

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE**

Prírodovedecká fakulta

**Fágová Terapia**

2010

Juraj Szász

**UNIVERZITA KOMENSKÉHO V BRATISLAVE**

Prírodovedecká fakulta

Katedra molekulárnej biológie

## **Fágová Terapia**

Bakalárska práca

**Juraj SZÁSZ**

Študijný odbor 4.2.1 Biológia

Vedúci bakalárskej práce: Doc. RNDr. Hana Drahovská, PhD.

BRATISLAVA 2010

---

## ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

**Meno a priezvisko študenta:** Juraj Szász  
**Študijný program:** biológia (Jednoodborové štúdium, bakalársky I. st., denná forma)  
**Študijný odbor:**  
**Typ záverečnej práce:** bakalárska  
**Jazyk záverečnej práce:** slovenský

**Názov:** Fágová terapia  
**Literatúra:** Sulakvelidze, A., Zempherira, A., Morris, J., G., Jr. (2001): Bacteriophage Therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Mar. 2001, pp. 649-659

García P., Martínez B., Obesoand J.M., Rodríguez A. (2008) Bacteriophages and their application in food safety, Letters in Applied Microbiology 47 (6), pp. 479-485

**Kľúčové slová:** bakteriofág, patogén, životný cyklus, hostiteľská špecificita  
**Cieľ:** Cieľom bakalárskej práce je pripraviť prehľad súčasných poznatkov o využití bakteriofágov v boji proti patogénnym baktériám, o výhodách a nevýhodách tohto postupu, ako aj uviesť základné poznatky o interakcii fágov a ich hostiteľov.

**Vedúci:** doc. RNDr. Hana Drahovská, PhD.  
**Katedra:** PriF.KMB - Katedra molekulárnej biológie  
**PriF vedúci katedry:** prof. RNDr. Ján Turňa, CSc.

**Dátum zadania:** 11.05.2010

**Dátum schválenia:** 18.05.2010



prof. RNDr. Ján Turňa, CSc.

### **Prehlásenie**

Čestne prehlasuje, že som predloženú bakalársku prácu spracoval samostatne s použitím uvedenej literatúry a ďalších informačných zdrojov.

V Bratislave, 24.5.2010

.....  
podpis autora práce

## **Pod'akovanie**

Chcel by som pod'akovať mojej školiteľke doc RNDr. Hane Drahovskej PhD. za pomoc, ochotu a cenné rady pri písaní bakalárskej práce. Osobitné pod'akovanie patrí mojim rodičom a mojim najbližším, bez ich podpory a pomoci by som to určite nezvládol.

## **ABSTRAKT**

### **Juraj Szász: Fágová terapia**

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie  
Bakalárska práca, 37 strán, 2010

Fágová terapia je použitie bakteriofágov, prirodzených parazitov baktérii na terapiu. Multirezistenté baktérie ako MRSA a VRE sú veľkým problémom modernej medicíny a fágová terapia je schopná efektívne liečiť tieto infekcie. Cieľom tejto práce je stručný prehľad fágovej terapie: histórie, výhodách, nevýhodách a budúcich vyhlíadok.

**Kľúčové slová:** bakteriofág, patogén, životný cyklus, hositeľská špecificita.

## **ABSTRACT**

### **Juraj Szász: Phage therapy**

Comenius University in Bratislava, Faculty of Natural Sciences, Department of Molecular biology  
Bachelor work, 37 pages, 2010

Phage therapy is use of bacteriophages, native bacterial parasites for therapeutic purpose. Multiresistant bacteria such as MRSA and VRE is big problem of modern medicine and the phage therapy is capable effectively treat the infections. The aim of the study is brief overview about phage therapy: history, benefits, disadvantages and future prospects.

**Key words:** bacteriophage, pathogen, life cycle, host range.

# OBSAH

<b>1. Úvod</b>	<b>7</b>
<b>2. Všeobecne o bakteriofágoch</b>	<b>8</b>
2.1. Morfológické a taxonomické rozdelenie bakteriofágov	8
2.2. Životné cykly bakteriofágov	9
2.3. Všeobecné použitie bakteriofágov v molekulárnej biológii	11
<b>3. História fágovej terapie</b>	<b>13</b>
3.1. Objav bakteriofágov	13
3.2. Prvopočiatky fágovej terapie	14
3.3. d'Hrellevoe kacírske myšlienky	15
3.4. Stalinova liečba	19
<b>4. Fágová terapia v súčasnosti</b>	<b>21</b>
4.1. Využitie prírodných bakteriofágov	22
4.2. Modifikované fágy	25
4.2.1. <i>Nereplikujúce sa vláknité fágy</i>	25
4.2.2. <i>Bakteriofágy viazané na membránu</i>	27
4.3. Fágové produkty – lyzíny	28
4.3.1. <i>Štruktúra peptidoglykanu</i>	28
4.3.2. <i>Enzymatický charakter endolyzínov</i>	29
4.3.3. <i>Mechanizmus účinku endolyzínov</i>	30
4.3.4. <i>Využitie v terapii</i>	30
<b>5. Záver</b>	<b>33</b>
<b>6. Zoznam použitých skratiek</b>	<b>34</b>
<b>7. Použitá literatúra</b>	<b>35</b>

# 1. Úvod

Vznik rezistentných kmeňov proti antibiotikám je vážnym problémom súčasnej medicíny. Vývoj nových antibiotík je stále viac nákladnejší a pomalší (rádovo roky). Často nové antibiotikum stráca účinnosť proti multirezistentným kmeňom v priebehu niekoľkých mesiacov. Táto kritická situácia ženie vedcov a farmaceutické spoločnosti k intenzívnejšiemu testovaniu vhodných alternatív. Fágová terapia je jednou z nich.

Fágová terapia znamená využitie bakteriofágov na liečbu ľudských bakteriálnych ochorení. Bakteriofágy sú bakteriálne vírusy, najjednoduchšie a najrozšírenejšie organizmy na Zemi. Ako jediné bakteriálne parazity sú schopné zničiť kompletne bakteriálne populácie v priebehu niekoľkých hodín. V prírode zastávajú funkciu hlavného regulátora stavu populácii baktérii.

Bakteriofágy útočia na baktérie inými mechanizmami než antibiotiká, teda sú schopné zabiť multirezistentné kmene baktérii bez obmedzení. Pre veľké rozdiely medzi ľudskými (eukaryotickými) a bakteriálnymi (prokaryotickými) bunkami fágy sú schopné infikovať iba baktérie. Čo pre pacienta znamená miernejšie vedľajšie účinky oproti antibiotickej liečbe.

Fágová terapia má predpoklad zachrániť mnoho životov tam, kde klasická antibiotická liečba zlyháva (Skurnik a kol. 2007, Sulakvelidze a kol. 2001).



