

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ “Інститут біології та медицини”

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА

Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри

від “\_\_\_” \_\_\_\_\_ 2024р.

**ВИДІЛЕННЯ ТА ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРІОФАГІВ *KLEBSIELLA  
PNEUMONIAE***

Кваліфікаційна робота магістра

денної форми навчання

за спеціальністю “Біологія”

Мухіної Наталії Валеріївни

Науковий керівник від кафедри:

доц., к.б.н. Коротєєва Г.В.

Робота виконана на базі ТОВ «ПРОБІОКЕАР»

Під керівництвом к.б.н. Корнієнко Н.О

Оцінка захисту роботи

---

**Київ-2024 р.**

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ .....</b>	<b>4</b>
<b>ВСТУП .....</b>	<b>5</b>
<b>РОЗДІЛ 1. Фагова терапія.....</b>	<b>7</b>
1.1.Останні досягнення у фаговій терапії .....	7
1.2. Стратегії фагової терапії.....	10
1.3. Фагові коктейлі.....	10
1.4. Фагові ферменти.....	11
1.5. Фаг і фагові ферменти в поєднанні з антибіотиками .....	12
1.6. Загальна характеристика бактерії <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	13
1.7. Характеристика бактериофагів <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	17
<b>РОЗДІЛ 2. Методи дослідження бактериофагів .....</b>	<b>22</b>
2.1. Методи виявлення та тестування активності фагів .....	22
2.2. Титрування бактериофагів за допомогою двошарового агару .....	23
2.3. Методи ідентифікації фагових частинок .....	24
<b>РОЗДІЛ 3. Матеріали та методи .....</b>	<b>26</b>
3.1. Об'єкти дослідження .....	26
3.2. Досліджувані бактериофаги.....	26
3.3. Культивування бактерій.....	27

	3
<b>3.4. Виділення бактеріофагів .....</b>	<b>28</b>
<b>3.5. Визначення концентрації бактеріофагу.....</b>	<b>29</b>
<b>3.6. Виділення чистої лінії бактеріофагу з культури.....</b>	<b>29</b>
<b>3.7. Визначення концентрації чистої лінії бактеріофагу .....</b>	<b>30</b>
<b>3.8. Визначення спектру хазяїв .....</b>	<b>31</b>
<b>3.9. Структурний аналіз бактеріофагів за допомогою електронної мікроскопії .....</b>	<b>31</b>
<b>3.10. Статистична обробка результатів .....</b>	<b>34</b>
<b>РОЗДІЛ 4. Результати досліджень та обговорення.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Визначення активності бактеріофагів у досліджуваних зразках .....</b>	<b>36</b>
<b>4.2. Визначення концентрації чистих ліній бактеріофагів .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3. Дослідження спектру хазяїв виділених бактеріофагів.....</b>	<b>43</b>
<b>4.4. Результати дослідження морфології виділених бактеріофагів.....</b>	<b>45</b>
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>50</b>
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>51</b>

## **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

БТ – бактеріофагова терапія

ВАПГ – віріон-асоційовані пептидоглікангідролази

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

РКД – рандомізованих контрольованих досліджень

ТТРА – структурний білок хвостового каналця А

ФАС – Фагово-антибіотична синергія

## ВСТУП

Грамнегативна бактерія *Klebsiella pneumoniae* – поширений збудник тяжких захворювань людей і тварин, зокрема госпітальних інфекцій, що важко піддаються лікуванню. Загалом на *K. pneumoniae* припадає приблизно 11,8% усіх внутрішньолікарняних пневмоній у світі. Особливо небезпечною інфекція є для людей похилого віку та пацієнтів із ослабленою імунною системою. Останнім часом ситуація погіршується через поширення антибіотикорезистентних штамів *Klebsiella pneumoniae*. Як альтернатива антибіотикам розглядаються бактеріофаги, що специфічно уражають різні штами цієї бактерії, зокрема антибіотикорезистентні, є безпечними для людей та тварин, не впливають на корисну мікробіоту.

Вивчення та використання бактеріофагів на сьогодні має величезну важливість та актуальність. Їх терапевтичний потенціал полягає в здатності протидіяти збудникам різноманітних бактеріальних інфекцій, у тому числі тим, які є резистентними до антибіотиків. Використання бактеріофагів відкриває нові можливості для лікування хвороб, а в деяких випадках навіть збереження життя пацієнтів. Дослідження у цій сфері сприяють розширенню розуміння властивостей та ефектів бактеріофагів, а також розвитку новаторських методів їхнього застосування. В умовах поширення антибіотикорезистентності, дослідження та впровадження у клінічну практику бактеріофагів стає невід'ємною складовою сучасної медицини, що сприяє боротьбі зі складними інфекційними захворюваннями та підвищує ефективність лікування.

Військові конфлікти та кризові ситуації створюють сприятливе середовище для поширення бактеріальних інфекцій, а використання препаратів на основі бактеріофагів може стати ефективним засобом боротьби з цією загрозою. Тому для України в сучасних умовах використання бактеріофагів стає надзвичайно актуальним.

Саме тому метою нашого дослідження було виділення та вивчення бактеріофагів, специфічних до бактерій *Klebsiella pneumoniae*.

## РОЗДІЛ 1

### ФАГОВА ТЕРАПІЯ

#### 1.1.Останні досягнення у фаговій терапії

До 2050 року, інфекції, викликані бактеріями, що є стійкими до антибіотиків, стануть причиною смерті близько 10 мільйонів людей на рік [1]. Ця проблема знову надала актуальності одному з напрямків лікуванню бактеріальних інфекцій - бактеріофаговій терапії (БТ). Дослідники знову почали цікавитись перевагами, які можуть надати фаги та фагові продукти; і виходячи з цього препарати, які мають у складі бактеріофаги, або фагові агенти, мають відповідати новітнім вимогам до розробки, синтезу, виробництва, експлуатації та маркетингу лікарських препаратів, включаючи рандомізованих контрольованих досліджень (РКД). Було проведено декілька невеликих за обсягом рандомізованих контрольованих досліджень, що мали на меті оцінити безпеку та ефективність автономного застосування деяких фагових продуктів. У результаті безпека фагових препаратів була підтверджена, але їхня ефективність ( у порівнянні з антибіотиками) не була доведена [2]. Але низка нерандомізованих клінічних досліджень, проведених на території колишнього Радянського Союзу, і збільшення кількості тематичних досліджень у наш час, підтверджують терапевтичну користь фагів, особливо в поєднанні з антибіотиками.

Успішні випадки використання препаратів на основі бактеріофагів мають дві спільні риси, які відрізняють їх від багатьох рандомізованих контрольованих досліджень. По-перше, використовувані фаги були підібрані для конкретних пацієнтів, іноді попередньо адаптовані для кращого націлювання на штами бактерій, що інфікують пацієнта [3]. По друге, бактеріофаги часто використовували як додаткову допоміжну терапію в поєднанні з антибіотиками [4]. Але наявність та доступність очищених фагових продуктів ускладнюється тим, що персоналізований підхід у

лікуванні не мав великого попиту у великих фармацевтичних компаній, які займаються розробкою та виготовленням препаратів. А органи, що регулюють діяльність фармацевтичних компаній, насторожено ставляться до непромислових фагів та їх використанню. Й більше того, галузь все частіше стикається з дилемою, яка пов'язана з медичними дослідженнями. Чи слід надавати екстрену допомогу критично хворим пацієнтам, маючи тільки історичні данні, попередні результати та припущення? Чи все таки лікарі мають дочекатись результатів рандомізованих контрольованих досліджень, які є золотим стандартом досліджень та є науково точними. Цілком природньо, що багато лікарів, які працюють у цій галузі та мають відношення до використання антибіотиків та препаратів на основі бактеріофагів у своїй практиці, хочуть допомогти своїм пацієнтам й тому вважають, що комбінація рандомізованих контрольованих досліджень та персоналізованого підходу у терапії, мають використовуватись у наданні допомоги, що може врятувати чиєсь життя [5].

Специфічність фагів дозволяє їм впливати лише на патогени, відповідальні за інфекцію, що підлягає лікуванню, таким чином захищаючи місцеві бактерії, які взаємодоповнюють один одного і складають мікробіом, дослідження ролі якого у здоров'ї людини, тільки починають ґрунтовно досліджувати. Однак цей потенціал фагів частково залежить від того, якому підходу надається перевага в моделі терапевтичної розробки.

У той час, як антибіотики є хімічними речовинами, фаги – це біологічні об'єкти, які мають складні взаємовідносини з мікроорганізмами на яких мають вплив, тобто з бактеріями. Фаги можуть бути вірулентними або помірковано вірулентними в залежності від їх циклу розвитку: літичними (знищення бактерії фагом) або лізогенними (вбудовування генетичного матеріалу фага в бактеріальну ДНК, що потім дає бактерії захист до інфекції ідентичним фагом). Тому в контексті використання бактеріофагів у терапевтичних цілях актуальні лише літичні фаги [6].

Під час адсорбції бактеріофагу, він прикріплюється до бактеріальної клітини. Ця фаза є дуже специфічною, оскільки фаги, як вказують дослідження, мають змогу впливати на певний вид бактерій. А іноді приєднання відбувається лише до деяких штамів цього виду. Потім відбувається введення генетичного матеріалу в бактерію, генетичний матеріал може розмножуватись за допомогою бактеріальних ферментів, які також будуть сприяти синтезу вірусних білків та ліпідів, що необхідні для утворення капсидів. Далі відбувається лізис бактерії, й під час цього вивільнюється від 50 до 200 нових фагів, які можуть адсорбуватись на інших бактеріях й почати цей цикл заново [3].

Тому під час застосування саме терапевтичного підходу виникає необхідність виділяти активні фаги проти бактерій, які спричиняють інфекцію пацієнта, ампліфікувати їх та вводити таким чином, щоб бактеріофаги вступали в контакт зі збудником. Фаги в організмі можуть поширюватись доти, доки залишаються необхідні бактерії для ураження. Після знищення збудника, фаги, які не можуть існувати без хазяїна, гинуть.

Так як механізм дії літичних фагів є високоспецифічним, а це дозволяє враховувати важливі аспекти, наприклад, історії виникнення інфекції, та дає можливість розробити терапевтичний підхід, що враховує його особливості. Використання препаратів на основі фагів робить можливими лікування ряду випадків, що вважаються критичними. А у зв'язку з поширенням антимікробної резистентності, таких випадків у світі стає дедалі більше. Але потенціал фагової терапії, залежить від типу підходу який вибран у тому чи іншому випадку терапії.

У статті, яка була опублікована у 2011 році [5], автори, чия робота тісно пов'язана з бактеріофагами, порівнювали два підходи: перший підхід базувався на виробництві сталих коктейлів фагів (кількість видів фагів сягала близько 10), з вірогідністю того, що принаймні один з фагів, що є у коктейлі, буде ефективним проти штаму, який має пацієнт з бактеріальним захворюванням. Цей підхід бере за основу потребу в стандартизованих

комерційних продуктах. Другий, абсолютно протилежний підхід, коли пацієнт отримує кілька фагів, які активні саме до штаму, який спричинив захворювання. У висновку, хоча автори стверджують можливість співіснування обох підходів, дослідники настоюють на тому, що другий метод враховує більше особливостей бактеріофагів і їх взаємодії з бактеріями. Тому цей підхід вважається більш обґрунтованим та вимагає подальших досліджень та розвитку.

## **1.2. Стратегії фагової терапії**

Останнім часом боротьба з бактеріальною резистентністю стає все актуальнішою, а шкода, яку завдає стійка до ліків бактеріальна інфекція, стає все більш серйозною. Використання фагів для лікування стійких до ліків бактеріальних інфекцій виявляється перспективним напрямом. Результати досліджень показують, що такий підхід може бути ефективним [6, 7].

Сучасні стратегії фагової терапії включають різні методи. Серед них - застосування фагових коктейлів, розробка ферментів на основі фагів, поєднання фагів з антибіотиками, фагова інженерія та нові комбінації фагів і систем CRISPR-Cas. Остання, зокрема, спирається на регулярно повторювані інтервали в генетичній конструкції, що може покращити ефективність боротьби зі стійкістю бактерій.

## **1.3. Фагові коктейлі**

Використання фагових коктейлів як комбінації різних фагів стає все популярнішим методом для боротьби з бактеріальними інфекціями. Цей підхід дозволяє подолати обмеження вузького спектру лізису окремих фагів

та зменшити ризик розвитку резистентності бактерій до них, що збільшує антибактеріальний ефект [8].

