



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Fagi - cudowne leki?

Author: Katarzyna Kasperkiewicz, Magdalena Noszczyńska

Citation style: Kasperkiewicz Katarzyna, Noszczyńska Magdalena. (2014). Fagi - cudowne leki? W: A. Babczyńska, M. Nakonieczny (red.), "Problemy Środowiska i Jego Ochrony" Cz. 22 (2014), (S. 126-140). Katowice : Wydawnictwo Uniwersytetu Śląskiego



Uznanie autorstwa - Użycie niekomercyjne - Bez utworów zależnych Polska - Licencja ta zezwala na rozpowszechnianie, przedstawianie i wykonywanie utworu jedynie w celach niekomercyjnych oraz pod warunkiem zachowania go w oryginalnej postaci (nie tworzenia utworów zależnych).



UNIWERSYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

**Katarzyna Kasperkiewicz
Magdalena Noszczyńska**

Fagi – cudowne leki?

Uniwersytet Śląski
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katowice

dr Katarzyna Kasperkiewicz – adiunkt w Katedrze Mikrobiologii, nauczyciel akademicki, członek Polskiego Towarzystwa Mikrobiologii. Prowadzi badania z zakresu immunochemii antygenów bakteryjnych oraz roli czynników odporności wrodzonej w patomechanizmie chorób zakaźnych. Uczestniczyła w wielu sympozjach oraz konferencjach zarówno krajowych jak i zagranicznych, gdzie prezentowała swoje osiągnięcia naukowe. Jest autorką i współautorką publikacji w czasopismach z list JCR.

mgr Magdalena Noszczyńska – asystent naukowo-dydaktyczny w Katedrze Mikrobiologii, doktorantka na kierunku „Advanced methods in Biotechnology and Biodiversity”. Interesuje się biotechnologią mikroorganizmów, szczególnie pałeczkami *Yersinia* spp. W swojej pracy naukowej zajmuje się immunochemią antygenów powierzchniowych wspomnianych wyżej bakterii. Dotychczasowe wyniki badań prezentowała na licznych konferencjach o zasięgu międzynarodowym i krajowym. Ponadto, jest autorką i współautorką publikacji w czasopismach z listy JCR.

Wzajemne relacje bakterii i fagów, z naszej, ludzkiej, perspektywy, dobrze opisują stare polskie porzekadła: „Kto mieczem wojuje, od miecza ginie”, „Jak Kuba Bogu, tak Bóg Kubie”, „Nosił wilk razy kilka, ponieśli i wilka” czy też wreszcie potoczne „Doigral się”.

Przy czym, precyzując podział ról zacytowanych przysłówiach, stroną wojującą mieczem, Kubą czy wilkiem jest właśnie bakteria, i to chorobotwórcza, a fag pełni rolę narzędzia sprawiedliwości.

Podstawami wiedzy o bakteriach chorobotwórczych dysponują już przedszkolaki. W kolejnych etapach edukacji ta wiedza się pogłębia, aż do etapu rozwiązań praktycznych, czyli metod terapii chorób wywołanych przez bakterie. Większość z dorosłych osób orientuje się w możliwościach i ograniczeniach antybiotykoterapii, a także jest świadoma nabywania odporności na antybiotyki przez niektóre bakterie. Z kolei niejedyn dorosły zapytany o fagi, albo bakteriofagi, często bezskutecznie przeszukuje pamięć w poszukiwaniu prawidłowych skojarzeń. Te najbardziej prawidłowe powinny umieszczać fagi w pobliżu szeroko rozumianych wirusów. Twory te, podobnie, jak inne wirusy potrzebują do rozmnażania komórek żywiciela, infekując jego organizm. W przypadku bakteriofagów, gospodarzem a zarazem ofiarą ataku, są bakterie. W tym również te, które doskonale rozwijają się i mnożą w narządach i tkankach ludzkiego ciała, powodując choroby, często coraz trudniejsze do leczenia. Genialnym w swej prostocie pomysłem wydaje się więc powiązanie bakteriofagów z bakteriami chorobotwórczymi w taki sposób, aby te pierwsze przypościły zmasowany atak na bakterie, które rozwijają się w zainfekowanym organizmie. Wygląda na to, że bakteriofagi w takiej roli mogą stać się narzędziem, na jakie czeka ludzkość, zwłaszcza jej zakażona część. Dobrze dobrany fag miałby apetyt wyłącznie na określony gatunek bakterii chorobotwórczych, pozostawiając nietkniętymi wszystkie pożyteczne i symbiotyczne. Fagi mają też szansę zdobyć przewagę nad antybiotykami także i w tym, że bakterie uodporniają się na antybiotyki i staje się on nieskuteczny. W relacji: bakteriofag–bakteria nie ma ryzyka uodpornienia się, podobnie, jak zając nigdy nie uodporni się na atak lisa. Albo wilka, aby było jak w staropolskim porzekadle (przyp. red. z serwisu internetowego www.us.edu.pl).