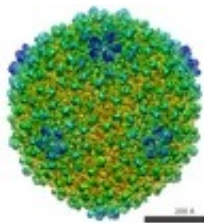
## 2. Všeobecne o bakteriofágoch

Bakteriofágmi (skrátene fágy) nazývame vírusy, ktoré infikujú prokaryotické organizmy - baktérie. Bakteriofágy sú najrozšírenejším organizmom na Zemi (celková populácia sa odhaduje na odhaduje sa  $10^{31}$  fágových častíc, zhruba 10 fágov na jednu baktériu). Nachádzajú sa prakticky v každom prostredí na Zemi.

### 2.1. Morfológické a taxonomické rozdelenie bakteriofágov

Fágy sa pozostávajú z dvoch základných zložiek: nukleovej kyseliny a bielkovinového obalu (kapsid), v ktorom je uložená. Morfológia kapsidu môže byť rôzna, ale väčšinou rozpoznávame tri základné morfológické typy:

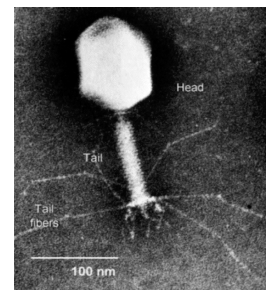
- 1. Ikozahedrálna:** Bielkoviny kapsidu sú usporiadané do sférického zoskupenia s nukleovou kyselinou v strede (napr. fág PM2, ktorý infikuje *Pseudomonas aeruginosa*).
- 2. Filamentárna:** Kapsid vytvára rúrku, v ktorej je uložené vlákno nukleovej kyseliny (napr. fág M13, ktorý napáda *E.coli*).
- 3. Hlavička s vláknom:** Nazývaná tiež T-štruktúra. Vizerá ako kombinácia ikozahedrálnej hlavičky (head) s filamentárnym vláknom – chvostíkom (tail). Nukleová kyselina sa nachádza v hlavičke a počas procesu infikovania baktérie prechádza do hostiteľskej bunky cez chvostík, ktorý môže byť kontraktívny, alebo nekontraktívny. Niektoré bakteriofágy môžu mať na konci chvostíka fimbriálne vlákna.



**Obr. 1:** Ikozahedrálna  
(Internetový zdroj 12)



**Obr. 2:** Filamentárna  
(Internetový zdroj 13)



**Obr. 3:** T-štruktúra  
(Internetový zdroj 14)

Bakteriofágy môžu obsahovať buď DNA, alebo RNA reťazec nukleovej kyseliny a to v jednovláknovej (s/s), alebo dvojitovláknovej (d/s) forme.

Na základe genetického kódu nemožno taxonomicky zaradiť fágy (ľahko mutujú apod.), preto sa používa delenie podľa morfológie a typu nukleovej kyseliny (najčastejšie sú Myoviridae, Podoviridae and Siphoviridae):

<b>Rod:</b>	<b>Skupina:</b>	<b>Príklad:</b>	<b>Morfológia:</b>	<b>Nukleová kys.:</b>
Corticoviridae	Corticovirus	PM2	izometrická	supercoiled d/s DNA
Cystoviridae	Cystovirus	Ø6	izometrická	trojzložková d/s RNA
Inoviridae	Inovirus	<b>kolifág fd</b>	vláknitá	kruhová s/s DNA
	Plectrovirus	Acholeplasma fág		
Leviviridae	Levivirus	kolifág <b>MS2</b>	ikozahedrálna	RNA
	Allolevirus	kolifág <b>Qbeta</b>		
Lipothrixviridae	Lipothrixvirus	Thermoproteus fág 1	vláknitá	lineárna d/s DNA
Microviridae	Microvirus	kolifág <b>ØX174</b>	ikozahedrálna	kruhová s/s DNA
	Spirovirus	Spiroplasma fágy		
		Mac-1 fág		
Myoviridae		kolifág <b>T4</b>	T-štruktúra	lineárna d/s DNA
Plasmaviridae	Plasmavirus	Acholeplasma fág	plejomorfická	kruhová d/s DNA
Podoviridae		kolifág <b>T7</b>	T-štruktúra	lineárna d/s DNA
Siphoviridae	Skupina lambda fágov	kolifág <b>lambda</b>	T-štruktúra	lineárna d/s DNA
Sulpholobus shibatae virus		SSV-1	podobná citrónu	kruhová d/s DNA
Tectiviridae	Tectivirus	fág PRD1	ikozahedrálna	lineárna d/s dna

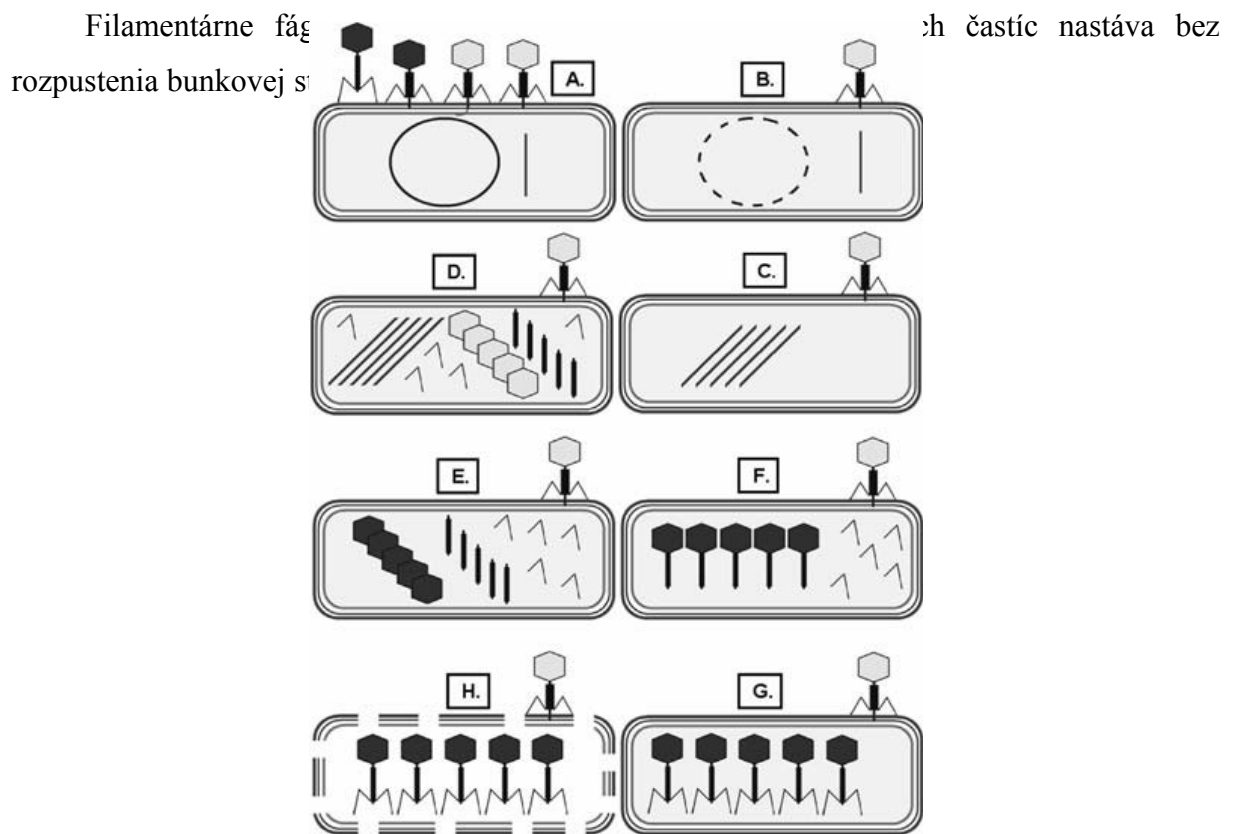
**Tab. 1:** Taxonomické rozdelenie bakteriofágov (Internetový zdroj 15)