Використання бактеріофагів для лікування інфекцій, зокрема викликаних *Staphylococcus aureus*, є поширеним у країнах колишнього Радянського Союзу [9]. Метагеномний аналіз комерційних фагових коктейлів, які використовуються для лікування шкірних та ранових інфекцій, показав велику різноманітність фагів, спрямованих проти різних бактерій, таких як *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Proteus*. Це свідчить про різноманітні стратегії створення фагових коктейлів та відсутність вірулентності [10]. Дослідження показали високу ефективність фагового коктейлю в терапії, зокрема зменшення резистентності бактерій до фагів [11,12].

У мишачих моделях ран, інфікованих *A. baumannii*, фаговий коктейль здатний ефективно знизити кількість бактерій у рані, що запобігає поширенню інфекції та зменшує захворюваність [12]. Також було доведено, що фагові коктейлі є ефективними проти *Vibrio* в аквакультурі [9], а також проти метицилін-резистентного *S. aureus* та *Clostridium difficile* [13]. Недавнє дослідження показало значне поліпшення стану 15-річного пацієнта з муковісцидозом, інфікованого *Mycobacterium abscessus*, після лікування трифаговим коктейлем після трансплантації легень [14]. Усі ці дані підтверджують доцільність та безпеку терапії фаговими коктейлями.

#### 1.4. Фагові ферменти

У життєвому циклі фагів є ряд ферментів, які заковані у їх геномах і можуть взаємодіяти з бактеріальними клітинами. Наприклад, віріон-асоційовані пептидоглікангідролази (ВАПГ) розташовані на фаговій базальній пластині і відповідають за пробивання отворів у клітинній стінці бактерій, дозволяючи фаговому генетичному матеріалу проникнути під час

адсорбції фагів. Вони виявляються стійкими та специфічними, що робить їх потенційними кандидатами для нових антибактеріальних засобів, але їх досить мало вивчено у клінічній практиці.

Крім того, фаги виробляють ендолізени, які лізують бактерії-господарі та звільняють вірусне потомство наприкінці літичного циклу. Ці лізини можуть руйнувати клітинну стінку бактерій безпосередньо, що робить їх потенційною альтернативою антибіотикам. Вони є високоспецифічними та мають ширший спектр лізису, ніж фаги, що дозволяє уникнути розвитку резистентності патогенів.

Додатково, багато бактеріофагів кодують деполімерази, які гідролізують полісахариди бактерій, такі як капсули або біоплівки. Ці ферменти можуть руйнувати захисні бар'єри патогенів і сприяти ефективному лікуванню інфекцій. Наприклад, деякі дослідження показали, що деполімерази можуть захищати тварин від різних патогенів, зокрема бета-гемолітичного *Streptococcus agalactiae* та мультирезистентного *A. baumannii*. Всі ці висновки свідчать про потенційну ефективність та перспективи використання фагових ферментів як альтернативи антибіотикам.

### **1.5. Фаг і фагові ферменти в поєднанні з антибіотиками**

Фаги вважаються перспективною альтернативою антибіотикам, але дослідження показали, що комбіноване лікування фагами та антибіотиками може бути ефективнішим, ніж лікування кожним засобом окремо. Фагово-антибіотична синергія (ФАС) виникла зі спостереження, що навіть невеликі дози деяких антибіотиків можуть стимулювати розмноження літичних бактеріофагів, що призводить до швидкого руйнування бактеріальних клітин і поширення фагів-потомків. Комбінація деполімераз, продуктів фагового лізису, з антибіотиками, такими як ципрофлоксацин, демонструє ефективність у руйнуванні біоплівок, захисного шару, який допомагає

бактеріям уникнути дії антибіотиків. Спільне лікування ванкомицином та фагами для лікування стійких до ванкомицину штамів *Enterococcus faecalis* показало більшу ефективність, ніж лікування кожним засобом окремо. Комбінація фагів і антибіотиків може не лише зміцнити антибактеріальну дію, але й зменшити ризик розвитку резистентності бактерій. Наприклад, комбінація фагового коктейлю та апігеніну показала кращий лікувальний ефект, ніж монотерапія кожним засобом окремо. Варто відзначити, що деякі антибіотики можуть мати антагоністичний вплив на фагову інфекцію, і що концентрація антибіотиків та порядок їх застосування також можуть впливати на синергійний ефект [15].

Отже, використання фагів у терапії бактеріальних інфекцій, можна зазначити, що ця нова технологія виявляє значний потенціал у боротьбі з розповсюдженням лікарняних штамів бактерій, особливо тих, які набули резистентності до стандартних антибіотиків. Використання фагів може відкрити нові можливості для індивідуалізованого лікування, забезпечуючи ефективну та безпечну альтернативу традиційним антибіотикам. Однак, перед широким впровадженням фаготерапії, необхідно провести додаткові дослідження з метою встановлення її ефективності, безпеки та можливих побічних ефектів.

### **1.6. Загальна характеристика бактерії *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella pneumoniae* – це факультативно-анаеробний вид бактерій, що належить до родини *Enterobacteriaceae*. У людей, у складі нормобіоти, вона зустрічається в шлунково-кишковому тракті та в дихальних шляхах, також присутня на шкірі. Це умовно-патогенна бактерія, який здатний викликати достатньо широкий спектр як позалікарняних інфекцій, так і внутрішньолікарняних; це може бути інфекції дихальних шляхів, інфекції сечовивідних шляхів, а також інфекції ран та м'яких тканин [7]. В останні

роки, бактерія *Kl. pneumoniae* стає однією з головних причин розвитку внутрішньолікарняних інфекцій у світі, при цьому смертність серед людей з ослабленим імунітетом від бактеріальної інфекції, що викликана даною бактерією, зростає [8].

Штами бактерій роду *Kl. pneumoniae* часто проявляють стійкість до антибіотиків групи бета-лактамів розширеного спектру дії, яскравим прикладом цієї групи є пеніциліни та цефалоспорини. Але при цьому, штамми, що продукують бета-лактамазу розширеного спектру дії, яка допомагає їм залишатись стійкими до антибіотиків бета-лактамів, все ще залишаються чутливими до класу антибіотиків карбапенемів, який включає в себе такі антибіотики, як меропенем та імipенем. Але існують вже дані, про зростання кількості випадків ураження штамми, що є резистентними до карбопенемів [9].

Значна кількість наукових досліджень, спрямованих на ідентифікацію факторів ризику, які можуть призвести до зараження бактерією *Kl. pneumoniae*, виявила, що передня терапія на основі антибіотиків є суттєвим чинником для майбутнього можливого зараження цією бактерією. Зокрема, використання карбапенемів, фторхінолонів, аміноглікозидів та глікопептидів для лікування інфекцій, спричинених *Kl. pneumoniae*, яка продукує карбапенемазу, а також використання цефалоспоринів при лікуванні інфекцій, спричинених бактеріями, що продукують розширений спектр бета-лактамаз, є важливими аспектами.

Наявність хронічних захворювань також є фактором ризику розвитку інфекції, що викликана *Kl. pneumoniae*. Деякі вчені [12], встановили, що хронічні захворювання печінки та рак є одними з найважливіших факторів розвитку бактеріємії *Kl. pneumoniae*; є дослідження які пролили світло на зв'язок між цукровим діабетом та інвазивною інфекцією, що спричинена *Kl. pneumoniae*, через подальший недосконалий контроль над глікемією та стійкості бактерії до фагоцитозу [13].

Існує також твердження, що найпоширенішим фактором ризику ураження даною бактерією - це тривалість перебування пацієнта в лікарні. Дійсно, деякі дослідники виявили кореляцію між тривалістю перебування пацієнта у закладі охорони здоров'я (лікарні в даному випадку) та ймовірністю зараження *Kl. pneumoniae* [14]. Це пов'язують з тим, що при тривалому знаходженні хворого в лікарні, на нього збільшується вплив патогенів, що широко поширені якраз з медичною допомогою, й чим більше час перебування пацієнта у закладі - тим більший вплив та ймовірність заразитись.

Хоча за класифікацією бактерія роду *Kl. pneumoniae* відноситься до умовно-патогенних бактерій, вона має у своїй будові достатньо факторів вірулентності, які дозволяють їй не просто інфікувати хазяїна, а й чинити опір його імунній відповіді, спричиняючи при цьому важке захворювання. Вважається, що факторами вірулентності *Kl. pneumoniae* є: капсула, фімбрії, сидерофори та ліпополісахариди.

Капсула являє собою позаклітинний матрикс, що складається з полісахаридів (К-антигенів), які є специфічними для кожного штаму; останні в свою чергу оточують бактерію, утворюючи при цьому достатньо волокнисту й товсту структуру. Так як ці полісахариди являються специфічними для кожного штаму *Kl. pneumoniae*, саме вони використовуються для ідентифікації певного штаму під час серологічного дослідження [15]. За період різноманітних досліджень, було визначено, що капсула виконує захисну функцію бактерії; вона захищає бактерію від фагоцитуючих імунних білків, зменшуючи при цьому рівень протизапальних цитокінів та блокуючи лізис, що опосередкований системою компліменту [16]. Було проведено дослідження, під час якого відбувалось зараження мишей мутантними штамами бактерій (штамами бактерій, що не мають капсули у своїй будові); це довело, що вірулентність *Kl. pneumoniae* зменшується за відсутності капсули у бактерій [17], і навпаки підвищується

у гіпервірулентних штамів, й саме ці штами виробляють більше матеріалу, який необхідний для формування капсули [18].

Ліпополісахариди складаються з олігосахаридного ядра, антигену O та ліпиду A [19]. Їх основна роль при бактеріальній інфекції полягає у захисті бактерій від лізису, що опосередкований комплементом. Цей процес являє собою зв'язування комплементу C3b з бактеріальною клітинною стінкою, що в процесі запобігає утворенню комплексу C5b-9 — мембранно-атакуючого комплексу. Цей процес здійснюється за участю антигену-O, й якщо цей антиген відсутній — це робить *Kl. pneumoniae* більш чутливою до бактеріального лізису [20].

Фімбрії — мембранні-адгезивні виступи, що беруть участь в адгезії бактеріальної клітини до поверхонь клітин, тим самим полегшуючи її інвазію. В будові бактерії *Kl. pneumoniae* спостерігається два основних типу фімбрій: тип 1 — це ниткоподібні структури, та тип 3 — структури, що мають спіралеподібну форму [21]. Слід зазначити, що рівень експресії кожного типу пілій залежить від середовища в якому розвивається бактерія, наприклад бактерії з фімбріями першого типу виявляються в сечовивідних шляхах й сечовому міхурі, але ніяк не в шлунково-кишковому тракті [22].

Ну і нарешті сидерофори необхідні бактерії для подальшого розвитку та розмноження. Так як в організмі ссавців недостатня кількість вільного заліза, бактерія має експресувати сидерофори. Це молекули, що на багато більше споріднені з залізом, ніж молекули, що відповідають за транспорт заліза у ссавців, наприклад трансферини, а саме використання сидерофорів дозволяє бактерії отримувати більше заліза для подальшого росту та інвазії. Одним з основних сидерофорів *Kl. pneumoniae* є ентеробактин - він експресується у більшості патогенних штамів. Також доведено, що гіпервірулентні штами *Kl. pneumoniae* можуть еспресувати одразу декілька видів сидерофорів, наприклад сальмохелін, ієрсиніабактин тощо [23].

В залежності від клінічних проявів інфекції, механізмів резистентності до антибіотиків та варіацій факторів вірулентності штами *Kl. pneumoniae*

мають різноманітні геноми, що дає можливість створювати різноманіття фенотипічних проявів. Вже доведено, що вид *Kl. pneumoniae* має чотири окремі філогрупи: КрI, КрII-А, КрII-В та КрIII, які в свою чергу розділились на 3 різні види: *K. Pneumoniae* (КрI), *Klebsiella quasipneumoniae* (КрII) і *Klebsiella variicola* (КрIII) [24]. У повному секвенуванні генома та його дослідженні, вчені Holt et al [23], зазначили що філогрупа КрI частіше викликає позалікарняні інфекції; саме ця група активно експресує сидерофори та гени *gtrA* та *gmA2*, які регулюють продукцію бактеріальної капсули. Також при дослідженні геному бактерії, підтвердилась наявність генів, що кодують продукцію бета-лактамаз. Ці гени входять до складу хромосомних ферментів усіх філогенетичних груп, в той час як набуті гени, що відповідають за стійкість до антибіотиків частіше можна виявити в ізолятах КрI та КрII, що не завдають шкоди організму, в той час як в геномі інфекційних ізолятів такі гени зустрічаються рідше. Це свідчить про роль резистентності до антибіотиків в розвитку інфекцій, що виникають саме під час перебування у лікарнях й викликані *Kl. pneumoniae*, які є коменсальними по відношенню до нашого організму. На противагу цьому, важкі випадки позалікарняних інфекцій спричинені штамми бактерій, які мають різні фактори вірулентності, наприклад високим утворенням капсули або наявністю сидерофорів.