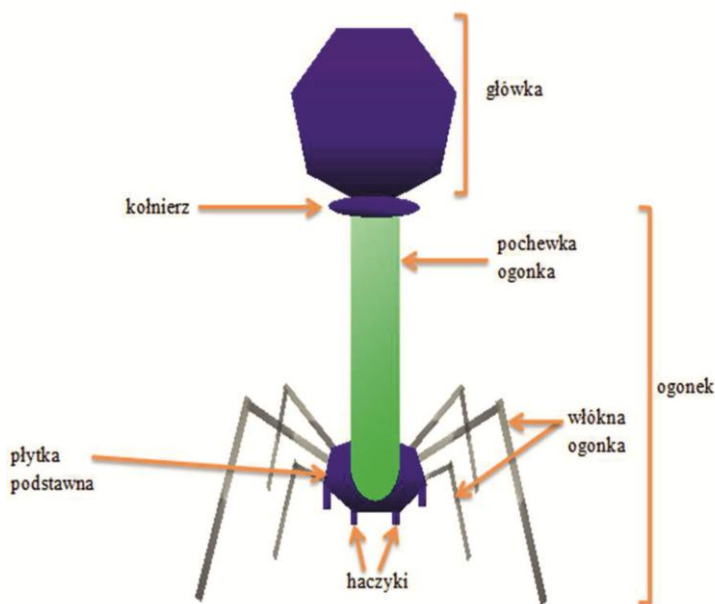
Antybiotyki jako drobnocząsteczkowe substancje hamujące wzrost lub namnażanie bakterii, odegrały niekwestionowaną rolę w medycynie. Ich „złoty wiek” przypada na lata 1940–2010. Dwie pierwsze dekady tej epoki były okresem odkrywania antybiotyków pochodzenia drobnoustrojowego. Kolejne lata należały do chemii medycznej, która umożliwiła projektowanie i produkcję ich półsyntetycznych lub syntetycznych analogów. Niestety, ten sposób produkcji kolejnych generacji, wszystkich klas antybiotyków opierał się tylko na zmianie chemicznych podstawników wokół permanentnego rdzenia, stanowiącego szkielet każdej molekuly tych terapeutyków. Powodowało to, że każdorazowo po wdrożeniu antybiotyku na rynek, w niedługim czasie po tym, pojawiały się już kliniczne szczepy bakterii na niego odporne [WALSH i WANCEWICZ, 2014]. Ponadto, często występujące zjawisko oporności wielolekowej (ang. *multidrug resistance*, MDR) bakterii, stało się problemem globalnym dla zdrowia publicznego. Najbardziej niebezpieczne patogeny pod względem szybko narastającej oporności na antybiotyki, zostały nazwane „alert-patogenami”. Wśród nich znalazły się obok Gram-dodatnich wankomycynopornych enterokoków (VRE) i metycylinoopornych szczepów *Staphylococcus aureus* (MRSA), Gram-ujemne pałeczki z rodzajów – *Klebsiella* i *Enterobacter* oraz szczepy z gatunku *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii*. W 2004 r. mikroorganizmy te zostały określone przez Infections Diseases Society of America (IDSA) mianem ESCAPE. O ile medycyna dysponuje jeszcze chemioterapeutykami (synercid, daptomycin) umożliwiającymi w większości przypadków zwalczanie zakażeń wywoływanych VRE lub MRSA, o tyle od wielu dekad nie opracowano nowego, skutecznego antybiotyku przeciwko ww. Gram-ujemnym bakteriom, którego struktura opierałaby się na zupełnie nowym rdzeniu chemicznym. W konsekwencji odkryte w drugiej połowie ubiegłego wieku polimyksyny,

których stosowania unikano ze względu na ich dużą toksyczność, stały się podstawą leczenia zakażeń tymi bakteriami [TALLY i DEBRUIN, 2000; ALLINGTON i RIVEY, 2001; FALAGAS i KASIAKOU, 2005; BOUCHER i in., 2009; FERNÁNDEZ i in., 2013]. Innym problemem są nie tylko ogromne koszty związane z wprowadzeniem nowego antybiotyku na rynek, ale czas jaki jest na to potrzebny. Od momentu zaprojektowania antybiotyku do jego sprzedaży mija co najmniej 11,5 roku [WALSH i WANCEWICZ, 2014]. Obecnie zbliżamy się do ery postantybiotykowej, której konsekwencje dla ludzkości będą bardzo poważne. Problemem będzie nie tylko brak możliwości leczenia konkretnych, wywoływanych przez bakterie chorób. Rykosztem dostanie się niemal całej współczesnej medycynie. Dla przykładu, transplantacje organów, wymagają nie tylko niezwykle sterylnych warunków, ale i podawania leków przeciwozrzucających, osłabiających układ odpornościowy człowieka. Dlatego stosowanie antybiotyków w trakcie hospitalizacji pacjenta jest konieczne, by zapobiec zakażeniom. Bez nich nawet najdrobniejsza infekcja będzie mogła stać się przyczyną śmierci chorego. Wobec tego koniecznym jest wprowadzenie nowych substancji lub czynników skutecznie zwalczających bakterie patogenne. Wydaje się, że jednym z takich czynników są bakteriofagi.

Bakteriofagi, nazywane inaczej fagami, są wirusami infekującymi bakterie. Zostały odkryte na początku dwudziestego wieku niezależnie przez WILLIAMA TWORT'A i FELIXA D'HÉRELLE'A. Zasadzają każde środowisko, w jakim występują ich naturalni gospodarze. Szacuje się, że ich liczba na Ziemi wynosi $>10^{31}$ [LANDER i in., 2008]. Klasyfikacja fagów ze względu na ich różnorodność morfologiczną, fizjologiczną i genomową jest bardzo skomplikowana. Niemniej jednak, powszechnie stosowane i zaakceptowane przez Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ang. *International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV) kryteria podziału bakteriofagów obejmują głównie naturę genomu (rodzaj oraz strukturę kwasu nukleinowego) oraz morfologię wirionu (częstek fagowych). System ICTV grupuje bakteriofagi w 10 rodzin, w tym 3 przydzielone do rzędu *Caudovirales* (rodziny *Myoviridae*, *Siphoviridae* oraz *Podoviridae*) [ACKERMANN, 2011]. Wiriony zbudowane są głównie z kwasów nukleinowych i peptydów. Te ostatnie tworzą płaszcz białkowy (kapsyd), będący bryłą, którego celem jest ochrona znajdującego się w jego wnętrzu kwasu nukleinowego. Kapsyd składa się z określonej liczby oligomerów zwanych kapsomerami. Ponadto białka uczestniczą w procesach adhezji fagów do komórek gospodarza i wykazują aktywność enzymatyczną. Wyróżnia się trzy podstawowe typy morfologiczne fagów:

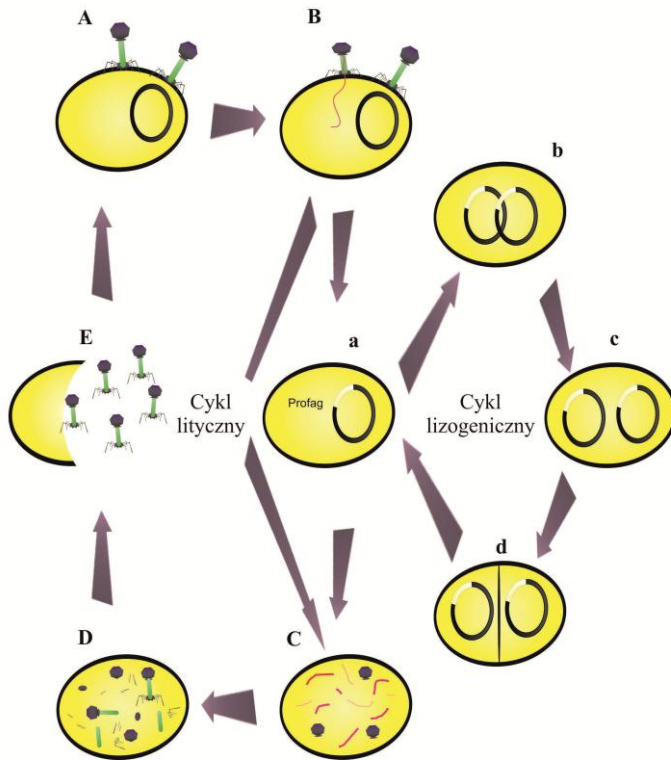
- ikosaedralny, w kapsydach o takiej symetrii podjednostki mogą występować w dwóch formach: pentamerów, czyli pięciu białek, które są umieszczone wokół wierzchołków bryły oraz heksamerów, będących gronami sześciu białek rozmieszczonych na ścianach i krawędziach kapsomerów [LUQUE i REGUERA, 2010].

- helikalny, gdzie kapsomery łączą się w regularnych odstępach wzdłuż łańcucha kwasu nukleinowego, zamykając go w helikalnej strukturze białkowej [CABILLY, 1999; PRISCO i DE BERARDINIS, 2012].
- złożony, będący najbardziej rozbudowaną formą morfologiczną bakteriofagów, łączy dwa wyżej wymienione kształty. Fagi o takiej morfologii składają się z ikosaedralnej główki i helikalnego ogonka. Zawierają dodatkowo takie elementy jak: kołnierz, włókna ogonka, pochewkę ogonka, haczyki oraz płytkę podstawową (Rys. 1) [ROSSMANN i in., 2004].



RYS. 1. Morfologia wirusa bakteryjnego na przykładzie bakteriofaga złożonego.

Bakteriofagi są bezwzględnyymi wewnątrzkomórkowymi pasożytami. Cechuje je zdolność do infekowania tylko swoistych gatunków, a nawet szczepów bakterii. Owa swoistość jest zależna od występowania na powierzchni komórki bakteryjnej receptorów rozpoznawanych przez fagi. Receptorami są m.in. fragmenty otoczek bakteryjnych, rzęsek czy też lipopolisacharydu [ORLOVA, 2009]. Bakteriofagi przeprowadzają (1) cykl lityczny kończący się zniszczeniem komórki bakteryjnej i uwolnieniem średnio dwustu potomnych fagów lub (2) cykl lizogeniczny, którego wynikiem jest zintegrowanie materiału genetycznego faga z chromosomem bakterii. Podstawą obydwu cykli jest rozpoznanie specyficznego dla siebie gospodarza i wprowadzenie do wnętrza jego komórki własnego kwasu nukleinowego (Rys. 2) [GOODRIDGE, 2004; SKURNIK i STRAUCH, 2006].



RYS. 2. Cykle życiowe bakteriofagów. *Cykl lityczny*. **A.** Bakteriofag rozpoznaje specyficzny receptor na powierzchni komórki bakteryjnej i przyłącza się do niego. Jednocześnie więcej niż jeden fag może adsorbować do mikrobiologicznej komórki. **B.** Wirus bakteryjny zaburza ciągłość osłony bakteryjnej i wstrzykuje do cytoplazmy komórki bakteryjnej kwas nukleinowy. **C.** DNA faga kieruje metabolizmem bakterii celem produkcji wirusowych białek i kwasu nukleinowego; komponowane są puste główki i ogonki fagowe. **D.** Składanie nowych wirionów jako pustych główek wypełnianych genomem faga, do których przyłączony zostaje ogonek. **E.** Potomne fagi uwalniane są z komórki bakteryjnej w wyniku jej lizy. *Cykl lizogeniczny*. W tym cyklu dwa pierwsze etapy są takie same jak etapy **A** i **B** cyklu litycznego. Konkretnie różnice obserwowane są dopiero od etapu trzeciego. Wirus bakteryjny może rozpocząć reprodukcję nowych wirionów (jak w cyklu litycznym) lub (**a**) zintegrować swój DNA z chromosomem bakteryjnym i istnieć jako profag. **b, c.** DNA faga jest powielane razem z bakteryjnym DNA i przekazywane potomnym komórkom. **D.** Każda potomna komórka bakteryjna niesie wirusowe DNA. Zwykle komórki z wbudowanym do chromosomu profagiem są zdolne do replikacji przez wiele generacji. W niektórych przypadkach może zostać zainicjowany cykl lityczny, co prowadzi do śmierci bakterii.