## 2.2. Životné cykly bakteriofágov

Bakteriofágy ako všetky vírusy sú schopné rozmnožovania iba infikovaním hostiteľskej bunky. Proces infikovania prebieha nasledovne:

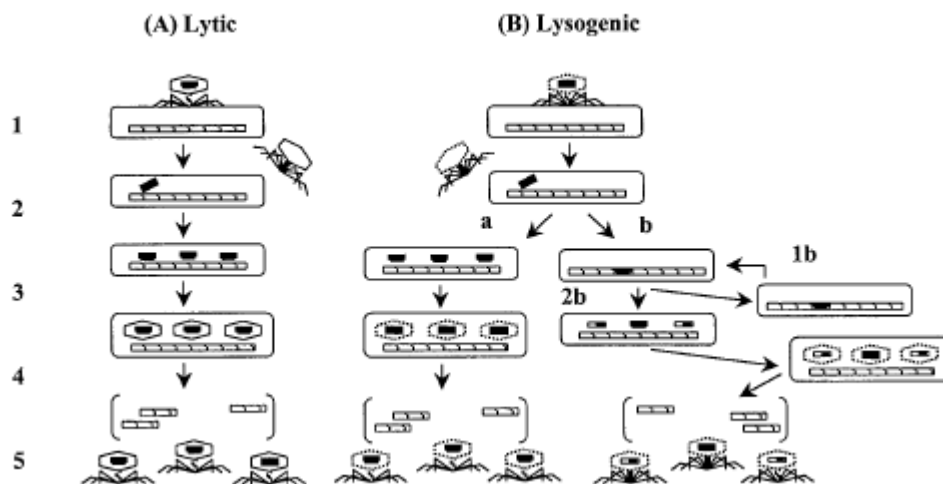
Bakteriofág sa difúziou dostane k cieľovej baktérii. Vyhladá špecifický receptor na jej povrch (napr. bičiky, brvy, iné špecifické bielkoviny, alebo lipopolysacharidy) a nasadne naň.

- A) Vstrekne svoju nukleovú kyselinu do vnútra bunky. Niektoré fágy (napr. kolifág T7) okrem svojej nukleovej kysleiny vstreknú do baktérie svoj enzým – špecifickú bakteriofágú polymerázu.
- B) Nastáva expresia skorých génov. Syntetizované skoré proteíny spôsobia zastavenie expresie bakteriálnych génov a umožnia replikáciu fágovej NK.
- C) Prebehne replikácia genómu bakteriofágu.
- D) Nastáva expresia neskorých génov, ktorých produkty tvoria kapsid a spôsobia lýzu bunky.
- E) Zreplikovaná fágová nukleová kyselina sa vplyvom neskorých proteínov vbalí do kapsidu.
- F) Konštrukcia fágových častíc.
- G) Pokračovanie v konštrukcii fágových častíc.
- H) Keď fágové častice sú dokončené, špecifické enzýmy rozpustia bunkovú stenu (nastane tzv. lýza baktérie) a fágové častice sa uvoľnia do prostredia.



**Obr. 4:** Lytický cyklus bakteriofágov  
(Kropinski, 2006)

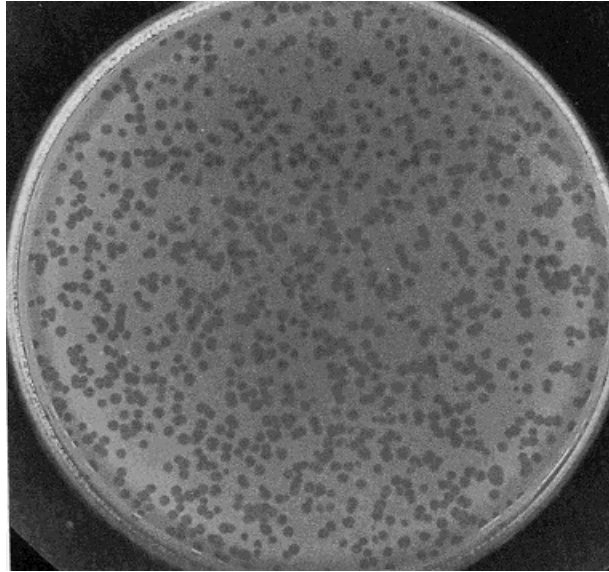
Tento cyklus sa nazýva lytický. Okrem neho mnohé bakteriofágy (napr. lambda) sú schopné tzv. lyzogénneho cyklu, pri ktorom dochádza v fáze B lytického cyklu k vloženiu fágovej nukleovej kyseliny do bakteriálneho chromozómu (**Obr. 5: a**). V tomto štádiu môže bakteriofág (nazývaný profág) zotrvať niekoľko generácií a bunkovým delením sa rozmnožiť v populácii baktérii (1b). Nakoniec, keď nastanú určité podmienky, profág prejde do lytického cyklu a spôsobí lýzu baktérie (**Obr. 5: 2b**).



**Obr. 5:** Lytický a Lyzogénny cyklus bakteriofágov (Sulakvelidze, 2001)

### 2.3. Všeobecné použitie bakteriofágov v molekulárnej biológii

Bakteriofágy v súčasnosti našli široké uplatnenie v najrôznejších oblastiach molekulárnej biológie a biotechnológii. Stali sa základom mnohých techník rekombinácie, expresie proteínov, alebo mutácie. Najprv potrebujeme stanoviť množstvo fágov (titer bakteriofága): Hustá zmes baktérii sa zmieša s rôzne nariedenou suspenziou fágov, potom sa nanáša na pevné pôdy a kultivuje do 18 hodín. Na platni sú viditeľné zakalené až priehľadné plochy tzv. plakety, ktoré predstavujú zlyzované baktérie pôvodne jedným fágom. Podľa počtu plakov a riedenia sa stanoví koncentrácia fágovej suspenzie tzv PFU – počet fágov /1 ml (Grones, 2005).



**Obr. 6:** Plaky kolifága  $\lambda$  (Internetový zdroj 16)

V technikách používaných v molekulárnej biológii sú veľmi používané fágove enzýmy ako T4 DNA polymeráza (napr. zatupovanie, značenie koncov DNA, alebo v mutagenéze), alebo T7 RNA polymeráza (napr. v heterologickej expresii).

