

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

Е.А.Плетенева<sup>1</sup>, О.В.Шабурова<sup>1</sup>, М.В.Буркальцева<sup>1</sup>, С.В.Крылов<sup>1</sup>,  
 А.М.Каплан<sup>1</sup>, Е.Н.Чеснокова<sup>1</sup>, О.А.Полыгач<sup>1,2</sup>, Н.Н.Ворошилова<sup>2</sup>,  
 Н.А.Михайлова<sup>1</sup>, В.В.Зверев<sup>1</sup>, В.Н.Крылов<sup>1</sup>

## НОВЫЙ ПОДХОД К СОСТАВЛЕНИЮ СМЕСЕЙ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

<sup>1</sup>НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва; <sup>2</sup>Филиал НПО «Микроген», Уфа

**Цель.** Оценить антибактериальную активность экспериментальной смеси из фагов, отнесенных к нескольким хорошо изученным видам. **Материалы и методы.** Работа проведена с использованием группы из 55 клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* разного происхождения, четырех моновидовых смесей 32 вирулентных бактериофагов (виды phiKZ-, phiKMV-, phiPB1-, PaP3- подобные фаги) и двух новых фагов, phiMK (вида PaK-P2) и phiPerm5. Активность препаратов из моновидовых смесей бактериофагов разных видов сравнивали с активностью 3 коммерческих смесей. Использовали стандартные методы исследования бактериофагов: определение литической активности высевом на бактериальные газоны *P. aeruginosa*, рестрикционный анализ ДНК фагов для подтверждения их отнесения к тому или иному виду. **Результаты.** Показано, что суммарная антибактериальная активность шести моновидовых смесей вирулентных фагов сходна с литической активностью коммерческих терапевтических смесей, используемых против инфекций *P. aeruginosa*. Пятьдесят четыре из 55 штаммов клинических изолятов *P. aeruginosa* проявили чувствительность к экспериментальной смеси, составленной из моновидовых смесей бактериофагов. Пятьдесят три штамма лизировались коммерческими препаратами. При этом в экспериментальной смеси исключена возможность случайного включения умеренных бактериофагов. **Заключение.** Показана возможность создания высокоактивных терапевтических антибактериальных препаратов против *P. aeruginosa* с использованием моновидовых смесей 6 видов литических бактериофагов. Применение такой смеси в терапии легочных инфекций понижает риск возникновения бактериальных штаммов повышенной вирулентности и патогенности при длительном применении.

Журн. микробиол., 2016, № 5, С. 3—11

**Ключевые слова:** бактериофаги, фаготерапия, *Pseudomonas aeruginosa*, патогенность, лекарственная устойчивость, генетические взаимодействия, генетический перенос

Е.А.Плетенева<sup>1</sup>, О.В.Шабурова<sup>1</sup>, М.В.Буркальцева<sup>1</sup>, С.В.Крылов<sup>1</sup>,  
 А.М.Каплан<sup>1</sup>, Е.Н.Чеснокова<sup>1</sup>, О.А.Полыгач<sup>1,2</sup>, Н.Н.Ворошилова<sup>2</sup>,  
 Н.А.Михайлова<sup>1</sup>, В.В.Зверев<sup>1</sup>, В.Н.Крылов<sup>1</sup>

## NOVEL APPROACH TO COMPOSITION OF BACTERIOPHAGE MIXTURES FOR ANTIBACTERIAL THERAPY

<sup>1</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow; <sup>2</sup>Branch of SPO «Microgen», Ufa, Russia

**Aim.** Evaluate antibacterial activity of an experimental mixture of phages, belonging to several well-studied species. **Materials and methods.** The study was carried out using a group of 55 clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains of various origins, 4 mono-species mixtures of 32 virulent bacteriophages (species phiKZ-, phiKMV-, phiPB1-, PaP3-like phages) and 2 novel phages, phiMK (species PaK-P2) and phiPerm5. Activity of preparations from mono-species mixtures of

