце PAO1 не содержащие фагов субстраты Ф-ПЭИ (рис. 9.6) также формировали различимые зоны ингибирования, демонстрируя антибактериальную активность ПЭИ.

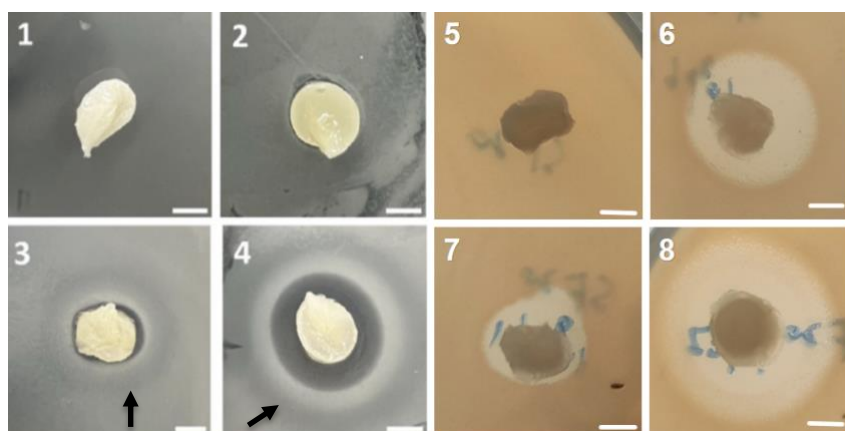
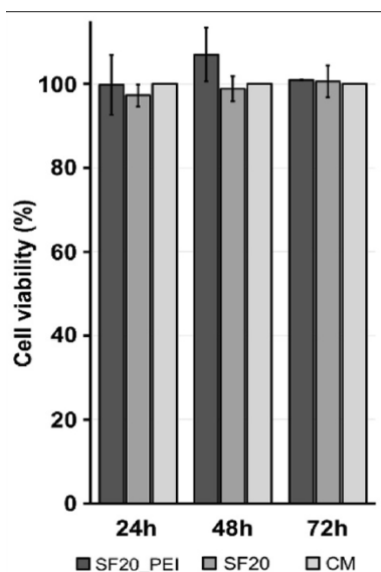


Рисунок 9. Антимикробная активность субстратов против Bs168 (1-4) и против PAO1 (5-8). Образцы: 1, 5 - Контроль, 2, 6 – Ф-ПЭИ; 3 – К+фаг AR9; 4 – Ф-ПЭИ-AR9; 7 – К+фаг PB1; 8 – Ф-ПЭИ-PB1. Масштабные линейки - 5 мм (Osire, Wang et al, 2025).

5) Воздействие на бактерии в жидкой среде: на 4-й день и до 7-го дня включительно после инокуляции устойчивая антибактериальная активность наблюдалась исключительно в присутствии функционализированных 5% ПЭИ и фагами AR9 и PB1 субстратов. Мы протестировали цитотоксичность обработанных 5% ПЭИ субстратов на эукариотических клетках NIH/3T3 в течение 72 часов с помощью МТТ-теста (рис. 10). Исследование не выявило



статистически значимых различий в жизнеспособности фибробластов (Osire, Wang et al, 2025). Таким образом, совместное использование 5% ПЭИ и бактериофагов позволяет достичь длительного воздействия в жидкой среде, что особо важно для инфицированных ран.

Рисунок 10. Анализ цитотоксичности субстратов, без обработки (SF20) и обработанных 5% ПЭИ (SF20_PEI) в течение 24, 48 и 72 часов. Контроль - полная среда (CM).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплексный подход, включающий современные биофизические методы, позволил определить характер взаимодействия бактериофагов с бактериальными пленками на разных этапах. В результате была построена молекулярная модель портового комплекса бактериофага TaPaz *A. baumannii* и выявлена роль отдельных аминокислот во взаимодействии с адаптерным белком, обеспечивающих механическую стабильность соединения «голова-хвост». В результате анализа электростатического поверхностного потенциала портала было установлено наличие положительно заряженной области в верхней части и отрицательно заряженной области в области взаимодействия с адаптерным белком. Такие структурные особенности портала обеспечивают формирование обширного интерфейса для взаимодействия с отрицательно заряженной ДНК и препятствуют преждевременному выбросу ДНК при инфекции.

Изучение ВРФИ показало, что, когда на начальном этапе инфекции phiKZ вводит свою ДНК и некоторые белки в клетку-хозяина, липидный бислой, предположительно происходящий из внутренней мембраны клетки, инкапсулирует их, образуя везикулы. Эта инкапсуляция защищает вирусные компоненты от бактериальных защитных механизмов, облегчая транскрипцию ДНК фага.

Была проведена работа по подбору условий для получения трёхмерных пористых субстратов на основе фиброина шелка. Этот биоматериал не токсичен, характеризуется высокой биосовместимостью и способностью к биодegradации. Исследовались различные биофизические параметры полученных субстратов: скорость набухания, деградация под действием ферментов, морфология пор, изменения во вторичной структуре белковых полимеров в образцах.