Na rekombináciu sa často používajú fágové vektory (napr.  $\lambda$ gt10, M13), alebo vektory odvodené od fágov (napr. kozmidy, fazmidy). Neposlednom rade je významná úloha pri tvorbe cDNA knižnice (Internetový zdroj 17, Tabor a Richardson, 1985).

Ďalšou veľmi používanou metódou je transdukcia. Keď fág prechádza z lyzogénneho cyklu do lytického vždy so sebou zoberie časť chromozómovej DNA, ktorú je schopný preniesť do ďalšej baktérie. Táto nepresnosť v mechanizme vystrihnutia profágu z bakteriálneho chromozómu sa využíva v molekulárnej biológii na výrobu rekombinantov. Podľa špecificity úseku bakteriálneho chromozómu, ktorý fág prenesie sa transdukujúce fágy delia na dve skupiny:

**Všeobecné transdukčné bakteriofágy**, ktoré sa integrujú na rôzne miesta hostiteľa a tým sú schopné preniesť rôzne veľký náhodný reťazec bakteriálneho chromozómu (receptora) a nešpecifické miesto chromozómu druhej baktérie (donora) Napr. fág P1.

**Špecializované transdukčné bakteriofágy** sa vložia na špecifické miesto bakteriálneho chromozómu (receptora) a krátky úsek v okolí tohto miesta prenesú na špecifické miesto (donora). Napr. bakteriofág lambda (Grones, 2005).

## 3. História fágovej terapie

### 3.1. Objav bakteriofágov

Prvá písomná zmienka o bakteriofágoch siaha až do konca devätnásteho storočia, keď v roku 1896 britský bakteriológ Ernest Hankin spozoroval antibakteriálnu aktivitu proti *Vibrio cholerae* vo vodách Gangy a Jumny. Neznámy agens prechádzal porcelánovým filtrom a bol termolabilný. Pripisoval mu miernejšie šírenie cholery v danej oblasti. Takmer dvadsať rokov po Hankinových pozorovaniach (v roku 1915) ďalší britský bakteriológ Frederic Twort pozoroval rovnaký jav v laboratórnych. Z rôznych dôvodov sa na Twortovu prácu sa zabudlo a o dva roky na to francúzsko-kanadský bakteriológ Felix d'Herelle z Pastérovho inštitútu „oficiálne“ objavil bakteriofága (Sulakvelidze a kol. 2001).

Felix d'Herelle sa prvý krát stretol s bakteriofágmi v roku 1910, keď študoval inváziu kobyliiek v Mexiku. Zistil, že kobyly hynú na sepsu a črevné symptómy spôsobené čistou kultúrou baktérii izolovanou z dyzenterickej stolice kobyliiek. Navrhol metódu umelého navodenia epidémie u kobyliiek rozprašovaním čistej kultúry do rojov. Pre pozitívne výsledky v štúdiách pokračoval i v Severnej a Južnej Amerike. Na niektorých agarových platniach pozoroval 2 až 3 mm široké prázdne miesta. Ich obsah odobral a pod svetelným mikroskopom ani po dôkladnom pozorovaní nič nepozoroval.

V roku 1915 bol d'Herelle požiadaný aby preskúmal výskyt dyzentérie v kavalérii francúzskej armády. Podobne ako pri výskume kobyliiek, na platniach čistej kultúry z dyzenterickej stolice vojakov znova pozoroval prázdne miesta. Svojom výskume pokračoval v nemocnici Inštitútu Luisa Pastéra, kde v tej dobe bolo množstvo pacientov s dyzentériou. I tu pozoroval podobné prázdne miesta u pacientoch, ktorých stav sa zlepšil. Vyslovil hypotézu, že prázdne miesta spôsobuje vírus. d'Herellerovu hypotézu verejne prezentoval Dr. Emile Roux 15 septembra, 1917 na Académie des Sciences. Na nej bol neznámy antibakteriálny agens pomenovaný bakteriofág (Dublanchet, 2007).



Obr. 7: Felix d'Herelle (internetový zdroj 2)



Obr. 8: Frederic Twort (internetový zdroj 3)

### 3.2. Prvopočiatky fágovej terapie

Už v roku 1917 mal d'Herelle a jeho kolegovia izolované fágy proti: *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus sp.* *Pseudomonas aeruginosa* a *Neisseria meningitis* (Fruciano, 2007).

V roku 1919 z Ameriky do Francúzska bola dovezená nebezpečná aviálna salmonelóza (ktorá napadá hlavne kurence). d'Herelle využil túto príležitosť na štúdium správania bakteriofágov v prírode. Epidémia zachvátila okraje oblasti Champagne a d'Herelle navštevoval farmy každý deň, ale nepodarilo sa mu zachytiť ani jedno uzdravené zviera, všetky uhynuli. V stolici ani jedného z nich nenašiel aktívne fágy. Až napokon sa jedna sliepka začala uzdravovať. Krátko na to sa všetky sliepky z daného kurníku sa uzdravili a d'Herelle izoloval z ich stolice virulentné bakteriofágy.

Potom stačilo overiť hypotézu: Chorá sliepka šíri okolo seba choroboplodné baktérie, nákaza sa rozširuje, sliepka vyzdravie a začne šíriť bakteriofágy a napokon sa nákaza úplne odstráni. Tak d'Herelle pridal bakteriofágy, ktoré izoloval zo stolice zdravej sliepky do napájadla a tým za niekoľko hodín vyliečil všetky sliepky na farme.

d'Herelle prehlásil o probléme rôznej účinnosti bakteriofágov:

“Fágová terapia je všetko, alebo nič. Ak bakteriofágne kultúry majú slabú, alebo priemernú aktivitu, baktérie odolajú a liečba bude neúčinná. A preto každá fágová terapia musí byť výsledok selekcie.”

(Dublanchet, 2007).

Prvým ľudským pacientom Frederucja d'Herelleho bol 12 ročný chlapec s ťažkou dyzentériou, ktorý bol hospitalizovaný v Hôpital des Enfants-Malades v Paríži. V roku 1919 Felix d'Herelle aplikoval jednu dávku antidyzentierického fága pod dohľadom, primára pediatrie, Profesora Victor-Henrího Hutinela. Chlapec sa uzdravil za pár dní. Následne liek aplikoval ďalším trom pacientom, ktorým choroba začala ustupovať do 24 hodín od podania lieku (Sulakvelidze a kol., 2001).

### 3.3. d'Herelleove kacírske myšienky

V roku 1920 d'Herelle študoval priebeh cholery u niekoľko stoviek pacientov. Ak do 48 hodín od prvých príznakov sa v ich stolici neobjavili špecifické fágy proti *Vibrio cholerae* podľahli chorobne. Pacienti s potvrdenými fágmi v stolici sa rýchlo uzdravili. d'Herelle nepozoroval žiadnu výnimku. To ho viedlo k záverom, že antibakterálna aktivita fágov je jediná príčina uzdravenia. V roku 1921 d'Herelle v l'Hôpital des Enfants Malades v Paríži pod dohľadom Profesora Hutinela vyliečil pacientov z toxickéj dyzentérie spôsobenej šigelami po orálnom podaní fágov (Dublanchet, 2007).