bacteriophages of various species were compared with activity of 3 commercial mixtures. Standard methods of study of bacteriophages were used: determination of lytic activity by seeding onto bacterial lawns of *P. aeruginosa*, restriction analysis of phage DNA for confirmation of their belonging to certain species. **Results.** Cumulative activity of 6 mono-species mixtures of virulent phages was shown to be similar to lytic activity of commercial therapeutic mixtures used against *P. aeruginosa* infections. 54 of 55 strains of clinical isolates of *P. aeruginosa* showed sensitivity to experimental mixtures composed of mono-species mixtures of bacteriophages. 53 strains were lysed by commercial preparations. Wherein the possibility of accidental inclusion of moderate bacteriophages in the experimental mixture is excluded. **Conclusion.** A possibility of creation of highly active therapeutic antibacterial preparations against *P. aeruginosa* using mono-species mixtures of 6 species of lytic bacteriophages is shown. Use of such a mixture in therapy of lung infections reduces the risk of emergence of bacterial strains with increased virulence and pathogenicity during prolonged administration.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 5, P. 3—11

Key words: bacteriophages, phage-therapy, *Pseudomonas aeruginosa*, pathogenicity, drug resistance, genetic interactions, genetic transfer

## ВВЕДЕНИЕ

Возникновение множественно устойчивых к антибиотикам патогенных бактерий возродило интерес к использованию бактериофагов. В России, Грузии и Польше фаготерапия успешно используется в лечении ряда заболеваний, в том числе раневых и урологических инфекций, инфекций верхних дыхательных путей, кишечника [5]. Часто причиной таких инфекций являются *Pseudomonas aeruginosa*. Особое значение однако имеет хроническая псевдомонадная инфекция легких у больных муковисцидозом (МВ). На фоне постоянного использования разных антибиотиков в специализированных клиниках возникли высоковирулентные штаммы *P. aeruginosa*, проявляющие не только множественную лекарственную устойчивость, но и способность к эпидемическому распространению и инфицированию здоровых людей [7, 10].

Единственным антибиотиком, к которому пока чувствительны большинство клинических изолятов *P. aeruginosa*, является колистин. С введением в лечение МВ так называемой агрессивной терапии и ингаляций колистина [4] связаны надежды на возможность увеличения продолжительности жизни больных МВ. Однако из-за высокой токсичности препарат не используют у детей до достижения шестилетнего возраста. Кроме того, к колистину также возникают устойчивые штаммы при мутациях в бактериальных генах [8, 12].

Недавно обнаружена трансмиссибельная плаزمида, кодирующая устойчивость к колистину [13]. Распространение таких плазмид в центрах по лечению МВ может иметь, очевидно, очень серьезные последствия. Возможно, что в этом случае применение специфических бактериофагов могло бы принести пользу в качестве единственно возможной антибактериальной терапии.

Несколько предприятий в России производят терапевтические фаговые препараты, в том числе активные при инфекциях, вызванных *P. aeruginosa*, но их нельзя применять для эрадикации *P. aeruginosa* при МВ по двум основным причинам. Используемый в настоящее время метод повышения активности терапевтических фаговых смесей, основанный на случайном обогащении любыми фагами из природных источников (сточная вода и др.), не исключает попадания в препарат умеренных бактериофагов, в том числе и тех видов, участие которых в эволюции *P. aeruginosa* привело к возникновению опасных эпидемических вариантов [16]. В ходе фаготерапии неизбежно возникают

фагоустойчивые мутанты бактерий, которые при кратковременном лечении не успевают накопиться до критического уровня. Однако поскольку при МВ антибактериальное лечение должно проводиться непрерывно, возникновение фагоустойчивости к определенной композиции бактериофагов приводит к необходимости быстрого приготвления новых активных фаговых препаратов с измененным спектром литической активности для каждого пациента.

Мы предлагаем другой подход к созданию терапевтических смесей фагов и к расширению их литической активности, который позволит использовать фаготерапию при МВ.

Базовую терапевтическую смесь (БТС) предлагается составлять из нескольких смесей фагов, каждая из которых содержит разные фаги одного вида с доказанной неспособностью стабильной лизогенизации бактерий. Каждая такая моновидовая композиция должна содержать фаги с разными спектрами литической активности. При этом на начальной стадии работы необходимо использовать прежде всего те виды, которые легко распознать по видимым признакам негативных колоний на газоне чувствительных бактерий. Это обеспечит в условиях реальной терапии быструю селекцию фагов известных видов (или их мутантов и рекомбинантов) с расширенным спектром литической активности.

