

Міністерство освіти і науки України
Національний університет «Києво-Могилянська академія»
Факультет природничих наук
Кафедра лабораторної діагностики біологічних систем

Магістерська робота

на тему «**ДОСЛІДЖЕННЯ КОМБІНОВАНОЇ ДІЇ ГРАМІЦИДИНУ S ТА
БАКТЕРІОФАГА T4 НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ *ESCHERICHIA COLI*: РОЛЬ
ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ І МЕМБРАННИХ ДЕСТРУКЦІЙ**»

Виконала: студентка 2-го року навчання
Галузь знань: 09 Біологія
Спеціальність: 091 Біологія і біохімія
Освітньо-наукова програма: Лабораторна
діагностика біологічних систем
Григор'єва Владислава Станіславівна

Керівники:

Комаров І.В.,
доктор хімічних наук, професор,
директор навчально-наукового інституту
високих технологій КНУ ім. Т. Шевченка;

Білько Н.М.,
доктор медичних наук, професор кафедри
лабораторної діагностики біологічних систем
НаУКМА

Рецензент Талько В. В.,
доктор медичних наук, професор

Кваліфікаційну роботу захищено
з оцінкою _____

Секретар ЕК
Пахаренко М. В.
« ____ » червня 20__ року

Київ – 2026

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1. Загальна характеристика антимікробних пептидів	9
1.2. Граміцидин S: структура, біологічні властивості та механізм дії.....	10
1.2.1. Структура і біологічні функції граміцидину S.....	10
1.2.2. Молекулярні механізми дії граміцидину S	12
1.2.3. Клінічне застосування граміцидину S	14
1.2.4. Використання граміцидину S у комбінованій антибактеріальній терапії	16
1.3. Характеристика і патогенний потенціал <i>Escherichia coli</i>	18
1.3.1. Механізми формування антибіотикорезистентності <i>E. coli</i>	20
1.3.2. Особливості дії граміцидину S щодо <i>Escherichia coli</i>	22
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	24
2.1. Опис об'єкта і предмета дослідження.....	24
2.2. Реактиви, розчини, середовища й обладнання, використані в роботі.....	24
2.2.1. Реактиви і розчини.....	25
2.2.2. Поживні середовища	25
2.2.3. Обладнання	25
2.2.4. Витратні матеріали	26
2.3. Методи дослідження.....	27
2.3.1. Дослідження внутрішньоклітинної генерації АФК	27
2.3.1.1. Підготовка бактеріального інокуляту і стандартизація культури <i>E. coli</i>	27

2.3.1.2. Розкапування мікропланшета для визначення АФК	28
2.3.1.3. Статистична обробка даних внутрішньоклітинної генерації АФК ...	30
2.3.2. Дослідження синергічної взаємодії GS та бактеріофага T4	30
2.3.2.1. Нарощування та стандартизація фагового лізату	30
2.3.2.2. Метод «шахового» мікророзведення.....	32
2.3.2.3. Статистична обробка результатів	34
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	35
3.1. Оцінка внутрішньоклітинної генерації активних форм кисню в <i>E. coli</i> , індукованої граміцидином S	35
3.2. Оцінка синергічної антибактеріальної активності граміцидину S і бактеріофага T4 проти <i>Escherichia coli</i> K-12 DSM 498	38
3.3. Оцінка синергічної антибактеріальної активності граміцидину S і бактеріофага T4 проти <i>Escherichia coli</i> BW25113.....	42
3.4. Порівняння ефективності комбінованої антибактеріальної терапії залежно від штаму <i>E. coli</i>	45
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	48
ВИСНОВКИ.....	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	52

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АМП	– антимікробні пептиди
АФК	– активні форми кисню
ЕТЛ	– електронтранспортний ланцюг
КУО	– колонієутворювальні одиниці
DCFH-DA	– 2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетат (2',7'- d ichloro f luorescein d iacetate, DCFH-DA)
DMSO	– диметилсульфоксид (d imethyl s ulfo x ide, DMSO)
FICI	– індекс фракційної інгібуючої концентрації (f ractional i nhibitory c oncentration i ndex, FICI)
GS	– граміцидин S (g ramicidin S , GS)
HTA	– триптон-агар твердий (h ard t ryptone a gar, HTA)
LB агар	– агар Лурія–Бертані (L uria– B ertani agar, LB агар)
MHB	– бульйон Мюллера–Гінтона (M ueller– H inton b roth, MHB)
MIC	– мінімальна інгібуюча концентрація (m inimum i nhibitory c oncentration, MIC)
MOI	– множинність інфікування (m ultiplicity o f i nfection, MOI)
PBS	– фосфатно-сольовий буфер (p hosphate- b uffered s aline, PBS)
PFU	– бляшкоутворюючі одиниці (p laque- f orming u nits, PFU)
PMB	– поліміксин В (p oly m yxin B , PMB)
SMB	– SM буфер (S M b uffer, SMB)
STA	– триптон-агар м'який (s oft t ryptone a gar, STA)
TB	– триптонний бульйон (t ryptone b roth, TB)

- Tu – тiosечовина (thiourea, Tu)
- A. – *Aneurinibacillus*
- E. – *Escherichia*
- K. – *Klebsiella*
- P. – *Pseudomonas*

ВСТУП

Стрімке зростання кількості штамів мікроорганізмів, стійких до дії антибактеріальних препаратів, визнано Всесвітньою організацією охорони здоров'я однією з найбільших загроз для глобальної медичної системи. Згідно з даними звіту ВООЗ 2025 року, антибіотикорезистентність щороку спричиняє понад 1,1 мільйона смертей у різних регіонах [1]. Особливе занепокоєння викликають бактеріальні штами з множинною (MDR) та надзвичайною (XDR) резистентністю, оскільки вони ускладнюють лікування добре вивчених інфекцій, роблячи його тривалим і дороговартісним або неможливим. Особливу небезпеку становлять грамнегативні бактерії через особливості будови, зокрема *Escherichia coli*, рівень резистентності якої до основних терапевтичних агентів перевищує 40–70%, особливо в африканському, східноазійському та східносередземноморському регіонах [1]. Сьогодні існує гостра потреба в пошуку й запровадженні альтернативних методів боротьби з інфекціями через поступову втрату ефективності застосовуваних традиційних антибактеріальних препаратів.

Перспективною стратегією боротьби є використання антимікробних пептидів (АМП), серед яких особливе місце посідає грамцидин S (GS). АМП характеризуються широким спектром дії з множинними вторинними впливами, швидким бактерицидним ефектом і низькою імовірністю формування резистентності бактеріальних клітин. GS здатен порушувати цілісність цитоплазматичної мембрани бактеріальних клітин, що робить його високоактивним проти грамнегативних і грампозитивних бактерій. Однак механізми дії цього циклічного декапептиду і, як наслідок, можливості його використання як компонента комбінованої терапії потребують детальнішого вивчення, що визначає **актуальність роботи**. Особливо поширеним у науковій спільноті є комбіноване застосування АМП та бактеріофагів для посилення адсорбції віріонів та подолання захисних бар'єрів бактеріальної клітини. Така терапія характеризується високою специфічністю й зменшеним ризиком появи побічних наслідків у пацієнтів.

Метою роботи є дослідження закономірностей внутрішньоклітинної генерації активних форм кисню (АФК), індукованої мембраноактивним пептидом граміцидином S, та потенціалу його взаємодії з бактеріофагом T4 у пригніченні росту штамів *E. coli*.

Для реалізації поставленої мети було визначено такі **завдання**:

1. Оцінити рівень внутрішньоклітинної генерації АФК у клітинах *E. coli* під впливом GS;
2. Встановити характер дозозалежного впливу GS на інтенсивність індукції оксидативного стресу та визначити критичні концентрації пептиду, що призводять до дестабілізації антиоксидантного балансу бактеріальних клітин і запуску окисно-відновного каскаду реакцій;
3. Проаналізувати індивідуальну антибактеріальну активність антибіотика GS і бактеріофага T4 щодо модельних лабораторних штамів *E. coli* K-12 DSM 498 та BW25113;
4. Дослідити комбінований вплив пептиду та бактеріофага на ріст і життєздатність клітин *E. coli*, зокрема оцінити характер їхньої взаємодії та визначити ступінь посилення антибактеріальної дії;
5. Здійснити порівняльний аналіз чутливості досліджуваних штамів *E. coli* до дії GS і бактеріофага T4.

Об'єкт дослідження – процеси пригнічення життєдіяльності й механізми антибактеріальної дії GS на клітини *E. coli* за умов індивідуального та комбінованого з бактеріофагом T4 впливу.

Предмет дослідження – рівні внутрішньоклітинної генерації АФК, динаміка бактеріального росту і показники синергічної взаємодії GS та бактеріофага T4 щодо лабораторних штамів *E. coli* K-12 DSM 498 і BW25113.

Методологічну основу роботи становить комплекс підходів, що включає флуоресцентний мікропланшетний аналіз для детекції оксидативного стресу під впливом антибіотика GS, метод кінетичної спектрофотометрії для моніторингу росту бактеріальної популяції, а також метод «шахового» мікророзведення з

використанням комбінованої антимікробної терапії й статистичну обробку отриманих даних.

Експериментальна частина роботи була виконана на базі мікробіологічної лабораторії Інституту біологічних інтерфейсів (IBG-2) Технологічного інституту Карлсруе (Karlsruhe Institute of Technology, KIT), м. Карлсруе, Німеччина. Авторка кваліфікаційної роботи висловлює щиру вдячність доктору Сергію Афоніну й Ірині Семчук за всебічну методичну підтримку і допомогу.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика антимікробних пептидів

Відкриття дефензинів і цекропінів у 1980-х рр. стало поштовхом до активного вивчення механізмів дії та можливих напрямів застосування антимікробних пептидів (АМП) [2]. Ці захисні пептиди господаря є компонентом його вродженого імунітету, який захищає організм від вірусів, бактерій, грибів і паразитів. Сьогодні АМП розглядаються як перспективний інструмент у боротьбі з розвитком глобальної антибіотикорезистентності завдяки розширенню спектра методів можливої терапії.

АМП зазвичай містять у своєму складі 12–50 залишків амінокислот, з яких щонайменше два мають позитивний заряд (лізин, аргінін і гістидин за кислого рН) [3]. Амфіфільні властивості молекул АМП також забезпечуються наявністю гідрофобних залишків, що складають щонайменше половину всього амінокислотного складу. Такі особливості первинної структури АМП забезпечують здатність до асоціації з біологічними мембранами. Вторинна структура АМП визначає їхню класифікацію на чотири групи: α -спіральні пептиди; β -структуровані пептиди з двома і більше дисульфідними містками; β -шпилькові або петльові пептиди, які стабілізуються циклізацією основного ланцюга чи одним дисульфідним містком; пептиди з розширеною структурою без чіткої впорядкованості [4]. У водному середовищі в незв'язаному стані АМП переважно мають нестабільну структуру й набувають її внаслідок взаємодії з мембранами [5].

За механізмом дії й основною мішенню впливу АМП умовно ділять на мембранолітичні та немембранолітичні. Мембранолітичні АМП призводять до загибелі клітини через порушення цілісності цитоплазматичної мембрани з подальшим виходом вмісту цитоплазми назовні. Розрив мембрани у даному випадку може відбуватися різними способами: за моделлю «бочкової клежки» з

утворенням трансмембранних каналів; за «килимовою» моделлю з дестабілізацією мембрани за рахунок щільного покриття її поверхні АМП; за тороїдальною чи дезорганізованою моделлю, які характеризуються утворенням стабільних і нестабільних пор відповідно [6]. Немембранолітичні АМП не викликають серйозних пошкоджень цитоплазматичних мембран, проте здатні проникати всередину клітини й спричиняти порушення реалізації етапів центральної молекулярної догми через пригнічення синтезу ДНК, РНК, білків, а також зміни активності клітинних ферментів. Одним із факторів дії немембранолітичних АМП також є порушення синтезу мембрани [7].

Під час взаємодії з мембранами клітин АМП утворюють електростатичні взаємодії з негативно зарядженими молекулами фосфатидилсерину, гангліозидів чи О-глікозильованих муцинів, які переважно є структурними складовими мембран бактерій [6]. Саме це є однією з основних характеристик АМП, що забезпечує селективність взаємодії з клітинами-мішенями, а не клітинами ссавців, мембрани яких здебільшого є електронеутральними через домінування цвіттеріонних фосфоліпідів. Однак в організмах господарів АМП здатні модулювати імунну відповідь через регуляцію експресії генів, стимуляцію синтезу хемокінів і опосередкування запальних реакцій організму [8, 9]. Описана вище багатofакторність дії АМП значно зменшує імовірність розвитку резистентності клітин-мішеней порівняно з антибіотиками, що пояснює їх широке використання в клінічній практиці (ванкоміцин, даптоміцин тощо).

1.2. Граміцидин S: структура, біологічні властивості та механізм дії

1.2.1. Структура і біологічні функції граміцидину S

Грамицидин S є одним із класичних представників пептидних антибіотиків бактеріального походження, який був відкритий у середині ХХ століття. GS був виділений з ґрунтової грампозитивної бактерії *Aneurinibacillus migulanus* й активно використовувався під час Другої світової війни для обробки ран військових його

спиртовим розчином [10]. Для бактерії *A. migulanus* цей АМП є ефективним засобом міжвидової конкуренції завдяки пригніченню росту чутливих штамів бактерій. Однак GS також є регулятором життєвого циклу бактерії через сприяння витривалості спор до зміни температур і контроль формування типової лаг-фази проростання [11]. Синтез GS відбувається на внутрішній поверхні цитоплазматичної мембрани за допомогою мультиферментних комплексів – нерибосомних пептидсинтетаз. Особливу роль у формуванні цілісної структури молекули відіграють білкові комплекси GrsA та GrsB. Вони беруть участь у послідовному приєднанні амінокислот і наступній циклізації. Синтезований GS накопичується у вигляді гранул, у яких він утворює комплекси з фосфагенними сполуками, що вказує на енергетичну функцію пептида через стабілізацію високоенергетичних зв'язків у клітинах бактерій [12, 13].

Структурно граміцидин S – циклічний декапептид, що описується формулою цикло-(Val–Orn–Leu–D-Phe–Pro)₂. На відміну від більшості АМП, GS зберігає стабільну конформацію у водних розчинах завдяки високій структурній компактності і впорядкованості та конформаційній стабільності. Структура молекули GS представлена на рисунку 1.1.

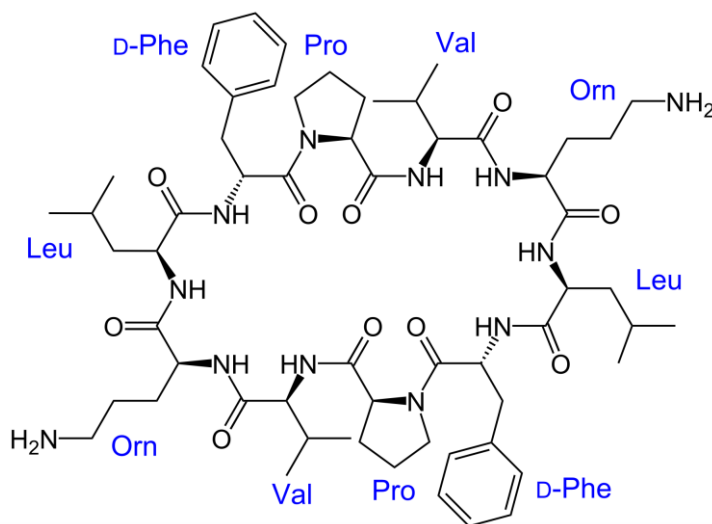


Рисунок 1.1. Структура граміцидину S

Фрагменти молекули, що складаються з поєднання амінокислотних залишків Val–Orn–Leu, формують антипаралельний β -шар, який стабілізується водневими зв'язками між залишками валіну та лейцину. β -повороти, які утворюються залишками D-фенілаланіну й проліну, також забезпечують жорсткість і симетричну будову молекули.

Промислове виробництво GS провадять шляхом глибинного культивування *A. niger* у біореакторах. Бактерії синтезують його лише при переході в стаціонарну фазу росту. GS виділяють із культуральної рідини і біомаси багатоетапним очищенням: центрифугування для первинного відокремлення клітин; екстрагування органічними розчинниками; осадження, хроматографічні методи чи перекристалізація для якісного очищення продукту [14, 15].

