

ЗАТВЕРДЖУЮ  
Директор Інституту молекулярної біології і  
генетики НАН України

Михайло ТУКАЛО

(підпис)  
М.Т.



**АНОТОВАНИЙ ЗВІТ**  
**про виконану роботу у 2021 році в рамках реалізації проєкту**  
**із виконання наукових досліджень і розробок**

«Розробка комбінованої терапії важких *Klebsiella pneumoniae*–асоційованих нозокоміальних інфекцій для подолання їхньої антибіотикорезистентності»

**Назва конкурсу:** «Підтримка досліджень провідних та молодих вчених»  
**Реєстраційний номер Проєкту:** 2020.02/0246

**Підстава для реалізації Проєкту з виконання наукових досліджень і розробок** (реєстраційний номер та назва Проєкту) реєстраційний номер 2020.02/0246 «Розробка комбінованої терапії важких *Klebsiella pneumoniae*–асоційованих нозокоміальних інфекцій для подолання їхньої антибіотикорезистентності»

Рішення наукової ради Національного фонду досліджень України щодо визначення переможця конкурсу «Підтримка досліджень провідних та молодих вчених» протокол від «21» вересня 2020 року № 16-17.

## 1. ЗАГАЛЬНА ІНФОРМАЦІЯ ПРО ПРОЄКТ

Загальна тривалість виконання проєкту 2020 рік – 2022 рік

Тривалість виконання Проєкту у 2021 році

Початок – 30.04.2021

Закінчення – 15.12.2021

Загальна вартість Проєкту, грн. 8 970 600

Вартість Проєкту по роках, грн.:

1-й рік 1 969 000

2-й рік 4 383 600

3-й рік 2 618 000

## 2. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ВИКОНАВЦІВ ПРОЄКТУ

до виконання Проєкту буде залучено 7 виконавців, з них:

доктори наук 1;

кандидати наук 2;

інші працівники 4.

## 3. ІНФОРМАЦІЯ ПРО ГРАНТООТРИМУВАЧА ТА ОРГАНІЗАЦІЮ(І) СУБВИКОНАВЦЯ(ІВ) ПРОЄКТУ



Грантоотримувачем є Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, директором є Тукало Михайло Арсентійович, який діє на підставі Статуту, затвердженого розпорядженням Президії НАН України від 22.12.2016 № 922.  
Субвиконавців у проєкті немає.

#### 4. ОПИС ПРОЄКТУ

##### 4.1. Мета Проєкту (до 200 знаків)

Метою проєкту є розробка нового лікувального протоколу подолання множинної стійкості до антибіотиків, зокрема, до  $\beta$ -лактамів, у провідного збудника госпітальних інфекцій із високою летальністю - полірезистентних штамів *Klebsiella pneumoniae*. Для цього відповідно проводитиметься дослідження нових властивостей відомого антибіотику макролідної групи азитроміцину як проти-біоплівкового агенту у складі комбінованої протибактеріальної терапії із залученням низькоефективного антибіотику останнього резерву – колістину із метою його терапевтичного посилення для подолання антибіотикорезистентності у полірезистентних штамів *K.pneumoniae*. Ще одною метою проєкту буде дослідження можливих впливів азитроміцину на бактеріальну чутливість до провідних антибіотиків у лікуванні грамнегативних інфекцій –  $\beta$ -лактамів. Можливість фармакологічного підвищення чутливості до  $\beta$ -лактамів у полірезистентних *K.pneumoniae* та залучення нового підходу у лікуванні *K.pneumoniae* інфекцій через контроль над утворенням біоплівок в осередках інфекційного процесу дозволить розробити і впровадити перші національні рекомендації у лікування важких полірезистентних *K.pneumoniae* –асоційованих інфекцій..

##### 4.2. Основні завдання Проєкту (до 400 знаків)

Відповідно до таких цілей будуть виконані наступні завдання. Перше завдання проєкту полягає в оцінці ефектів комбінації AZM і CMS у фізіологічно досяжному діапазоні на формування біоплівки та поведінку планктону як стандартного штаму *K.pneumoniae* ATCC 10031, так і госпітальних штамів *K.pneumoniae*. Друге завдання - розробити *in vitro* модель катетер-асоційованої інфекції на основі колагенового матриксу для аналізу динаміки інфекційного процесу *K.pneumoniae* та дослідження ефектів AZM і CMS у комбінації та окремо. Третє завдання - дослідити, чи може AZM підвищувати фенотипову чутливість до  $\beta$ -лактамічних антибіотиків у стійких до  $\beta$ -лактамів (MDR) штамів *K.pneumoniae*. Четверте завдання - виявити молекулярні механізми підвищеної чутливості до  $\beta$ -лактамічних антибіотиків через підвищення експресії мембранного експортеру MexCD-Opj у штамів *K.pneumoniae* на фоні адаптації до AZM.