В работе проведена оценка антибактериальной активности экспериментальной смеси из фагов, отнесенных к нескольким хорошо изученным видам. Рассматриваются проблемы, которые могут возникать при длительной фаготерапии как следствие взаимодействия фагов разных видов, и обсуждаются возможные способы их преодоления.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения большинства бактериофагов в высокой концентрации использовали бактерии стандартного лабораторного штамма *P. aeruginosa* PAO1. Фаги вида PaP3 ( $\phi$ iTL и  $\phi$ iCHU), плохо растущие на штамме PAO1, размножали на варианте этих бактерий с плазмидой *pmg53* [15]. Для сравнения активности фагов применяли 55 штаммов бактерий *P. aeruginosa* разного происхождения: 12 штаммов разных серогрупп из коллекции НИИВС им. И.И. Мечникова (группа А); 18 штаммов, выделенных при урологических инфекциях, получены от Т.С. Перепановой (НИИ урологии) (группа В); 25 штаммов выделены от больных муковисцидозом, получены от M. Vanechoutte, University of Ghent, Бельгия и С. Pourcel, Université Paris-Sud, Orsay, Франция (группа С).

В моновидовую смесь  $\phi$ iKZ-подобных фагов включено 14 фагов, для смеси фагов вида PB1 — 12 разных фагов, для смеси фагов вида  $\phi$ iKMV — 4, для вида PaP3 — 2 фага. Некоторые из экспериментальных бактериофагов видов  $\phi$ iKZ, PB1,  $\phi$ iKMV и фаги вида PaP3 ( $\phi$ iCHU и  $\phi$ iTL) впервые выделены в лаборатории генетики бактериофага из разных природных образцов, отобранных в России, Бельгии и Германии [1, 3, 14]. Бактериофаг  $\phi$ iMK, относящийся к виду PAK\_P2, был выделен из образца сточной воды в предгорье Килиманджаро (Танзания). Бактериофаг  $\phi$ iNFS вида KMV-подобных фагов отобран как мутант одного из фагов в коммерческом препарате [11]. Некоторые бактериофаги видов PB1,  $\phi$ iKZ и фаг  $\phi$ iPerm5 были выделены из терапевтических смесей фагов и классифицированы до вида в ходе настоящей работы с использованием ПЦР и рестрикционного анализа. Некоторые из фагов ( $\phi$ iNFS,  $\phi$ iPerm5), выделенные из коммерческих смесей, использовались после мутационной адаптации к росту на лабораторном штамме только в целях научного исследования.

Получение фага в высоком титре: чашки Петри с агаризованной средой LB (1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 1,5% агар в дистиллированной воде) заливали слоем полужидкого агара с добавлением бактерий штамма PAO1 и на поверхность наносили бактериофаг из единичной колонии фага (бляшки) стерильными бумажными полосками. После инкубации при температуре 37°C в течение 18 — 20 часов полужидкий слой агара, содержащий выросший фаг, снимали, ресуспендировали в физиологическом растворе (0,9% NaCl) и центрифугировали при 12 000 об/мин. К супернатанту с фагом добавляли хлороформ для стерилизации. Хранили суспензии фагов при 6°C.

Рост фагов на поверхности газонов разных бактерий-хозяев сравнивали нанесением с помощью аппликатора на подготовленный бактериальный газон суспензий фагов и последующей инкубацией при температуре 37°C в течение 18 — 20 часов. Исследование взаимодействий фагов и бактерий-хозяев и между фагами разных видов проводилось в тех же условиях.

Подготовка образцов фагов описана выше. В ряде случаев очистка и концентрирование фагов проводились центрифугированием фаговых суспензий в градиенте плотности CsCl (Ultramicro centrifuge Hitachi, Япония, swing rotor S52ST, 25000g) с последующим диализом против фагового буфера TM (10 mM трисHCl, pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NaCl). Выделение ДНК проводили фенольным методом, переваривание ДНК — эндонуклеазами EcoRV и HindIII (Fermentas) в соответствии с прилагаемыми инструкциями, электрофорез в агарозном геле — по Sambrook J. et al. ПЦР анализ ДНК фагов вида PB1 проводили на амплификаторе BIOER Gene Q Thermal Cycler с использованием праймеров фирмы «ЕвроГен».