1.2.2. Молекулярні механізми дії граміцидину S

Ефективність бактерицидної дії GS визначається його багатовекторністю, оскільки включає механічні порушення цілісності мембран бактерій різного ступеня, інгібування основних білкових процесів, насамперед пов'язаних з поділом бактеріальних клітин, і дефективне функціонування електронтранспортного ланцюга (ЕТЛ) [16]. Така мультифокальність дії антибіотика робить його одним із найбільш ефективних антимікробних агентів, оскільки бактеріям важко адаптуватися й виробляти ефективні механізми резистентності до антибіотика, оскільки не існує єдиної мішені його дії.

Основним процесом, що визначає токсичність GS для бактеріальних клітин, є деструктивний вплив на мембрани, який пов'язаний із невідворотним руйнуванням архітектоники ліпідного шару і, як наслідок, позбавлення клітин їх первинного захисного бар'єра [17]. Молекули GS масово адсорбуються на поверхні бактерії через електростатичні взаємодії із негативно зарядженими ліпідами у складі мембрани. Накопичення молекул антибіотика початково дестабілізує мембрану, після чого GS вбудовується в ліпідний каркас і кінцево хаотизує його

впорядковану структуру [18]. Це призводить до втрати герметичної цілісності клітини, що стає причиною неконтрольованого витікання йонів (насамперед калію та протонів), порушення енергетичного метаболізму через зміни в електрохімічному градієнті [17]. У результаті таких перебудов і змін клітина бактерії втрачає здатність підтримувати гомеостаз, що призводить до її загибелі.

Застосування низки біофізичних підходів для дослідження етапності впливу GS на бактеріальні клітини (ЯМР-спектроскопія, рентгенівська дифракція тощо) призвело до розширення концепції механізму дії антибіотика. Окрім локальної дезорганізації мембрани, GS здатен до утворення впорядкованих нанорозмірних пор через накопичення молекул у мембрані чи утворювати канали змішаної природи, оскільки до них залучаються молекули GS і ліпіди мембрани. Це створює умови для відтоку йонів різного заряду та низки низькомолекулярних сполук назовні. Попри наявність доказів формування пороподібних утворень у мембранах бактерій, локальні безструктурні дефекти є частішими [19–22], що може свідчити про залежність характеру порушення мембрани від концентрації антибіотика, біохімічного складу мембрани й умов взаємодії між ними. Згідно з дослідженнями з використанням мічених залишків фтору й азоту серед міметиків GS було встановлено, що за малих концентрацій пептид накопичується на поверхні мембрани, а за великих – утворює пороподібні структури [20].

Ліпіди є основними мішенями бактерицидної дії GS, проте не єдиними, оскільки декапептид здатен спричиняти просторове порушення периферійних мембранних білків [22]. Критичними є зміна розташування протеїнів, пов'язаних з регуляцією й забезпеченням клітинного циклу та правильного формування мембрани. Зокрема, порушення локалізації білків MinD і DivIVA з вільного розташування до накопичення в певному компартменті призводить до зміни у встановленні поверхні поділу клітини [22]. Фосфоліпідсинтаза PlsX та глікозилтрансфераза MurG також можуть змінювати свою локалізацію на нефункціональну. Це унеможлиблює синтез нових компонентів бактеріальної

оболонки [23]. Усі можливі механізми дії GS на грампозитивну бактерію представлено на рисунку 1.2.

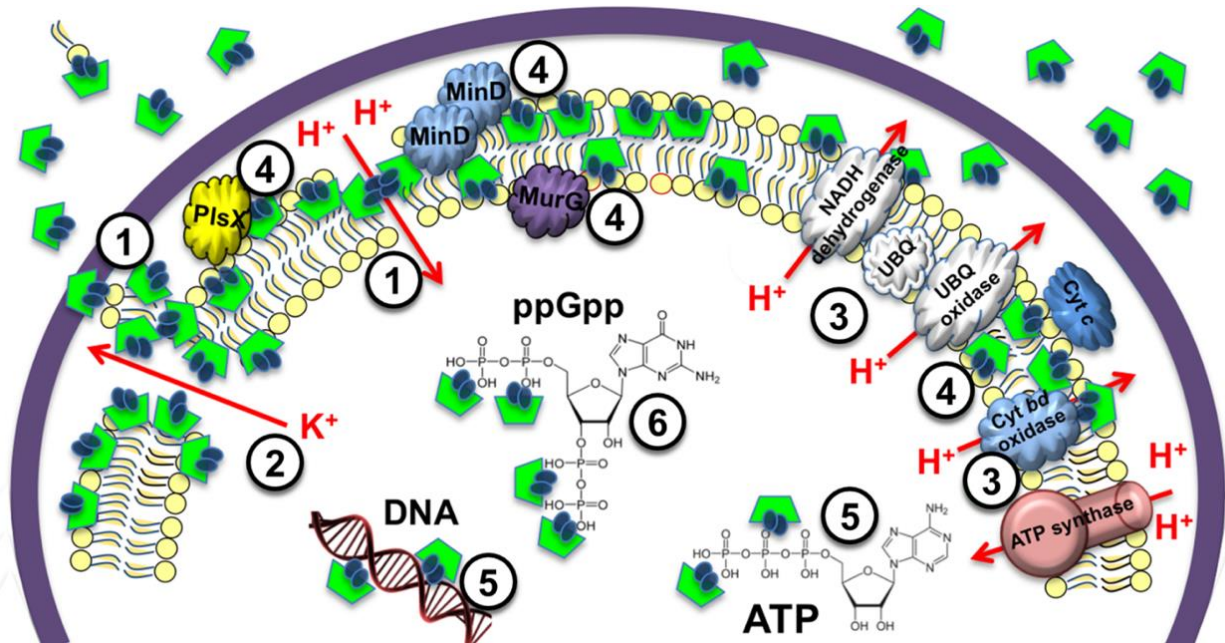


Рисунок 1.2. Основні мішені бактерицидної дії граміцидину S у грампозитивних бактерій, які включають (1) порушення цілісності цитоплазматичної мембрани; (2) дисбаланс іонів (витік K^+); (3) інгібування дихального ланцюга й порушення протонного градієнта; (4) пригнічення синтезу клітинної стінки і мембранних процесів; (5) інгібування синтезу ДНК і АТФ; (6) індукція стресової відповіді клітини (накопичення гуанозин тетрафосфату) [24]

У деяких наукових статтях висувуються гіпотези про вторинні ефекти GS, пов'язані з впливом на функціональну активність ЕТЛ з подальшим розвитком оксидативного стресу в клітині. Доведеним є вплив антибіотика на активність NADH-дегідрогенази та цитохромоксидази [24], що призводить до порушення синтезу АТФ і зміни енергетичного балансу бактеріальної клітини.

1.2.3. Клінічне застосування граміцидину S

Граміцидин S має селективну активність щодо грампозитивних і грамнегативних штамів бактерій, що пов'язано з топологією бактеріальних оболонок. Оскільки грампозитивні бактерії не мають зовнішньої мембрани, взаємодія антибіотика з цитоплазматичною мембраною є швидшою. Це підтверджується середніми значеннями мінімальної інгібуючої концентрації GS (MIC), що для *Staphylococcus aureus* та *Enterococcus faecium* варіюються в межах 3,9–7,8 мкг/мл (3,42–6,84 мкМ) [25]. Інтенсивна адсорбція декапептиду спостерігається вже при концентраціях близько 1–1,5 мкг/мл (0,88–1,31 мкМ) [22, 26]. Натомість наявність зовнішньої мембрани, багатой на ліпополісахариди, у грамнегативних бактерій робить доступ GS до ліпідів внутрішньої мембрани ускладненим. Адсорбція антибіотика спостерігається при 5–10 мкг/мл залежно від штаму (4,38–8,76 мкМ) [22, 26], а значення MIC для *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* та *Pseudomonas aeruginosa* лежать в межах 31,3–62,5 мкг/мл (27,4–54,8 мкМ) [25].

Синтезовані модифікаційні версії GS показують значно менші значення MIC проти грамнегативних бактерій: до 8–32 мкг/мл (7,01–28,1 мкМ) для *E. coli* або 16 мкг/мл (14 мкМ) для *K. pneumoniae* [25, 27–29]. Аналоги GS були покликані зменшити гідрофобність природної сполуки за рахунок заміни валіну і/або лейцину на орнітин і/або лізин. Також зміна кількості амінокислотних залишків у ланцюзі призводить до прояву різної функціональної активності: коротші структури (від 8 і менше амінокислот) проявляли інертність, довші на 2 амінокислоти не мали стабільної конфігурації. Однак міметик з 14-членним циклом за умови додаткової модифікації стереохімії показував збільшення терапевтичного індексу. До того ж, метилювання NH-груп і у бічних ланцюгах, і в зонах поворотів молекули призводило до перешкоджання утворення водневих зв'язків. Як наслідок, молекула втрачала свою ригідну структуру й амфіфільні властивості. Такі міметики демонстрували значно менші значення гемолітичної активності й, у результаті, вищі значення терапевтичного індексу [30]. Заміни неполярних залишків амінокислот на адамантил-вмісні, які характеризуються більшим об'ємом та

підвищеною гідрофобністю, спричиняли значне підвищення ефективності деяких аналогів GS [31]. Модифікації проліну, заміни фенілаланіну з синтезом імідазольних і триазольних міметиків, комплексні заміни дипептидних ділянок фенілаланіну-проліну переважно призводять до посилення біологічної активності пептиду [32–37]. Таким чином, основними факторами, які здатні впливати на чутливість бактерій до дії антибіотика, окрім доступності цитоплазматичної мембрани і її ліпідного складу, є структура антибіотика й співвідношення гідрофобних і гідрофільних зон між собою.

Окрім функціональної ефективності залежно від штаму бактерії, ще однією особливістю використання GS в антимікробній терапії є значна гемолітична активність. Це пов'язано з амфіфільною структурою антибіотика, що дозволяє ефективно взаємодіяти не тільки з бактеріальними, а й еукаріотичними мембранами. Згідно з дослідженнями, значення HC_{50} , тобто концентрація GS, яка викликає 50% гемолізу еритроцитів, становить близько 35,2 мкг/мл (30,9 мкМ). Враховуючи вказані вище значення МІС як для грампозитивних, так і грамнегативних бактерій (3,9–62,5 мкг/мл або 3,42–54,8 мкМ), терапевтичний індекс є досить вузьким (0,56–18,5) [25]. Загалом, для досягнення потрібного в терапії антимікробного ефекту треба використовувати концентрації, що часто наближаються до рівнів, близьких до руйнування еритроцитарної мембрани. Також GS може призводити до зміни форми тромбоцитів, їхнього набухання чи дезагрегації [38]. Обидва процеси є дозозалежними, оскільки зі збільшенням концентрації пептиду збільшується й гемоцитотоксичність [25, 38]. Це є основною причиною обмеженого застосування антибіотика в клінічній практиці. Системне використання унеможливлене, проте у місцевій терапії м'яких тканин, лікуванні очей і вуха є дієвим.

1.2.4. Використання грамїцидину S у комбінованій антибактеріальній терапії

Попри підвищену токсичність при системному використанні, GS вважається перспективним у можливості розробки його менш токсичних синтетичних аналогів (зміна заряду й гідрофобності молекул) та у складі комбінованої терапії. Насамперед це пов'язано із його здатністю порушувати цілісність мембрани – виступати у ролі пермеабілізатора, що сприяє проникненню іншого компонента терапії всередину бактеріальної клітини. Згідно з дослідженнями, використання GS дозволяє знизити MIC іншого антибіотика [24].

Одним із найбільш вивчених варіантів комбінованої терапії є поєднання GS з поліміксином В (PMB) проти грамнегативних бактерій, зокрема *P. aeruginosa*. За результатами досліджень при застосуванні такої комбінації спостерігався синергізм у 20 штамів, з яких 17 є мультирезистентними клінічними ізолятами. Значення індексу фракційної інгібуючої концентрації (FICI) коливалися від 0,36 до 0,70. MIC обох антибіотиків були значно зниженими у порівнянні з монотерапією. GS, імовірно, опосередковано впливав на всі АТФ-залежні процеси у бактеріальних клітинах навіть у суб-MIC через високу спорідненість до АТФ [39]. Оскільки значення для деяких ізолятів FICI перевищувало 0,5, тобто демонструвало адитивний, а не синергетичний ефект, індивідуалізований підбір комбінацій антимікробних препаратів є необхідним. Найбільше на ефективність синергії впливають особливості будови мембран клітин бактерій і фенотип малих колоній.

Окрім цього, комбінація GS з PMB значно підвищувала ефективність проти формування біоплівки (значення FICI = 0,375), знижуючи метаболічну активність бактеріальних клітин значно швидше і триваліше за поодинокі застосування [39]. Це має важливе практичне значення, оскільки біоплівки відіграють ключову роль у хронічних інфекціях та інфекціях, пов'язаних із медичними імплантатами.

Загалом, комбінована терапія з використанням АМП дозволяє використовувати ті антибіотики, до яких бактерії вже виробили різноманітні механізми резистентності. Також можна припустити, що деполяризація мембрани бактеріальних клітин, що відбувається під впливом GS, може блокувати роботу ефлюксних pomp, які мали б викачувати молекули антибіотиків назовні [16]. Щодо

гемолітичної активності GS, комбінована терапія дозволяє використовувати пептид у концентраціях 1–4 мкг/мл (0,88–3,5 мкМ), що знижує імовірність розвитку системної токсичності із збереженим терапевтичним ефектом [39].

Використання комбінованої терапії АМП з бактеріофагами вважається одним із найефективніших для подолання антибіотикорезистентності, оскільки фаги здатні адаптуватися разом з бактеріями, а пептид полегшує адсорбцію фагових частинок. У низці досліджень встановлено, що пептид-фаг терапія забезпечує зменшення бактеріального навантаження й остаточне блокування росту бактеріальних клітин [40], однак подібних досліджень з GS не проводилося. Таким чином, дослідження можливої синергічної взаємодії GS з бактеріофагами може значно зменшити МІС антибіотика, що зменшить його гемолітичну активність.

1.3. Характеристика і патогенний потенціал *Escherichia coli*

Escherichia coli є представником грамнегативних бактерій родини *Enterobacteriaceae* і в нормі входить до складу мікробіоти теплокровних тварин (приблизно 0,1 % від загальної кількості бактерій [41, 42]). Будучи факультативно анаеробною, кишкова паличка здатна адаптуватися до функціонування як за умов наявності, так і за відсутності кисню в навколишньому середовищі. Метаболічна активність бактерії є дуже пластичною, оскільки для вироблення енергії вона використовує широку номенклатуру субстратів і може переходити на змішано-кислотне бродіння за умов відсутності кисню [43]. За умов температурного оптимуму (37 °С) час генерації для *E. coli* становить 20 хв [44]. Пересування бактерії забезпечується перитрихіально розташованими джгутиками на поверхні всієї клітини [45].

Переважає більшість штамів *E. coli* є коменсальними, однак до патогенних належать ентеропатогенні (ЕПЕС), ентеротоксигенні (ЕТЕС) та ентерогеморагічні (ЕНЕС) штами [46]. За даними ВООЗ та глобальних досліджень, кишкова паличка спричиняє до 800–950 тисяч смертей щороку [47]. Патогенні штами можуть

викликати гострі шлунково-кишкові розлади, геморагічні коліти і гемолітико-уремічний синдром, що призводить до ниркової недостатності. Також одними із найпоширеніших є інфекції сечовивідних шляхів, оскільки адгезини *E. coli* дозволяють їй закріплюватися на епітелії, викликаючи цистит чи пієлонефрит [48]. Проникнення кишкової палички в кровотік викликає розвиток сепсису, а подолання гематоенцефалічного бар'єру може спровокувати розвиток бактеріального менінгіту [49].

На рисунку 1.3 представлені значення поширеності антибіотикорезистентності *E. coli*, яка визначалася методом дискової дифузії [50]. Для цього використовували ізоляти, отримані від людей, тварин і з харчових продуктів й навколишнього середовища. Рівні резистентності залежали від джерела ізолятів і типу антибіотика.