V roku 1927 vypukla epidémia áziskej cholery. Pri liečbe tejto choroby d'Herelle začal niekoľkých dedinách s 2000 až 3000 obyvateľmi. Použil dve metódy profylaxie fágovou terapiou: Podávaním jednotlivých dávok každému obyvateľovi zvlášť a pridaním fágového preparátu do miestnych vodných zdrojov. Oba spôsoby zastavil epidémiu za 24 hodín. Pre porovnanie, v tej dobe bežnými metódami zastavili epidémiu za 26 dní (Fruciano, 2007).

d'Herelle v dvadsiatich a tridsiatich rokoch vyrábal fágové liečiva vo veľkom a jeho liečba dosiahla veľký úspech a podporu politických špičiek Európy, USA i ZSSR. V roku 1933 d'Herelle založil Laboratoire du bacteriophage v Paríži, kde produkoval fágové preparáty na liečbu sinustitíd, infekcií rán a črevných ochorení. Ďalej v rokoch 1934 a 1936 d'Herelle založil tri laboratória v Kyjeve, Krakove a Tbilisi. Z pomedzi komerčne vyrobených preparátov boli najznámejšie Bacté-coli-phage, Bacté-rhino-phage, Bacté-intesti-phage, Bacté-pyo-phage a Bacté-staphy-phage. Preparáty podával lokálne, ale aj orálne, alebo intervenózne. Taktiež sa osvedčila prevencia pridávaním fágov do vodných zdrojov (Dublanchet, 2007; Fruciano, 2007; Sulakvelidze a kol. 2001).



Felix d'Herelle, ktorý sa považoval za objaviteľa bakteriofágov a prehlasoval, že Frederic Twort vychádzal z jeho prác. d'Herelle odmietal všeobecne podporovaný názor, že bakteriofágy sú enzýmy (ktorý podporoval aj Twort) a bez presvedčivých dôkazov zastával teóriu vírusovej podstaty bakteriofágov – teória vírusovej podstaty bakteriofágov bola definitívne potvrdená až elektrónovým mikroskopom. (Sulakvelidze a kol., 2001).

Pozorovania a praktické skúsenosti z liečby bakteriofágami viedli d'Herelleho k vytvoreniu teórie o úlohe bakteriofágov v procese rekonvalescencie a prirodzenej imunity. Tvrdil, že vtedy známe mechanizmy humorálnej a bunkovej imunity nie sú schopné uzdraviť človeka. Len virulentné bakteriofágy sú skutočným nositeľom antibakteriálnej imunity. Domnieval sa, že virulentné bakteriofágy sú prirodzenou súčasťou každého živého organizmu, od dážd'ovky k človeku a ich hlavnou úlohou je zničenie infekcie. Nazdával sa, že môže mechanizmus priebehu ochorenia vyvodit' od vzájomného vzťahu baktérií a bakteriofágov v tele pacienta. Pri vypuknutí choroby sa fágy postupne množia až prevážia nad baktériami a pacient sa začne uzdravovať. V prípade chronických ochorení dojde k symbióze medzi fágami a baktériami. V prípade, že určitý fág sa nenachádza u daného pacienta, tak fág je schopný sa šíriť medzi chorými pomocou stolice (slabé hygienické podmienky). V tomto príklade môžeme hovoriť o tzv. epidémii uzdravenia. Ako dôkaz prezentoval porovnanie štatistík troch nemocníc v Kalkate so slabými hygienickými podmienkami (27% úmrtnosť na dyzentériu) a prestížnej Campbellskej nemocnice (86% úmrtnosť).

d'Herelle delil imunitu na dva odlišné procesy: Heterologickú imunitu, ktorá predstavuje činnosť fágov a homologickú imunitu, ktorá zahrňuje známe imunitné mechanizmy (fagocytóza, protilátky apod.). U pokusných zvierat je homologická imunita proti *Vibrio cholerae* dostatočne silná, tak sa u nich cholera neprejaví, ale u človeka je prislabá, preto potrebuje heterologickú imunitu vo forme špecifických fágov proti *Vibrio cholerae*.

Teóriou, ktorá odporuje klasickej imunológii Meičnokova, Bordeta a Ehrilcha vyvolal d'Herelle rozruch vo vedeckom svete. Síce si prial zakomponovanie svojej teórie do klasickej imunológie, ale väčšina vedeckej obce jeho hypotézu zamietla ako absurdnú, či dokonca kacírsku. Síce mnohí vedci uznávali bakteriofágy ako účinný terapeutický nástroj, ale odmietali d'Herelleho hypotézu úlohy bakteriofágov v individuálnej, ale aj populačnej epidemiológii. d'Herelle nekompromisne bojoval za teóriu, o ktorej si bol presvedčený, že

spraví revolúciu nie len mikrobiológiu a imunológiu, ale aj epidemiológiu, patológiu, terapiu a hygienu.

d'Herelle považoval klasickú imunológiu za dogmu, ktorá bráni vo vývoji imunológie správnym smerom. Otvorene zaznával vakcináciu a séroterapiu. Vyhlásil, že séroterapia je u človeka neúčinná, pretože nebolo dokázaný bakteriolytický (ničiaci baktérie) účinok séra, len bakteriostatický (zastavenie rastu). Len bakteriofágy sú schopné skutočne ničiť baktérie, ktoré spôsobujú ochorenie. Dokazoval to tým, že pri chorobách s recidívou (opakujúce sa zlepšovanie a zhoršovanie napr. malária, alebo mor) je množstvo protilátok v čase zlepšenia a zhoršenia rovnaký. Teda protilátky nepôsobia na množstvo baktérií spôsobujúce ochorenie. Tvrdil, že vakcinácia je neefektívna a nebezpečná. Dokazoval to úmrtiami v regiónoch, kde bola použitá. Tým pádom, podľa d'Herelleho, každá terapia vychádzajúca z klasickej imunológie je "nebezpečná pre verejnosť."

Okrem boja s imunológmi sa d'Herelle pustil do boja s vedcami, ktorí spochybňovali jeho výsledky vo fágovej terapii. Vyčítali mu, že urobil množstvo metodických chýb (napr. absencia kontrolných skupín, nedôkladná diagnostika) a všeobecne ignoroval mnohé známe javy súvisiace s bakteriofágmi (napr. vznik rezistencie baktérii voči fágom, úzke spektrum proti rôznym druhom baktérii ktoré fágy sú schopné infikovať, alebo častá inaktivácia fágov v tráviacom trakte). Mnohí kritici poukazovali na neúspechy testov fágovej terapie získané nezávislými skupinami čo vytváralo dojem, že d'Herelle a jeho nasledovníci nesprávne, alebo dokonca umelo nadhodnocujú efektívnosť fágovej terapie.