Моновидовые смеси составляли из равных объемов концентрированных (10<sup>10-11</sup> б.о.е./мл) суспензий фагов данного вида и размножали высевом двуслойным методом на чашки Петри с газонами бактерий лабораторного штамма *P. aeruginosa* PAO1 или для фагов вида PaP3 — его варианта с плазмидой pMG53.

Активность смеси фагов оценивали нанесением капель смеси с помощью игольчатого репликатора на газоны в чашках Петри 55 клинических штаммов разного происхождения. Положительным результатом считали появление явного пятна лизиса после ночной инкубации.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффективность препаратов бактериофагов при длительном применении во многом зависит от возможности быстрого пополнения его состава безопасными литическими фагами, преодолевающими возникающую фагоустойчивость бактерий. Поиск и отбор новых фагов хорошо изученных видов может осуществляться на основании признаков, общих для представителей данного вида. На рис. 1 показан рост негативных колоний фагов выбранных нами видов после одного дня инкубации на газоне *P. aeruginosa* PAO1.

Для phiKZ-подобных фагов характерным признаком являются маленький размер бляшек (до 1мм) и специфическая опалесценция роста на газоне бактерий вследствие накопления большого количества фаговых частиц [2]. Присутствие фагов вида phiKZ во всех изученных коммерческих препаратах подтверждает широкий спектр их литической активности, в том числе, по видимому, и вследствие значительной независимости от бактериальной системы транскрипции [6]. Однако узкий интервал изменчивости среди фагов этого вида по признаку круга хозяев и способность фагов дикого типа к псев-

долизогенизации бактериальных клеток при множественной инфекции вызывают проблемы, которые можно решить направленным поиском мутантов с расширенным литическим спектром и сниженной способностью к псевдолизогении. Применение  $\phi$ KZ-подобных фагов в смеси с фагами других видов может компенсировать эти недостатки.

Второй вид, фаги которого визуально распознаются — вид КМV-подобных фагов. Для фагов этого вида, также обнаруженных в разных коммерческих препаратах, характерны крупные (от 0,5 см и более) негативные колонии, размер которых увеличивается при росте на стареющих бактериальных газонах в течение нескольких дней (в отличие от фагов остальных видов). Фаги этого вида способны вызывать псевдолизогенизацию бактериальных клеток при развитии на стареющем газоне во время фазы замедления клеточного деления [11].

Третий вид, также часто обнаруживаемый в составе коммерческих фаговых смесей и распознаваемый визуально по морфологии бляшек на бактериальном газоне, РВ1-подобные фаги. Вокруг негативных колоний фагов вида РВ1 после остановки роста формируется характерный плотный валик из псевдолизогенных бактерий-хозяев. Для этих фагов характерны высокая литическая активность (быстрый лизис), низкая частота возникновения устойчивых бактериальных мутантов). При совместной инфекции могут возникать рекомбинанты с измененным литическим спектром. Так, в данной работе после однократного пассажа моновидовой смеси из 12 разных РВ1-подобных фагов на *P. aeruginosa* PAO1 возникли гибридные фаги с новыми спектрами литической активности.

Четвертая моновидовая смесь, использованная в работе, пока содержит только два новых фага вида РаРЗ-подобных фагов —  $\phi$ CHU и  $\phi$ TL, выделенных в нашей лаборатории из природных источников. Их геномы секвенированы [15]. Фаги этого вида постоянно встречаются в коммерческих препаратах, поскольку обладают широким спектром литической активности, в том числе и в отношении многих мукоидных штаммов *P. aeruginosa*, устойчивых к антибиотикам. Особенность фагов этого вида — образование мутных, почти неразличимых негативных колоний на штамме *P. aeruginosa* PAO1. Однако на газоне штамма PAO1 с плазмидой рMG53 (группа IncP2) происходило улучшение роста этих фагов с образованием различных по морфологии вариантов бляшек [11].