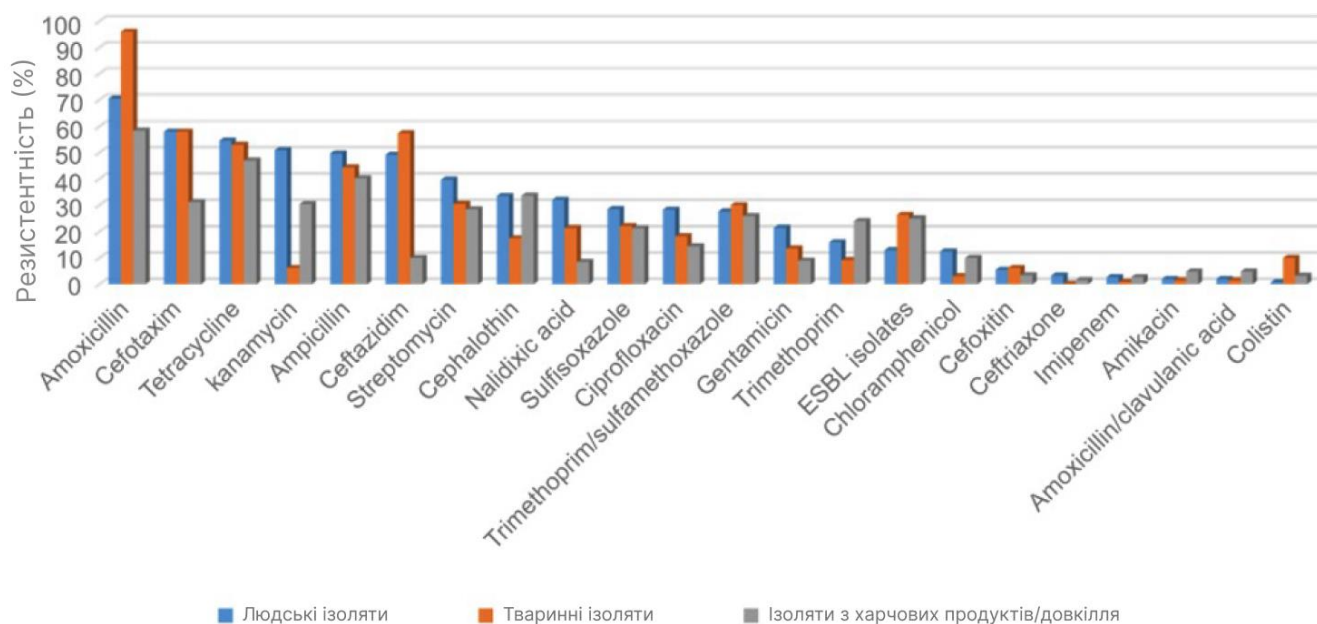


Рисунок 1.3. Рівні резистентності *E. coli* до антибіотиків у людських, тваринних й екологічних ізолятах, отриманих методом дискової дифузії [50]

Для всіх типів ізолятів найбільшими є рівні резистентності до амоксициліну, цефотаксиму й тетрацикліну, натомість найнижчими – до іміпенему, амікацину й комбінації амоксициліну з клавуліновою кислотою [50, 51].

1.3.1. Механізми формування антибіотикорезистентності *E. coli*

Висока здатність *E. coli* до адаптації, у тому числі формування механізмів антибіотикорезистентності, зумовлена структурними й метаболічними особливостями бактерії й підвищеною генетичною лабільністю. Найважливішим механізмом у зменшенні ефективності дії антибіотиків є їхня інактивація ферментами. Зокрема бактерія синтезує β -лактамази розширеного спектра дії (ESBL, особливо родини CTX-M), що здатні гідролізувати цефалоспорини III покоління, пеніциліни й монобактами [52]. Частота виявлення ESBL-продукуючих штамів становить від 30 до 50% залежно від регіону, найбільші показники характерні для Африки і південної Азії [53]. Особливу небезпеку становлять штами, які синтезують карбапенемази (наприклад, NDM-1, KPC), які здатні інактивувати антибіотики останньої лінії застосування. Рівень летальності, у разі наявності інфекції саме такими штамми кишкової палички, становить 40–50% [54].

Беззаперечно, клітинна оболонка *E. coli* значно обмежує доступ гідрофобних препаратів антимікробної терапії внаслідок наявності зовнішньої мембрани із ліпополісахаридами. Окрім цього, зміни, які можуть бути пов'язаними зі структурою і кількістю поринових білків (наприклад, OmpF і OmpC), підвищують рівень резистентності до β -лактамів [55, 56]. Також наявність ефлюксних насосів, що здатні виводити назовні низку антибіотиків, призводить до збільшення їхнього MIC [57]. Найбільш вивченим є механізм антибіотикорезистентності, що пов'язаний з функціонуванням насосу AcrAB-TolC родини RND-транспортерів [57, 58]. Наявність мутацій у регуляторних генах *marA* і *soxS* призводить до підвищеної активації чи експресії ефлюксних каналів [59].

Доведеним є механізм модифікації білків-мішеней, які залучені до функціональної дії антибіотиків. Наприклад, зміни у структурі рибосомальних білків чи метилювання рибосомальних РНК призводить до збільшення значень MIC антибіотиків першого, другого і третього покоління [60]. Наявні мутації в генах

gyrA та *parC* підвищують МІС ципрофлоксацину в декілька разів, причому виявлена пряма кореляція між кількістю накопичених мутацій і збільшенням значення МІС. Особливо ефективними у збільшенні рівня антибіотикорезистентності були штами з наявними щонайменше двома мутаціями в гені *gyrA* й супровідною мутацією в гені *parC* [61, 62].

Особливу увагу слід звертати на геномну пластичність кишкової палички, оскільки близько 20% генів геному бактерії є спільними для всіх її штамів. Процеси горизонтального перенесення генів стали причиною надбання приблизно 18% генетичного матеріалу бактерії [63]. Наприклад, кон'югація за допомогою плазмід між різними штамми часто стає причиною набуття генів ESBL або карбапенемаз, кон'югація гена *mcr-1* забезпечує формування резистентності до колістину, а саме зростання МІС до 16 мкг/мл (14 мкМ) [64]. Трансдукція завдяки бактеріофагам може призвести до інтеграції гена шига-токсину й появи високопатогенних штамів, таких як O157:H7 [65]. Також наявність плазмідних генів *qnrA* та *qnrB* забезпечуює виживання *E. coli* під дією антибіотиків групи хінолонів, зокрема ципрофлоксацину. Також у дослідженні 2020 року підтверджено передачу резистентності між людьми і тваринами через харчовий ланцюг [66]. Наявність інтронів і транспозонів також впливає на розвиток антибіотикорезистентності клітин кишкової палички. Вони здатні накопичувати гени, які беруть участь в адаптаційних механізмах, і вбудовувати їх у бактеріальний геном. Наприклад, наявність інтронів першої групи часто описується внаслідок дослідження геномів клінічних ізолятів *E. coli*. Такі бактерії виявляють мультирезистентність до аміноглікозидів, сульфаніламідів і β -лактамів [66].

Окремо у літературі виділяють формування біоплівки, що збільшує антибіотикорезистентність у деяких штамів. Це пов'язано із унеможливленням дифузії молекул антибіотиків крізь біоплівку й сильною зміною у метаболітичній активності бактерій у сторону її уповільнення. Наприклад, для ципрофлоксацину було доведено, що бактерії у складі біоплівки здатні виживати навіть при концентраціях, які в десятки разів перевищують МІС (до 130 \times) [67]. Формування

персистентних клітин (клітини, що не піддаються змінам генетичного апарату, а проявляють тимчасову толерантність до дії антибактеріальних препаратів) є додатковим механізмом у багатofакторній системі антибіотикорезистентних пристосувань *E. coli*. Ці клітини тривалий час здатні перебувати у стані метаболічного спокою, тому дія антибіотиків є малоефективною. Після завершення дії антимікробних агентів ці клітини відновлюють ріст і спричиняють рецидив інфекції, що особливо небезпечно у клінічній практиці.

1.3.2. Особливості дії грамїцидину S щодо *Escherichia coli*

Досліджень дії грамїцидину S на *E. coli* у науковій літературі описано небагато. Складність впливу антибіотика на клітини кишкової палички полягає в потребі руйнування трьох шарів, а саме цитоплазматичної й зовнішньої мембран й пептидогліканового шару. GS діє як мембранотропний агент, який спричиняє локальні порушення мембрани з подальшим витоком йонів калію й зміною мембранного потенціалу.

З метою визначення основних властивостей декапептиду, які забезпечують його ефективність проти *E. coli*, було проведене порівняння його дії з димером сполуки 48/80 (результат конденсації N-метил-p-метоксифенілетиламіну з формальдегідом) [68]. Обидві сполуки є полікатионними, амфифільними й циклічними. Однак димер здатний порушувати структуру лише зовнішньої мембрани за рахунок витіснення йонів магнію і кальцію з ділянок, які визначають зв'язування з ліпополісахаридами. У свою чергу GS завдяки β -складчастій структурі здатен порушувати цілісність цитоплазматичної мембрани і дозволяє гідрофобним антибіотикам, таким як нігеріцин і грамїцидин D, проникати всередину клітини. Інгібування росту кишкової палички за дії GS було зафіксовано вже при 6 мкг/мл (5,3 мкМ), однак критична концентрація міцелоутворення для GS становить 400 мкг/мл або 352 мкМ (для димера ці значення становили понад 200 мкг/мл і 800 мкг/мл відповідно або 286 мкМ і 1140 мкМ) [69]. Це доводить те,

що руйнування клітин пов'язане із зміною структури й властивостей ліпідного шару мембрани, а не її повним руйнуванням за рахунок повного розчинення.

Також характерною особливістю дії GS є вихід йонів калію, який відбувається без затримки після додавання декапептиду, як у РМВ (час затримки становить 30 секунд). Крива виходу катіонів практично ідентична кривій зниження життєдіяльності клітин. За концентрації 25 мкг/мл (22 мкМ) вихід усього пулу калію з клітини відбувається за декілька хвилин. До того ж, витік катіонів відбувається вже при 20 °С, на відміну від 30 °С, що характерно для РМВ [69, 29].

Узагальнюючи наведену вище інформацію, виникає необхідність у розробці нових підходів до терапії інфекцій, спричинених *E. coli*. Особливо перспективними є комбіновані засоби із застосуванням бактеріофагів для подолання антибіотикорезистентності й зниження рівня ускладнень і летальності.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Опис об'єкта і предмета дослідження

Об'єктом даного дослідження було обрано молекулярно-клітинні механізми антибактеріальної дії мембраноактивного пептиду GS щодо *E. coli* за умов монотерапії та комбінованого застосування з бактеріофагом T4. Особливу увагу було приділено змінам функціонального стану клітин, що виникають у відповідь на дію досліджуваних агентів, включаючи порушення структурної цілісності клітинних мембран, індукцію оксидативного стресу, а також пригнічення росту і проліферативної активності бактерій.

Як модельні об'єкти дослідження використовували грамнегативні бактерії *E. coli* (штами K-12 DSM 498 та BW25113), надані лабораторією Інституту біологічних інтерфейсів Технологічного інституту Карлсруе, Німеччина. Ці штами широко застосовуються у мікробіологічних та молекулярно-біологічних дослідженнях як стандартні тест-системи. Окрім бактеріальних культур, у роботі застосовувався бактеріофаг *Enterobacteria phage* T4 (ATCC, 11303-B4) – літичний вірус родини *Myoviridae*, специфічний до клітин *E. coli*, який є класичною моделлю для вивчення фаг-бактеріальних взаємодій і механізмів антибактеріальної дії.

Предметом дослідження були рівні внутрішньоклітинної генерації АФК, динаміка росту бактеріальних культур і показники взаємодії між GS і бактеріофагом T4 щодо лабораторних штамів *E. coli* K-12 DSM 498 і BW25113. Окремо досліджувався характер цієї взаємодії, зокрема можливість виникнення синергічного ефекту при їхньому комбінованому застосуванні.

2.2. Реактиви, розчини, середовища й обладнання, використані в роботі

2.2.1. Реактиви і розчини

- Граміцидин S гідрат (CAS N. 113-73-5, Sigma-Aldrich, США);
- 2',7'-дихлорфлуоресцеїн діацетат, DCFH-DA (CAS N. 4091-99-0, Sigma-Aldrich, США);
- Поліміксин В сульфат, PMB (CAS N. 1405-20-5, Sigma-Aldrich, США);
- Тіосечовина, Tu (CAS N. 62-56-6, Sigma-Aldrich, США);
- Диметилсульфоксид, DMSO (CAS N. 67-68-5, BIOMUS, Польща);
- Резазурин натрієва сіль (CAS N. 62758-13-8, Sigma-Aldrich, США);
- Фосфатно-сольовий буфер, PBS (Thermo Scientific, США);
- Магній сульфат (CAS N. 7487-88-9, Sigma-Aldrich, США).

2.2.2. Поживні середовища

- Агар Лурія–Бертані, LB агар (NaCl – 5 г/л, дріжджовий екстракт – 5 г/л, триптон/пептон – 10 г/л, агар – 20 г/л, Sigma-Aldrich, США);
- Бульйон Мюллера–Гінтона, МНВ (м'ясний екстракт – 2 г/л, кислотний гідролізат казеїну – 17,5 г/л, крохмаль – 1,5 г/л, Sigma-Aldrich, США);
- Триптонний бульйон, ТВ (NaCl – 5 г/л, триптон/пептон – 10 г/л, Sigma-Aldrich, США);
- Триптон-агар твердий 1,5%, НТА (NaCl – 5 г/л, триптон/пептон – 10 г/л, агар – 15 г/л, Sigma-Aldrich, США);
- Триптон-агар м'який 0,7%, СТА (NaCl – 5 г/л, триптон/пептон – 10 г/л, агар – 7 г/л, Sigma-Aldrich, США);
- SM буфер, SMB (NaCl – 5 г/л, магній сульфат семиводний – 1,98 г/л, Tris-основа – 5 г/л, Sigma-Aldrich, США).

2.2.3. Обладнання

- Ламінарні шафи класу II (Labogene A/S, Данія);
- Стаціонарні термостати IN30 (Memmert GmbH, Німеччина);

- Термошейкер 15005 (OHAUS, США);
- Орбітальний шейкер BT909-D (LabTech, Китай);
- Спектрофотометр SmartSpec 3000 UV/VIS (Bio-Rad, США);
- Центрифуга Medifuge (Thermo Scientific, США);
- Лабораторна настільна центрифуга SPIN PLUS XC-3000 (MPW Med. Instruments, Польща);
- Вортекс Vortex-Genie (Scientific Industries, США);
- Аналітичні ваги Radwag AS 220.R2 (RADWAG, Польща);
- Компактні лабораторні ваги MWP-N (RADWAG, Польща);
- Мікропланшетний рідер Tecan Spark (Tecan Group Ltd., Швейцарія);
- Водяні бані Memmert WTB50 (Mettler, Німеччина);
- Мікрохвильова піч;
- Холодильні й морозильні шафи;
- Електронний дозатор-контролер Pipet4U OASIS (F.L. Medical, Італія);
- рН-метр;
- газовий пальник;
- автоклави.

2.2.4. Витратні матеріали

- Одноканальні й багатоканальні автоматичні піпетки 0,1–2 мкл, 2–20 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл, 1–5 мл (Eppendorf, Німеччина);
- 96-лункові мікропланшети (Falcon, США);
- Чашки Петрі (Sarstedt, Німеччина);
- Наконечники для автоматичних піпеток різного об'єму з фільтром і без (Starlab, Німеччина);
- Мікроцентрифужні пробірки 1,5 і 2 мл (Eppendorf, Німеччина);
- Пластикові флакони об'ємом 15 і 50 мл (Corning-Falcon, США);
- Шприцеві фільтри 0,22 мкм (Millipore-Merck, Німеччина);

- Парафільм М (Bemis Company Inc., США);
- Кювети (Brand GmbH, Німеччина);
- Резервуари для багатоканальних піпеток 10 і 25 мл (Integra Biosciences, Швейцарія);
- Скляні культуральні пробірки і колби (Duran Group, Німеччина);
- Плівки для мікропланшетів (Thermo Scientific, США);
- Штативи для пробірок;
- Дезінфекційний засіб Meliseptol rapid (B. Braun Melsungen AG, Німеччина);
- Мікробіологічні петлі;
- Рукавички.