### **1.7. Характеристика бактерофагів *Klebsiella pneumoniae***

Бактеріофаги - це представники царства *Vira* (вірусів), які інфікують бактерії й зазвичай знаходяться в тому ж самому середовищі, що і їх бактерія. Вперше, фаги були виявлені у 1915 році Вільямом Твортом, завдяки утворенню прозорих зон на чашах з бактеріальними культурами. Вже пізніше, в 1917 році Фелікс д'Ерель ввів термін "бактеріофаг", підтвердивши відкриття свого попередника [25]. До відкриття антибактеріальних

препаратів, фаги вважались головними ліками від інфекцій, що спричинені бактеріальним агентом, але після відкриття пеніциліну, терапевтичне використання фагів припинили досліджувати, але продовжували використовувати як модель для досліджень у сфері молекулярної біології [26].

Фаги, що уражають *K. pneumoniae*, були ізольовані з різних місць оточуючого середовища по всьому світу, в ці місця входять: каналізаційні стоки, стічні води, зі зразків морської води, кишківника людини тощо. Ці фаги у результаті досліджень, віднесли до чотирьох родин ряду *Caudoviricetes*. Цей порядок має спільну будову й описуються як фаги, що мають хвіст з ікосаедричними головками, їх генетичний матеріал міститься у дволанцюговій ДНК: *Herelleviridae* мають у своїй будові довгі, прямі та скоротливі хвости; *Autographiviridae* має короткі хвости, які не можуть скорочуватись; *Drexelviridae* мають хвости, що не скорочуються, а також хвости довгі й гнучкі, а родина вірусів *Straboviridae* характеризуються як фаги, що мають у своїй будові хвіст, що скорочуються, на кожному з хвостових шипів ( а їх всього шість) ще знаходяться по чотири додаткові шипи [27].

При порівнянні геномів літичних фагів *K. pneumoniae* виявило кілька цікавих як подібних елементів, так і відмінних елементів. У деяких фагів *K. pneumoniae*, які були нещодавно відкриті, спостерігалась експресія полісахаридних деполімераз [28], й саме ці ферменти приймають участь у деградації капсули, що вистилає зовнішню бактеріальну оболонку. Є припущення, що саме руйнування цієї капсули за допомогою фагової полісахаридної діполімерази підвищує чутливість бактерії до антибіотиків та фагової інфекції [29]. Більше цього, ефект від фагової полісахаридної діполімерази можна спостерігати у лабораторних умовах. Цей ефект характеризується утворенням прозорого «ореолу» навколо зони лізису на чашках з культурами бактерій, що були уражені частками фагів. Цей ефект є

основою для важливого експериментального методу, на якому базується такі аспекти характеристики фагів, як спектр хазяїв та їх специфічність [30].

Тим часом відмінності, що спостерігаються між родинами, також є дуже важливими для характеристики фагів. Таке дослідження, як рестрикційний аналіз, під час якого відбувається розщеплення фагового генетичного матеріалу за допомогою бактеріальних ферментів рестрикції, може допомогти оцінити розмір геному бактеріофагів. Використання трансмісійної електронної мікроскопії допомагає виявити морфологічні особливості, наприклад, структура хвоста фагу та тип симетрії головки фагу [31].

Щоб фаги мали можливість інфікувати, вони мають для початку зв'язатись з бактеріальною клітиною, яка буде до них сприятливою. Для цього процесу бактеріофагам для початку треба розпізнати та зв'язатись зі специфічними рецептори на поверхні клітини-господаря. Ця взаємодія дозволяє утворити зв'язок між структурою фага та рецептором клітини, що в подальшому сприяє розпізнаванню сприйнятливої бактерії та підготовки до вбудовування генетичної інформації бактеріофага в бактерію. Процес адсорбції спроможний відбуватись через будь-яку зовнішню структуру, в залежності від будови самої бактерії-господаря та бактеріофага, наприклад, у бактерії *Kl. pneumoniae*, капсули бактерії можуть включати у свою будову: білки зовнішньої мембрани, фрагменти цукрів, пілі та ліпополісахариди [32]. Саме особливості процесу адсорбції визначають діапазон господаря, тобто коло господарів, яких може уразити той чи інший бактеріофаг. Наприклад, D'Andrea та ін. [33] у своєму дослідженні продемонстрували, що бактеріофаг φVO1E, який нещодавно був відкрит їхньою дослідницькою групою, розпізнає специфічний капсульний полісахарид, що асоціювався зі штамми другої лінії *Kl. pneumoniae*, але до штамів, які належать до першої лінії, бактеріофаг φVO1E не є близькоспорідним.

Літичні фаги з широким спектром дії ( на рівні роду чи виду) у контексті терапевтичного застосування вважаються більш корисними, ніж бактеріофаги, що мають вузький спектр бактерій, які вони можуть уражати(

наприклад на рівні штаму). Справа у тому, що бактеріофаги з вузьким спектром дії не можуть бути використані для профілактичної або прогностичної терапії, бо вони залежать від інфекційних агентів, що були виділені та про ідентифіковані до початку лікування пацієнта. Ї слід зазначити, що у порівнянні з антибіотики мають ширший спектр дії, ніж бактеріофаги, які мають широкий спектр дії [34]. Саме тому розширення спектру дії бактеріофагів включало в себе як і розробку спеціальних фагових коктейлів для лікування, так і гібридизацію хвостових структур бактеріофага для штучного розширення спектру дії [35].

Коли необхідно вибрати бактеріофаг для використання в терапевтичному лікуванні проти бактеріального агента, необхідно враховувати декілька аспектів. По-перше, це не сама ефективність бактеріофагів проти певного виду/роду/штаму бактерій. Ми визначаємо ці характеристики фага в *in-vitro*, використовуючи зону лізису, що включає їх кількість і розміри, у порівнянні з колонією бактерій. Зона лізису утворюється характерними великими прозорими бляшками у точці внесення бактеріофагу [36]. По-друге, треба враховувати те, що літичні бактеріофаги знищують бактерії швидше та ефективніше, завдяки характеру свого життєвого циклу, тому саме на них треба робити упор у дослідженнях.

Одна з галузей досліджень бактеріофагів, що спрямована на пошук ліків від бактеріальних агентів – це можливість використовувати специфічні продукти генів фагів для боротьби з інфекціями, замість самих фагів. Однієї з переваг такого терапевтичного підходу полягає в тому, що отримати схвалення рекомбінантних білкових продуктів швидше й легше, ніж при застосуванні бактеріофага. Дійсно, використання даних рекомбінантних продуктів, що були отримані за допомогою бактеріофагів, є доцільним як проти самої бактерії, що викликала бактеріальне захворювання, так і використання як частини комбінованого підходу, щоб доповнити або посилити антибактеріальні схеми лікування, що вже існують.

У життєвому циклі бактеріофагів є ряд білків, які використовуються фагом для успішної адсорбції, інфікування, реплікації та вивільнення бактеріофагів наступного покоління. Ці білки потенційно можуть використати як антибактеріальні агенти. Полісахаридні деполімерази й пептидоглікан гідролаза зазвичай знаходяться у хвостовому шипі бактеріофагу та беруть участь в інфікуванні бактерії після адсорбції [37].

Капсула бактерії *Kl. pneumoniae* – важливий фактор вірулентності, що дозволяє бактерії уникати лізису й фагоцитозу. Тому саме вона є основною мішенню для рекомбінантних білків, що були виділені з бактеріофагів, й сьогодні широко вивчаються. Нещодавно було визначено, що структурний білок хвостового каналця А (ТТРА), що входить до складу хвостового відростку фагу КР32, може полімеризувати полісахариди. ТТРА піддали клонуванню та експресії в *E.coli*, наступним етапом була перевірка активності даного ферменту за допомогою точкового нанесення його на культуру *Kl. pneumoniae* РСМ2713. У результаті дослідження, було виявлено, що на місцях, на які був нанесений фермент, спостерігалась напівпрозора зона інгібування росту бактерій [38]. В подальшому було проведено мікроскопічний аналіз ділянок. Аналіз продемонстрував, що клітини бактерій, які були оброблені ТТРА, не мали у своїй будові капсул, на відміну від клітин, які не були оброблені ферментом. Під час схожого дослідження, Паном та іншими[39], було ідентифіковано дев'ять полісахаридних ферментів, що експресуються бактеріофагом ФК64-1, кожен з яких був активний проти капсул різних *Kl. pneumoniae*. Результати цих досліджень підтверджують роль ферментів бактеріофагу, у випадку цих досліджень це полісахаридрозщеплюючі ферменти (гідролази), у визначенні специфічності фага.

## РОЗДІЛ 2

### МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ БАКТЕРІОФАГІВ

#### 2.1. Методи виявлення та тестування активності фагів

Саме наявність інформації про функціонування бактеріофага та вибір коректного бактеріофага для лікування бактеріальної інфекції є головними ключами для досягнення успішного результату при терапевтичному використанні бактеріофагу. Для цього необхідно використовувати відповідні методи виділення бактеріофагів, їх виявлення, накопичення тощо [40].

Для виділення потенційних нових бактеріофагів використовується метод “збагачення фагів”. Ідея розробки цього методу належить Виноградському [41], й після цього метод ще декілька разів покращувався й адаптувався, й лише у 2009 році оновлена версія протоколу була опублікована [42]. Для виявлення бактеріофагів використовуються культури бактерій різних видів, дуже часто при накопиченні та збагаченні використовують декілька культур (велика бактеріальна панель), що сприяє ізоляції полівалентних фагів з середовища [43]. Використання бактеріальної панелі в процесі ізоляції бактеріофагів збільшує вірогідність виявлення фагів різного спектру дії у зразку, який використовують для дослідження, а також, що не менш важливо, може сприяти підвищенню титру виявлених бактеріофагів, що підвищує вірогідність їх виявлення. Існує декілька варіантів створення бактеріальної панелі: гомогенна бактеріальна панель - є найкращим варіантом, він полягає у використанні в збагаченні лише бактерій певного виду. Але також використовують гетерогенні бактеріальні панелі, тобто використовують бактерії декількох видів. Використання певних видів бактерій залежить від наукового інтересу дослідження: в бактеріальну панель можуть бути включені бактерії, що чий властивості повністю вивчені. Тобто кожна характеристика бактерії починаючи від можливого середовища

існування закінчуючи характеристикою генома має бути відома. Або панель будується навколо конкретної особливості бактерій, наприклад стійкість до антибіотиків, тоді повний перелік характеристик не обов'язковий [44]. Список бактерій, що зазвичай входять до складу бактеріальної панелі, складається зі штамів, що вже добре адаптовані й схвалені для використання для розмноження та виробництва бактеріофагів.

## 2.2. Титрування бактеріофагів за допомогою двошарового агару

Метод титрування бактеріофагів за допомогою двошарового агару дозволяє локалізувати взаємодію бактеріофаг-бактерія у закритому середовищі, наприклад чашка Петрі, що містить два шари агару. Перший шар агару (тобто шар, що є нижнім) готується на основі поживного середовища, що відіграє важливу роль у живленні та рості бактерії, що використовується у дослідженні (наприклад при використанні *Escherichia coli* в експериментах використовують будь який бульйон до складу якого входить глюкоза, хлорид натрію, сульфат магнію, гідролізат казеїну), й містить 1-1,5% агару. Верхній шар агару - за складом це те саме поживне середовище, що й використовується при виготовленні нижнього шару агару, але воно має меншу концентрацію агару від 0,4% до 0,6% [45]. Верхній шар агару змішують з бактеріями й виливають на нижній шар, утворюючи газон, й з верхнього шару бактерії осідають на нижній шляхом дифузії. Варіанти додання зразку, що потенційно містить бактеріофаг, може бути різноманітним: можна додавати його поверх другого шару, можна змішувати безпосередньо з бактеріями та рідким агаром. Потім чашки з середовищем необхідно інкубувати при умовах, що є оптимальними для бактерії. Якщо після інкубації бактеріофаги виявили негативний вплив на ріст бактерій, тоді на чашці з'являються прозорі плями або наліт, у яких в міститься лізовані бактерії та частинки фагів [46].