Еще два вида фагов — представленные фагами  $\phi$ МК вида РаК-Р2 и новым фагом  $\phi$ Perm5, выбраны в качестве исходных для составления моноспецифических смесей, поскольку они были способны лизировать некоторые штаммы клинических изолятов, устойчивые к фагам других выбранных видов. На газоне *P. aeruginosa* PAO1 фаг  $\phi$ МК образовывал прозрачные крупные (5 — 7 мм) негативные колонии. Для фага Perm5 характерно образование с высокой частотой более прозрачных мутантов — обозначены как Perm5 clear (один из таких мутантов был использован в дальнейшей работе).

Подтвердить правильность визуального отнесения фага к определенному

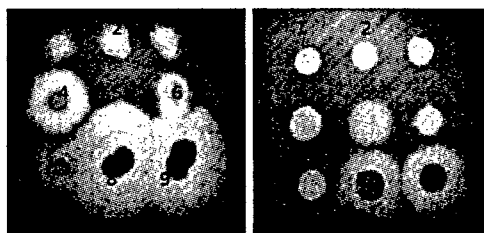
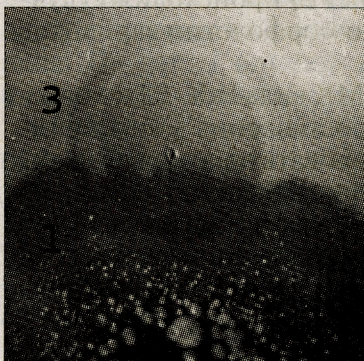
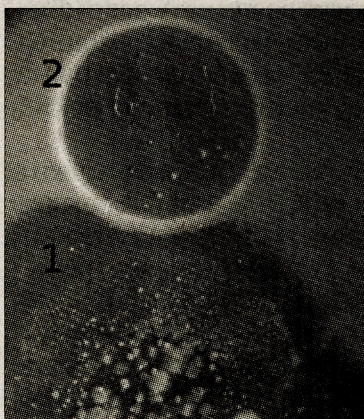


Рис. 1. Рост фагов разных видов на газонах *P. aeruginosa* PAO1 (слева) и *P. aeruginosa* Pu21 (PMG53) (справа). 1 —  $\phi$ KZ; 2 — EL vir10; 3 — Lin68; 4 —  $\phi$ МК; 5 — TL; 6 — РВ1; 7 —  $\phi$ Perm5; 8 — FMV; 9 —  $\phi$ NFS.

виду можно по результатам ПЦР, рестрикционного анализа ДНК или экспресс-секвенирования. Сравнение рестрикционных профилей ДНК отдельных фагов и приготовленных из них моновидовых смесей позволяет легко обнаружить общие для геномов разных фагов данного вида консервативные участки генома.

Определение литической активности фагов, включенных в состав моновидовых смесей, показало, что 52 из 55 включенных в работу штаммов *P. aeruginosa* проявили чувствительность к лизису смесью, составленной из 32 бактериофагов шести видов (табл.). Один из штаммов оказался устойчив к смеси всех фагов. Еще два штамма проявили чувствительность к двум разным фагам, phiMK и phiPerm5. Фаг phiMK отнесен к виду PaK-P2, а фаг phiPerm5 — к группе N4-подобных фагов (на основании данных секвенирования и аннотации, личное сообщение D. Magill и L. Kulakov, Северная Ирландия).

Три разных коммерческих смеси фагов лизировали 52 штамма из 55 использованных в работе. Таким образом, явных различий в литической активности суммарной смеси, составленной из разных моновидовых смесей и коммерческих препаратов, не обнаружено. Полученные результаты позволяют сделать предположение, что эффективность смесей изученных фагов в фаготерапии будет достаточно высокой.



**Сравнение активности 6 моновидовых смесей на 55 штаммах разного происхождения**

Группы изолятов	KMV-like	PB1-like	phiKZ-like	PaP3-like	phiMK	phiPerm5
A	8	10	8	4	7	3
B	9	10	15	9	3	6
C	14	17	12	2	11	12

Примечание. Группы изолятов см. «Материалы и методы».