2.3. Методи дослідження

2.3.1. Дослідження внутрішньоклітинної генерації АФК

2.3.1.1. Підготовка бактеріального інокуляту і стандартизація культури *E. coli*

Для проведення досліджень використовували нічну культуру *E. coli*, яку попередньо засівали на тверде поживне середовище LB агар з використанням мікробіологічної петлі та інкубували протягом 20–24 годин при температурі 37 °С у термостаті. Одну ізольовану колонію переносили у 5 мл стерильного бульйону МНВ 1×, попередньо профільтрованого через шприцевий фільтр з діаметром пор 0,22 мкм або автоклавованого. Культивування проводили у стерильних скляних флаконах у термошейкері при 37 °С і швидкості обертання 270–290 об/хв протягом 2–3 годин до досягнення середньо-логарифмічної фази росту. Контроль росту бактеріальної культури здійснювали шляхом вимірювання оптичної щільності суспензії при довжині хвилі 600 нм на спектрофотометрі. Робочу суспензію доводили до значення $OD_{600} = 0,5$, що відповідає концентрації клітин приблизно 10^8 КУО/мл, шляхом розведення свіжим середовищем МНВ 1× [70].

2.3.1.2. Розкапування мікропланшета для визначення АФК

Отриману клітинну суспензію центрифугували при $5000 \times g$ протягом 5 хвилин при температурі $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Супернатант видаляли, а клітинний осад тричі промивали стерильним PBS 1×. Після фінального промивання бактерії ресуспендували у PBS 1× і перевіряли кінцеве значення оптичної щільності OD₆₀₀.

Далі вихідний стоковий розчин DCFH-DA (10 мМ) готували у 100% DMSO, який безпосередньо перед роботою розводили до концентрації 1 мМ. Також готували розчин тіосечовини (1,2 М у воді MilliQ) і розчин PMB (16,5 мкМ у PBS 1×) [71]. Робочий розчин GS (1024 мкМ) готували безпосередньо перед розкапуванням плашки у два етапи: у 100% DMSO до досягнення концентрації 51,2 мМ і в PBS 1× до досягнення цільової концентрації з обов'язковим інтенсивним вортексуванням для запобігання агрегації молекул декапептиду. Перед внесенням розчину GS у лунки мікропланшета проводили повторне вортексування з метою мінімізації утворення агрегатів і подальшого спотворення результатів спектрофотометричного вимірювання.

Після підготовки робочих розчинів усіх компонентів клітинну суспензію розділяли: частина не змішувалася з DCFH-DA, тоді як інша інкубувалася зі зондом протягом 30 хвилин при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ у темряві для забезпечення проникнення речовини в клітини та її деацетилювання внутрішньоклітинними естеразами. Кінцева концентрація зонда в клітинній суспензії становила 10 мкМ [71, 72]. Після інкубації клітини центрифугували при $4000 \times g$ протягом 4 хвилин при $4 \text{ }^\circ\text{C}$ для повного видалення надлишку барвника, супернатант зливали і ресуспендували осад у PBS 1×, обережно перемішуючи клітинну суспензію піпетуванням.

Розкапування проводили у стерильні 96-лункові мікропланшети, досягаючи об'єму 200 мкл у кожній лунці. Схема загального розкапування представлена на рисунку 2.1. Роботу розпочинали з серійних розведень GS по 50 мкл у 50 мкл

PBS 1×, починаючи зі стовпчика 2 до 10 з використанням автоматичної багатоканальної піпетки. Таким чином, у лунках першого стовпчика загальна концентрація GS становила 256 мкМ. Після цього додавали по 100 мкл суспензії фарбованих бактерій у всі використовувані лунки. Для досягнення 200 мкл об'єму додавали по 50 мкл PBS 1×. Останніми розкапували контролю, що включали: негативний контроль (бактерії, інкубовані зі зондом, але без GS), контроль відновлення АФК тіосечовиною, позитивний контроль з РМВ, а також контролю автофлуоресценції клітин без попередньої інкубації зі зондом та GS і фонового сигналу використовуваного середовища (МНВ 1× і PBS 1×). Після розкапування усіх компонентів мікропланшет герметизували плівкою й інкубували 30 хвилин при 37 °С у термостаті, мінімізуючи потрапляння світла.

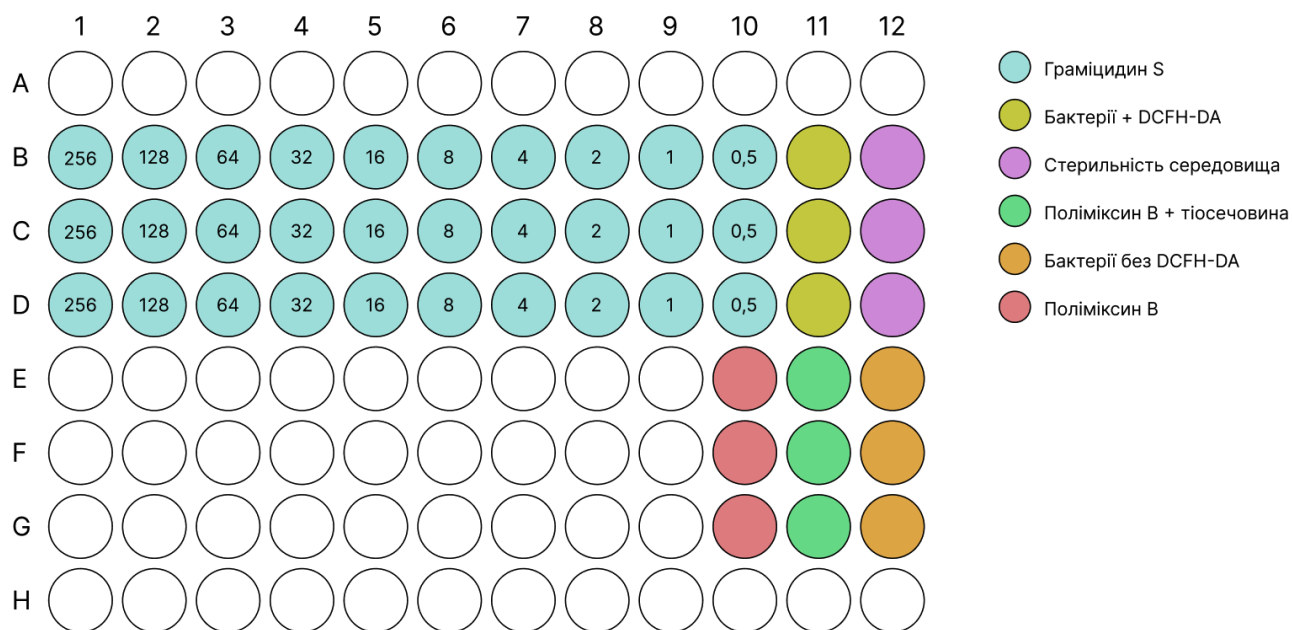


Рисунок 2.1. Схема розподілу компонентів реакційної суміші для аналізу генерації АФК. У лунках, позначених «Граміцидин S», проводили серійне розведення, починаючи з другого стовпчика. За потреби крайові лунки заповнювали 200 мкл PBS 1× з метою мінімізації випаровування і спотворення результатів вимірювань

Реєстрацію інтенсивності флуоресценції здійснювали за допомогою мікропланшетного рідера при довжині хвилі збудження 488 нм й емісії 525 нм [71–73]. Перед початком вимірювання планшет витримували за кімнатної температури протягом 1–2 хвилин для уникнення утворення конденсату. Також за потреби дно мікропланшета протирали безворсовою серветкою, змоченою 80% етанолом.

2.3.1.3. Статистична обробка даних внутрішньоклітинної генерації АФК

Статистичну обробку експериментальних даних проводили у GraphPad Prism 10.0 з урахуванням того, що всі вимірювання виконували у трьох незалежних повторях. Початкові значення інтенсивності флуоресценції, виражені в одиницях відносної флуоресценції, коригували шляхом віднімання фонового сигналу середовища для усунення впливу неспецифічної флуоресценції. Після цього дані нормалізували, а саме за 0% приймали значення флуоресценції середовища, тоді як за 100% – сигнал позитивного контролю РМВ.

Далі отримані дані оцінювали на відповідність нормальному розподілу за допомогою тесту Шапіро–Вілка. Також проводили перевірку однорідності дисперсій між групами, використовуючи для цього критерій Левена. За умови виконання цих припущень подальший аналіз проводили із застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA), що дозволяло оцінити статистично значущі відмінності між дослідними групами. Результати обробки подавали у вигляді середнього значення і стандартного відхилення, а для наочності представляли у формі гістограм.

2.3.2. Дослідження синергічної взаємодії GS та бактеріофага T4

2.3.2.1. Нарощування та стандартизація фагового лізату

Нарощування фагів проводили з використанням заздалегідь приготованих клітинних суспензій штамів *E. coli* K-12 DSM 498 і BW25113, які вирощували у

рідкому середовищі МНВ 1× при 37 °С і 250 об/хв на термошейкері протягом ночі. Отриману культуру інокулювали у ТВ та інкубували до досягнення експоненційної фази росту ($OD_{600} = 0,4$), контролюючи оптичну щільність за допомогою спектрофотометра кожні 30 хвилин до досягнення $OD_{600} = 0,3$, далі кожні 10 хвилин. Клітини осаджували центрифугуванням (10 хвилин, $3000 \times g$, 4 °С), ресуспендували у ТВ, доповненому 10 мМ $MgSO_4$, і стандартизували до $OD_{600} = 2$. Підготовлену бактеріальну суспензію використовували одразу або зберігали при 4 °С протягом одного тижня.

Паралельно готували агаризовані середовища, попередньо розплавлені у мікрохвильовій печі: НТА розливали у чашки Петрі по 20 мл автоматичною піпеткою, а СТА – у скляні пробірки по 3–4 мл і підтримували у рідкому стані у водяній бані при 60 °С.

Нарощування фагів проводили методом подвійного агарового шару. Для цього бактеріальну суспензію змішували з відповідним розведенням фагового стоку й інкубували при 37 °С для адсорбції. Після цього суміш додавали до СТА, обережно вортексували на невеликих обертах і рівномірно наносили на поверхню НТА, очікуючи повного застигання. Чашки Петрі інкубували перевернутими при 37 °С протягом 16–24 годин до формування зон лізису. Далі для отримання фагового лізату на поверхню агару в чашках Петрі додавали 3–4 мл SMB й інкубували при кімнатній температурі на орбітальному шейкері протягом 2 годин для елюції фагових частинок. Отриману суспензію переносили у 2 мл епандорфи, очищали від клітинних залишків центрифугуванням (10 хвилин, $4500 \times g$) і фільтрували. Очищений фаговий лізат зберігали при 4 °С до подальшого використання.

Стандартизацію фагового лізату проводили методом plaque-тесту із застосуванням серійних десяткових розведень у SMB. Готові розведення змішували із стандартизованою бактеріальною суспензією та інкубували 15 хвилин при 37 °С для адсорбції. Суміш вносили у скляні пробірки з СТА і наносили на поверхню НТА у чашках Петрі, після чого інкубували при 37 °С протягом 16–24 годин. Тест

починали з розведень 7-, 8-, 9-ого порядків, за потреби використовували менші порядки. Для розрахунків використовували ті чашки Петрі, у яких налічувалося від 30 до 300 бляшок [74]. Кількість утворених бляшок використовували для розрахунку титру фагів у PFU/мл:

$$\text{PFU/мл} = \frac{\text{кількість бляшок}}{\text{об'єм посіяного розчину (мл)} \times \text{розведення}}$$

МІС бактеріофагів визначали із використанням мікропланшетного аналізу з реєстрацією росту бактерій. Бактеріальні культури вирощували у середовищі МНВ 1×, стандартизували за оптичною щільністю й доводили до концентрації 10^6 клітин/мкл шляхом послідовних розведень у МНВ 2×. Фагові препарати серійно розводили у SMB у 2 мл еппендорфах із подальшим вортексуванням, після чого вносили у лунки мікропланшета разом із бактеріальною суспензією, включаючи необхідні контролю стерильності середовища, бактерій і бактеріофагів. Мікропланшет герметизували плівкою, інкубували при 37 °С з подальшим спектрофотометричним вимірюванням і додатково вносили розчин резазурину (робочий розчин 80 мкМ) для оцінки метаболічної активності клітин.

2.3.2.2. Метод «шахового» мікророзведення

Бактеріальні культури *E. coli* K-12 DSM 498 або BW25113 вирощували у середовищі МНВ 1× у термошейкері протягом 3–4 годин. Отримані культури стандартизували центрифугуванням ($6000 \times g$, 2 хвилини) з подальшим ресуспендуванням у стерильному МНВ 2× і доведенням до кінцевої концентрації 10^6 КУО/мл. Перед використанням бактеріальну суспензію витримували на льоду.

Робочий розчин GS готували за принципом, описаним у підрозділі 2.3.1.2. У мікропланшеті формували градієнт концентрацій GS шляхом серійного двократного розведення по вертикалі із використанням PBS 1× автоматичною багатоканальною піпеткою. Фагові препарати серійно десятикратно розводили у SMB в окремих еппендорфах, після чого вносили у мікропланшет по горизонталі,

формуючи відповідний градієнт концентрацій фага. Внесення бактеріофага здійснювали від найбільшого до найменшого розведення для мінімізації можливої контамінації. Після попередньої підготовки мікропланшета у всі дослідні й контрольні лунки вносили стандартизовану бактеріальну суспензію по 100 мкл, щоб кінцева концентрація становила приблизно 10^5 КУО/мл [75–77].

В експерименті було враховано низку контрольних зразків, наприклад, контроль стерильності середовища, фагового стоку та GS, що дозволяло виключити можливу контамінацію. Окремо використовували контроль росту бактерій і контроль взаємодії бактерій з бактеріофагами без GS. Схема розкапування представлена на рисунку 2.2.

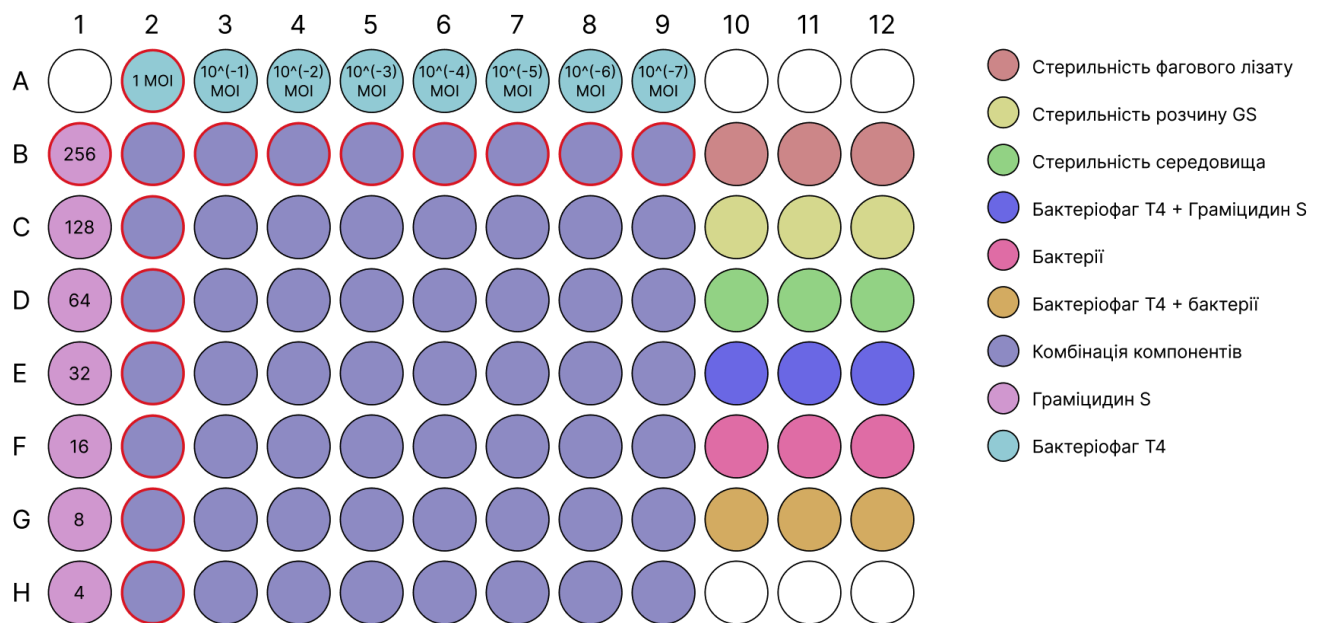


Рисунок 2.2. Схема розподілу компонентів у 96-лунковому мікропланшеті для дослідження синергічної взаємодії граміцидину S і бактеріофага T4. Лунки, розташовані в межах червоного обведення й нижче, містили комбінації GS і бактеріофага T4

Мікропланшет герметизували плівкою й інкубували у мікропланшетному рідері при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ з одночасною кінетичною реєстрацією росту бактерій при 600 нм кожні 30 хвилин. Після 24 годин інкубації для додаткової оцінки метаболічної

активності клітин у лунки вносили розчин резазурину (робоча концентрація 80 мкМ) й інкубували ще 30–60 хвилин до візуалізації результату.