Fagi tak jak inne wirusy, z biologicznego punktu widzenia nie żyją. Mogą przetrwać tylko w żywym organizmie, jakim są bakterie. Już w latach dwudziestych ubiegłego wieku twierdzono, że fagi istnieją pod osłoną życia. Posiadają kwas nukleinowy w postaci DNA lub RNA, ale nigdy obydwaj jednocześnie, jak żyjące komórki. Co więcej, fagi nie syntezują własnego ATP. Można określić je jako makromolekuły będące kompleksem kwasów nukleinowych i białek, metabolicznie nieaktywne poza bakterią, które replikują swój materiał genetyczny tylko po rozpoznaniu i zainfekowaniu odpowiedniego dla siebie bakteryjnego gospodarza [VANDAMME, 2014].

Po raz pierwszy bakteriofagi w kuracji ludzi zostały zastosowane w 1919 roku przez FELIXA D'HÉRELLE²A, w leczeniu ostrej biegunki u dwunastoletniego chłopca, a następnie u innych pacjentów [SULAKVELIDZE i in., 2001]. Jednakże słabe zrozumienie natury bakteriofagów, używanie preparatów fagowych zanieczyszczonych cząstkami bakterii, ale przede wszystkim odkrycie antybiotyków, spowodowało zaniechanie badań nad fagoterapią na Zachodzie. Pomimo tego, głównie z powodu ograniczonego dostępu do antybiotyków, takie badania kontynuowano w Europie Wschodniej [DUCKWORTH i GULIG, 2002]. Rosnąca antybiotykooporność bakterii stała się motywacją dla społeczności naukowej na Zachodzie do ponownej ewaluacji terapii fagowej w walce z infekcjami bakteryjnymi, których nie można wyleczyć konwencjonalną chemioterapią. Dzięki temu, powstało wiele bardzo dobrych publikacji potwierdzających nie tylko skuteczność, ale i bezpieczeństwo terapii z użyciem bakteriofagów, w dobrze monitorowanych próbach na zwierzętach i ludziach-wolontariuszach, które spełniają wszelkie kryteria stawiane obecnie takim badaniom [SULAKVELIDZE i in., 2001]. Terapia fagowa jak dotąd jest tylko terapią eksperymentalną i stosuje się ją wyłącznie jeśli wszystkie inne metody zawiodą. Można poddać się jej w Polsce w otwartym pod koniec 2005 roku Ośrodku Terapii Fagowej we Wrocławiu, a także w Gruzji i Meksyku, gdzie swoje placówki mają naukowcy z Instytutu Bakteriofagów, Mikrobiologii i Wirusologii z Tbilisi (Gruzja). Fagoterapia wykazuje wysoką, bo ponad 94-procentową skuteczność w leczeniu takich infekcji jak: zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie kości i szpiku, zapalenie kości po złamaniu, zakażenie układu moczowego, przewlekłe ropne przetoki, zapalenie powiek, spojówek, ucha środkowego, ropnie skóry, ropowica, trądzik martwiczy i ropnie gruczołu piersiowego [MATSUZAKI i in., 2005; HANLON, 2007]. Fagoterapię można także z powodzeniem stosować u pacjentów z obniżoną odpornością. Wykazano, że suplementacja antybiotyków bakteriofagami w leczeniu ropowicy u pacjentów onkologicznych, umożliwia wyjąłowanie rany, a tym samym zapobiega rozwojowi posocznicy [TRELIŃSKA i in., 2010]. W fagoterapii stosuje się odpowiednie preparaty fagowe, które są przygotowywane wg określonej procedury, indywidualnie dla każdego pacjenta. Aby przygotować taki preparat, przeprowadza się tzw. typowanie fagowe. Polega ono na wyizolowaniu od pacjenta szczepu bakterii, będącej przyczyną infekcji, a następnie poszukiwaniu faga, na którego działanie wyizolowany patogen jest wrażliwy

[MIĘDZYBRODZKI i in., 2006]. Zdarza się, że w trakcie terapii, bakterie nabierają oporności przeciwko specyficznym dla siebie fagom, przez co dalsze leczenie pacjenta jest nieskuteczne. Dlatego, znakomitym sposobem na uniknięcie tego rodzaju komplikacji jest stosowanie koktajli fagowych. Są to mieszanki kilku różnych wirusów bakteryjnych, wspólnie zapewniających szerszy zakres działania przeciwbakteryjnego. Koszty produkcji koktajli fagowych nie są małe, ale niezaprzeczalnie ich stosowanie jest tańsze w porównaniu z kosztami nieefektywnego leczenia antybiotykami [CHAN i in., 2013]. Dodatkowo, na terenie Gruzji i Rosji dostępne są w sprzedaży komercyjne preparaty zawierające cząstki fagowe [HOUSBY i MANN, 2009]. Należą do nich m.in.: PHAGEPY firmy JSC Biochimpharm – płyn do stosowania zarówno oralnego jak i zewnętrznego, zawierający fagi infekujące *P. aeruginosa*; PHAGESAL – tabletki produkowane przez tę samą firmę, skierowane przeciwko bakteriom z rodzaju *Salmonella* [JSC Biochimpharm, 2014]; a także PhagoBioDerm® firmy PolymerPharm – polimerowy bandaż zawierający koktajl fagowy, przeznaczony do aplikacji na rany [ABEDON i in., 2011; PolymerPharm, 2014]. Do głównych zalet fagoterapii zalicza się (1) możliwość zwalczania bakterii antybiotykoopornych (2) przy jednoczesnym braku jej wpływu na naturalną mikroflorę człowieka, (3) co przekłada się na brak rozwoju biegunek oraz grzybic układu pokarmowego i pochwy, (4) brak toksyczności fagów w stosunku do organizmu wyższego; (5) a także logarytmiczny wzrost fagów, który pozwala na ich namnażanie do takiej ilości, jaka jest niezbędna do eradykacji patogenów. Za stosowaniem fagów w leczeniu przemawia także ich ogólnodostępność [SKURNIK i STRAUCH, 2006; LOC-CARRILLO i ABEDON, 2011].