Концентрацію інфекційного бактеріофага (його титр) в зразку можна визначити за допомогою нанесення серійних розведень зразка на середовище з бактеріями. Значення концентрації вимірюється в бляшкоутворюючих одиницях. Метод з використанням двошарового агару має свої переваги через його простоту та одночасну ефективність й може бути проведений в будь-якій лабораторії з мінімальними вкладеннями фінансів, а також є універсальним для багатьох бактеріофагів. Але з іншого боку цей метод потребує додаткову оптимізацію для кожної досліджуваної пари бактеріофаг-бактерія, бо ці пари можуть мати достатньо високу варіабельність, якщо характеристика їх взаємодії є недостатньо стандартизовані. Стандартизація є важливим процесом при роботі з бактеріями, що є клінічно важливими, оскільки в даному випадку дуже важливо виявити бактеріофаг, який інфікує бактерію за короткий термін часу. Й слід враховувати, що під час досліджень бактерії можуть мутувати та ставати резистентними до обраного фагу. Крім того, не можна виключати людський фактор з потенційного впливу на результати, бо помилки при піпетуванні, упередженість дослідника, забруднення іншими бактеріями та фагами, зміна параметрів росту бактерії - можуть мати значний вплив на результати дослідження [47].

### **2.3 Методи ідентифікації фагових частинок**

Трансмійна електронна мікроскопія є важливим методом для отримання зображення об'єкта за допомогою електронного мікроскопа. Мікроскоп використовує промінь електронів, за допомогою якого можна отримати зображення вищої роздільної здатності ніж при використанні звичайного традиційного мікроскопу. Цю технологію використовують для кількісного визначення вірусних частинок, хоча використовуючи цю

технологію необхідно враховувати, що для надійності результатів зразок має бути висококонцентрованим ( приблизно  $10^6$  частинок/мл) [48].

#### *Кількісне визначення бактеріофагів в комплексних зразках*

Виявлення та підрахунок бактеріофагів у складних зразках, таких як харчові продукти, клінічні зразки, фекалії - вимагають більш ретельного підходу, бо хімічні сполуки, що містяться у зразках, можуть суттєво вплинути на результати [49]. При проведенні кількісного визначення загальної кількості бактеріофагів, основною проблемою полягає видалення інгібіторів розвитку фагів. Зазвичай, для видалення великих частинок використовують центрифугування й подальше фільтрування через фільтр з політетрафторетиленової мембрани, розмір пор якої складає 0.22-0.45 мкм, після чого вірусні частки, бактеріофаги, концентруються у рідкій фракції. Концентрування відбувається за допомогою поліетиленгліколя для отримання концентрату вірусної суспензії, яка в подальшому буде використана для підрахунку [50].

Отже, загальна тенденція свідчить про потенційну обіцяність фагової терапії як ефективного і безпечного методу лікування стійких до антибіотиків бактеріальних інфекцій, зокрема, інфекцій, спричинених бактерією *Kl. pneumoniae*. Дослідження підтверджують, що фаги, спрямовані проти *Kl. pneumoniae*, можуть бути ефективними у руйнуванні біоплівки та клітин цієї бактерії, що відкриває шлях до розвитку нових методів лікування цієї небезпечної інфекції. Дослідження також підкреслюють значущість пошуку нових фагів та вдосконалення комбінованих терапевтичних режимів для подальшого успішного контролю і лікування інфекцій, які можуть стати резистентними до існуючих антибіотиків.

## РОЗДІЛ 3

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 3.1. Об'єкти дослідження

У дослідженні ми використовували бактерії роду *Klebsiella pneumoniae*, які були надані ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України». Ми отримали 4 зразки з бактеріями, кожен з яких був позначений відповідним номером: 1303, 1324, 1298 та 1372 відповідно. Для культивування бактерії ми використовували триптон-соєвий агар, який забезпечує оптимальні умови для розвитку досліджуваної бактерії й дозволяє формувати колонії та продукувати необхідні речовини для їх життєдіяльності.

#### 3.2. Досліджувані бактеріофаги

На наявність бактеріофагів, що мають дію на вибрані нами культури бактерій, ми мали на меті перевірити два зразки: зразок №1 - зразок стічної води; та зразок М.

Так як в наукових джерелах присутня інформація, що виділити зразки з потенційно наявними бактеріофагами можливо з будь-якого середовища, найбільш простим методом було дослідити зразки води зі стічної води. Також у нашому дослідженні був присутній експериментальний зразок М, який був надан лабораторією “НеоПробіоКеар” для дослідження дії цього зразку на бактерії з метою виявлення в ньому бактеріофагів. Зразок М - зразок стічної води, який був відібраний лабораторією та не був досліджень.

### 3.3. Культивування бактерій

Як було зазначено раніше, для культивування бактерій ми використовували соєво-казеїновий агар, який також відомий як триптонно-соєвий агар.

Триптонно соєвий агар, який також відомий як триптоказеїновий агар або соєвий агар з триптоказою, середовище для дослідження бактеріальних культур, яку використовують для росту, як аеробних, так й анаеробних бактерій. Середовище є універсальним, неселективним й забезпечує оптимальну кількість поживних речовин для росту й розвитку різних мікроорганізмів. Зазвичай даний тип агару використовуються для загального посіву культур, виділення чистих культур, тестування ефективності антимікробних препаратів, підрахунок колоній, збереження культур тощо. Це середовище можна використовувати як з агаром, так й без нього, як бульйон. Триптонно-соєвий агар має ферментативне розщеплення казеїну та соєвого шроту, саме це забезпечує наявність амінокислот та інших азотистих основ, вітамінів та мінералів; джерелом вуглеводів стає глюкоза; саме ці складові роблять агар живильним середовищем, а хлорид натрію підтримує осмотичний тиск. Також до триптон-соєвого агару можна додавати різноманітні складники, що покращують його властивості по відношенню до різних родів бактерій. Наприклад, якщо до данного агару додати сіль, він може бути корисним для визначення галотолерантності мікроорганізмів.

Для приготування середовища нам необхідно було розчинити 40 г середовища в одному літрі дистильованої води. Наступним кроком, ми нагріли суміш, ретельно перемішуючи, згодом автоклаували при температурі 121 °С, при тиску 1,1 бар протягом 15 хвилин. Після завершення автоклаування, ми охолоджували середовище до 45-50 °С, це відбувалось

приблизно протягом 15 хвилин. Останнім кроком, ми розлили середовище в стерильні чашки Петрі, перед цим ми його добре перемішали, щоб бульбашки повітря, якщо такі є у середовищі, зникли. Після цього чашки з середовищем перемістили в холодильник з температурою 4°C. Після застигання середовища ми нанесли матеріал на поверхню поживного середовища, починаючи з краю чашки. Для нанесення ми використали бактеріальну петлю, яку попередньо ми прокалили за допомогою полум'я для знезараження, потім ми її охолодили, торкаючи стінки чашки. Петлю ми охолодили для того, щоб гарячою петлею не пошкодити матеріал, що має бактерії, далі ми обережними круговими рухами наносимо матеріал, тримаючи чашку напівзакритою, а потім розподіляємо матеріал рівномірно по поверхні середовища. Чашки Петрі з матеріалом культивували при анаеробних умовах при температурі 37°C впродовж 48 годин до появи видимого росту культури.

#### **3.4. Виділення бактеріофагів**

Зразки стічної води в об'ємі 100 мл відбирали та переносили у колби, що містили 30 мл рідкого триптонно-соєвого бульйону. Далі колби поміщали в термостат для подальшої інкубації протягом 3 днів при температурі 37°C. Колби протягом 3 днів, кожен день струшували для поліпшення для збагачення повітрям інкубованої суміші. Після закінчення періоду інкубації, ми розливали суміш в центрифужні пробірки та центрифугували протягом 20 хвилин зі швидкістю 2500 об/хв. Активність бактеріофагів визначали за допомогою візуальної оцінки чашки Петрі на наявність негативних колоній.

### **3.5. Визначення концентрації бактеріофагу**

Для визначення концентрації бактеріофагу ми використовували метод Грація й виконували наступні кроки. Спочатку вливали перший шар агару в чашки Петрі. Після цієї процедури ми переміщали чашки з середовищем в термостат, який створює оптимальні умови для росту мікроорганізмів.

Наступним кроком було приготування рідкого поживного середовища, з концентрацією агару 0.7%, який потім розливали у пробірки по 3-4 мл в кожній.

### **3.6. Виділення чистої лінії бактеріофагу з культури**

Після визначення титру початкової суміші бактеріофагів, ми відібрали певну кількість колоній, які утворилися зі зразка стічної води для подальшого дослідження з кожного поживного середовища. З поживного середовища, на якому культивували бактерії під номером 1303, ми відібрали одну колонію та перемістили у мікропробірку та позначили фаг номером 4. Потім до вмісту пробірки додаємо 1 мл фізіологічного розчину та добре ресуспендували. Наступним кроком було відбір матеріалу, що містить бактеріофаг з поживного середовища, що містить культуру під номером 1324, та проводимо ту саму маніпуляцію - відбираємо матеріал з 3 колоній( так як вони є невеликого розміру), додаємо 1 мл фізіологічного розчину, добре ресуспендували та позначаємо дану пробірку як бактеріофаг під номером 3.

### 3.7. Визначення концентрації чистої лінії бактеріофагу

Для визначення концентрації чистих ліній бактеріофагів, які ми відібрали раніше, ми використали метод SPOT-тесту. Для цього ми бактеріальну культуру розводили у поживному середовищі з концентрацією агару 0.5%, для того щоб розчин середовища з бактеріями було рідким для рівномірного розповсюдження бактерій на чашці Петрі. На чашках Петрі підготували те ж саме середовище, але з концентрацією агару 1.5%, дана концентрація була вибрана для того, щоб середовище швидше затверділо. Наступним кроком, ми виливали рівномірно рідке поживне середовище, яке містило бактерії, на тверде середовище, що вже знаходиться на чашках. Після затвердіння верхнього шару ми розділили поверхню чашки на 9 секторів, в кожному з яких ми внесли певне розведення бактеріофагів.

Для підготування розведення бактеріофагів ми використовували ізотонічний розчин хлориду натрію. Для цього ми використовували наступні розведення: для концентрації  $10^{-1}$  ми брали 100 мкл речовини з бактеріофагом та додавали 900 мкл фізіологічного розчину, суміш добре вортексували та підписували мікропробірку. Для концентрації  $10^{-2}$  ми використовували 100 мкл рідини попереднього розведення та додавали 900 мкл фізіологічного розчину. Проводили цю процедуру декілька разів до створення розведення  $10^{-9}$  включно, кожного разу беручи 100 мкл з попереднього розведення. Після того, як ми зробили розчини усіх розведень, ми приступили до виконання самого тесту: ми взяли розведення і концентрації  $10^{-1}$  та відбираємо з нього 10 мкл за допомогою смплера, вносимо ці 10 мкл на ділянку на чашці, що позначена цифрою один. Дуже важливо при цьому не торкатись наконечником смплера до поверхні агару, бо це може перешкоджати утворенню газону й сприйматись як хибно-позитивний результат. Такі ж самі процедури ми проводимо з кожним розведенням. Далі, ми поміщаємо чашки Петрі в оптимальні умови інкубації - температури  $37^{\circ}\text{C}$  та проводимо її до появи видимого бактеріального росту

( протягом 24 годин). Цей процес повторювали з усіма зразками бактеріофагу, зберігаючи однаковий принцип і процедуру для кожного зразка, кожного розведення. Отже, ми розробили SPOT-тест для визначення концентрації чистої культури бактеріофагів., використовуючи при цьому розведені у різних концентраціях зразки бактеріофагів.

### **3.8. Визначення спектру хазяїв**

Після визначення концентрації бактеріофагів, наступним кроком була перевірки дії робочих розведень розчинів бактеріофагів на різних культурах бактерій, тобто культурах, які вже були використані у нашому дослідженні. Для цього ми посіяли кожен культуру бактерій на окрему чашку Петрі. Дно кожної чашки ми поділили на 4 сектора та відмітили кожен сектор цифрою: 1,2,3,4. Потім на кожен з 4 секторів, було нанесено по 15 мкл розчину, що містив бактеріофаг. Повторювали цю маніпуляцію з кожною культурою бактерій. Далі всі чашки інкубували в належних умовах, тобто у термостаті, що має температуру 37°C, протягом 24 годин.