2.3.2.3. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням пакетів програмного забезпечення Microsoft Excel та GraphPad Prism 10.0. Усі досліди виконували у трьох незалежних технічних повторах. Для кількісної оцінки взаємодії між GS і бактеріофагом T4 розраховували FICI. На першому етапі для кожного агента визначали індивідуальний FICI:

$$FICI_{GS/\text{фага}} = \frac{MIC_{GS/\text{фага у комбінації}}}{MIC_{GS/\text{фага індивідуально}}}$$

Підсумковий FICI визначали як суму отриманих значень:

$$FICI = FICI_{GS} + FICI_{\text{фага}}$$

Інтерпретацію характеру взаємодії проводили на основі розрахованих значень, де показник $FICI \leq 0,5$ свідчив про синергізм, інтервал $0,5 < FICI \leq 1,0$ вказував на адитивний ефект, значення $1,0 < FICI \leq 4,0$ трактували як індиферентність, а результат $FICI > 4,0$ розцінювали як прояв антагонізму між компонентами суміші [75, 76].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Оцінка внутрішньоклітинної генерації активних форм кисню в *E. coli*, індукованої грамїцидином S

Оскільки одним із основних механізмів антибактеріальної дії АМП є виникнення оксидативного стресу в клітинах-мішенях, була проведена оцінка генерації АФК, які можуть накопичуватися в цитоплазмі бактеріальної клітини під дією GS. Кількісне визначення рівня внутрішньоклітинних АФК проводилося із застосуванням флуоресцентного зонда DCFH-DA у широкому діапазоні концентрацій GS, а саме від 0,5 мкМ до 256 мкМ.

Сполука DCFH-DA завдяки ліпофільній природі здатна проникати через клітинну мембрану *E. coli*. Усередині клітини вона піддається дії естераз, які відщеплюють ацетатні групи і перетворюють нефлуоресцентну сполуку на полярну форму 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїну (DCFH), яка накопичується в цитоплазматичних компартментах клітин. Однак під дією АФК DCFH окиснюється до високофлуоресцентного 2',7'-дихлорфлуоресцеїну (DCF), який детектується під час досліджень. Концентрація утвореного DCF є прямо пропорційною до рівня АФК у клітині. Це дозволяє визначати рівні внутрішньоклітинних АФК кількісно. Хоча DCFH-DA використовується як загальний маркер окиснювального стресу, він демонструє найбільшу спорідненість до гідроксильних радикалів, пероксинітриту і пероксиду водню [78].

На основі результатів аналізу отриманих даних був виявлений дозозалежний ефект між концентрацією антибіотика та інтенсивністю генерації АФК клітинами *E. coli*, а також було виділено кілька основних діапазонів концентрації відповідно до відповіді бактеріальної культури. Дані аналізу результатів генерації АФК клітинами кишкової палички подані у вигляді гістограми на рисунку 3.1.

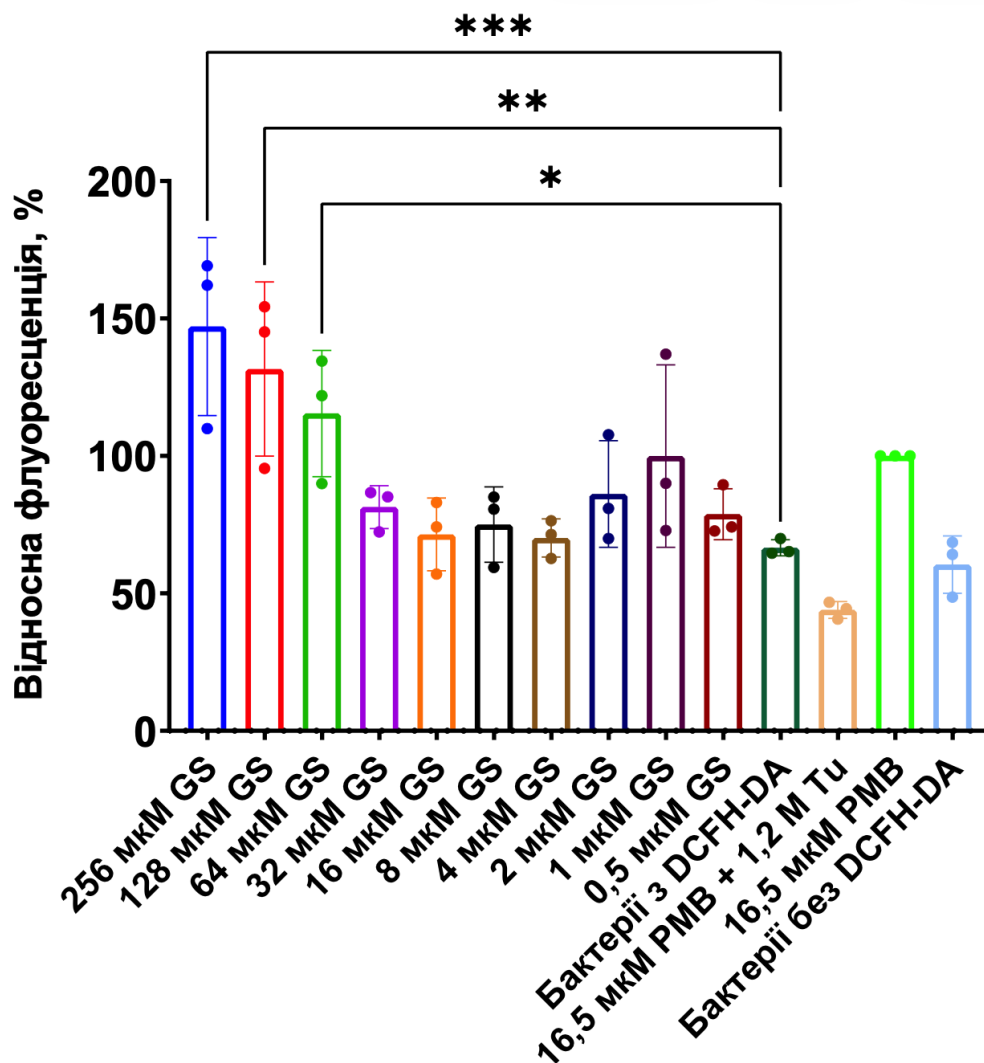


Рисунок 3.1. Дозозалежна генерація АФК у клітинах *E. coli*, індукована граміцидином *S*. Клітини інкубували з антибіотиком у діапазоні концентрацій 0,5–256 мкМ. Дані виражені у відсотках відносної флуоресценції порівняно з негативним і позитивним контролями (бактерії, інкубовані без GS і 16,5 мкМ PMB відповідно). Статистичну значущість визначали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) з пост-хок тестом Даннета; * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$. Лінії похибки представляють стандартне відхилення ($n = 3$)

За низьких концентрацій GS (0,5–16 мкМ) спостерігалось незначне коливання рівня відносної флуоресценції, яке статистично не відрізнялося від показників

контрольної групи з бактеріальними клітинами, які не піддавалися інкубації з декапептидом. Також дані цих концентрацій GS були меншими за рівень відносної флуоресценції у позитивному контролі з РМВ, що був прийнятий за 100%, тому що він є антибіотиком з відомим механізмом стимуляції окиснювального стресу через пошкодження зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій. За мінімальних концентрацій (0,5–8 мкМ) рівень відносної флуоресценції залишався в межах від $78,8 \pm 10,17\%$ до $75,04 \pm 16,33\%$ відповідно відносно рівня позитивного контролю ($n = 3$). Така відповідь клітин *E. coli* може бути пояснена тим, що за низьких доз GS механізми антиоксидантного захисту клітин здатні нівелювати початкові прояви оксидативного стресу або пошкодження мембрани, що викликаються АМП, не спричиняють значного порушення функціональної активності ЕТЛ.

За концентрацій GS у діапазоні 16–32 мкМ спостерігалось поступове зростання інтенсивності відносної флуоресценції, що становило $71,44 \pm 13,92\%$ і $81,38 \pm 12,12\%$ відповідно. Згадані вище концентрації антибіотика не викликали статистично значущих змін у генерації АФК бактеріальними клітинами відносно негативного контролю.

Суттєві зміни у внутрішньоклітинній генерації АФК спостерігалися за високих концентрацій декапептиду, а саме 64–256 мкМ, що відповідає МІС антибіотика. За концентрації 64 мкМ значення відносної флуоресценції варіювало в діапазоні $115,46 \pm 23,87\%$. Також спостерігалось достовірне підвищення рівня АФК відносно бактеріальних клітин, що інкубувалися зі зондом DCFH-DA, але без GS ($\Delta = -48,87$; 95% ДІ: $-93,76 - -3,99$; $p = 0,0272$).

Доза GS у 128 мкМ викликала збільшення значення відносної флуоресценції до $131,62 \pm 28,06\%$, що є статистично значущим показником ($\Delta = -63,03$; 95% ДІ: $-109,9 - -20,15$; $p = 0,0018$). За концентрації в 256 мкМ рівень АФК зріс до $147,07 \pm 28,82\%$, що вказує на високий ступінь статистичної достовірності ($\Delta = -80,48$; 95% ДІ: $-125,4 - -35,59$; $p = 0,0001$). Таке посилення сигналу вказувало на запуск каскаду генерації АФК і розвиток гострого оксидативного стресу через порушення

функціонування антиоксидантних компонентів клітини, таких як каталаза та супероксиддисмутаза.

Зростання рівня АФК при високих концентраціях GS може бути пояснено його здатністю порушувати цілісність цитоплазматичної мембрани бактеріальної клітини. Це призводить до витоку іонів і кофакторів, необхідних для нормального функціонування ферментів ЕТЛ, що викликає утворення АФК через надлишок електронів, які відновлюють молекулярний кисень. Водночас варіабельність даних у певних групах концентрацій може бути зумовлена гетерогенністю клітинної популяції або різницею у ступені пошкодження клітин.

Для додаткового підтвердження природи флуоресцентного сигналу було використано контроль з Tu, сполукою з добре дослідженими антиоксидантними властивостями [78]. Застосування Tu знижувало рівень відносної флуоресценції до $43,97 \pm 4,08\%$ порівняно з позитивним контролем. Це підтверджує, що реєстрований сигнал був зумовлений наявністю АФК, а не артефактами флуоресценції самого пептиду чи компонентів середовища.

Отже, за результатами проведених досліджень було виявлено, що GS здатен індукувати генерацію АФК у клітинах *E. coli* за дозозалежним принципом. Статистично значущий приріст АФК, а саме на 15–47% вище контролю, спостерігається за концентрацій 64–256 мкМ. Отримані дані дозволяють стверджувати, що стимуляція окиснювального стресу є важливим компонентом загального механізму антибактеріальної дії GS, що доповнює його пряму мембранолітичну активність.

3.2. Оцінка синергічної антибактеріальної активності грамїцидину S і бактеріофага T4 проти *Escherichia coli* K-12 DSM 498

За допомогою методу «шахового» мікророзведення з одночасним кінетичним реєструванням зміни оптичної щільності було досліджено зміни росту бактерій *E. coli* K-12 DSM 498 й проаналізовано ефективність комбінованого застосування

GS і бактеріофага T4. У ході дослідження також було підтверджено MIC GS і мінімальну ефективну множинність інфікування (MOI) бактеріофага.

За відсутності бактеріофага T4 антибіотик GS демонструє дозозалежний вплив на бактеріальні клітини. При концентраціях 4–16 мкМ ріст бактерій досягав рівнів $131,11 \pm 9,49\%$, $125,48 \pm 3,80\%$ і $122,67 \pm 10,75\%$ відповідно ($n = 3$). За підвищення концентрації декапептиду до 32 і 64 мкМ значення відносного росту бактерій зменшувалося до $56,57 \pm 7,01\%$ і $25,53 \pm 4,51\%$ відповідно порівняно з контролем росту бактеріальної суспензії без інкубування з антибіотиком чи бактеріофагом. За концентрацій, що лежать в діапазоні понад 128 мкМ, росту бактерій не спостерігалось. З результатів можна зробити висновок, що ефективна концентрація GS щодо *E. coli* K-12 DSM 498 лежить у межах 64–128 мкМ, що і визначає MIC даного антибіотика. Результати дослідження методом «шахового» мікророзведення представлені на рисунку 3.2.

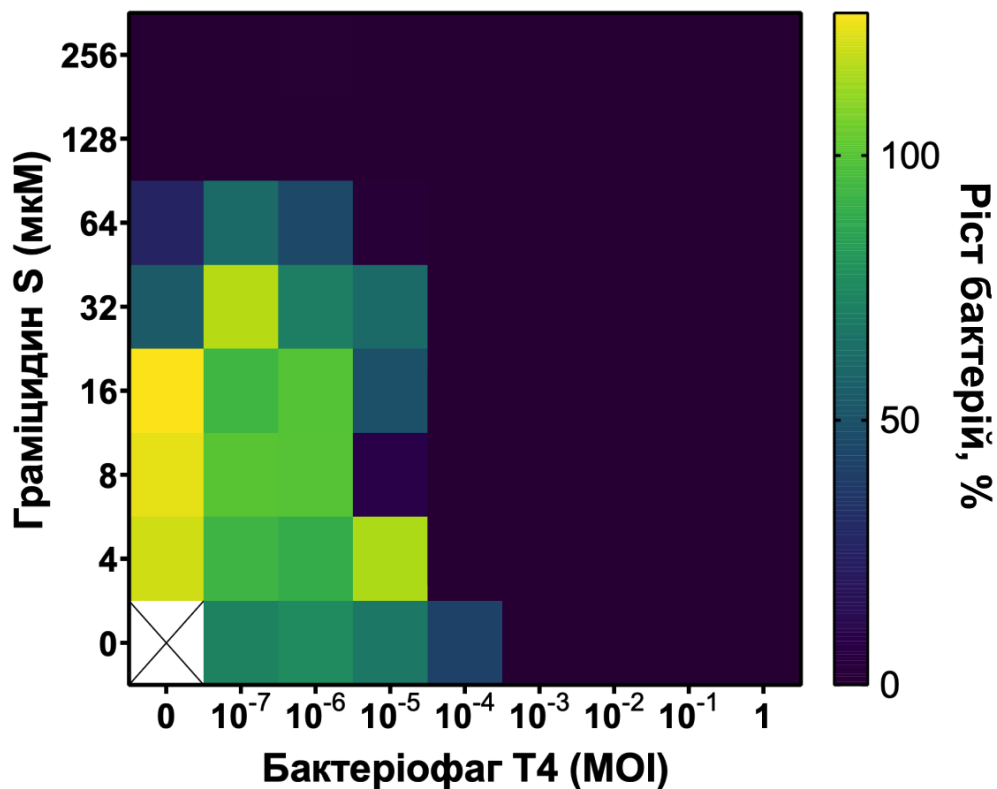


Рисунок 3.2. Теплова карта впливу комбінованої терапії граміцидину S і бактеріофага T4 щодо штаму *E. coli* K-12 DSM 498. Колірна шкала вказує на

відносно значення росту бактерій з урахуванням оптичної щільності (OD_{600}), де за 100% був прийнятий ріст бактерій без інкубації з агентами антибактеріальної терапії ($n = 3$)

Додавання бактеріофага T4 без GS призводило до повної зупинки росту бактерій за $MOI = 10^{-3}$ і вище (за 100% приймали ріст бактерій за відсутності інкубування з обома компонентами антимікробної терапії), натомість за значень MOI , що коливалися в межах 10^{-4} та 10^{-7} , значення відносного росту *E. coli* становило $40,25 \pm 14,38\%$ і $70,87 \pm 2,40\%$ відповідно. Таким чином, ефективне інгібування даного штаму бактерій вимагає $MOI = 10^{-3}$.