**Рис. 2. Взаимодействие бактериофагов в биопленке (газоне) *P. aeruginosa* PAO1.**

Вверху — при перекрытии зон лизиса фагов видов KMV и PB1 бактерии, устойчивые к PB1, не поддерживают развития KMV-подобного фага phiNFS. Внизу — в области пересечения зон лизиса phiNFS и phiPerm5 происходит взаимодействие, при котором значительная часть бактерий, устойчивых к phiPerm5, лизируется фагом phiNFS. Возраст биопленки 72 часа. Зона лизиса KMV-подобного фага phiNFS (1) продолжает увеличиваться, а зоны лизиса фагов PB1 (2) и phiPerm5 (3) полностью сформированы.

Бактерии *P. aeruginosa* обычно образуют биопленки на пораженных поверхностях органов или в ране. Моделью биопленки может служить рост бактерий в тонком верхнем слое полужидкого агара. При этом удается наблюдать уникальные взаимодействия между бактериофагами разных видов, включенными в терапевтическую смесь, и оценить возможное влияние на лечебный эффект. На рис. 2 показаны примеры таких взаимодействий на газоне *P. aeruginosa* PAO1. Можно видеть, что рост бляшек фагов вида phiKMV, проявляющих наиболее выраженный и долго-

временный литический эффект, подавляется при контакте с зоной роста фагов других видов. Такое взаимодействие может отрицательно повлиять на антибактериальную эффективность при терапии, но его можно минимизировать подбором оптимальных концентраций разных фагов в исходной базовой терапевтической смеси.

При посеве на газоны разных клинических изолятов выявлены особенности взаимодействия фагов вида *phiKMV* с некоторыми штаммами бактерий. На поверхности газона клинического изолята *P. aeruginosa* UR14 образовывались крупные плаки. При инфекции этих бактерий фагом *phiNFS* (вид *KMV*-подобных) происходило изменение характера роста бактерий в зоне, прилежащей к месту нанесения фага. В непосредственной близости от зоны лизиса бактериальные плаки отсутствовали, а в остальной части они имели существенно меньший размер (рис. 3). Причиной уменьшения размера плаков в

этой области является ее состав — кроме присутствия неизмененных бактерий штамма UR14, в ней были обнаружены мутанты этих бактерий, у которых плакирование существенно подавлено, что и приводит к уменьшению размера плаков. Следует отметить, что область выраженного подавления плакообразования имеет четкую границу, и это может быть связано с сигнальной активностью диффундирующих из пятна лизиса продуктов.

Фаги видов *phiKZ*- и *KMV*-подобных являются постоянными компонентами коммерческих терапевтических смесей, что подтверждает широту спектра литической активности и обязательность их использования в виде моновидовых наборов для включения в БТС. В то же время, для этих фагов описана способность вызывать у инфицированных бактерий состояние псевдолизогении [2, 11]. По-видимому, недостаточная терапевтическая эффективность фагов *phiKZ* и *phiKMV*, использованных индивидуально в модельных опытах на животных [9], объясняется именно возникновением псевдолизогенов. В то же время, псевдолизогены по фагам этих видов лизируются при перекрестной инфекции, а также при инфекции фагами других видов. Таким образом, эффект псевдолизогении при совместном использовании фагов этих видов не понизит эффективности терапевтической смеси фагов. Кроме того, в случае *phiKZ*-подобных фагов можно отобрать мутанты, лизирующие бактерии в псевдолизогенном состоянии [2]. Пока отбор таких мутантов достаточно трудоемкий, но можно ожидать, что после локализации области в геноме фага, контролирующей этот признак, создание таких вирулентных мутантов окажется достаточно простым и быстрым процессом.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Возникновение множественно устойчивых к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa* осложняет лечение инфекции легких у больных муковисцидозом.