Цей дослід дозволив нам визначити спектр дії бактеріофагів та оцінити специфічність кожного бактеріофагу.

### **3.9. Структурний аналіз бактеріофагів за допомогою електронної мікроскопії**

Для подальшого розуміння вектору майбутніх досліджень, ми вирішили дослідити морфологію виділених бактеріофагів. Для цього ми використовували електронну мікроскопію.

Візуалізація досліджуваних зразків за допомогою електронної мікроскопії, зокрема підготовка зразка до візуалізації, є складним процесом

через взаємодію електронів із конкретними речовинами. У нашому дослідженні ми застосовуємо метод трансмісійної електронної мікроскопії, де пучки електронів проходять через дуже тонкий зразок і взаємодіють з ним, формуючи зображення.

Для проведення цього дослідження ми використовували стандартні методи контрастування. У нашому випадку це негативний метод контрастування. Ми розпочали процес, створюючи сітки з міді, на які наносили наші зразки, за допомогою розчину формвару. Предметне скельце занурювали в ємність, в якій знаходився розчин формвару. Для приготування плівок використовували розчин формвару (поліфінілформальдегіду) з концентрацією 0.2%. В якості розчинника використовували хлороформ. Готувати розчин протягом одного дня до використання та зберігали його у посуді з притертою кришкою в темному місці. Після цього ми витягнули його і дали формвару, який залишився на поверхні скельця, висохнути. Після висихання плівок, ми обережно зрізали їх зі скельця за допомогою скальпелю, але робили це так, щоб плівки залишались на скельцях, просто були роз'єднані з їх поверхнею. Для цього ми обережно погрузали склянку з розчином формвару у воду так, щоб плівки відокремилися від її поверхні й плавали на воді. Після цього, на місце, де знаходилися плівки, ми поклали спеціальні мідні сіточки. Щоб не пошкодити конструкцію, ми видаляли її з води за допомогою фільтрувального паперу, а потім дозволяли сіточкам висохнути. Для запобігання забрудненню або пошкодженню плівок, ми зберігали їх у чашці Петрі.

Після підготування сіток, ми почали вже безпосередню підготовку самих зразків для мікроскопії. Варто помітити, що для виконання дослідження морфології за допомогою електронного мікроскопу, є необхідність, щоб концентрація фагових частинок у розчині була приблизно  $10^6$ - $10^7$  на 1 мл. У нашому дослідженні ми використали такий метод нанесення зразку на плівку, як метод краплі. Для цього ми брали сіточки й наносили краплю нашої досліджуваної речовини. Ми використовуємо

маленький об'єм речовини, щоб запобігти накладанню частинок одна на одну. Через 1 хвилину, за яку відбувається адсорбція зразку на плівку, на зразок нанесли розчин уранілацетату для контрастування. Надлишок рідини ми забираємо за допомогою фільтрувального паперу. Готові сіточки з нанесеними на них зразками, ми переміщуємо у сухі й чисті чашки Петрі. Приблизно через 15-30 хвилин зразки можуть бути використані для електронної мікроскопії. Далі ми провели контрастування зразків, застосовуючи метод негативного контрастування [52].

Перевагою методу негативного контрастування полягає в тому, що навколо бажаного об'єкту( в нашому випадку це бактеріофаги), утворюється гомогенний фон з речовин, що мають високу електронну щільність, а контрастність необхідних біологічних об'єктів збільшується за рахунок того, що пори та нерівності на поверхні зразку інфільтруються, тим самим утворюючи навколо електронно-прозорого об'єкта, електронно-щільний фон. Роздільна здатність негативного контрастування на порядок вища, ніж розподільна здатність позитивного контрастування. Хімічні речовини, які використовуються під час підготовки зразка до контрастування, тобто під час фарбування, також мають певні критерії, щоб забезпечити створення якісного та чіткого зображення. Один з критеріїв - це відсутність реакції між об'єктом дослідження та речовиною, яка використовується під час фарбування. Другий критерій - можливість бути розчинними. Третій - однією з важливих характеристик є висока електронна щільність речовини. Й четверта - це термічна стабільність та висока точка плавлення речовини для попередження деструкції під дією електронних пучків. Суть методу достатня проста й полягає у тому, що наносячи досліджуваний об'єкт, шляхом занурення у нього наших плівок з формвару, які мають високу електронну щільність, ми отримуємо якісне зображення малоконтрастного зразку на фоні темного фону.

Зразки були піддані фарбуванню за допомогою 2,5%-ного розчину уранілацетату при рН 5,6 протягом 30 секунд (виробництва Serva,

Німеччина). Подальші дослідження проводилися за допомогою трансмісійного електронного мікроскопа JEM 1400 від компанії JEOL (Японія). Зображення зразків були отримані зі збільшенням від 5000 до 60000 разів.

### 3.10. Статистична обробка результатів

В ході дослідження була проведена статистична обробка результатів щодо визначення розмірів бактеріофагів з отриманих зразків. Для цього були використані електронні мікроскопічні зображення, які були виміряні у програмі Adobe Photoshop. Розміри головки та хвоста бактеріофагів були виміряні зображеннями та записані в нм. Усього було оброблено дані для п'яти зразків бактеріофагів. Для кожного зразка було проведено три незалежні вимірювання, щоб забезпечити достовірність результатів. Потім отриманні результати обробляли в програмі Microsoft Excel.

Було використано статистичні методи для обробки цих даних та отримання середніх значень та стандартного відхилення. Середні значення діаметра головки та довжини хвоста для кожного зразка були обчислені, використовуючи середнє арифметичне значення трьох вимірювань для кожного зразка.

Формула для обчислення середнього значення:

Середнє значення = Сума вимірювань / кількість вимірювань;

Цю формулу в програмі можна було візуалізувати так: =AVERAGE(A1:A3), де A1:A3 - діапазон вимірювань для одного зразка.

Стандартне відхилення було також обчислене для кожного зразка, щоб оцінити різницю між вимірюваннями та визначити точність отриманих результатів.

Стандартне відхилення =  $\sqrt{(x - \text{середнє})^2 / \text{кількість вимірювань} - 1}$ ; де

- $x$  - кожне окреме вимірювання,
- Середнє - середнє значення вимірювань
- Кількість вимірювань - загальна кількість вимірювань.

Усі обчислені значення були подальшим чином були використані для аналізу та порівняння розмірів бактеріофагів.

## РОЗДІЛ 4

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 4.1. Визначення активності бактеріофагів у досліджуваних зразках

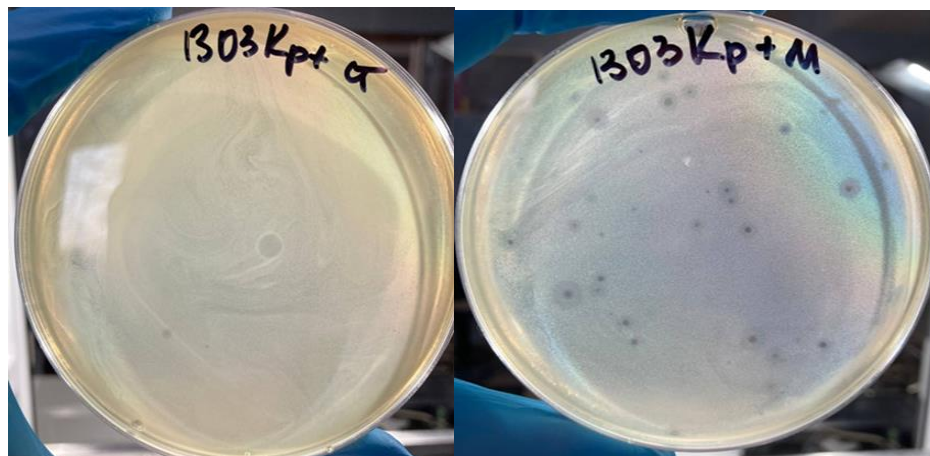
Під час виявлення наявності бактеріофагів в експериментальних зразках, ми використовували метод двошарового агару. Для проведення експерименту, ми використовували 4 ізолята бактерій виду *Kl. pneumoniae*, які були позначені як: ізолят 1303, 1324, 1298 та 1372. На кожному ізоляті ми дослідили два зразки: перший зразок - це зразок зі стічної води; другий зразок - зразок М, що представляє собою зразок стічної води, яка була зібрана лабораторією, але раніше не досліджена. По дві чашки були використані для ізоляції кожного з ізолятів бактерій - 1303, 1324, 1298 та 1372. Після цього на кожній з ізольованих культур було досліджено зразки стічних вод.

Ці маніпуляції дозволили визначити наявність бактеріофагів у зразках, які впливають на кожен із ізолятів бактерій. Результати цих досліджень показали наявність бактеріофагів, що може вказувати на їхню можливу роль у біологічних процесах, які відбуваються в стічних водах.

Після проведення цього експерименту, ми отримали наступні результати: на чашці з ізолятом 1303, на якій було проведено дослідження активності бактеріофагів, що наявні у зразку стічної води, була наявна лише одна негативна колонія. Це може нам допомогти зробити наступні припущення: або даний ізолят бактерій є не сприятливим до дії бактеріофагів, які знаходяться у зразку стічних вод; або концентрація бактеріофагів є недостатньою у зразку, щоб спричинити загибель великої кількості бактерій. Під час дослідження на тому ж самому дії експериментального зразка М, ми виявили, що кількість негативних колоній не тільки більша, але й колонії мають візуальні відмінності від колоній, що утворились при дії зразка стічної води. На чашці утворилось близько 20 колоній, деякі з яких мали напівпрозорий ореол довкола негативної колонії.

Перші висновки, які ми можемо зробити – наявність двох типів колоній бактерій, утворених під впливом одного зразка бактеріофагів, може свідчити про наявність двох різних штамів чи типів бактеріофагів в даному зразку. Один тип бактеріофагів може бути більш агресивним або ефективним у руйнуванні бактерій, що може вказувати на його вплив на формування ореолу навколо колоній бактерій. У той же час, інший тип бактеріофагів може мати менший вплив на колонії, тому колонії, утворені цим типом, можуть бути менш видимими або не мати ореолу.

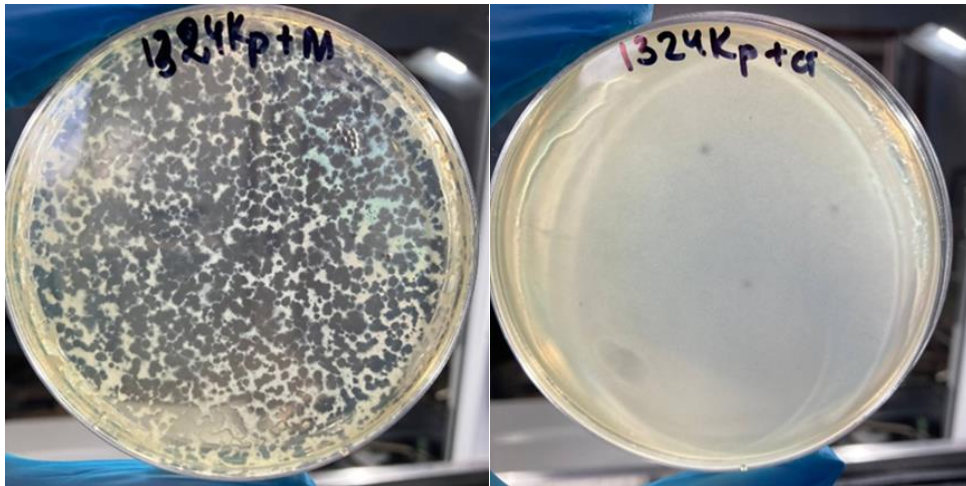
Це свідчить про наявність різноманітності бактеріофагів у зразку і може вказувати на складну динаміку взаємодії між бактеріями та їхніми фагами в досліджуваному середовищі. Такі спостереження можуть бути важливими для розуміння екологічних та біологічних взаємодій у мікробному світі; та ізолят є сприятливим до дії бактеріофагів, що знаходяться у зразку, бо на чашці утворено близько 20 негативних колоній. Результати проілюстровані на рис 4.1.