За значень MOI бактеріофага T4 $\geq 10^{-4}$ спостерігалось повне інгібування росту бактерій *E. coli* на рівні 0–5% незалежно від концентрації декапептиду. Це може свідчити про домінування фагового ефекту в обраній комбінованій терапії через швидкий лізис бактеріальної популяції.

Також згідно з аналізом теплової карти комбіноване застосування GS і бактеріофага T4 спричиняє інгібування росту бактерій *E. coli* K-12 DSM 498 при 4 мкМ антибіотика й $MOI = 10^{-4}$ бактеріофага (відносний ріст бактерій становив $12,83 \pm 11,07\%$), тому індекс синергічної взаємодії обох компонентів становить:

$$FICI_{K-12\text{ DSM}} = \frac{0,0001}{0,001} + \frac{4}{64} = 0,1625$$

Отримане значення $FICI_{K-12\text{ DSM}}$, що лежить у діапазоні менше 0,5, вказує на сильну синергічну взаємодію між декапептидом і бактеріофагом. Високий показник взаємодії компонентів може бути пояснений підвищенням проникності зовнішньої і цитоплазматичної мембран бактерій під дією GS і, як наслідок, полегшенням адсорбції й загальної інфекції бактеріофагом T4. Також важливим є те, що антибіотик, який використовується в суб-МІС концентраціях дозволяє підтримувати життєдіяльність бактеріальних клітин протягом довшого часу, що є критично важливим для ефективної пролонгованої реплікації бактеріофага.

Аналіз динаміки росту бактерій штаму *E. coli* K-12 DSM 498 протягом 24 годин за індивідуальної й комбінованої терапії наведено на рисунку 3.3. У контрольному зразку з бактеріальними клітинами без інкубування з компонентами терапії спостерігали типову криву росту, а саме після короткої лаг-фази бактерії активно розмножуються і після 16 годин інкубації виходять на плато росту. На графіку представлені криві росту бактерій за межових ефективних концентрацій GS: за 64 мкМ ріст пригнічується частково через недостатнє порушення цілісності й структурної сталості мембран (значення $OD_{600} = 0,139 \pm 0,031$, $n = 3$), а за 128 мкМ – майже повністю зупиняється без виходу в логарифмічну фазу ($OD_{600} = 0,005 \pm 0,002$).

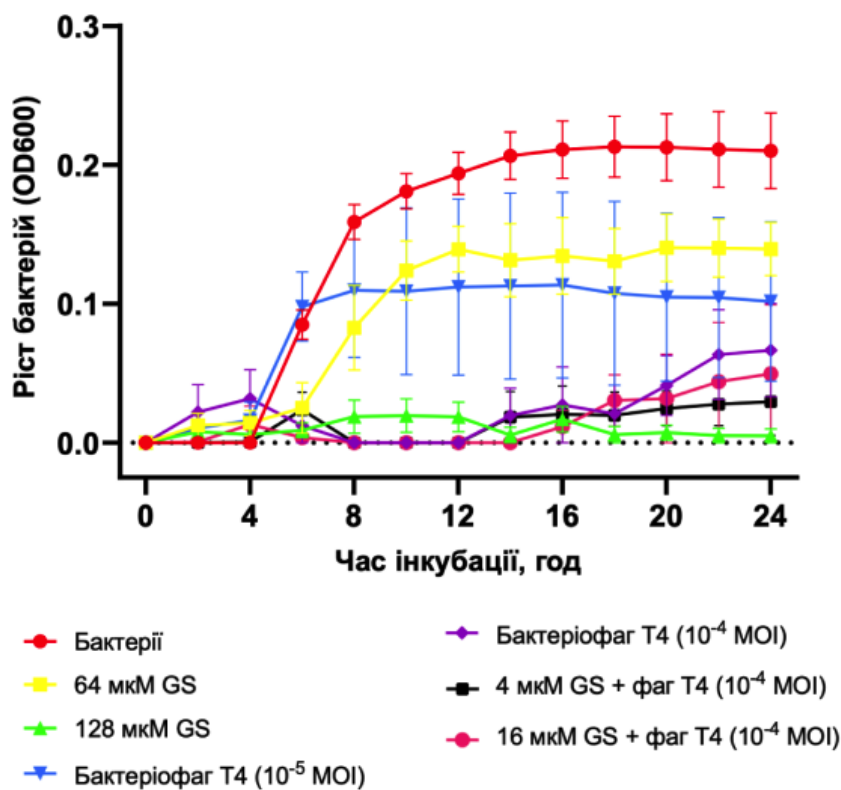


Рисунок 3.3. Динаміка росту бактерій *E. coli* K-12 DSM 498 в умовах інкубації за дії бактеріофага T4 і граміцидину S, застосованих окремо та в комбінації. Значення оптичної щільності наведено після корекції на контроль середовища. Дані представлені як середнє значення \pm стандартне відхилення ($n = 3$)

За монотерапії бактеріофагом Т4 з $MOI = 10^{-5}$ спостерігався ріст бактерій кишкової палички, однак із зменшенням швидкості порівняно з контролем ($OD_{600} = 0,128 \pm 0,062$). За $MOI = 10^{-4}$ спочатку відбувалося пригнічення поділу бактеріальних клітин, проте після 14 годин інкубації крива росту починала зростати ($OD_{600} = 0,067 \pm 0,058$), що потенційно може вказувати на появу фагорезистентних бактерій, наприклад, з мутаціями у рецепторах мембрани.

За комбінованого використання антибіотика й бактеріофага спостерігалось пригнічення росту бактерій за концентрацій GS 4–16 мкМ, що підтверджує синергічний ефект використаних компонентів антимікробної терапії. Значення оптичної щільності становили $0,016 \pm 0,008$ і $0,030 \pm 0,004$ відповідно, що підтверджує результат аналізу теплових карт синергічної активності.

3.3. Оцінка синергічної антибактеріальної активності граміцидину S і бактеріофага Т4 проти *Escherichia coli* BW25113

Для штаму *E. coli* BW25113 методом «шахового» мікророзведення було досліджено індивідуальну і комбіновану антимікробну терапію з використанням GS і бактеріофага Т4. Теплова карта впливу комбінованої терапії щодо *E. coli* BW25113 наведена на рисунку 3.4.

За індивідуального використання антибіотика при концентраціях 8–16 мкМ відносний ріст бактерій становив $122,28 \pm 11,87\%$ і $78,44 \pm 15,24\%$ відповідно ($n = 2$). Стимуляція росту кишкової палички може бути пояснена адаптивною відповіддю клітин на інкубацію з субінгібіторними дозами декапептиду. За значень 32–64 мкМ ріст бактерій дещо пригнічувався до $54,73 \pm 12,31\%$, а за концентрацій, вищих за 128 мкМ, спостерігалось майже повне пригнічення поділу бактеріальних клітин на рівні $3,33 \pm 1,80\%$.

Використання бактеріофага Т4 з $MOI \geq 10^{-4}$ призводило до повного припинення росту бактеріальних клітин штаму *E. coli* BW25113, а саме в межах

18,55 ± 9,44%. За зниження значень MOI спостерігалось часткове інгібування поділу бактерій.

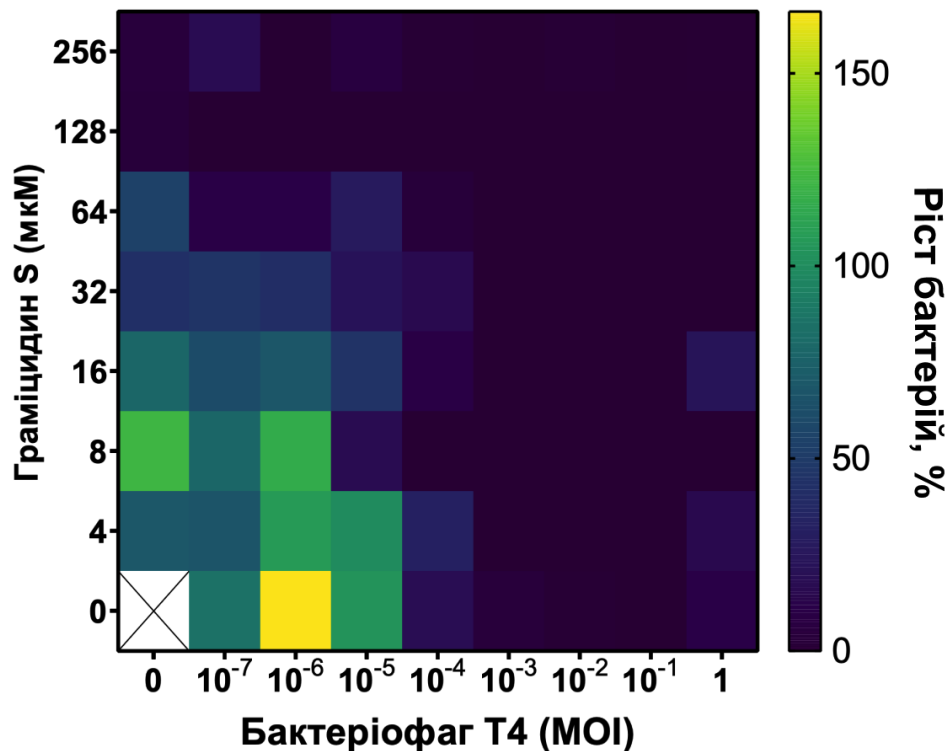


Рисунок 3.4. Теплова карта впливу комбінованої дії граміцидину S і бактеріофага T4 на ріст бактерій *E. coli* BW25113. За 100% був прийнятий контроль росту бактерій без попередньої інкубації з компонентами терапії (n = 2)

Комбіноване використання GS і бактеріофага T4 було найбільш ефективним за концентрації антибіотика 32 мкМ і MOI = 10⁻⁵, за яких відносний ріст бактерій кишкової палички становив 12,17 ± 17,21%. Отже, індекс синергічної взаємодії становить:

$$FICI_{BW25113} = \frac{0,00001}{0,0001} + \frac{32}{64} = 0,6$$

Подібний індекс взаємодії вказує на адитивний ефект між компонентами антибактеріальної суміші. Таким чином, значення синергічного ефекту залежить від штаму бактерій.

Аналіз кінетики росту бактерій *E. coli* BW25113, отриманого шляхом вимірювання оптичної щільності протягом 24 годин, представлений на рисунку 3.5. Для даного штаму вихід на плато у кривій росту спостерігався пізніше, приблизно протягом 20–24 годин інкубування ($OD_{600} = 0,268 \pm 0,015$).

За концентрацій GS, що дорівнювали 64 і 128 мкМ, значення оптичної щільності становило $0,154 \pm 0,052$ і $0,039 \pm 0,041$ відповідно, що підтверджує отримані дані з аналізу теплової карти росту клітин кишкової палички. За монотерапії бактеріофагом $MOI = 10^{-5}$ і 10^{-4} оптична щільність варіювала від $0,233 \pm 0,193$ до $0,020 \pm 0,013$ відповідно. За $MOI = 10^{-5}$ крива росту відтворювала патерн кривої росту бактеріальної популяції без інкубації з антимікробними агентами, проте мала дещо нижчі значення оптичної щільності.

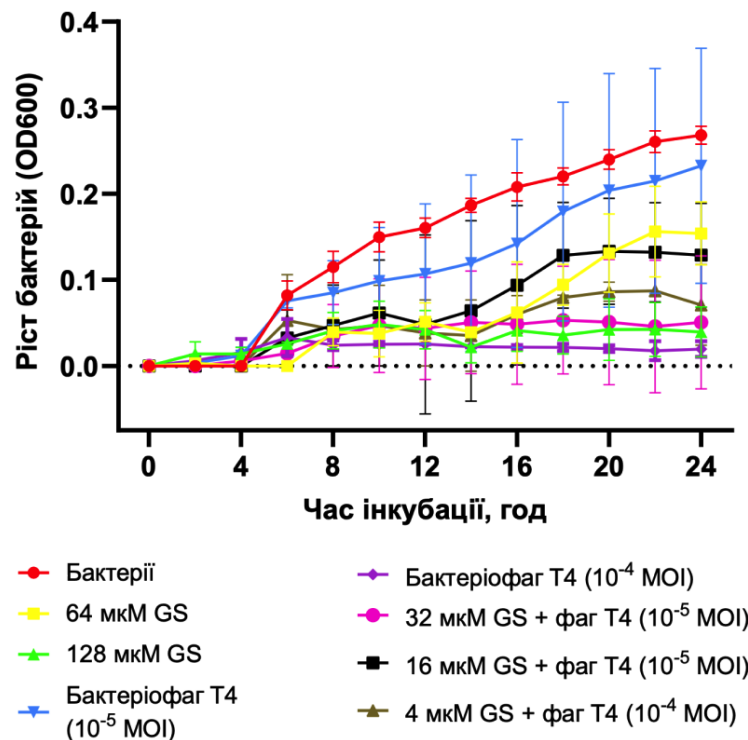


Рисунок 3.5. Динаміка росту бактерій *E. coli* BW25113 в умовах інкубації з бактеріофагом T4 і граміцидином S, застосованих окремо та в комбінації. Значення оптичної щільності наведено після корекції на контроль середовища. Дані представлені як середнє значення \pm стандартне відхилення ($n = 2$)

Поєднання антибіотика при 32 мкМ і бактеріофага $MOI = 10^{-5}$ під час інкубування бактерій штаму *E. coli* BW25113 призводило до зниження росту в межах оптичної щільності $0,046 \pm 0,002$. Крива не характеризувалася додатковими піками росту, що свідчить про повне пригнічення росту бактерій.

Поєднання інших значень MOI й концентрацій також призводило до зниження росту бактеріальної популяції, але не до повного його пригнічення. За 16 мкМ антибіотика і $MOI = 10^{-5}$ значення оптичної щільності становило $0,129 \pm 0,085$, тоді як за 4 мкМ GS і MOI бактеріофага $= 10^{-4}$ (значення, характерні для синергічної взаємодії щодо штаму *E. coli* K-12 DSM 498) – $0,071 \pm 0,066$.

3.4. Порівняння ефективності комбінованої антибактеріальної терапії залежно від штаму *E. coli*

Дослідження антибактеріальної активності індивідуальної й комбінованої терапії GS і бактеріофага T4 щодо лабораторних штамів *E. coli* K-12 DSM 498 та BW25113 показало різницю в чутливості до їхньої дії, що свідчить про штам-специфічну дію обраних агентів. Насамперед це пов'язано з генетичними особливостями обох штамів попри те, що вони належать до лінії K-12.

Штам *E. coli* BW25113 є лабораторним штамом, який широко використовується, оскільки є базою накопичення нокаутів генів. Найважливішими генетичними змінами є мутації у генах, які залучені до регулювання метаболізму ($\Delta araBAD$ і $\Delta rhaBAD$) і систем рестрикції (*hsdR*), а також наявність алелю *rph-1*, який впливає на швидкість росту і метаболічний стан бактеріальних клітин кишкової палички [79]. Генетичний матеріал штаму *E. coli* K-12 DSM 498 є більш інтактним, що призводить до збереження регуляторних систем клітини наближено до дикого варіанту.

Застосування антибіотика хоч і проявило дозозалежний ефект для обох штамів, проте ступінь відповіді у вигляді росту бактеріальних популяцій був

різним. Для *E. coli* K-12 DSM 498 ефект декапептиду у вигляді інгібування росту проявлявся при 64 мкМ, натомість для *E. coli* BW25113 значно ефективнішою була концентрація в 128 мкМ. Така різниця може бути пояснена різницею в складі жирних кислот у цитоплазматичній мембрані обох штамів і можливі модифікації в структурі ліпополісахариду. Також для *E. coli* K-12 DSM 498 за суб-МІС концентрацій спостерігалось явище гормезису, а саме стимуляція росту понад 100% у порівнянні з контролем росту бактеріальної популяції. Такий вплив антимікробних пептидів може бути пов'язаний з активацією стресової відповіді бактеріальних клітин кишкової палички через двокомпонентні регуляторні системи PhoPQ/PmrAB [80]. Почергова активація даних систем призводить до зміни ліпополісахаридів за рахунок збільшення позитивно заряджених груп і зменшення зв'язування з GS. Подібний механізм має за побічний ефект стимуляцію росту бактерій внаслідок успішної адаптації до впливу АМП.