Terapia fagowa może być również z powodzeniem stosowana w leczeniu infekcji bakteryjnych u roślin. Jak dotąd zastosowano ją w eradykacji m.in.: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* powodującym rdzę bakteryjną, *Erwinia* spp., doprowadzającą do rozwoju zarazy ogniowej, *Ralstonia* odpowiedzialną za bakteryjne więdnienie tytoniu czy *Streptomyces scabies* powodujący parch zwykły ziemniaka. Wdrożenie fagów do uprawy roślin, mimo bardzo dobrych wyników wstępnych badań, napotyka poważne problemy. Do najważniejszych należą trudności w sukcesywnym przeniesieniu wyników laboratoryjnych na pola uprawne, gdzie nie ma kontroli nad temperaturą, wilgotnością powietrza, promieniowaniem UV, a także pH gleby. Dodatkowo rolnicy, obciążeni wydatkami na walkę z chwastami, insektami, grzybami czy wirusami roślinnymi, nie wykazują zbyt dużego zainteresowania nowymi technologiami. Poza tym panuje ogólna nieuzasadniona obawa o rozprzestrzenienie się fagów w danym ekosystemie. Innym problemem jest sama natura zakażeń bakteryjnych u roślin. Patogeny bardzo często występują w postaci zbitej i gęstej masy, otoczonej pozakomórkowymi polisacharydami. Uniemożliwia to efektywną adsorpcję fagów do powierzchni bakterii i zmniejsza wydajność terapii [BALOGH i in., 2010]. Przeprowadzono także liczne badania dokumentujące skuteczność fagoterapii w walce z bakteryjnymi patogenami zwierząt. Jedne z pierwszych analiz dotyczyły leczenia zakażeń szczepami *E. coli* na modelu my-

sim, porównujące skuteczność preparatu fagowego i antybiotyków. W tym celu część myszy zainfekowanych szczepem *E. coli* O18:K1:H7 leczono różnymi antybiotykami, natomiast pozostałą część poddano fagoterapii. Badania te wykazały, że jedna dawka fagów dała podobny efekt terapeutyczny co kilkakrotnie powtarzane dawki streptomycyny. Co więcej, była bardziej skuteczna niż wielokrotne dawki tetracykliny, ampicyliny, chloramfenikolu oraz trimetoprimu z sulfafurazolem [SMITH i HUGGINS, 1981; WESTWATER i in., 2003]. Kolejne testy preparatów fagowych przeprowadzono na cielętach, jagniętach oraz prosiętach. Pozytywne wyniki tych badań, były dowodem na to, że leczenie infekcji powodowanych bakteriami *E. coli* u zwierząt jest możliwe [SULAKVELIDZE i in., 2001]. Wykazano również skuteczność fagów w walce z bakteriami z rodzaju *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Helicobacter*, *Streptococcus* oraz *Staphylococcus*, powodującymi infekcje m.in. u myszy, kurcząt, świń i cieląt. Drogi podawania terapeutyków były różne, zarówno doustne, jak i domięśniowe, donosowe, dootrzewnowe, czy też dożylnie [HANLON, 2007; ALMEIDA i in., 2009]. Interesującym jest fakt, iż fagi z powodzeniem są także stosowane w przemyśle spożywczym. Szacuje się że co roku 25% wyprodukowanej na całym świecie żywności, nie nadaje się do spożycia, ze względu na szkody wyrządzone przez bakterie. Straty finansowe takich szkód wynoszą biliony dolarów. Społeczeństwo oczekuje żywności pozbawionej niebezpiecznych patogenów, a jednocześnie wolnej od konserwantów. Wśród liderów mikrobiologicznych zanieczyszczeń żywności przodują: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* i *Campylobacter jejuni*. Bakterie te powodują głównie poważne infekcje układu pokarmowego. Ich rezerwuarem są zwierzęta hodowlane. Kontrola zakażeń bakteryjnych wśród tych zwierząt jest bardzo skomplikowana. Do niedawna, antybiotyki stanowiły główną linię obrony przed nimi. Niestety, ich nadużycie w paszach, przyczyniło się do rozprzestrzenienia antybiotykoooporności wśród bakterii. Obecnie dodawanie antybiotyków do pasz w Europie jest zabronione, niemniej jednak jest to dalej praktykowane w Stanach Zjednoczonych. Potencjalne korzyści z zastosowania fagoterapii w kontroli i eradykacji patogennych bakterii wśród zwierząt hodowlanych, były oceniane w wielu badaniach na drobiu, świnia, owcach i bydło, także w warunkach *in vivo*. Przeprowadzone testy jednoznacznie wykazały jej skuteczność [ENDERSEN i in., 2014]. Ponadto dostępnych jest wiele komercyjnych preparatów fagowych przeciwko infekcjom bakteryjnym u zwierząt. Stosowane są one do leczenia zarówno zwierząt domowych, jak i przede wszystkim hodowlanych. Przykładem takich preparatów są PLSV-1TM przeciwko bakteriom z rodzaju *Salmonella* oraz INT-401TM przeciwko szczepom z gatunku *Clostridium perfringens* [Intralictix, 2014]. Co więcej, fagi można także stosować w kontroli żywności, która nie jest poddawana żadnym procesom przetwarzania. Do takiej żywności należą m.in.: świeże owoce i warzywa oraz mleko w proszku dla niemowląt [ENDERSEN i in., 2014]. Terapia z zastosowaniem wirusów bakteryjnych w walce z zakażeniami bakteryjnymi, nie jest terapią idealną. Fagi mogą być nośnikami niebezpiecznych genów np. kodujących toksyny. Dlatego