##### 4.3. Детальний зміст Проєкту:

###### - Сучасний стан проблеми (до 400 знаків)

Інфекції, спричинені грам-негативними бактеріями, та, особливо, представниками роду *Klebsella* в Україні стали одними з найрозповсюджених збудників госпітальних інфекційних ускладнень із множинною стійкістю до протибактерійних препаратів. Головною проблемою лікування таких інфекцій є їхня власна патогенність та токсичність у поєднанні із полірезистентністю. Такі штами є агресивними та часто призводять до летальних наслідків через низку вірогідність хронічного перебігу інфекційного ускладнення та/або персистення. Натомість, навіть коли масивна антибактеріальна терапія призводить до хронізації та/або персистення збудника та зменшення патологічного інфекційного процесу, вірогідність повторного рецидиву інфекції складає до 80% протягом наступних шість місяців. Тому стратегія лікування полірезистентних клебсієльозів є виключним пріоритетом сучасної клінічної мікробіології в Україні зокрема та у світі в цілому.

###### - Новизна Проєкту (до 400 знаків)



Вперше в Україні було приділено увагу популяційним аспектам антибіотикорезистентності головного збудника грам негативних інфекційних ускладнень.

- Методологія дослідження (до 400 знаків)

Матеріалом для дослідження був патологічний вміст хірургічних ран, бронхіальних змивів, спинномозкової рідини, крові отриманого на різних етапах захворювання. Під час досліджень використовували стандартизовані сухі поживні середовища промислового виробництва, а саме, МПА, МПБ, тіогліколеве середовище, середовище Мюллера-Хінтона, агар Сабуро, середовище Ендо, селективний сольовий агар, шоколадний агар, 5% кров'яний агар, цукровий бульон. Ферментативні властивості для ідентифікації здійснювали на VITEK 2 compact 15 (Франція). Основою для вибору антибіотиків, що підлягали включенню у дослідження, були рекомендації EUCAST guideline (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 10.0, valid from 2020-01-01) для *K.pneumoniae* або групи *Klebsiella spp.*, про поширення серед них набутої резистентності, а також про клінічну ефективність АБП. Визначення чутливості виділених культур *K.pneumoniae* до АБП визначали за допомогою диск-дифузійного методу відповідно до міжнародних рекомендацій EUCAST-2020р. Граничні значення діаметрів зон пригнічення росту калібровані по відношенню до європейських граничних значень, які опубліковані EUCAST і розміщені у вільному доступі на веб-сайті (<http://www.eucast.org>).

## **5. ОТРИМАНІ НАУКОВІ АБО НАУКОВО-ТЕХНІЧНІ РЕЗУЛЬТАТИ (до 2 сторінок) в поточному році/ в рамках реалізації Проєкту, зокрема:**

### **5.1. Опис наукових або науково-технічних результатів, отриманих в рамках виконання Проєкту (із зазначенням їх якісних та кількісних (технічних) характеристик)**

Дослідження проводились на базі Комунального неприбуткового підприємства Київської обласної ради "Київська обласна клінічна лікарня". В рамках проєкту вперше в Україні було проаналізовано молекулярно-генетичні особливості стійкості до бета-лактамів у госпітальних клебсіел. Було встановлено, що найрозповсюдженими є гени стійкості NDM та KPC (97% і 84,6% штамів із MDR фенотипом) та OXA-48, який виявився у 44,6% штамів. Тільки 3% колекції мали ген VIM.

В рамках виконання проєкту у поточному році було досліджено ефекти азитроміцину і колістину у моно-застосуванні і у комбінаціях у різних діапазонах концентрацій на планктоні і біоплівках стандартного штаму *K.pneumoniae* ATCC10031 та госпітальних штамів *K.pneumoniae*. Було виявлено, що не дивлячись на задекларовану вроджену фенотипову стійкість клебсіел до макролідів та, зокрема, до азитроміцину, культура ATCC10031 була набагато більш чутливою до азитроміцину чим до колістину в моно-режимі. Комбінація колістину і азитроміцину статистично не відрізнялась від моно-застосування азитроміцину у діапазоні колістину від 0 до 6 мг/л та відрізнялась у біль вираженому антибактеріальному ефекті при колістину більше 6 мг/л. Подібний ефект було зафіксовано по відношенню до планктонних культур штамів госпітальних ізолятів клебсієли. Втім, як і для штаму ATCC10031, моно-застосування азитроміцину мало суттєвий бактерицидний ефект, який посилювався із додаванням колістину. Як і для ATCC10031, для госпітальних штамів азитроміцин проявляв виражену антибіоплівкову дію. При чому, не було виявлено залежності ступеню резистентності і чутливості до азитроміцину. Цікаво, дія колістину не була передбачуваною згідно з фенотипом чутливості до колістину. Тобто, колістин пригнічував розвиток біоплівки із різною ефективністю як у випадку полічутливих, так і у випадку полірезистентних штамів. Як і у випадку із ATCC10031 комбінація азитроміцину і колістину мала виражену антибіоплівкову дію на всі штами.