**Рис. 4.1.** Дія зразків на ізолят бактерій 1303: а) дія бактеріофагів зі стічної води; б) дія фагів виділених з експериментального зразка М, наданого лабораторією

У випадку повторного дослідження двох зразків на ізоляті 1324, ми отримали наступні результати. Під час дії зразка стічної води, на чашці було виявлено 3 окремі колонії зі слабким ореолом. Тобто, наші припущення на

рахунок зразка стічної води все ще залишаються вірними - або концентрація фагів недостатня для утворення більшої кількості негативних колоній, або бактерії й цього ізоляту також є стійкими до дії бактеріофагів. Під час дії зразку М на ізолят 1324, майже вся поверхня агару була вкрита негативними колоніями, що свідчить про високу сприйнятливість бактерій та високий титр бактеріофагів у зразку. Результати продемонстровані на рис 4.2.



**Рис. 4.2.** Дія зразків з бактеріофагами на поживне середовище з бактеріями штаму 1324. А) дія зразку зі стічної води та Б) дія зразку М

Під час дослідження дії зразків на ізоляті 1298, ми отримали наступні результати: при перевірці активності зразка стічної води, спостерігали утворення 4 негативних колоній, кожна з яких мала великий ореол. Під час дослідження дії експериментального зразку М було виявлено 17 негативних колоній, серед яких переважають ті, що мають ореол. Це свідчить про наявність великої кількості бактеріофагів у зразку М. Це знову ж таки може вказувати на кращу сприйнятливість бактерій до фагів, які знаходяться у зразку М. А також на високий титр бактеріофагів у тому ж самому зразку. Результати дослідження представлені на рис 4.3.



**Рис. 4.3.** Дія експериментальних зразків на ізолят бактерій 1298 а) зразок стічної води та б) зразок М

Під час дослідження на наявність бактеріофагів у експериментальних зразках зі стічної води та зразка М на штам 1372 ми не отримали позитивного результату.

Після завершення даного етапу експерименту можемо зробити наступні висновки: У двох досліджуваних зразках було виявлено наявність бактеріофагів; Активність фагів у експериментальному зразку "М" виявилася вищою, ніж у зразку стічної води, що підтверджується кількістю утворених колоній на кожному ізоляті під час дії зразка "М"; Під час оцінки активності зразка стічної води було виявлено, що дія бактеріофагів у цьому зразку менш активна порівняно з зразком "М".

Ці висновки свідчать про різницю в активності та концентрації бактеріофагів у досліджуваних зразках, що може бути важливим для подальшого розуміння впливу бактеріофагів у відповідних середовищах.

Також, враховуючи морфологію утворених колоній на різних ізолятах при перевірці зразка стічної води, можна зробити припущення, що в зразку наявні кілька ліній бактеріофагів, тому вони по різному діють на різні ізоляти бактерій.

Після отримання даних результатів з кожної чашки Петрі був відібраний матеріал для подальшого дослідження чистих ліній. Для початку ми відібрали матеріал з чашок де перевірявся зразок стічної води. З чашки з

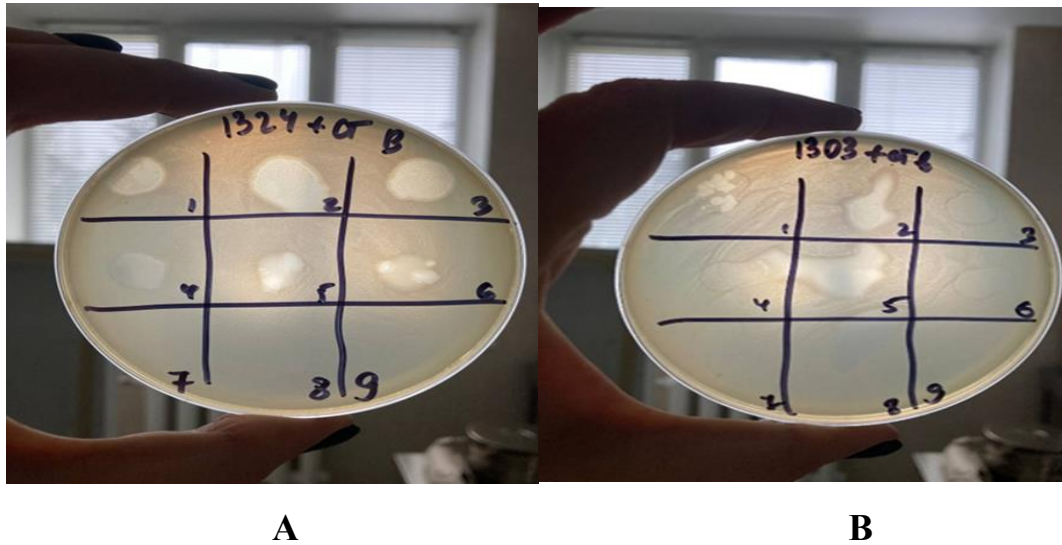
ізолятом 1303 був відібраний фаг, який отримав номер 4; фаг з ізоляту 1324 був позначений номером 3; фаги з ізоляту 1298 були позначені номерами 1 та 2. Потім ми відібрали матеріал з ізоляту 1324, з чашки, де перевірявся зразок М. Його ми позначили як фаг №5.

#### **4.2. Визначення концентрації чистих ліній бактеріофагів**

Після того як було відібрано матеріал з негативних колоній, що утворились під час перевірки активності бактеріофагів, вирішили провести дослідження концентрації отриманих зразків за допомогою спот-тесту.

Аналізуючи результати спот-тесту, отримали наступні концентрації: 1) Бактеріофаг №4 має  $10^{-3}$ ; 2) бактеріофаг №3 має  $10^{-6}$ . Ці результати дають нам уявлення про активність бактеріофагів у різних розчинах. Значення концентрації можуть вказати на те, яке розведення є найефективнішим для використання бактеріофагів у лікувальних або дослідницьких цілях. Наприклад, з розведенням  $10^{-6}$  виявлено, що бактеріофаги все ще діють, що може бути важливим показником для подальшого використання їх у лікуванні або дослідженнях. Отримані результати концентрації бактеріофагів є важливими для подальших досліджень з кількох причин. Перш за все, вони допомагають встановити оптимальні умови для використання бактеріофагів у лікуванні або дослідженнях. Наприклад, знання концентрації допомагає визначити оптимальну дозу фагів для лікування або експерименту. Отже, ці дані становлять важливу основу для подальших досліджень, дозволяючи вченим краще розуміти потенційні переваги та обмеження використання бактеріофагів у лікуванні та

дослідженнях. Результати спот-тесту продемонстровані на рис 4.4.

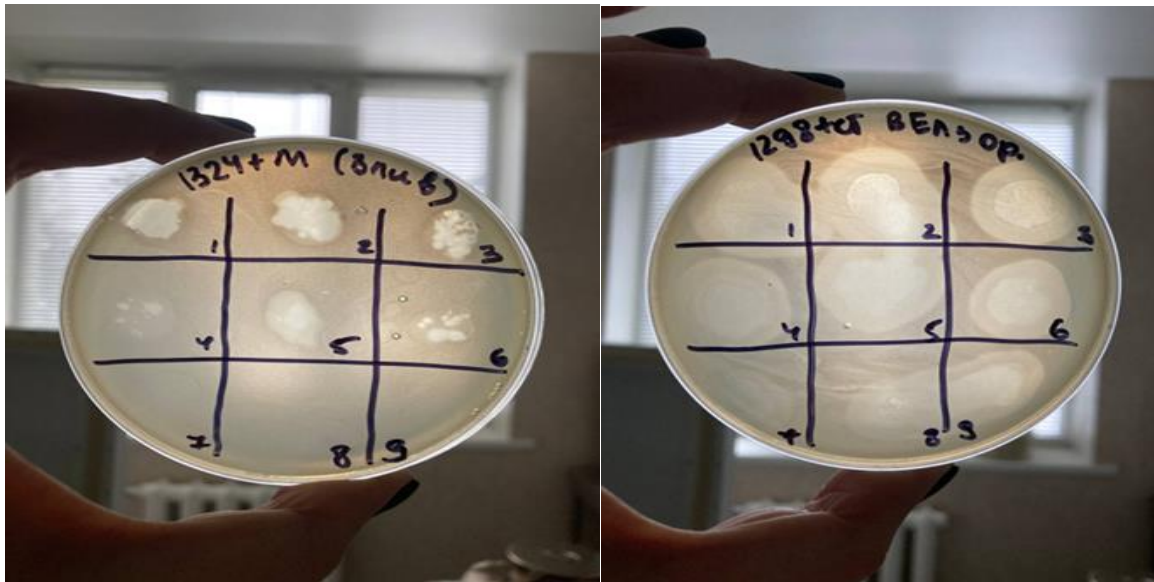


**Рис. 4.4.** Результати титрування фагів №4( А) та №3(В).

Отримані результати спот-тесту показали, що бактеріофаги №1 та №2 мають концентрацію  $10^{-9}$ . Це свідчить про потенційну ефективність цієї суспензії у лікуванні бактеріальних інфекцій, викликаних *Kl. pneumoniae*. Дані результати створюють підґрунтя для подальших досліджень з метою визначення конкретних протоколів лікування та клінічних випробувань для підтвердження ефективності цієї суспензії на практиці. Така концентрація є обіцяючою через кілька причин. По-перше, вона показує високу концентрацію активних бактеріофагів у суспензії, що може забезпечити ефективне прибирання бактерій *Kl. pneumoniae*. По-друге, ця концентрація може бути достатньою для лікування інфекційних захворювань, що спричиняються цими бактеріями, без необхідності використання великих обсягів суспензії. Це може зробити лікування більш зручним та доступним у клінічній практиці. Таким чином, така концентрація відкриває перспективи для ефективного та ефективного застосування цієї суспензії у медичній практиці для боротьби з інфекціями, спричиненими *Kl. pneumoniae*.

Отримана концентрація бактеріофага №5 на рівні  $10^{-6}$  свідчить про те, що при такому розведенні зразку є активні бактеріофаги, які можуть інфікувати та лізувати бактерії. Це демонструє, що навіть при досить

високому розведенні зразку, ще існують активні бактеріофаги, які можуть взаємодіяти з бактеріями. Інтерпретуючи цей результат, можна сказати, що зразок містить достатню кількість активних бактеріофагів, які можуть бути використані для подальших експериментів або для розробки терапевтичних препаратів проти *Kl. pneumoniae* (рис 4.5).



А

В

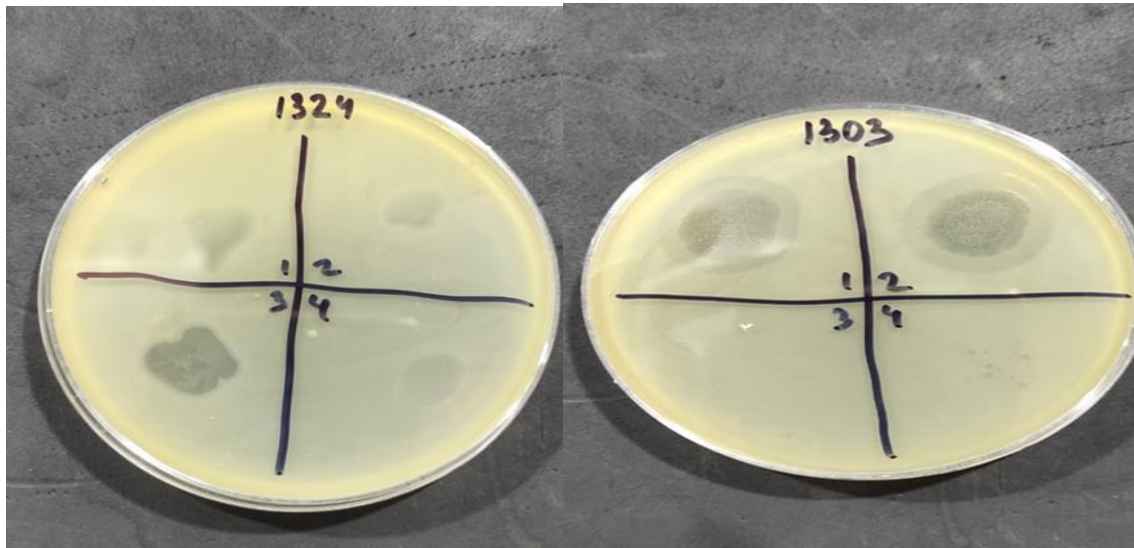
**Рис. 4.5.** Результати титрування фагу №1(А) та фагу №5(В)

Отримані під час спот-тесту результати концентрації бактеріофагів є обнадійливими для подальших досліджень та можливого застосування в клініці. Наприклад, концентрація бактеріофагів №1 та №2 на рівні  $10^{-9}$  також обіцяє їхню ефективність у лікуванні інфекцій, викликаних бактерією *Kl. pneumoniae*. А концентрація бактеріофагів №5 та №3 на рівні  $10^{-6}$  вказує на їхню активність при високих розведеннях, що може бути важливим у розробці терапевтичних препаратів. Концентрація бактеріофагів №4 була найнижчою -  $10^{-3}$ . Незважаючи на це, дана проба бактеріофагів можуть бути ефективними при індивідуальному підході до лікування пацієнта.