Proti d'Herellermu vznikla tzv. Belgická skupina vedcov z Bordetovho tábora (Bordet okrem toho, že patril medzi zakladateľov imunológie, bol riaditeľom Pausterovho inštitútu v Bruseli). Belgická skupina zastávala hypotézu enzýmovej podstaty bakteriofágov (v tom období ešte neexistoval elektrónový mikroskop, ktorý by dokázal, že fágy sú vírusy). Lytickú aktivitu bakteriofágov považovali za výsledok metabolizmu baktérii, produkujúcich enzým, ktorý spôsobuje dedičnú chorobu šíriacu sa medzi baktériami. Ich neúspechy v testoch fágovej terapie boli pravdepodobne spôsobené tým, že študovali temperovavé fágy namiesto virulentných. Napriek množstvu dôkazov podporujúcich d'Herelleho hypotézu o vírusovej podstate bakteriofágov (s rozumnými argumentami schopnosťou množiť sa a zničiť chorobu aj po mnohonásobnom riedení) nezískal dostatočnú podporu vedeckej obce, pretože si rozhádal veľa vplyvných vedcov.

d'Herelle si postavil proti sebe Calmettea, zástupcu riaditeľa Pasteurovno inštitútu v Paríži pre d'Herelleho názor na vakcináciu. Calmette perzekvoval d'Herelleho v kariérom postupe a preto v roku 1921 náhle odišiel zo Pasteurovho inštitútu. Je nutné zdôrazniť, že d'Herelle nikdy nedosiahol významný post v Pasteurovom inštitúte napriek jeho dôležitým objavom.

Na to odišiel do Tbilisi, kde splolu s gruzínskym bakteriológom Georgim Eliavou založil Eliavov inštitút bakteriofágov, mikrobiológie a virológie v 1923. Po Druhej svetovej vojne ho západná vedecká obec definitívne zdiskreditovala za prácu pre soviety.

d'Herelle sa stal profesorom na Jalskej univerzite a riaditeľom Bakteriologickej služby Spoločnosti národov. Napriek veľkému prínosu pre súčasnú vedu nikdy nedostal Nobelovú cenu, aj keď v rokoch 1924 až 1937 mal 28 nominácií I po diskreditácii vo vedeckej obci pokračoval v práci na fágovej terapii.

Objav antibiotík a d'Herellerova výbušná povaha (nemal trpezlivosť s tými čo s ním nesúhlasia, alebo sú proti jeho názorom a nerobil ústupky a kompromisy v zásadných chvíľach) i jeho kontroverzná imunologická teória spôsobili jeho pád na vedeckom poli a tým aj zavrnutie jeho fágovej terapie v západnom svete na dlhé desaťročia.

Jeho odchod do Gruzínska, ktorý bol považovaný za politický akt sympatizácie s komunistickým režimom len pridali kríž na d'Herellerovej práci. Našťastie vo východnom bloku sa nezanevrelo na fágovú terapiu, práve preto je známa aj ako "Stalinova liečba"

Dobrym príkladom obrazu doby je zavrnutie Himmelweitovej metódy z roku 1945 kombinovanej liečby bakteriofágov a penicilínu na liečbu rezistentných kmeňov po úspešných klinických testoch. (Sulakvelidze a kol., 2001).

### 3.4. Stalinova liečba

Po Druhej svetovej vojne výskum fágovej terapie pokračoval iba v Sovietskom zväze a štátoch východného bloku. Až do polovice 70tich rokov, začiatku 80tich rokov dvadsiateho storočia , kedy na Západe sa fágová terapia začala znovu vyvíjať a klinicky testovať najmä pre hrozivo stúpajúcu rezistenciu baktérii proti antibiotikám. V štádiu experimentálnej liečby sa fágová terapia nachádza aj v súčasnosti. Avšak v niektorých postkomunistických krajinách ako Poľsko, alebo Gruzínsko je fágová terapia používaná na liečbu ťažkých bakteriálnych infekcií multirezistentných kmeňov (napr. kmeňov MRSA)

George Eliava spolu s Felixom d'Herelle v roku 1923 založil Eliavov inštitút bakteriofágov mikrobiológie a virológie, EIBVM Gruzínskej akadémie vied v Tbilisi. D'Herelle pracoval niekoľko mesiacov v Gruzínsku spolu s Eliavom a uvažoval o trvalom odchode do Gruzínska. Bohužiaľ v roku 1937 Eliava bol zatknutý Stalinovou NKVD (predchodca KGB), vyhlásený za „verejného nepriateľa“ a popravený. Znechutený a rozčarovaný d'Herelle sa už nikdy nevrátil do Gruzínska a z EIBMV sa postupne stala jednou z najväčších inštitúcií vyvíjajúcich fágové liečebné preparáty. Počas druhej svetovej vojny slúžila na liečenie nemeckých vojakov a vo vojne o Fínsko, Stalin využíval Eliavov inštitút na liečenie vojakov Červenej armády. V najlepších časoch zamestnávala okolo 1200 ľudí a produkovala tony fágových preparátov denne proti stovkám patogénom ako stafylokoky, *Pseudomonas*, *Proteus*, a mnoho ďalších. EIBMV (Internetový zdroj 4) funguje do súčasnosti a stále produkuje a vyvíja fágové preprapráty (Fruciano, 2007; Sulakvelidze a kol., 2001).



**Obr. 9:** George Eliava (internetový zdroj 5)

Hirszfeldov inštitút (Internetový zdroj 6) vo Wroclave bol založený v roku 1952 a aktívne pracuje na fágovej terapii od roku 1957, keď fágy boli použité na liečenie infekcie spôsobenej šilegami. Bakteriofágové laboratórium inštitútu pomáhalo pri vývoji produkcii fágov na liečenie kožných vredov, sepsy, infekcií pľúc a močového ústrojenstva, ale aj profylaxiu a liečenie pooperačných infekcií. Mnohých prípadoch, fágy sa použili proti multirezistentným kmeňom, ktoré odolávali klasickej liečbe (Sulakvelidze a kol., 2001).

V roku 1958 pod dohľadom Profesora A. G. Nikonova s a kol. zo Štátneho inštitútu Rostov nad Donom bola použitá metóda množenia fágov proti *Vibrio cholerae* v črevnej sliznici morčiat na výrobu terapeutických fágov, z ktorými liečil ľudí. Stávajúca metóda množenia v bujóne bola vyvinutá v dobe, keď o fágoch sa uvažovalo ako o enzýmoch. Bakteriofágy množené v bujóne prirodzene strácajú nepotrebné gény na infekciu baktérii v sliznici čreva, tým pádom po rokoch neustálej kultivácie úplne stratili schopnosť infikovať *Vibrio cholerae* in vivo, teda schopnosť liečiť. Preparát z takto pripravených fágov bol podávaný orálne a vyliečil väčšinu pacientov bez výrazných vedľajších účinkov. S Preparátmi vyrobenými Nikonovou metódou bolo v nasledujúcich rokoch vyliečených takmer pol milióna pacientov s cholerou v ZSSR (Sayamov, 1963).