bardzo ważna jest znajomość genomu faga, który ma zostać użyty w celach terapeutycznych. Pomimo znakomych wyników terapii fagami w warunkach *in vitro*, podobnych rezultatów nie otrzymuje się w warunkach *in vivo*. Istotnym czynnikiem ograniczającym skuteczność terapii fagowej jest szybki klirens fagów z organizmu ludzi i zwierząt, zależny od niespecyficznego wychwytywania wirionów przez układ siateczkowo-śródbłonkowy wątroby i śledziony. Aby ograniczyć ten proces, stosuje się m.in. fagi o wydłużonym okresie półtrwania w surowicy, uzyskiwane za pomocą metody seryjnego pasażu. Bardzo ważne jest również zapobieganie przenoszeniu przez fagi genów oporności na antybiotyki i kodujących niebezpieczne toksyny pomiędzy bakteriami. Dlatego w opisywanej terapii należy stosować tylko fagi lityczne, ewentualnie fagi lizogeniczne z inaktywowanymi genami odpowiedzialnymi za lizogenezę [SULAKVELIDZE i in., 2001].

Szczególne cechy i właściwości bakteriofagów czynią z nich obiecujące narzędzie w rękach współczesnej biotechnologii, medycyny i farmacji. Technika phage display opiera się na zastosowaniu wirusów bakteryjnych w poszukiwaniu ligandów dla białkowych i niebiałkowych struktur docelowych [ZAWADZKA i in., 2012]. Po raz pierwszy została opisana w 1985 roku i polega na prezentacji produktu pożądanego genu na powierzchni kapsydu bakteriofaga. Sekwencję cDNA produktu wprowadza się do genu kodującego białko płaszczka bakteriofaga. Tego typu modyfikacja skutkuje ekspresją obcego białka lub peptydu na powierzchni kapsydu, z zachowaniem charakterystycznych dla nich właściwości. Ligandy nie tracą swej specyficzności i są rozpoznawane przez odpowiednie receptory [HAQ i in., 2012]. Technika phage display znalazła zastosowanie m.in. w nowoczesnej terapii przeciwnowotworowej. Pozwala na uzyskanie peptydów, blokujących rozwój guza, których miejscem wiązania są fragmenty powierzchni komórek nowotworowych. Związki te mogą służyć jako nośniki substancji przeciwnowotworowych, hamować angiogenezę lub blokować aktywność enzymów odpowiedzialnych za rozrost nowotworu. Przykładem takiego peptydu, jest białko, które blokuje oddziaływanie czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) z receptorem. Owe białko prezentowane na powierzchni kapsydu faga, jest antagonistą receptora dla VEGF, uniemożliwiając temu ostatniemu przyłączenie się do receptora. Skutkuje to zahamowaniem unaczynienia guza, ograniczeniem podziałów komórkowych, a w dalszym efekcie prowadzi do zmniejszenia jego masy i ilości przerzutów [VODNIK i in., 2011].

Ponadto, metoda phage display znalazła także zastosowanie w konstrukcji szczepionek. Stworzenie szczepionki opartej na tej technice wymaga wprowadzenia do genomu faga genu kodującego pożądanego antygen lub jego fragment, czego skutkiem jest produkcja fuzyjnego białka na powierzchni kapsydu. Wprowadzenie tak zrekombinowanego bakteriofaga do organizmu, prowadzi do produkcji przeciwciał oraz indukcji limfocytów T przeciwko antygenowi wytworzonemu na kapsydzie. Zmodyfikowane fagi są łatwe do uzyskania w dużych ilościach, są stabilne, a ich produkcja nie wymaga wysokich kosztów [PRISCO i DE BERARDINIS, 2012]. Metoda ta

okazała się skuteczniejsza od użycia standardowych plazmidowych szczepionek DNA. Na jej efektywność wpływa m.in. fakt, iż wprowadzane do organizmu DNA jest chronione przez białka fagowego kapsydu przed degradacją [HAQ i in., 2012].

Ostatnie badania w dziedzinie biotechnologii wykazały ogromny potencjał użycia enzymów bakteriofagowych jako czynników antybakteryjnych. Należą do nich endolizyny i holiny. Te pierwsze są nietoksycznymi białkami o różnym spektrum aktywności, wykazującymi wysoką efektywność [BORYSOWSKI i in., 2006]. Posiadają aktywności amidaz, muramidaz, peptydaz, endopeptydaz oraz glikozydaz. Degradują zatem różne wiązania w strukturze peptydoglikanu ściany komórkowej. Endolizyny są skuteczne w walce z patogenami takimi jak m.in. *Streptococcus* spp., *S.aureus* w tym MRSA, *Enterococci*, *Bacillus anthracis*, a także beztlenowe laseczki z rodzaju *Clostridium* [FENTON i in., 2010]. Enzymami, które kontrolują działanie endolizyn są holiny, niskocząsteczkowe, hydrofobowe białka błonowe. W cyklu litycznym powodują rozerwanie błony cytoplazmatycznej, jednocześnie pozwalając na uwolnienie endolizyn. Stanowią bardzo różnorodną grupę białek, które zasługują na uwagę ze względu na ich zdolność do degradacji błon biologicznych. Ich antybakteryjny potencjał nie jest jednak dobrze zbadany, gdyż ich silne właściwości toksyczne utrudniają znalezienie zwierzęcego modelu do badania ich molekularnej ekspresji [BRZOWSKA i in., 2011; DRULIS-KAWA i in., 2012].