### 4.3. Дослідження спектру хазяїв виділених бактеріофагів

Після визначення спектру хазяїв на 4 стартових культурах і визначення титру бактеріофагів, які були вилучені з власних бактерій, ми спробували перевірити, чи спостерігається однакова дія на інші штами бактерій, які належать до нашої колекції. Ми поцікавилися, чи бактеріофаги є високоспецифічними (діють лише на конкретні штами бактерій) або низькоспецифічними (діють на кілька штамів бактерій).

При дослідженні інгібуючої дії на ізоляти, фагів №1 та №2, ми отримали наступні результати (рис. 5.6): фаги №1 і №2, проявили позитивну дію на ізолят 1303. При дії фага №1 спостерігалася утворення великої зони лізису з ореолом, а при дії фага №2 спостерігалася зона лізису без ореолу. Крім того, фаги №1 і №2 проявили слабку лізису на ізоляті 1324. Тобто можна зробити висновок, що ці фаги є низькоспецифічними, але при цьому їх дія на ізолят відрізняється: і про це свідчить морфологія негативних колоній.



**Рис. 4.6.** Інфекційна активність бактеріофагів (№1,2,3,4) на ізолятах 1303 та 1324

За результатами наших досліджень, бактеріофаги 3 і 4 виявили високу специфічність, оскільки проявили активність лише на ізолятах бактерій, з яких вони були виділені. При проведенні спектру хазяїв було помічено, що

ці фаги утворюють мутну зону лізису та окремі негативні колонії (у випадку фага 4) лише ізолятах бактерій, з яких вони були виділені. Ці результати говорять про те, що бактеріофаги 3 і 4 мають високу специфічність до бактерій і взаємодіють переважно з певними штамами бактерій. Це може бути пов'язано з особливостями рецепторів на поверхні бактерій, до яких фаги зв'язуються для ініціювання процесу лізису.

Під час дослідження спектру бактерій, які були сприятливі до дії бактеріофагів, яке було проведено в межах нашого експерименту, ми вияснили, що бактеріофаги №1 та №2 мають низьку специфічність, оскільки їхня дія проявилася не тільки на вихідному ізоляті, але й на іншому. Бактеріофаги №3 і №4 типів виявили свою активність лише на своїх вихідних ізолятах, що свідчить про вищу специфічність цих фагів.

Низька специфічність перших двох бактеріофагів може бути пов'язана з їхньою широкою дією на різні штами бактерій. Бактеріофаги третього і четвертого типів, які виявили активність тільки на своїх вихідних ізолятах, можуть мати вузьку специфічність, що може бути корисним для точного та направленого впливу на конкретний штам бактерій.

У разі, коли ізольований штам бактерій стає епідемічним, бактеріофаги з низькою специфічністю можуть бути корисними для швидкого контролю за розповсюдженням інфекції, оскільки вони можуть впливати на широкий спектр бактерій, включаючи різні штами. У випадках, коли конкретний штам бактерій є причиною захворювання у пацієнта, використання бактеріофагів з вузькою специфічністю може бути ефективним, оскільки ці фаги можуть точно спрямовувати свою дію на цей штам, забезпечуючи цільове та ефективне лікування. У контексті профілактики інфекцій, бактеріофаги з низькою специфічністю можуть бути використані для ефективного усунення широкого спектру патогенних бактерій. Це відкриває можливості для запобігання поширенню захворювань і збереження громадського здоров'я. Використання таких бактеріофагів може мати

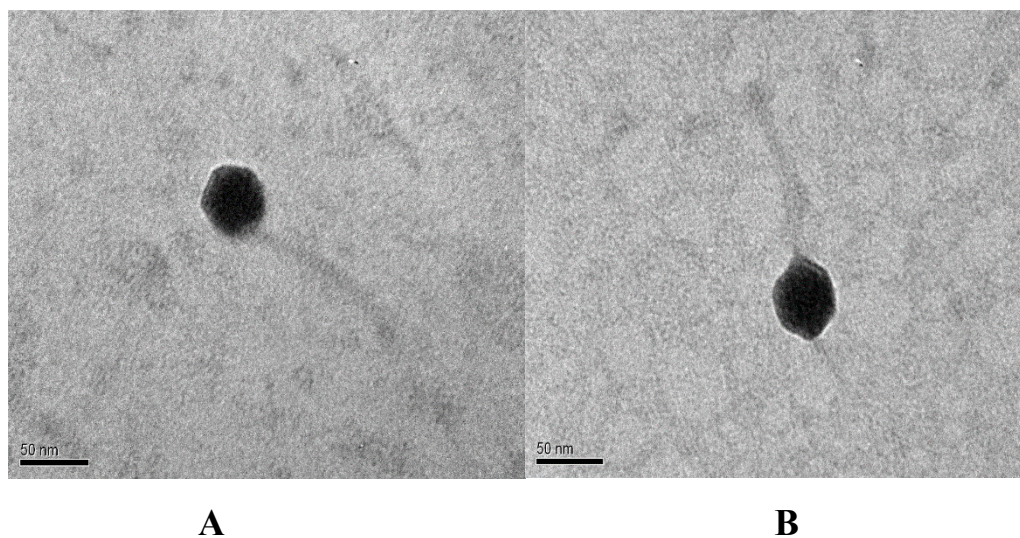
значний вплив на здоров'я спільноти, допомагаючи зменшити ризик інфекційних захворювань та покращити загальний стан здоров'я.

#### 4.4. Результати дослідження морфології виділених бактеріофагів

Проведення електронномікроскопічного дослідження дозволило не лише підтвердити наявність цілих фагових часток у одержаних препаратах, а також детально вивчити їх морфологію. Виділених бактеріофагів збуло вивчено їх морфологію. Ці дані є важливими для розуміння життєвого циклу бактеріофагів та особливостей їх взаємодії з бактеріями. Морфологічна характеристика вірусів також може бути використана для встановлення їх таксономічного положення.

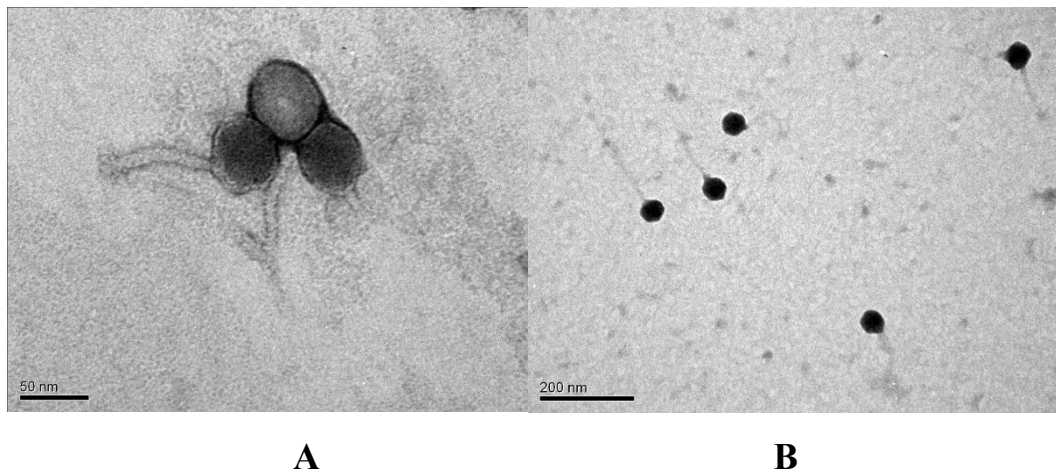
Отже, дослідження морфології бактеріофагів має важливе значення як для фундаментальних досліджень в області вірусології, так і для практичних застосувань у медицині та біотехнології.

Під час дослідження зразків, ми використовували метод негативного контрастування. Отримали такі результати ( рис. 4.7 ).



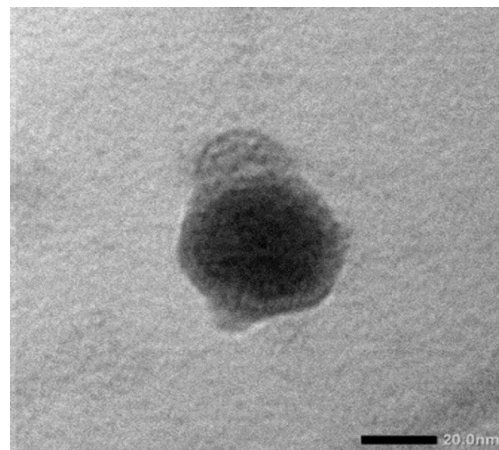
**Рис. 4.7.** Електронномікроскопічне зображення бактеріофагів №1(А) та №2(Б). Лінійка - 50 нм

При огляді зображення, ми можемо зробити висновок, що фаги № 1 та №2 - це фаги, які мають ікосаедричні голівки та довгі хвостові відростки ( рис. 4.7 ) . Фаг №1 має діаметр голівки з  $50,3 \pm 1,5$  нм, а довжина хвостового відростка складає  $99 \pm 0,5$  нм. Згідно з інформації, які ми отримали за допомогою зображення, можна зробити висновок, що фаг належить до класу *Caudoviricetes*, родини *Drexlerviridae*. Фаг №2 має діаметр голівки  $69 \pm 1$  нм та довжиною хвостового відростка  $101 \pm 2$  нм. По цим характеристикам можна зробити висновок, що цей фаг також відноситься до класу *Caudoviricetes*, родини *Drexlerviridae*, та має характеристику сифоподібних вірусів. Головка капсида у бактеріофагів, що відносяться до сифоподібних бактеріофагів, має ікосаедричну будову. Вона є великою та розміщена у верхній частині його структури." Розмір голівки коливається приблизно від 50 до 200 нм у діаметрі. Сифоподібні віруси відомі своєю довгою, контрактильною хвостовою структурою, яка може використовуватися для прикріплення до бактеріальної клітини та впровадження генетичного матеріалу. Хвостовий відросток у фагів зазвичай є довгим та контрактильним. Його розміри можуть також варіюватися, але вони зазвичай становлять приблизно від 100 до 200 нанометрів у довжину. Всі ці характеристики відповідають бактеріофагу №1 та №2 ( рис. 4.7 ) .



**Рис. 4.8.** Електронномікроскопічне зображення бактеріофагів №3 (А) та бактеріофагів №5 (В). Лінійка 50 нм (А), 200 нм (В)

Отримавши зображення бактеріофагів №3, ми виявили, що вони також належать до сифоподібних вірусів ( рис. 4.8 ) . Фаг №3 має діаметр голівки  $60\pm 1$  нм, а довжина хвостового відростку сягає  $149,33\pm 0,58$  нм. За цим характеристикам можна зробити висновок, що цей фаг також відноситься до класу *Caudoviricites*, родини *Drexleviridae*, та має характеристику сифоподібних вірусів. Бактеріофаг №5 має короткий хвіст та також ікосаедричну голівку, тому він не може належати до сифоподібних вірусів. При більш детальному дослідженні ми виявили, що діаметр голівки фагу сягає  $65,66\pm 0,57$  нм, а довжина хвостового відростка складає  $65\pm 1$  нм. Перевіривши отримані дані з необхідною літературою, ми виявили, що досліджуваний бактеріофаг відноситься до родини *Herelleviridae*. Ця родина має характеристику міоподібних вірусів, тобто фаги цієї родини мають короткі хвости, порівняно з іншими представниками *Caudoviricites*, які мають довгі хвости. Зазначені розміри капсида фага відповідають типовим розмірам головки фагів родини *Herelleviridae*. Додатково, розмір хвостового відростка фага №5 також відповідає характеристикам фагів цієї родини, які зазвичай мають короткі хвостові відростки.



**Рис 4.9.** Електронномікроскопічне зображення бактеріофагу №4.  
Лінійка 20 нм

Після дослідження бактеріофагу №4, ми отримали електронне зображення, яке нам продемонструвало, що бактеріофаг має ікосаедричну голівку та відсутній хвіст ( рис. 4.9). З урахуванням діаметру головки фагу №4 у розмірі  $60 \pm 1$  нм, можемо припустити його віднесення до родини *Autographieviridae*.