Одиночне використання бактеріофага T4 також спричиняло різну відповідь бактеріальних популяцій. Різниця в один порядок між ефективним МОІ для обох штамів (для *E. coli* K-12 DSM 498 10^{-3} і для *E. coli* BW25113 10^{-4}) свідчить про вищу ефективність реплікації бактеріофага або його адсорбції для штаму *E. coli* BW25113. Бактеріофаг T4 використовує у ролі основних рецепторів ліпополісахариди і поринові канали OmpC, які діють як ко-рецептори. Для швидкого інфікування і введення ДНК наявність обох факторів є обов'язковою [81]. Генетичні зміни, які спричиняють порушення структури цих рецепторів, можуть впливати на ефективність фагової інфекції.

Аналіз результатів комбінованої терапії антибіотиком і бактеріофагом також показав різний характер впливу на бактерії. Для *E. coli* K-12 DSM 498 дія даних антимікробних агентів має синергічний ефект (FICI = 0,1625), тоді як для *E. coli* BW25113 – адитивний (FICI = 0,6). Отримані дані підтверджують результати монотерапії, адже для ефективнішого інфікування бактеріофагом порушення структури мембран бактеріальних клітин є необхідним, тому штам *E. coli* K-12 DSM 498 є більш чутливим до подвійної дії антимікробних агентів. У штаму *E. coli*

BW25113 також можуть бути більш стабільними мембрани щодо змін, спричинених GS, або системи їхнього відновлення є більш ефективними. Також за результатами кінетичного аналізу можна зробити висновок, що клітини штаму *E. coli* K-12 DSM 498 виходять у стаціонарну фазу росту на 5–7 годин швидше, тому описаний активний поділ клітин може пришвидшувати й сприяти реплікації бактеріофага T4 і лізису. Згідно з даними динаміки росту бактерій *E. coli* K-12 DSM 498 було описано повторне відновлення росту бактеріальних клітин після попереднього пригнічення внаслідок комбінованого впливу GS і бактеріофага T4. Це може бути пояснено появою резистентних клітин з мутаціями, які впливають на структуру основних рецепторів бактеріофага T4.

Також слід зазначити, що синергічний ефект щодо *E. coli* K-12 DSM 498 може бути пов'язаний із спостережуваною дією субінгібіторних концентрацій декапептиду, що спричиняє стрес, який без додаткового антимікробного агента (бактеріофаг T4) використовується клітинами для адаптаційних процесів. У даному випадку морфологічні зміни бактеріальної клітини використовуються бактеріофагами для полегшення доступу хвостових ниток до рецепторів ліпополісахариду та порину OmpC, які в інтактних клітинах можуть бути частково екранованими іншими компонентами мембрани.

Порівняльний аналіз підтверджує, що близькоспоріднені лабораторні штами кишкової палички можуть проявляти різну відповідь на однакову антимікробну пептид-бактеріофагову терапію. Це підкреслює важливість дослідження й подальшого врахування можливих штам-специфічних особливостей для розробки найбільш ефективних підходів лікування.

УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

АМП є одними з найбільш перспективних антибактеріальних агентів, оскільки механізми їхньої дії мають широкий спектр ефектів, зокрема індукцію внутрішньоклітинного оксидативного стресу. Особливо ефективним є поєднання АМП із бактеріофагами для боротьби з глобальним зростанням антибіотикорезистентності й мінімізації впливу застосовуваної терапії на пацієнта. GS, як один із представників АМП, має виражені мембранолітичні властивості й здатен викликати порушення антиоксидантної системи бактеріальних клітин.

У результаті проведених досліджень було встановлено, що GS здатен індукувати генерацію АФК у клітинах *E. coli* за допомогою флуоресцентного аналізу. Особливу увагу було приділено оцінці можливої ефективності використання комбінованої терапії декапептиду й бактеріофага T4, а також визначенню різниці в чутливості до індивідуальної й подвійної дії антимікробних агентів щодо лабораторних штамів *E. coli* K-12 DSM 498 та BW25113 за допомогою методу «шахового» мікророзведення.

Унаслідок аналізу отриманих даних було засвідчено, що GS дозозалежно індукує утворення АФК у бактеріальних клітинах. Для підтвердження оксидативної природи реєстрованого сигналу було використано тіосечовину. За концентрацій 0,5–8 мкМ значення відносної флуоресценції коливалися в межах $75,04 \pm 16,33\%$ – $78,8 \pm 10,17\%$ порівняно з позитивним контролем, що статистично не відрізнялося від величин негативного контролю. За підвищення концентрацій до 16–32 мкМ показники слабо відрізнялися від нижчих концентрацій, проте за концентрації 64 мкМ рівень АФК зростав до $115,46 \pm 23,87\%$ ($p = 0,0272$), за 128 мкМ – до $131,62 \pm 28,06\%$ ($p = 0,0018$), а за 256 мкМ – до $147,07 \pm 28,82\%$ ($p = 0,0001$). Отже, підвищення рівнів відносної флуоресценції за МІС концентрацій становило 15–47% порівняно з позитивним контролем, а саме бактерій, інкубованих з РМВ. Подібний ефект дії GS може бути пов'язаним з порушенням функціональної активності ЕТЛ

через порушення структури цитоплазматичних мембран із одночасним пригніченням роботи антиоксидантних систем бактерій.

Дослідження індивідуального впливу GS на клітини *E. coli* різних штамів показало, що штам K-12 DSM 498 є більш чутливим, ніж BW25113, оскільки значення MIC становили 64 і 128 мкМ відповідно. Також було описане явище гормезису в *E. coli* K-12 DSM 498 для субінгібіторних концентрацій, а саме 4–16 мкМ. Спостерігалася стимуляція росту бактеріальної популяції до рівнів $122,67 \pm 10,75\%$ – $131,11 \pm 9,49\%$ порівняно з контролем росту бактерій, що, імовірно, відбувалося внаслідок активації стресової відповіді з наступною адаптацією до дії декапептиду.

Окреме використання бактеріофага T4 показало протилежний результат, адже штам BW25113 виявив більшу чутливість до фагової інфекції ($MOI = 10^{-4}$) на відміну від K-12 DSM 498 ($MOI = 10^{-3}$). Подібні відмінності у реакціях на дії антибактеріальних агентів можуть бути пов'язані з генетичними і морфологічними особливостями клітин обох штамів, насамперед зі структурою мембран.

Комбіноване застосування GS і бактеріофага T4 також показало різні рівні відповіді росту бактеріальних популяцій для різних штамів. Для штаму *E. coli* K-12 DSM 498 зафіксовано сильний синергічний ефект через $FICI = 0,1625$ для 4 мкМ антибіотика й бактеріофага з $MOI = 10^{-4}$. Для *E. coli* BW25113 ефект був адитивним ($FICI = 0,6$) за 32 мкМ GS і $MOI = 10^{-5}$. Дані були підтверджені результатами кінетичного аналізу, який фіксував зниження оптичної щільності бактеріальних культур для штамів K-12 DSM 498 і BW25113 до $0,016 \pm 0,008$ і $0,046 \pm 0,002$ відповідно. Однак також спостерігалось відновлення росту бактерій з часовим відтермінуванням внаслідок формування фагорезистентних клітин або адаптації до дії антибактеріальних агентів. Подібний сценарій росту характерний для монотерапії бактеріофагом T4 $MOI = 10^{-4}$, за якого повторний ріст бактерій розпочинався після 14 годин інкубації.

Результати порівняльного аналізу впливу антибактеріальної терапії на різні лабораторні штами кишкової палички показали, що ефективність дії має

штамозалежний характер, що особливо важливо враховувати при призначенні лікування у клінічній практиці. Штам *E. coli* K-12 DSM 498 проявляв більшу чутливість до окремого й комбінованого застосування GS.

Отже, GS виконує антибактеріальну роль не лише завдяки порушенню цілісності мембран, а й через індукцію оксидативного стресу в бактеріальних клітинах. Комбіноване використання бактеріофага T4 й антибіотика підвищує ефективність пригнічення росту клітин кишкової палички і зменшує ефективні концентрації потенційно гемотоксичного GS, що робить дану терапію перспективною для використання. Аналіз даних також привертає увагу до можливих штам-специфічних особливостей відповіді бактеріальних клітин, які є особливо важливими для розробки ефективних підходів до антимікробної терапії. Отримані результати можуть слугувати основою для подальших досліджень у напрямку створення комбінованих антибактеріальних препаратів.

ВИСНОВКИ

1. Граміцидин S спричиняє внутрішньоклітинну генерацію активних форм кисню в клітинах *E. coli*, що підтверджується інтенсифікацією відносної флуоресценції за концентрацій 64–256 мкМ.
2. Під дією граміцидину S оксидативний стрес індукується за дозозалежним принципом. За нижчих концентрацій у діапазоні 0,5–32 мкМ рівень АФК залишається в межах контрольних значень, проте зі збільшенням дози понад 64 мкМ – зростає на 15–47%. Отримані дані вказують на порушення антиоксидантного балансу бактеріальних клітин за умови досягнення критичних концентрацій декапептиду.
3. Граміцидин S і бактеріофаг T4 виявляють штам-залежну індивідуальну активність щодо *E. coli*. Для штаму *E. coli* K-12 DSM 498 значення MIC антибіотика становить 64–128 мкМ, тоді як для *E. coli* BW25113 – 128 мкМ; ефективні значення MOI бактеріофага T4 дорівнюють 10^{-3} і 10^{-4} відповідно.
4. Комбіноване застосування граміцидину S і бактеріофага T4 посилює антибактеріальний ефект і зменшує ефективні концентрації декапептиду. Для *E. coli* K-12 DSM 498 характерна синергічна взаємодія компонентів (FICI = 0,1625), а для *E. coli* BW25113 – адитивний ефект (FICI = 0,6).
5. Дія антибактеріальних агентів має штам-специфічний характер, за якого штам *E. coli* K-12 DSM 498 є більш чутливим до дії декапептиду, що зумовлено генетичними і структурними особливостями клітин.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. WHO Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS): Global antibiotic resistance surveillance report 2025. URL: https://media.tghn.org/medialibrary/2025/10/Global_antibiotic_esistance_Surveillanc_e_r_eport_2025.pdf (Accessed: 05.02.2026).
2. Lehrer R. Primate defensins. *Nature Reviews Microbiology*. 2004. Vol. 2(9). P. 727–738. doi: 10.1038/nrmicro976.
3. Sitaram N., Nagaraj R. Host-defense antimicrobial peptides: importance of structure for activity. *Current Pharmaceutical Design*. 2002. Vol. 8(9). P. 727–742. doi: 10.2174/1381612023395358.
4. Oliveira Júnior N.G., Souza C.M., Buccini D.F., Cardoso M.H., Franco O.L. Antimicrobial peptides: structure, functions and translational applications. *Nature Reviews. Microbiology*. 2025. Vol. 23. P. 687–700. <https://doi.org/10.1038/s41579-025-01200-y>.
5. Ma X., Wang Q., Ren K., Xu T., Zhang Z., Xu M., Rao Z., Zhang X. A Review of Antimicrobial Peptides: Structure, Mechanism of Action, and Molecular Optimization Strategies. *Fermentation*. 2024. Vol. 10(11), 540. <https://doi.org/10.3390/fermentation10110540>.
6. Brogden K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*. 2005. Vol. 3(3). P. 238–250. doi: 10.1038/nrmicro1098.
7. Frimodt-Møller J., Champion C., Nielsen P.E., Løbner-Olesen A. Translocation of non-lytic antimicrobial peptides and bacteria penetrating peptides across the inner membrane of the bacterial envelope. *Current Genetics*. 2022. Vol. 68. P. 83–90. <https://doi.org/10.1007/s00294-021-01217-9>.
8. Duarte-Mata D.I., Salinas-Carmona M.C. Antimicrobial peptides' immune modulation role in intracellular bacterial infection. *Front Immunol*. 2023. Vol. 14, 1119574. doi: 10.3389/fimmu.2023.1119574.

9. Li H., Niu J., Wang X., Niu M., Liao C. The Contribution of Antimicrobial Peptides to Immune Cell Function: A Review of Recent Advances. *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15(9), 2278. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092278>.
10. Gall Y.M., Konashev M.B. The discovery of Gramicidin S: the intellectual transformation of G.F. Gause from biologist to researcher of antibiotics and on its meaning for the fate of Russian genetics. *History and Philosophy of the Life Sciences*. 2001. Vol. 23 (1). P. 137–150.
11. Marahiel M. A., Danders W., Krause M., Kleinkauf H. Biological role of gramicidin S in spore functions: studies on gramicidin-S-negative mutants of *Bacillus brevis* ATCC9999. *European Journal of Biochemistry*. 1979. Vol. 99(1). P. 49–55. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb13229.x>.
12. Berditsch M., Trapp M., Afonin S., Weber C., Misiewicz J., Turkson J., Ulrich A. S. Antimicrobial peptide gramicidin S is accumulated in granules of producer cells for storage of bacterial phages. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7(1), 44324. <https://doi.org/10.1038/srep44324>.
13. Bonhomme S., Dessen A., Macheboeuf P. The inherent flexibility of type I non-ribosomal peptide synthetase multienzymes drives their catalytic activities. *Open Biology*. 2021. Vol. 11(5), 200386. doi: 10.1098/rsob.200386.
14. Lvova K., Vecino X., Pérez-Cid B., Moldes A.B., Cruz J.M. Efficient one step extraction process of Gramicidin S from *Aneurinibacillus aneurinilyticus* biomass. *Front Bioeng Biotechnol*. 2024. Vol. 12, 1452796. doi: 10.3389/fbioe.2024.1452796.
15. Pfukwa N.B.C., Rautenbach M., Hunt N.T., Olaoye O.O., Kumar V., Parker A.W., Minnes L., Neethling P.H. Temperature-Induced Effects on the Structure of Gramicidin S. *J Phys Chem B*. 2023. Vol. 127(17). P. 3774–3786. doi: 10.1021/acs.jpcc.2c06115.
16. Mogi T., Kita K. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. *Cell Mol Life Sci*. 2009. Vol. 66(23). P. 3821–3826. doi: 10.1007/s00018-009-0129-9.

17. Prenner E.J., Lewis R.N., McElhaney R.N. The interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayer model and biological membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1999. Vol. 1462(1-2). P. 201–221. doi: 10.1016/s0005-2736(99)00207-2.
18. Kondejewski L.H., Farmer S.W., Wishart D.S., Kay C.M., Hancock R.E., Hodges R.S. Modulation of structure and antibacterial and hemolytic activity by ring size in cyclic gramicidin S analogs. *J Biol Chem*. 1996. Vol. 271(41). P. 25261–25268. doi: 10.1074/jbc.271.41.25261.
19. Llamas-Saiz A.L., Grotenbreg G.M., Overhand M., van Raaij M.J. Double-stranded helical twisted beta-sheet channels in crystals of gramicidin S grown in the presence of trifluoroacetic and hydrochloric acids. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2007. Vol. 63(Pt 3). P. 401–407. doi: 10.1107/S09074444906056435.
20. Afonin S., Dürr U.H., Wadhvani P., Salgado J., Ulrich A.S. Solid State NMR Structure Analysis of the Antimicrobial Peptide Gramicidin S in Lipid Membranes: Concentration-Dependent Re-alignment and Self-Assembly as a β -Barrel. *Top Curr Chem*. 2008. Vol. 273. P. 139–154. doi: 10.1007/128_2007_20.
21. Ashrafuzzaman M., Andersen O.S., McElhaney R.N. The antimicrobial peptide gramicidin S permeabilizes phospholipid bilayer membranes without forming discrete ion channels. *Biochim Biophys Acta*. 2008. Vol. 1778(12). P. 2814–2822. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.08.017.
22. Wenzel M., Rautenbach M., Vosloo J.A., Siersma T., Aisenbrey C.H.M., Zaitseva E., Laubscher W.E. et al. The Multifaceted Antibacterial Mechanisms of the Pioneering Peptide Antibiotics Tyrocidine and Gramicidin S. *mBio*. 2018. Vol. 9(5), e00802-18. doi: 10.1128/mBio.00802-18.
23. Müller A., Wenzel M., Strahl H., Grein F., Saaki T.N.V., Kohl B., Siersma T. et al. Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016. Vol. 113(45), E7077-E7086. doi: 10.1073/pnas.1611173113.
24. Berditsch M., Afonin S., Reuster J. Lux H., Schkolin K., Babii O. et al. Supreme activity of gramicidin S against resistant, persistent and biofilm cells of staphylococci and

enterococci. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, 17938. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54212-z>.