Jedną z podstawowych strategii przeżywalności w środowisku naturalnym mikroorganizmów jest umiejętność tworzenia skomplikowanych struktur zwanych biofilmem. Jest to bakteryjna wspólnota, złożona z licznych komórek zakotwiczo-nych do substratu lub podłoża, a także do siebie nawzajem, otoczona substancją pozakomórkową (egzopolisacharydem), cechująca się spowolnionym tempem wzrostu, a także ekspresją genów, które nie są charakterystyczne dla bakterii planktonicznych. Biofilmy tworzone przez patogenne bakterie stanowią duże zagrożenie dla ludzi, gdyż powodują choroby takie jak zapalenie wsierdza, gruczołu krokowego, chroniczne zapalenie ucha środkowego, czy paradontozę. Ponadto są one odporne na działanie środków antybakteryjnych. Przyczyną tego są m.in. trudności w przedostawaniu się antybiotyków lub innych środków przez powłokę egzopolisacharydu, a także osłabiony metabolizm bakterii [DONLAN i COSTERTON, 2002]. Bakteriofagi, które infekują bakterie otoczone śluzem lub otoczkami są zdolne do produkcji związanych z kapsydem białek o aktywności depolimeraz. Enzymy te skutecznie degradują polisacharydy, których fragmenty są receptorami dla bakteriofagów. Dzięki występowaniu depolimeraz, fagi znajdują zastosowanie w niszczeniu bakteryjnych biofilmów. Degradacja egzopolisacharydu może ułatwić także dostęp do bakterii antybiotykami. Poza degradacją biofilmów, enzymy te znajdują zastosowanie także w leczeniu chorób roślinnych, a także chorób zwierzęcych wywoływanych przez bakterie otoczkowe [AZEREDO i SUTHERLAND, 2008].

Niezwykle interesującą aplikacją bakteriofagów jest zastosowanie ich w terapii uzależnień od narkotyków. Wyniki badań przeprowadzonych na modelu zwierzęcym są bardzo obiecujące. Zrekombinowane fagi metodą phage display, które pre-

zentowały na powierzchni kapsydu tysiące kopii przeciwciał monoklonalnych swoistych dla kokainy, podawano szczurom [DICKERSON i JANDA, 2008]. Po zaaplikowaniu zwierzętom narkotyku, przeciwciała te skutecznie go wiązały, blokując jego przedostanie się do ośrodkowego układu nerwowego. W innym doświadczeniu wykazano, iż enzym bakteryjny – esteraza, przekształca kokainę w produkty, które nie wykazują psychoaktywności. Dzięki technice phage display otrzymano ekspresję esterazy w strukturze kapsydu bakteriofaga [ROGERS i in., 2005].

Piśmiennictwo

1. ABEDON S.T., KUHL S.J., BLASDEL B.G., KUTTER E. M. 2011: Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 1: 66–85.
2. ACKERMANN H.W. 2011: Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*. 2: 90–94.
3. ALLINGTON D.R., RIVEY M.P. 2001: Quinupristin/dalfopristin: a therapeutic review. *Clin. Ther.* 23: 24–44.
4. ALMEIDA A., CUNHA A., GOMES N.C.M., ALVES E., COSTA L., FAUSTINO M.A.F. 2009: Phage Therapy and Photodynamic Therapy: Low Environmental Impact Approaches to Inactivate Microorganisms in Fish Farming Plants. *Mar. Drugs*. 7: 268–313.
5. AZEREDO J., SUTHERLAND I.W. 2008: The Use of Phages for the Removal of Infectious Biofilms. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9: 261–266.
6. BALOGH B., JONES J.B., IRIARTE F.B., MOMOL M.T. 2010: Phage therapy for plant disease control. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11: 48–57.
7. BORYSOWSKI J., WEBER-DĄBROWSKA B., GÓRSKI A. 2006: Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp. Biol. Med.* 231: 366–377.
8. BOUCHER H.W., TALBOT G.H., BRADLEY J.S., EDWARDS J.E., GILBERT D., RICE L.B., SCHELD M., SPELLBERG B., BARTLETT J. 2009: Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48: 1–12.
9. BRZOZOWSKA E., BAZAN J., GAMIAN A. 2011: Funkcje białek bakteriofagowych. *Post. Hig. Med. Dośw.* 65: 167–176.
10. CABILLY S. 1999: The basic structure of filamentous phage and its use in the display of combinatorial peptide libraries. *Mol. Biotechnol.* 12: 143–148.
11. CHAN B.K., ABEDON S.T., LOC-CARRILLO C. 2013: Phage cocktails and future of phage therapy. *Future Microbiol.* 8: 769–783.
12. DICKERSON T.J., JANDA K.D. 2008: Recent Advances for the Treatment of Cocaine Abuse: Central Nervous System Immunopharmacotherapy. [W:] RAPAKA R. S. i SADÉE W. (red.). *Drug Addiction. From Basic Research to Therapy*. Springer New York. ss.: 217–229
13. DONLAN R.M., COSTERTON J.W. 2002: Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 167–93.
14. DRULIS-KAWA Z., MAJKOWSKA-SKROBEK G., MACIEJEWSKA B., DELATTRE A.S., LAVIGNE R. 2012: Learning from bacteriophages – advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1: 699–722.
15. DUCKWORTH D.H., GULIG P.A. 2002: Bacteriophages: potential treatment for bacterial infections. *BioDrugs*. 16: 57–62.
16. ENDERSEN L., O'MAHONY J., HILL C., ROSS R.P., MCAULIFFE O., COFFEY A. 2014: Phage therapy in the Food Industry. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 5: 15.1–15.23.