## 4. Fágová terapia v súčasnosti

Gruzínska spoločnosť **Phage Therapy Center™** (Internetový zdroj 7) so sídlom v Tbilisi lieči ľudí pomocou fágovej terapie, konkrétne infekcie rezistentných kmeňov stafylokokov (MRSA, CO-MRSA – nový kmeň, ktorý obsahuje . Panton-Valentine leukocidin), streptokokov, enterokokov, *E. coli*, *Proteus spp*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*. **Phage Therapy Center™** v roku 2004 otvorila kliniku fágovej terapie v Tijuane (Internetový zdroj 8), kde liečia vrede, osteomyelitídy, preležaniny, popáleniny, paradontózu, stomatitídu a infekcie spôsobené multirezistentnými kmeňmi MRSA a VRE). Farmaceutická spoločnosť **JSC BioChimPharm** (Internetový zdroj 9), ktorá vznikla v EIBMV (Internetový zdroj 4), produkuje fágové preparáty pre Phage Therapy Center. Medzinárodnú distribúciu fágových liečiv a zakladanie kliník fágovej terapie vykonáva spoločnosť **Phage International™**, ktorá bola založená v roku 2004. V Hirschfeldom inštitúte imunológie a experimentálnej terapie (Internetový zdroj 6) poskytujú experimentálnu fágovú terapiu. Česká firma **Sevapharma Praha** (Internetový zdroj 10) produkuje vysoko účinný stafylokokový lyzát pod názvom Stafal.

Fágovú terapiu podľa použitých elementov môžeme rozdeliť do troch skupín:

- **Prirodzené fágové častice** izolované z prírodného prostredia patria k najlacnejšiemu spôsobu fágovej terapie.
- **Geneticky Modifikované fágové častice** sa vyvíjajú a klinicky testujú za účelom zvýšenia efektivity liečby, alebo zabránenie vyplavenia nebezpečných endotoxínov po lýze bakteriálnej bunky čo môže u pacienta vyvolať septický šok.
- **Fágové produkty – endolyzíny** sú enzýmy, exprimované v neskorej fáze infekcie baktérie fágom, ktoré štiepia bunkovú stenu a tým umožnia uvoľniť fágové častice do prostredia. Ukázali sa ako veľmi efektívne boji proti Gram pozitívnym baktériám (napr. stafylokoky, streptokoky).

•

## 4.1. Využitie prírodných bakteriofágov

Použitie prírodných fágov je najstarší spôsob fágovej terapie, ale aj v súčasnosti nachádzajú uplatnenie. V boji proti multirezistentým kmeňom baktérii (napr. MRSA a VRE), ktoré sú najčastejšími pôvodcami komplikácií u pacientov so zníženou imunitou v nemocniciach. Fágová terapia je lacná. Na vývoj antibiotík sa každoročne minú miliardy eur, pričom priemerne iba jedno z ôsmich dosiahne štádium klinických skúšok v priebehu niekoľkých rokov. A Baktérie sa môžu stať rezistentými počas niekoľkých mesiacov od zavedenia, alebo dokonca počas klinických skúšok. Zato izolácia a purifikácia nového bakteriofágu zaberie iba niekoľko týždňov, tým pádom vznik rezistencie nemôže sa stať dlhodobým problémom.

Miedzybrodzki a kol. (2007) porovnali náklady bežnej antibiotikovej liečby MRSA infekcii u chronických pacientov s fágovou terapiou. Náklady kompletnej výroby fágového preparátu (vrátane typizácie, kultivácie, purifikácie atd) boli až 6 krát menšie, než terapia pomocou najdrahších a jediných účinných antibiotík proti MRSA.

Pri fágovej terapii neboli pozorované žiadne vedľajšie účinky.. Na rozdiel od antibiotík, z ktorých prakticky každé spôsobuje rôzne silné vedľajšie účinky (napr. Chlóramfenikol je toxický, spôsobuje výraznú hemolýzu).

d'Herelle testoval prípadnú toxicitu bakteriofágov na sebe, svojej rodine a spolupracovníkoch s negatívnym výsledkom. d'Herellove práce nie sú naj dôveryhodnejšie, ale počas 12 rokov vývoja a testovania stafylokokového lyzátu – Staphage lysate v Delmontských laboratóriách (USA) neboli pozorované výraznejšie vedľajšie účinky (Kropinski, 2006).

Bruttin a Brüssov (2005) testovali reakciu dobrovoľníkov na orálne podaný kolifág T4. Pozorovali iba minimálne vedľajšie účinky u malého počtu osôb

Fágové preparáty sa môžu aplikovať:

1. orálne (v tabletách, alebo vo forme suspenzie: v koncentrácii  $10^5$  až  $10^{11}$  PFU v jednej dávke)
2. rektálne
3. lokálne (na kožu, oči, uši, rany apod)
4. v napustených tampónoch, masťami, aerosolom
5. intravenózne.

Experimenty na myšiach dokázali, že fágy v priebehu niekoľkých hodín po aplikácii sa dosiahli orgány, ako je pečeň, slezina; v tráviacom trakte a pre antibiotiká ťažko dosiahnuteľné orgány ako prostata, alebo kosť. (Sulakvelidze a kol., 2001).

Pred použitím fágovej terapie je dôležitá dôkladná znalosť použitého fága. Väčšina bakteriofágov má úzke, špecifické, spektrum baktérii, ktoré sú schopné infikovať (často iba jeden druh, či niekoľko kmeňov jedného druhu). Len veľmi málo fágov má širšie spektrum (napr. Felix O1, ktorý je schopný infikovať všetky salmonely). Výhodou úzkeho spektra je, že bakteriofágy nelyzujú kmene prirodzenej fluóru (ústna, črevná, alebo vaginálna), ako je to u antibiotík (neselektívne zabíjajú všetky citlivé kmene vrátane kmeňov prirodzenej flóry). Prudké zmeny zložení v prirodzenej fluóry často vedie k vzniku novej infekcie spôsobenej pôvodne nepatogénnymi kmeňmi.

Naopak úzke spektrum je často nevýhodné v praktickom lekárstve. Keď lekár stráca čas nutnou presnou identifikáciou pôvodcu, ktorý mohol byť pacient už liečený v prípade nasadenia širokospektrálneho antibiotika. Ako alternatíva sa používa kokteil fágov, ktoré sú schopné lyzovať rôzne bakteriálne druhy.