25. Swierstra J., Kapoerchan V., Knijnenburg A., van Belkum A., Overhand M. Structure, toxicity and antibiotic activity of gramicidin S and derivatives. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016. Vol. 35(5). P. 763–769. doi: 10.1007/s10096-016-2595-y.

26. Yonezawa H., Kaneda M., Tominaga N., Higashi S., Izumiya N. Adsorption of ¹⁴-Labeled Gramicidin S on Cell of Bacteria. *The Journal of Biochemistry*. 1981. Vol. 90(4). P. 1087–1091. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133560>.

27. Wang Y., Kalyvas J.T., Evans J.D., Toronjo-Urquiza L., Horsley J.R., Abell A.D. Expanding the therapeutic window of gramicidin S towards a safe and effective systemic treatment of methicillin-resistant *S. aureus* infections. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2025. Vol. 283, 117128. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2024.117128>.

28. Shkuratova T.S., Andreeva D.V., Tikhomirov A.S., Shchekotikhin A.E. Analogues of gramicidin S: A promising direction for future antibacterial drug development? *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2025. Vol. 297, 117955. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.117955>.

29. Kalyvas J.T., Wang Y., Romeo O., Horsley J.R., Abell A.D. Broad-Spectrum Gramicidin S Derivatives with Potent Activity Against Multidrug-Resistant Gram-Negative ESKAPE Pathogens. *Antibiotics (Basel)*. 2025. Vol. 14(5), 423. doi: 10.3390/antibiotics14050423.

30. Li Y., Bionda N., Yongye A., Geer P., Stawikowski M., Cudic P., Martinez K., Houghten R.A. Dissociation of antimicrobial and hemolytic activities of gramicidin S through N-methylation modification. *ChemMedChem*. 2013. Vol. 8(11). P. 1865–1872. doi: 10.1002/cmdc.201300232.

31. Knijnenburg A.D., Kapoerchan V.V., Spalburg E., de Neeling A.J., Mars-Groenendijk R.H., Noort D. et al. Tuning hydrophobicity of highly cationic tetradecameric Gramicidin S analogues using adamantane amino acids. *Bioorg Med Chem*. 2010. Vol. 18(23). P. 8403–8409. doi: 10.1016/j.bmc.2010.09.018.

32. Kondejewski L.H., Farmer S.W., Wishart D.S., Hancock R.E., Hodges R.S. Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria. *Int J Pept Protein Res.* 1996. Vol. 47(6). P. 460–466. doi: 10.1111/j.1399-3011.1996.tb01096.x.

33. Van der Knaap M., Lageveen L.T., Busscher H.J., Mars-Groenendijk R., Noort D., Otero J.M. et al. Evaluation of Readily Accessible Azoles as Mimics of the Aromatic Ring of D-Phenylalanine in the Turn Region of Gramicidin S. *ChemMedChem.* 2011. Vol. 6. P. 840–847. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000539>.

34. Solanas C., de la Torre B.G., Fernández-Reyes M., Santiveri C.M., Jiménez M.A., Rivas L. et al. Therapeutic index of gramicidin S is strongly modulated by D-phenylalanine analogues at the beta-turn. *J Med Chem.* 2009. Vol. 52(3). P. 664–674. doi: 10.1021/jm800886n.

35. Tamaki M., Fujinuma K., Harada T., Takanashi K., Shindo M., Kimura M., Uchida Y. Fatty acyl-gramicidin S derivatives with both high antibiotic activity and low hemolytic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2012. Vol. 22(1). P. 106–109. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.11.062>.

36. Kawai M., Yamamura H., Tanaka R., Umemoto H., Ohmizo C., Higuchi S., Katsu T. Proline residue-modified polycationic analogs of gramicidin S with high antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria and low hemolytic activity. *The Journal of Peptide Research.* 2005. Vol. 65(1). P. 98–104. doi: 10.1111/j.1399-3011.2004.00204.x.

37. Knijnenburg A.D., Spalburg E., de Neeling A.J., Mars-Groenendijk R.H., Noort D., Grotenbreg G. et al. Ring-Extended Derivatives of Gramicidin S with Furanoid Sugar Amino Acids in the Turn Region Have Enhanced Antimicrobial Activity. *ChemMedChem.* 2009. Vol. 4(12). P. 1976–1979. DOI:[10.1002/cmdc.200900379](https://doi.org/10.1002/cmdc.200900379).

38. Hackl E.V., Berest V.P., Gatash S.V. Interaction of polypeptide antibiotic gramicidin S with platelets. *Journal of Peptide Science.* 2012. Vol. 18. P. 748–754. <https://doi.org/10.1002/psc.2461>.

39. Berditsch M., Jäger T., Stempel N., Schwartz T., Overhage J., Ulrich A.S. Synergistic effect of membrane-active peptides polymyxin B and gramicidin S on

multidrug-resistant strains and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015. Vol. 59(9). P. 5288–5296. doi: 10.1128/AAC.00682-15.

40. Gu Liu C., Green S.I., Min L., Clark J.R., Salazar K.C., Terwilliger A.L. et al. Phage-Antibiotic Synergy Is Driven by a Unique Combination of Antibacterial Mechanism of Action and Stoichiometry. *mBio.* 2020. Vol. 11(4), e01462-20. doi: 10.1128/mBio.01462-20.

41. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M. et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science.* 2005. Vol. 308(5728). P. 1635–1638. doi: 10.1126/science.1110591.

42. Foster-Nyarko E., Pallen M.J. The microbial ecology of *Escherichia coli* in the vertebrate gut. *FEMS Microbiology Reviews.* 2022. Vol. 46(3). DOI:[10.1093/femsre/fuac008](https://doi.org/10.1093/femsre/fuac008).

43. Denamur E., Clermont O., Bonacorsi S., Gordon D. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2021. Vol. 19(1). P. 37–54. doi: 10.1038/s41579-020-0416-x.

44. Gibson B., Wilson D.J., Feil E., Eyre-Walker A. The distribution of bacterial doubling times in the wild. *Proc Biol Sci.* 2018. Vol. 285(1880), 20180789. doi: 10.1098/rspb.2018.0789.

45. Darnton N.C., Turner L., Rojevsky S., Berg H.C. On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology.* 2007. Vol. 189 (5). P. 1756–1764. doi:[10.1128/JB.01501-06](https://doi.org/10.1128/JB.01501-06).

46. Ramos S., Silva V., Dapkevicius M.L.E., Caniça M., Tejedor-Junco M.T., Igrejas G., Poeta P. *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria Among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β -lactamase (ESBL) Production. *Animals (Basel).* 2020. Vol. 10(12), 2239. doi: 10.3390/ani10122239.

47. Bacterial infections linked to one in eight global deaths, according to GRAM study. *Global Research on Antimicrobial Resistance.* URL: <https://lnk.ua/SjZMYrZyp> (Accessed: 21.03.2026).

48. Croxen M.A., Law R.J., Scholz R., Keeney K.M., Wlodarska M., Finlay B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 2013. Vol. 26(4). P. 822–880. doi: 10.1128/CMR.00022-13.
49. Kim K.S. Human Meningitis-Associated *Escherichia coli*. *EcoSal Plus.* 2016. Vol. 7(1). doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0015-2015.
50. Pormohammad A., Nasiri M.J., Azimi T. Prevalence of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: a systematic review and meta-analysis. *Infect Drug Resist.* 2019. Vol. 12. P. 1181–1197. <https://doi.org/10.2147/IDR.S201324>.
51. Han H., Li W., Liu J., Zhang X., Huo X., Sun Y. et al. Seven-year overview of antimicrobial resistance in diarrheagenic *Escherichia coli* from sporadic human diarrhea cases in 20 Chinese provinces. *One Health Adv.* 2024. Vol. 2(29). <https://doi.org/10.1186/s44280-024-00064-w>.
52. Husna A., Rahman M.M., Badruzzaman A.T.M., Sikder M.H., Islam M.R., Rahman M.T., Alam J., Ashour H.M. Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities. *Biomedicines.* 2023. Vol. 11(11), 2937. doi: 10.3390/biomedicines11112937.
53. Salman S., Umar Z., Xiao Y. Current epidemiologic features and health dynamics of ESBL-producing *Escherichia coli* in China. *Biosaf Health.* 2024. Vol. 6(1) P. 40–49. doi: 10.1016/j.bsheal.2024.01.002.
54. Logan L.K., Weinstein R.A. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis.* 2017. Vol. 215(suppl_1), S28-S36. doi: 10.1093/infdis/jiw282.
55. Delcour A.H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2009. Vol. 1794(5). P. 808–816. doi: 10.1016/j.bbapap.2008.11.005.
56. Allen H.K., An R., Handelsman J., Moe L.A. A response regulator from a soil metagenome enhances resistance to the β -lactam antibiotic carbenicillin in *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2015. Vol. 10(3), e0120094. doi: 10.1371/journal.pone.0120094.

57. Bahaj S.S., Al-Dhubaibi M.S., Noman A., Ali S.S., Mehmood H., Alkassar W.Y. et al. Expression of multidrug efflux pump gene *acrAB* in *Escherichia coli*: a systematic review and meta analysis. *BMC Infect Dis.* 2025. Vol. 25(1), 1362. doi: 10.1186/s12879-025-11778-6.
58. Smith B.L., Fernando S., King M.D. *Escherichia coli* resistance mechanism AcrAB-TolC efflux pump interactions with commonly used antibiotics: a molecular dynamics study. *Sci Rep.* 2024. Vol. 14, 2742. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52536-z>.
59. Duval V., Lister I.M. MarA, SoxS and Rob of *Escherichia coli* – Global regulators of multidrug resistance, virulence and stress response. *Int J Biotechnol Wellness Ind.* 2013. Vol. 2(3). P. 101–124. doi: 10.6000/1927-3037.2013.02.03.2.
60. Redgrave L.S., Sutton S.B., Webber M.A., Piddock L.J. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 2014. Vol. 22(8). P. 438–445. doi: 10.1016/j.tim.2014.04.007.
61. Heisig P. Genetic evidence for a role of *parC* mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996. Vol. 40(4), P. 879–885. doi: 10.1128/AAC.40.4.879.
62. Cambau E., Bordon F., Collatz E., Gutmann L. Novel *gyrA* point mutation in a strain of *Escherichia coli* resistant to fluoroquinolones but not to nalidixic acid. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993. Vol. 37(6). P. 1247–1252. doi: 10.1128/aac.37.6.1247.
63. Lukjancenko O., Wassenaar T.M., Ussery D.W. Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microb Ecol.* 2010. Vol. 60(4). P. 708–720. doi: 10.1007/s00248-010-9717-3.
64. Cao L., Li X., Xu Y., Shen J. Prevalence and molecular characteristics of *mcr-I* colistin resistance in *Escherichia coli*: isolates of clinical infection from a Chinese University Hospital. *Infect Drug Resist.* 2018. Vol. 11. P. 1597–1603. doi: 10.2147/IDR.S166726.

65. Lim J.Y., Yoon J., Hovde C.J. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol.* 2010. Vol. 20(1). P. 5–14.
66. Doma A.O., Popescu R., Mitulețu M., Muntean D., Dégi J., Boldea M.V. et al. Comparative Evaluation of *qnrA*, *qnrB*, and *qnrS* Genes in *Enterobacteriaceae* Ciprofloxacin-Resistant Cases, in Swine Units and a Hospital from Western Romania. *Antibiotics (Basel).* 2020. Vol. 9(10), 698. doi: 10.3390/antibiotics9100698.
67. Nesse L.L., Osland A.M., Asal B., Mo S.S. Evolution of antimicrobial resistance in *E. coli* biofilm treated with high doses of ciprofloxacin. *Front Microbiol.* 2023. Vol. 14, 1246895. doi: 10.3389/fmicb.2023.1246895.
68. Schemann M., Kugler E.M., Buhner S., Eastwood C., Donovan J., Jiang W., Grundy D. The mast cell degranulator compound 48/80 directly activates neurons. *PLoS One.* 2012. Vol. 7(12), e52104. doi: 10.1371/journal.pone.0052104.
69. Katsu T., Kobayashi H., Fujita Y. Mode of action of gramicidin S on *Escherichia coli* membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1986. Vol. 860(3). P. 608–619. doi: 10.1016/0005-2736(86)90560-2.
70. Swebocki T., Barras A., Kocot A., Plotka M., Boukherroub R. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) Assays Using Broth Microdilution Method. 2023. <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5qpvo3x6dv4o/v1>.
71. Ye Z., Fu L., Li S., Chen Z., Ouyang J., Shang X. et al. Synergistic collaboration between AMPs and non-direct antimicrobial cationic peptides. *Nat Commun.* 2024. Vol. 15, 7319. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-51730-x>.
72. Lu Y., Liu J.H., Yue C., Bergen P.J., Wu R., Li J., Liu Y.Y. Overexpression of *mcr-1* disrupts cell envelope synthesis and causes the dysregulation of carbon metabolism, redox balance and nucleic acids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2022. Vol. 60(3), 106643. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106643>.
73. Lu T., Han H., Wu C., Li Q., Hu H., Liu W. et al. Discovery of a novel polymyxin adjuvant against multidrug-resistant gram-negative bacteria through oxidative

stress modulation. *Acta Pharm Sin B*. 2025. Vol. 15(3). P. 1680–1695. doi: 10.1016/j.apsb.2025.01.022.

74. Panec M., Katz D.S. Plaque Assay Protocols. 2006. URL: <https://asm.org/asm/media/protocol-images/plaque-assay-protocols.pdf?ext=.pdf> (Accessed: 07.04.2026).

75. Nikolic I., Vukovic D., Gavric D., Cvetanovic J., Aleksic Sabo V., Gostimirovic S. et al. An Optimized Checkerboard Method for Phage-Antibiotic Synergy Detection. *Viruses*. 2022. Vol. 14(7), 1542. doi: 10.3390/v14071542.

76. Kim M.K., Chen Q., Echterhof A., Pennetzdorfer N., McBride R.C., Banaei N. et al. A blueprint for broadly effective bacteriophage-antibiotic cocktails against bacterial infections. *Nat Commun*. 2024. Vol. 15, 9987. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53994-9>.

77. Shein A.M.S., Wannigama D.L., Hurst C. Monk P.N., Amarasiri M., Wongsurawat T. et al. Phage cocktail amikacin combination as a potential therapy for bacteremia associated with carbapenemase producing colistin resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep*. 2024. Vol. 14, 28992. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-79924-9>

78. Kim H., Xue X. Detection of Total Reactive Oxygen Species in Adherent Cells by 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate Staining. *J Vis Exp*. 2020. Vol. 160. doi: 10.3791/60682.

79. Grenier F., Matteau D., Baby V., Rodrigue S. Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BW25113. *Genome Announc*. 2014. Vol. 2(5), e01038-14. doi: 10.1128/genomeA.01038-14.

80. Wang C.H., Siu L.K., Chang F.Y., Tsai Y.K., Huang L.Y., Lin J.C. Influence of PhoPQ and PmrAB two component system alternations on colistin resistance from non-mcr colistin resistant clinical *E. Coli* strains. *BMC Microbiol*. 2024. Vol. 24(1). doi: 10.1186/s12866-024-03259-8.

81. Suga A., Kawaguchi M., Yonesaki T., Otsuka Y. Manipulating Interactions between T4 Phage Long Tail Fibers and *Escherichia coli* Receptors. *Appl Environ Microbiol*. 2021. Vol. 87(13), e0042321. doi: 10.1128/AEM.00423-21.