17. FALAGAS M.E., KASIAKOU S.K. 2005: Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 40: 1333–1341.
18. FENTON M., ROSS P., MC AULIFFE O., O'MAHONY J., COFFEY A. 2010: Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioeng. Bugs.* 1: 9–16.
19. FERNÁNDEZ L., ÁLVAREZ-ORTEGA C., WIEGANDA I., OLIVARES J., KOCÍNCOVÁČ D., LAMC J. S., MARTÍNEZ J.L., HANCOCKA R.E. W. 2013: Characterization of the polymyxin B resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57: 110–119.
20. GOODRIDGE L.D. 2004: Bacteriophage biocontrol of plant pathogens: fact or fiction? *Trends Biotechnol.* 22: 384–385.
21. HANLON G.W. 2007: Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 30: 118–128.
22. HAQ I.U., CHAUDHRY W.N., AKHTAR M.N., ANDLEEB S., QADRI I. 2012: Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. *Virol. J.* 9: 9.
23. HOUSBY J.N., MANN N.H. 2009: Phage therapy. *Drug Discov. Today.* 14: 536–540.
24. LANDER G.C., EVILEVITCH A., JEEMBAEVA M., POTTER C.S., CARRAGHER B., JOHNSON J.E. 2008: Bacteriophage Lambda Stabilization by Auxiliary Protein gpD: Timing, Location, and Mechanism of Attachment Determined by Cryo-EM. *Structure.* 16: 1399–1406.
25. LOC-CARRILLO C., ABEDON S.T. 2011: Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage.* 1: 111–114.
26. LUQUE A., REGUERA D. 2010: The structure of elongated viral capsids. *Biophys. J.* 98: 2993–3003.
27. MATSUZAKI S., RASHEL M., UCHIYAMA J., SAKURAI S., UJIHARA T., KURODA M., IKEUCHI M., TANI T., FUJIEDA M., WAKIGUCHI H., IMAI S. 2005: Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious disease. *J. Infect. Chemother.* 11: 211–219.
28. MIĘDZYPBRODZKI R., BORYSOWSKI J., FORTUNA W., WEBER-DĄBROWSKA B., GÓRSKI A. 2006: Terapia fagowa jako alternatywa w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie antybiotykooporne. *Kardiochir. Torakochir. Pol.* 3: 201–205.
29. ORLOVA E.V. 2009: How viruses infect bacteria? *EMBO J.* 28: 797–798.
30. PRISCO A., DE BERARDINIS P. 2012: Filamentous bacteriophage fd as an antigen delivery system in vaccination. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 5179–5194.
31. PRISCO A., DE BERARDINIS P. 2012: Filamentous bacteriophage fd as an antigen delivery system in vaccination. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 5179–5194.
32. ROGERS J.C., JENNY M., MEE J.M., KAUFMANN G.K., DICKERSON T.J., JANDA K.D. 2005: Towards Cocaine Esterase Therapeutics. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 10016–10017.
33. ROSSMANN M.G., MESYANZHINOV V.V., ARISAKA F., LEIMAN P.G. 2004: The bacteriophage T4 injection machine. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 171–180.
34. SKURNIK M., STRAUCH E. 2006: Phage therapy: facts and fiction. *Int. J. Med. Microbiol.* 296: 5–14.
35. SMITH H.W., HUGGINS M.B. 1981: Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* 128: 307–318.
36. SULAKVELIDZE A., ALAVIDZE Z., MORRIS J.G. JR. 2001: Bacteriophage Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 649–659.
37. TALLY F.P., DEBRUIN M.F. 2000: Development of daptomycin for Gram-positive infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 46: 523–526.

38. TRELIŃSKA J., STOLARSKA M., ZALEWSKA-SZEWCZYK B., KUZAŃSKI W., MLYNARSKI W. 2010: Zastosowanie bakteriofagów w leczeniu zakażeń o etiologii *Pseudomonas aeruginosa* u pacjentów z ostrymi białaczkami – opis dwóch przypadków. *Onkol. Pol.* 1: 50–53.
39. VANDAMME E.J. 2014: Phage therapy and phage control: to be revisited urgently!! *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89: 329–333.
40. VODNIK M., ZAGER U., STRUKLJ B., LUNDER M. 2011: Phage display: selecting straws instead of needle from a haystack. *Molecules.* 16: 790–817.
41. WALSH C.T., WANCEWICZ T.A. 2014: Prospects for new antibiotics: a molecule-centered prospective. *J. Antibiot.* 67: 7–22.
42. WESTWATER C., KASMAN L.M., SCHOFIELD D.A., WERNER P.A., DOLAN J.W., SCHMIDT M.G., NORRIS J.S. 2003: Use of Genetically Engineered Phage To Deliver Antimicrobial Agents to Bacteria: an Alternative Therapy for Treatment of Bacterial Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1301–1307.
43. ZAWADZKA Z., ADAMCZYK M., TYBINKA A., ŁĄTKA A., DĄBROWSKA K., GÓRSKI A. 2012: Biotechnologia bakteriofagów: wybrane zastosowania metody phage-display. *Postępy Farmacji. Wersja elektroniczna wydania 3 /2012.*

Źródła internetowe

1. Intralictix, 2014: Intralix – Safety by Nature [Dostęp: czerwiec 2014]. Dostępny w Internecie: <http://www.intralytix.com>
2. JSC Biochimpharm, 2014: JSC Biochimpharm [Dostęp: czerwiec 2014]. Dostępny w Internecie: <http://www.biochimpharm.ge>
3. PolymerPharm, 2014: PolymerPharm – Biodegradable, Biocompatible Drug Delivery System [Dostęp: czerwiec 2014]. Dostępny w Internecie: <http://www.polymerpharm.ge>