Отже, після проведення електронної мікроскопії, ми визначили, що за своїми морфологічними характеристиками у зразках присутні представники 3 родин класу *Caudoviricetes*: *Autographieviridae*, *Herelleviridae* та *Drexelviriidae*. Бактеріофаги №1, №2 та №3 належать до родини *Drexelviriidae*. бактеріофаг №4 належить до *Autographieviridae*, а фаг №5 - до *Herelleviridae*.

Результати дослідження вказують на присутність бактеріофагів у обох досліджених зразках. Експериментальний зразок "М" проявив вищу активність фагів порівняно зі зразком стічної води, що підтверджується кількістю утворених колоній на кожному ізоляті під час дії зразка "М". Результати спот-тесту вказують на оптимальні концентрації бактеріофагів, що свідчить про їхню ефективність у лікуванні інфекцій, зокрема інфекцій, спричинених бактерією *Kl. pneumoniae*. Дослідження спектру літичної дії бактеріофагів показало їх різну специфічність, що має значення при виборі найбільш ефективних фагів інфекцій спричинених бактерією *Kl. pneumoniae*. Дослідження за допомогою електронної мікроскопії допомогло нам вивчити морфологічні характеристики бактеріофагів, класифікуючи їх у родині *Caudoviricetes*: *Autographieviridae*, *Herelleviridae* та *Drexelviriidae*.

Отже, отримані дані свідчать про потенційну ефективність використання бактеріофагів у клінічній медицині. Перспективи використання бактеріофагів, що виявляють вузьку специфічність, тобто мають здатність діяти лише на конкретний штам бактерій, є важливим аспектом у сфері біотехнологій та медичної практики. Ці бактеріофаги можуть забезпечити цільове та ефективне лікування захворювань, спричинених конкретними патогенними штамми бактерій, мінімізуючи

при цьому вплив на корисну мікрофлору організму. Використання таких бактеріофагів може бути особливо корисним у лікуванні захворювань, що викликаються штамми бактерій, що проявляють резистентність до антибіотиків, або в умовах, коли необхідне точне та цільове впливання на конкретну патогенну мікроорганізмів.

З іншого боку, бактеріофаги, які проявляють більш широкий спектр дії, здатні атакувати декілька ізолятів бактерій, виявляють потенцій для використання у широкому спектрі захворювань та умовах. Такі бактеріофаги можуть бути ефективними у лікуванні інфекцій, де домінуючим фактором є наявність декількох патогенних штамів, а також у випадках, коли діагностика конкретного штаму бактерій виявляється складною або часом відсутньою. Використання таких бактеріофагів може сприяти зниженню ризику виникнення резистентності бактерій до лікування та забезпечити більш широке охоплення патогенних штамів, що дозволяє покращити результати терапії та знизити рівень захворюваності.

## ВИСНОВКИ

1. Виділено та проведено аналіз бактеріофагів зі зразків стічної води. Встановлено, що вони є активними проти актуальних клінічних ізолятів *Klebsiella pneumoniae*. З кожного зразку виділено чисту лінію бактеріофагів. За допомогою спот-тесту визначено, що найбільшу концентрацію мають лінії фагів №1 та №2 -  $10^9$ .

2. Визначено спектр літичної активності фагів. Встановлено, що фаги №3, №4 та №5 є моновалентними фагами, а фаги №1 та №2 – полівалентними.

3. За морфолого-структурною організацією бактеріофаги №1, №2 та №3 відносяться до сифоподібних фагів (діаметр голівки бактеріофагу  $65 \pm 0,5$  нм, довжина хвостового відростка  $112 \pm 0,5$  нм), а бактеріофаги №4 та №5 - до подоподібних фагів (діаметр голівки  $61,5 \pm 0,5$  нм, хвостовий відросток довжиною  $66 \pm 0,5$  нм).

4. Бактеріофаги з низькою специфічністю можуть стати корисним інструментом для швидкого контролю за розповсюдженням інфекції, оскільки вони можуть впливати на широкий спектр бактерій. Використання бактеріофагів з вузькою специфічністю може бути ефективним, оскільки ці фаги можуть точно спрямовувати свою дію на необхідний штам, забезпечуючи цільове та ефективне лікування.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.
2. Pirnay, J. P., & Kutter, E. (2021). Bacteriophages: it's a medicine, Jim, but not as we know it. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(3), 309-311.
3. Dedrick, R. M., Guerrero-Bustamante, C. A., Garlena, R. A., Russell, D. A., Ford, K., Harris, K., ... & Spencer, H. (2019). Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nature medicine*, 25(5), 730-733.
4. Chaudhry, W. N., Concepcion-Acevedo, J., Park, T., Andleeb, S., Bull, J. J., & Levin, B. R. (2017). Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PloS one*, 12(1), e0168615.
5. Russell, D. A. (2018). Sequencing, assembling, and finishing complete bacteriophage genomes. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 3*, 109-125.
6. Brives, C., & Pourraz, J. (2020). Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures. *Palgrave Communications*, 6(1), 1-11.
7. Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, 11(4), 589-603.
8. Shon, A. S., Bajwa, R. P., & Russo, T. A. (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*, 4(2), 107-118.
9. Khan, E., Schneiders, T., Zafar, A., Aziz, E., Parekh, A., & Hasan, R. (2010). Emergence of CTX-M Group 1-ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* from a tertiary care centre in Karachi, Pakistan. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4(08), 472-476.

10. Liu, P., Li, X., Luo, M., Xu, X., Su, K., Chen, S., ... & Qiu, J. (2018). Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection: a meta-analysis. *Microbial drug resistance*, 24(2), 190-198.
11. Tuon, F. F., Kruger, M., Terreri, M., Penteado-Filho, S. R., & Gortz, L. (2011). *Klebsiella* ESBL bacteremia-mortality and risk factors. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15, 594-598.
12. Meatherall, B. L., Gregson, D., Ross, T., Pitout, J. D., & Laupland, K. B. (2009). Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *The American journal of medicine*, 122(9), 866-873.
13. Silva, N., Oliveira, M., Bandeira, A. C., & Brites, C. (2006). Risk factors for infection by extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Salvador, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 10, 191-193.
14. Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., & Kamal, M. A. (2015). Risk factors for acquisition of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in North-Indian hospitals. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(1), 37-41.
15. Wyres, K. L., Wick, R. R., Gorrie, C., Jenney, A., Follador, R., Thomson, N. R., & Holt, K. E. (2016). Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microbial genomics*, 2(12), e000102.
16. Yoshida, K., Matsumoto, T., Tateda, K., Uchida, K., Tsujimoto, S., & Yamaguchi, K. (2000). Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of medical microbiology*, 49(11), 1003-1010.
17. Lawlor, M. S., Handley, S. A., & Miller, V. L. (2006). Comparison of the host responses to wild-type and *cpsB* mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Infection and immunity*, 74(9), 5402-5407.
18. Cortés, G., Borrell, N., de Astorza, B., Gómez, C., Sauleda, J., & Albertí, S. (2002). Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of

*Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infection and immunity*, 70(5), 2583-2590.

19. Follador, R., Heinz, E., Wyres, K. L., Ellington, M. J., Kowarik, M., Holt, K. E., & Thomson, N. R. (2016). The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microbial genomics*, 2(8), e000073.

20. Merino, S., Camprubí, S., Albertí, S., Benedí, V. J., & Tomas, J. (1992). Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infection and immunity*, 60(6), 2529-2535.

21. Paczosa, M. K., & Meccas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and molecular biology reviews*, 80(3), 629-661.

22. Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. A. (2008). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and immunity*, 76(9), 4055-4065.

23. Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., ... & Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27), E3574-E3581.

24. Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. A. (2009). Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and immunity*, 77(11), 5016-5024.

25. Twort, F. W. (1961). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Acta Kravsi*.

26. Clokie, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, 1(1), 31-45.

27. Adriaenssens, Evelien M., et al. "Taxonomy of prokaryotic viruses: 2017 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee." *Archives of Virology*, 163(4), 1125-1129.
28. Chhibber, Sanjay, Deepika Nag, and Shruti Bansal. "Inhibiting biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* B5055 using an iron antagonizing molecule and a bacteriophage." *BMC microbiology*, 13(1), 1-8.
29. Jamal, Muhsin, et al. "Characterization of Siphoviridae phage Z and studying its efficacy against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* planktonic cells and biofilm." *Journal of medical microbiology*, 64(4), 454-462.
30. Taha, Omar A., et al. "Bacteriophage ZCKP1: a potential treatment for *Klebsiella pneumoniae* isolated from diabetic foot patients." *Frontiers in microbiology*, 9, 2127.
31. Hughes, K. A., et al. "Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases—novel tools for study of bacterial biofilms." *Journal of applied microbiology*, 85(3), 583-590.
32. Kęsik-Szeloch A, Drulis-Kawa Z, Weber-Dąbrowska B, Kassner J, Majkowska-Skrobek G, et al. Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Virol J*, 10(100).
33. Storms, Z., and D. Sauvageau. "Host receptors for bacteriophage adsorption." *FEMS Microbiol Lett*, 363(4).
34. D'Andrea, Marco Maria, et al. "φBO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage." *Scientific Reports*, 7(1), 2614.
35. Loc-Carrillo, Catherine, and Stephen T. Abedon. "Pros and cons of phage therapy." *Bacteriophage*, 1(2), 111-114.
36. Yosef, Ido, et al. "Extending the host range of bacteriophage particles for DNA transduction." *Molecular cell*, 66(5), 721-728.
37. Harper, D. R. (2018). Criteria for selecting suitable infectious diseases for phage therapy. *Viruses*, 10(4), 177.

38. Drulis-Kawa, Zuzanna, Grazyna Majkowska-Skrobek, and Barbara Maciejewska. "Bacteriophages and phage-derived proteins—application approaches." *Current medicinal chemistry*, 22(14), 1757-1773.
39. Pyra, A., Brzozowska, E., Pawlik, K., Gamian, A., Dauter, M., & Dauter, Z. (2017). Tail tubular protein A: a dual-function tail protein of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage KP32. *Scientific reports*, 7(1), 2223.
40. Pan, Y. J., Lin, T. L., Chen, C. C., Tsai, Y. T., Cheng, Y. H., Chen, Y. Y., ... & Wang, J. T. (2017). *Klebsiella* phage  $\Phi$ K64-1 encodes multiple depolymerases for multiple host capsular types. *Journal of virology*, 91(6), e02457-16.
41. Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., & Abedon, S. T. (2010). Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Current pharmaceutical biotechnology*, 11(1), 69-86.
42. Kropinski, A. M., Mazzocco, A., Waddell, T. E., Lingohr, E., & Johnson, R. P. (2009). Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Bacteriophages: methods and protocols, volume 1: isolation, characterization, and interactions*, 69-76.
43. Van Twest, R., & Kropinski, A. M. (2009). Bacteriophage enrichment from water and soil. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, 15-21.
44. Yu, P., Mathieu, J., Li, M., Dai, Z., & Alvarez, P. J. (2016). Isolation of polyvalent bacteriophages by sequential multiple-host approaches. *Applied and environmental microbiology*, 82(3), 808-815.
45. Merabishvili, M., Pirnay, J. P., Verbeken, G., Chanishvili, N., Tediashvili, M., Lashkhi, N., ... & Vanechoutte, M. (2009). Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *PloS one*, 4(3), e4944.
46. Abedon, S. T., & Yin, J. (2009). Bacteriophage plaques: theory and analysis. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*, 161-174.

47. Hyman, P., & Abedon, S. T. (2009). Practical methods for determining phage growth parameters. *Bacteriophages: methods and protocols, volume 1: isolation, characterization, and interactions*, 175-202.
48. Anderson, B., Rashid, M. H., Carter, C., Pasternack, G., Rajanna, C., Revazishvili, T., ... & Sulakvelidze, A. (2011). Enumeration of bacteriophage particles: Comparative analysis of the traditional plaque assay and real-time QPCR-and nanosight-based assays. *Bacteriophage*, 1(2), 86-93.
49. Mann NH. (2005). The third age of phage. *PLoS Biol*, 3(5), e182.
50. Wilson IG. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol*, 63(10), 3741-51.
51. Conceição-Neto, N., Zeller, M., Lefrère, H., De Bruyn, P., Beller, L., Deboutte, W., ... & Matthijnssens, J. (2015). Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Scientific reports*, 5(1), 165.
52. Clokie, Martha RJ, and Andrew Kropinski, eds. *Bacteriophages: methods and protocols, volume 2: molecular and applied aspects*. Vol. 502. Humana, 2008.