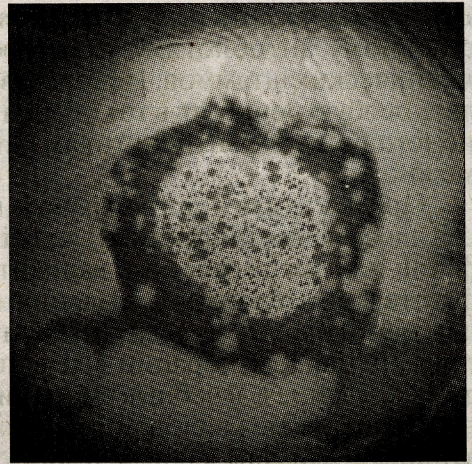


Рис. 3. Рост фага *phiNFS* вида *KMV*-подобных на газоне плакирующего штамма *P. aeruginosa* UR14.

Вокруг зоны лизиса изменяется (усиливается) рост бактерий. В непосредственной близости от зоны лизиса бактериальные плаки отсутствуют, а в остальной части они имеют существенно меньший размер.

Возрастает частота штаммов, проявляющих устойчивость к колистину, единственному антибиотику, к которому все еще чувствительно большинство клинических штаммов. Использование фаготерапии при МВ может представлять особую ценность в тот период, когда пациент инфицирован множественно устойчивым к антибиотикам патогеном, а использование колистина невозможно.

Предлагаемая в данной работе модификация приготовления фаговых смесей для лечения инфекций *P. aeruginosa* исключает попадание в них умеренных фагов или их литических вариантов и способна обеспечить непрерывность фаготерапии, благодаря созданию и постоянному расширению наборов фагов для моновидовых смесей. Мы считаем, что оба эти условия обязательны для применения фаготерапии в лечении инфекции *P. aeruginosa* при муковисцидозе. Введение в лечебные смеси вирулентных фагов хорошо изученных видов, не имеющих межвидовой гомологии ДНК, исключает возникновение «мозаиков» и «химер» как в результате рекомбинации фагов, так и при рекомбинации геномов фагов с бактериальными геномами. Отбор новых фагов выбранных видов следует вести на постоянной основе, заранее создавая резервные коллекции для каждого из видов фагов. Их при необходимости можно использовать для расширения литического спектра БТС.

Предполагается, что применение БТС и предлагаемых моновидовых смесей фагов для лечения инфекции *P. aeruginosa* при МВ потребует обязательной персональной адаптации состава для каждого пациента. Эта дополнительная работа может проводиться персоналом медицинского учреждения с использованием коллекций фагов, созданных в научных или/и производственных лабораториях.

Разумеется, при необходимости спектр литической активности БТС может быть расширен добавлением к ней моновидовых смесей фагов других видов (после доказательства их литической природы).

Проведенное ранее изучение результатов ингаляции персонально приготовленных фаговых смесей у больных муковисцидозом подтвердило принципиальную возможность элиминации инфицирующих бактерий [Shabalova I.A. et al., 1995]. Очевидно, что обнаружение сложных отношений фагов вида РВ1 и бактерий разных видов [Malki A. et al., 2015] требует дальнейшего изучения разнообразия взаимодействия фагов и бактерий для исключения возможности межвидовой трансдукции в ходе терапии.

*Авторы выражают благодарность за предоставление фагов и клинических изолятов P.aeruginosa Т.С.Перепановой (Москва), М.Vaneechoutte (Бельгия), С.Pourcel (Франция) и Н-W.Ackermann (Канада).*

## ЛИТЕРАТУРА

1. Плетенева Е.А., Буркальцева М.В., Шабурова О.В., Крылов С.В., Печникова Е.В., Соколова О.С., Крылов В.Н. Новый бактериофаг TL *Pseudomonas aeruginosa* и его использование для поиска фагов, образующих ореолы. Генетика. 2011, 47 (1): 5-9.
2. Плетенева Е.А., Крылов С.В., Шабурова О.В., Буркальцева М.В., Мирошников К.А. Крылов В.Н. Псевдолизогения бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, инфицированных  $\rho$ hiKZ-подобными бактериофагами. Генетика. 2010, 46 (1): 26-32.
3. Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Сыкилинда Н.Н., Мирошников К.А., Кадыков В.А., Крылов С.В., Месянжинов В.В., Крылов В.Н. Изучение разнообразия в группе фагов вида РВ1 (Myoviridae) *Pseudomonas aeruginosa* и их поведения на адсорбционно-устойчивых мутантах бактерий. Генетика. 2008, 44 (2): 185-194.
4. Barry P.J., Jones A.M. New and emerging treatments for cystic fibrosis. *Drugs*. 2015, 75(11): 1165-75. doi: 10.1007/s40265-015-0424-8.
5. Chanishvili N. Phage therapy — history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv. Virus. Res.* 2012, 83: 3-40.