Таким чином було встановлено що не дивлячись на задекларовану вроджену фенотипову стійкість клебсіел до макролідів всі штами *K.pneumoniae* проявляли чутливість до азитроміцину як у формі планктону, так і у формі біоплівки. Також з'ясувалось, що колістин не проявляє жодної антибактеріальної дії по відношенню до планктонної субпопуляції клебсіел, але проявляє обмежену антибіоплівкову дію. При чому, ця дія посилювалась у присутності азитроміцину, тобто антибіотики проявляли синергізм.



В рамках роботи у поточному році було створено *in vitro* модель катетер-асоційованої інфекції на основі пористого 3D-матриксу з колагену I типу, колонізованого епітеліоподібними клітинами лінії HEK293, та поживних середовищ, які імітують ексудат у рановому ложі. Продемонстровано, що підібрані для імітації ексудату середовища здатні підтримувати ріст культури *K.pneumoniae in vitro*.

Розроблену модель було використано для дослідження ефективності азитроміцин-комбінованої терапії для лікування інфекційного процесу, викликаного госпітальним MDR ізолятом *K.pneumoniae*. З'ясувалось, що не дивлячись на те, що культура клебсієли була колістин-чутливою, ефективність колістину спостерігалась виключно за умов несприятливої для росту бактерій моделі у другій модифікації, в той час як азитроміцин суттєво знижував біоплівкоутворення та планктонну популяцію клебсієл у всіх трьох модифікаціях моделі.

Було досліджено особливості структури біоплівки *K.pneumoniae* під впливом азитроміцин-комбінованої терапії та встановлено, що азитроміцин супресував експресію амілоїдних фібрил матриксу біоплівки *K.pneumoniae* в той час як колістин не перешкоджав синтезу бактеріальних функціональних амілоїдів.

## **5.2. За наявності науково-технічної продукції обґрунтування її переваг у порівнянні з існуючими аналогами**

Вперше в Україні було приділено увагу популяційним аспектам антибіотикорезистентності головного збудника грам негативних інфекційних ускладнень. Наразі не ведеться та не оприлюднювалась жодна робота в цьому напрямку. Вперше було створено біомімічну *in vitro* модель катетер-асоційованої інфекції, яка була використана для дослідження катетер-асоційованого ранового інфекційного процесу.

## **5.3. Практична цінність отриманих результатів реалізації Проєкту для економіки та суспільства (стосується проєктів, що передбачають проведення прикладних наукових досліджень і науково-технічних розробок)**

Оприлюднено та обговорено проблему множинної стійкості до антибіотиків у госпітальних інфекційних штамів. Вперше в Україні ідентифіковано та охарактеризовано повністю стійкий до всіх наявних антибіотиків госпітальний штам *K.pneumoniae* UHI 1633 із підтвердженими генами стійкості до карбапенемів, що було ізольовано та досліджено протягом першого етапу роботи у 2021 році. Цей штам було використано у виконанні роботи та публікації:

Moshynets, O.V.; Baranovskyi, T.P.; Iungin, O.S.; Kysil, N.P.; Metelytsia, L.O.; Pokholenko, I.; Potochilova, V.V.; Potters, G.; Rudnieva, K.L.; Rymar, S.Y.; Semenyuta, I.V.; Spiers, A.J.; Tarasyuk, O.P.; Rogalsky, S.P. eDNA Inactivation and Biofilm Inhibition by the Polymeric Biocide Polyhexamethylene Guanidine Hydrochloride (PHMG-Cl). Preprints 2021, 2021110280 (doi: 10.20944/preprints202111.0280.v1), яка знаходиться на стадії рецензування та розміщена у препринтовому архіві Preprints.org

## **5.4. Опис шляхів та способів подальшого використання результатів виконання Проєкту в суспільній практиці.**

Охарактеризовані штами будуть використані у подальшій роботі за проєктом. Планується оприлюднення матеріалів дослідження протягом 32го Європейського конгресу з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб (32nd European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 32nd ECCMID), на який подано три тези.

Примітка: Анотований звіт не повинен містити відомостей, заборонених до відкритого опублікування

### **Науковий керівник Проєкту**

С.н.с. Олена МОЩИНЕЦЬ