Полимеризация с ПЭИ привела к уменьшению размера пор и содержания β -листов в фиброине шелка. Это, видимо, выражается в менее организованной структуре фиброина и появлении новых заряженных участков, которые способствуют лучшему прикреплению фагов. Действительно, скорость диффузии бактериофагов из материала подложки составила 10^6 КОЕ/мл в течение 6 дней, что означает, что функционализированные фагами подложки могут доставлять фаг к месту инфекции и выделять его в течение длительного времени в жидких средах, что подтверждает их потенциал для предотвращения первичной инфекции.

Мы изучили клинические изоляты *P.aeruginosa* с множественной антибиотикоустойчивостью и разной способностью к образованию биоплёнок. Протестированные бактериофаги 2-х родов (Phikzvirus и Pбunavirus) класса Caudoviricetes воздействовали на биопленки с разной интенсивностью, 6 фагов разрушали более 50% биопленки, а 2 фага – более 75% биопленки. В большинстве случаев способность фага разрушать биопленки находилась в прямой зависимости от множественности инфекции (MOI). Для достижения наиболее полного разрушения биопленки требуется индивидуальный подбор

фагов для каждого штамма бактерий. Оценка способности разрушать бактериальные биопленки является дополнительным критерием при отборе фагов для персонализированной ФТ и позволяет рассматривать бактериофаги в качестве эффективных агентов для борьбы с биопленками.

Выводы

1. Крио-ЭМ с высоким разрешением (3,18 Å) показала C12-симметричную архитектуру комплекса белков в области голова-хвост фага TaPaz *A. baumannii*. Распределение электростатического поверхностного потенциала аминокислот портала выявило обширные области с отрицательным потенциалом внутри порталного канала, предположительно контролирующее положение ДНК как при наполнении головки, так и при инфекции.
2. Ранние стадии инфекции фага phiKZ характеризуются формированием РВФИ с использованием внутренней мембраны бактерии-хозяина. Везикулы защищают ДНК фага от нуклеаз бактерии до формирования «фагового ядра».
3. Эффективность фагов против биопленок *P. aeruginosa* зависит от их строения и рН среды. Рыхлые биопленки быстро разрушались бактериофагами, тогда как плотные структуры проявляли устойчивость, что связано с наличием толстого защитного слоя из экзополисахаридов (ЭПС). Фаг РВ1 проявляет наибольшую противомикробную активность при нейтральном рН.
4. Субстраты на основе фиброина шелка (ФС), функционализированные ПЭИ и бактериофагами, продемонстрировали контролируемое длительное высвобождение фага ($>10^6$ КОЕ/мл в течение 6 дней) и повышенную структурную стабильность, а анализы на цитотоксичность подтвердили биосовместимость субстратов (жизнеспособность NIH/3T3 $>95\%$), они обеспечивали устойчивое подавление бактерий в жидких средах в течение 6 дней и демонстрировали стабильное ингибирование роста бактерий в агаровых средах, значительно превосходя по эффективности нефункционализированные субстраты.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальностям 1.5.2. Биофизика, 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия (биологические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах):

1) Osire T., **Wang Y.**, Burtseva O., Sokolova O. Structural Heterogeneity and Diversity of *Bacillus subtilis* 168 Biofilms under Different Conditions // Moscow University Biological Sciences Bulletin. — 2024. — Vol. 78. — Suppl. 1. — pp. S40-S44. Импакт-фактор 0.16 (SJR) (0.3/0.2), EDN: PNPVHX.

2) Antonova D., Nichiporenko A., Sobinina M., **Wang Y.**, Vishnyakov I.E., Moiseenko A., Kurdyumova I., Chesnokov Y.M., Stepanchikova E., Bourkaltseva M., Samygina V.R., Khodorkovskii M., Sokolova O.S., Yakunina M.V. Genomic transfer via membrane vesicle: a strategy of giant phage phiKZ for early infection // Journal of Virology — 2024. — Vol. 98. — No 10. — P. e00205. Импакт-фактор 1,28 (SJR) (4.54/0.5), EDN: PGXULG.

3) **Wang Y.**, Bourkaltseva M.V., Burykin A.I., Sokolova O.S. Study of the Effect of Virulent Bacteriophages on *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Bacterial Biofilms by Scanning Electron Microscopy // Microbiology. — 2025. — Vol. 94. — No. 2. — P. 282-285. Импакт-фактор 0,3 (JCI) (0.3/0.2), EDN: UOFGCZ

4) Osire T.*, **Wang Y.***, Popova L.*, Lu G., Zhang L., Burtseva O., Arkhipova A., Parshina E.Y., Sokolova O.S. Silk fibroin-based scaffolds functionalized with Bacteriophages exhibit substantial Antimicrobial Potential // Materials Chemistry and Physics. — 2025. — Vol. 339. — P. 130650. Импакт-фактор 4.7 (JIF) (1.25/0.6), EDN: FXIELE.

Перевод текста автореферата на русский язык выполнен д.б.н., профессором
РАН Соколовой О.С.

* Авторы внесли равный вклад в данную работу.