6. Ceyskens P.J., Minakhin L., Van den Bossche A. et al. Development of giant bacteriophage  $\phi$ KZ is independent of the host transcription apparatus. *J Virol.* 2014, 88 (18): 10501-10510.
7. Fothergill J.L., Walshaw M.J.; Winstanley C. Transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infections. *Eur. Resp. J.* 2012, 40: 227-238.
8. Fernández L., Gooderham W.J., Bains M. et al. Adaptive resistance to the «last hope» antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54 (8): 3372-3382.
9. Henry M., Lavigne R., Debarbieux L. Predicting in vivo efficacy of therapeutic bacteriophages used to treat pulmonary infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013, 57 (12): 5961-5968.
10. James C.E., Fothergill J.L., Kalwij H. et al. Differential infection properties of three inducible prophages from an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* 2012, 21 (12): 216. doi: 10.1186/1471-2180-12-21.
11. Krylov V., Shaburova O., Pleteneva E. et al. Selection of phages and conditions for the safe phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Viol. Sin.* 2015, 30 (1): 33-44.
12. Lee J.Y., Chung E.S., Na I.Y. et al. Development of colistin resistance in pmrA-, phoP-, parR- and cprR-inactivated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014, Jul 2. pii: dku238.
13. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 2015, Nov 18. pii: S1473-3099(15)00424-7. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
14. Lavigne R., Burkaltseva M.V., Robben J. et al. The genome of bacteriophage phiKMV, a T7-like virus infecting *Pseudomonas aeruginosa*. *Virology.* 2003, 312 (1): 49-59.
15. Magill D.J., Shaburova O.V., Chesnokova E.N. et al. Complete nucleotide sequence of phiCHU: a Luz24likevirus infecting *Pseudomonas aeruginosa* and displaying a unique host range. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015, 362 (9). pii: fnv045. doi: 10.1093/femsle/fnv045. Epub. 2015 Mar 30.
16. Winstanley C., Langille M.G., Fothergill J.L. et al. Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res.* 2009, 19 (1): 12-23.

*Поступила 20.02.16*

Контактная информация: Крылов Виктор Николаевич,  
105064, Москва, пер. М.Казенный, 5А, р.т. (495)917-49-00

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

*И.И.Долгушин<sup>1</sup>, Ю.С.Шишкова<sup>1</sup>, С.Н.Даровских<sup>2</sup>, И.А.Комарова<sup>1</sup>,  
Н.В.Вдовина<sup>2</sup>, Е.А.Мезенцева<sup>1</sup>, К.В.Никушкина<sup>1</sup>*

## **ОСОБЕННОСТИ МОДИФИЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНЫХ ЭЛЕКТРОМАГНИТНЫХ ИЗЛУЧЕНИЙ ПРИРОДНОГО И ТЕХНОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ СТАТУС НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ**

<sup>1</sup>Южно-Уральский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>Южно-Уральский государственный университет, Челябинск

*Цель.* Изучить in vitro действие микроволновых электромагнитных излучений (ЭМИ) СВЧ диапазона на жизнеспособность и функциональный статус нейтрофильных гранулоцитов. *Материалы и методы.* Нейтрофилы периферической крови 30 условно здоровых доноров в возрасте 18 — 20 лет подвергали воздействию широкополосного (природного, аналогичного радиоизлучению Солнца) и моночастотного (техногенного, аналогичного излучению сотовых телефонов, компьютеров, микроволновых печей и др.) ЭМИ в диапазоне частот 4 — 4,34 ГГц, генерированных СВЧ-генератором «АИМТ-1». После 16 мин воздействия изучалась жизнеспособность нейтрофильных гранулоцитов, фагоцитарная функция, лизосомальная активность клеток, оценивалась НСТ-восстанавливающая спо-