Je dôležité sa ubezpečiť či daný bakteriofág nikdy neprechádza do lyzogénneho cyklu, pretože fágovú terapiu sú použiteľné iba lytické fágy. Temperované fágy neusmrtnia baktérie a pomocou transdukcie môžu prenášať gény kódujúce toxíny, alebo gény spôsobujúcu rezistenciu na antibiotiká, prítomnosť a iné faktory virulencie (napr. fág c-st infikujúci *Clostridium botulinum* prenáša botulotoxín; fág CTXΦ baktérie *Vibrio cholerae*, prenáša choleroxín a niekoľko fágov napadajúci enterohemoragický kmeň *E. coli* môžu niesť šiga toxíny).

Keď fágový kmeň je bezpečný je potrebné ho namnožiť v médiu s baktériami. Takýto lyzát obsahuje fragmenty baktérii, exo a endotoxíny, ktoré vyvolávajú alergickú reakciu u zvierat. Je nutné izolovať dôkladne purifikovať a to najlepšie centrifugáciou v CsCl gradiente, precipitáciou síranom amónnym (Skurnik a kol., 2007), alebo iónovou chromatografiou (Sulakvelidze a kol., 2001).

Nakoniec naklonované fágy je potrebné uskladniť pre budúce terapeutické využitie. Skurnik a kol. (2007) napísali prehľad rôznych metód a ich účinnosti pri použití na fágovú terapiu.



- **Lyofilizovanom stave:** Pri použití vhodného kryoprotektantu (napr. živného média) bakteriofágy nestratia infekčnosť a možno ich skladovať aj 20 rokov. Táto metóda nie je vhodná pre laktokokové fágy.
- **Pri laboratórnej teplote:** Je potrebné aby boli uskladnené v optimalizovanom pufri a v sterilnom prostredí.
- **Pri chladničkovej teplote:** Bakteriofágy strácajú účinnosť (napr. fágu, ktorý napadá *B.antracis* skladovaný 1 rok pri teplote 4°C sa mu znížil titer o 30%, alebo *E. coli* fágu T3, ktorý bol skladovaný 60 týždňov stratil 35% z pôvodného titra.
- **Zamrazené:** Väčšinou pri teplote -70/-80°C, alebo v tekutom dusíku glycerole, alebo DMSO ako kryoprotektant. Bakteriofágy veľmi dobre znášajú zamrazenie.

Fágová terapia má niekoľko závažných nedostatkov:

- **Úzke spektrum účinnosti** Špecifickosť fágov môže byť braná ako výhoda, pretože fágy neútočia na iné baktérie, napr. prirodzenej flóry, ako to často býva u antibiotík. Lenže to znamená presnú identifikáciu pôvodcu pred začiatkom terapie. V praktickej medicíne sa to často berie ako komplikácia. Riešením by bolo použiť širokospektrálne fágy (napr. fág Felix O1 ktorý lyzuje takmer všetky salmonely, alebo fág K proti stafylokokom), lenže tých sa v prírode našlo veľmi málo, alebo použiť fágové kokteily
- **Schopnosť replikácie:** To čo d'Herelle bral ako výhodu fágovej terapie sa v praktickej medicíne ukazuje ako problém. Množenie fágov komplikuje farmakokinetiku, čím komplikuje výpočet účinnej dávky.
- **Imunitná odpoveď a RES:** Bakteriofágy sú schopné vyvolať imunitnú odpoveď u pacienta. Síce nebola pozorovaná alergická reakcia, ale imunitný a retikuloendotelový systém (makrofágy, lymfatické uzliny apod) sú schopné do 12 hodín úplne inaktivovať bakteriofágy, pokiaľ sa nereplikujú dostatočne rýchlo. Zatiaľ nebolo zistené ako dlho v tele pretrvávajú protilátky proti fágovým časticiam.

- **Lyzogénia a gény virulencie:** Na fágovú terapiu je nutné použiť zásadne iba lytické fágy. Podobne je nutné zabrániť aj možnému prenosu génov virulencie do hostiteľských baktérii (Chen a Novick, 2009). Na vyhľadávanie génov nesúce toxíny je vhodné použiť PCR skriningové metódy (Skurnik, 2007).
- **Tráviaci trakt inaktivuje fágy:** Je známe, že tráviace šťavy majú schopnosť znížiť aktivitu fágov, ale aj anaeróbne prostredie čriev inaktivuje fágy, ktoré prešli žalúdkom, pravdepodobne preto, že žlč viaže voľné dvojmocné ióny, ktoré fágy potrebujú na prienik bunkovou stenou.
- **Masívne uvoľnenie endotoxínov:** Bakteriofágy sú schopné, v priebehu krátkej doby od podania, zlyzovať obrovský počet baktérii. Čo vedie k vyplaveniu veľkého množstva endotoxínov do organizmu, ktoré môže u imunitne oslabeného pacienta vyvolať septický šok.
- **Vznik rezistencie baktérii:** Baktérie môžu s istou pravdepodobnosťou získať rezistenciu proti fágom, ktorá s častým používaním daného fága, stúpa. Riešením by mohlo byť použitie fágových zmesí. Skurnik a Strauch (2006) referujú, že často rezistencia je vyvolaná stratou receptorov, ktoré sú často aj faktormi virulencie (napr. púzdra), z čoho vyplýva, že vznikom rezistencie proti bakteriofágu sa daná baktéria stáva nevirulentná. Je potrebné brať do úvahy, že toto nie je jediný mechanizmus vzniku rezistencie.

## 4.2. Modifikované fágy

Nevýhody spojené s použitím prirodzených bakteriofágov vo fágovej terapii (napr. úzke spektrum, alebo problém uvoľnenia endotoxínov) motivuje vedcov, k vytvoreniu nových liečiv na základe rôzne upravených fágových častíc. Do tejto kategórie patria nereplikujúce sa modifikované vláknité fágy a bakteriofágy viazané na membránu.

### 4.2.1. Nereplikujúce sa vláknité fágy:

Nereplikujúce sa modifikované vláknité fágy poskytujú niekoľko výhod oproti prírodným bakteriofágom. V prvom rade stratou schopnosti replikácie sa zjednodušila farmakokinetika a zabránilo sa horizontálnemu prenosu nebezpečných toxických génov.

Pridaním smrtiaceho agensu (v podobe génu, alebo antibiotika naviazaného na povrch fágu) sa vytvoria nové žiaduce vlastnosti (napr. zvýšenie efektivity liečby) a v neposlednom rade je možné naviazať na povrch látky, ktoré vylepšia spektrum účinnosti.

Westwaterová a kol. (2003) navrhli nový liečebný nástroj v podobne rekombinantného vláknitého bakteriofágu M13, ktorý nesie toxické gény do baktérie *E. coli*.

Gén *gef* depolarizuje bunkovú membránu, čo vedie k lýze baktérie a uvoľneniu jej obsahu do prostredia. Regulácia je založená, že antisence RNA *Sof* prekryje čítací rámec *orf69* a tak zabráni expresii. Z toho dôvodu nebol čítací rámec *orf69* vložený do rekombinantného fágu.

Druhý gén *chpBK* je regulovaný neutralizačným proteínom ChpBI, ktorého gén sa nachádza na chromozóme, preto gén *chpBK* bol vložený do vysokokópiového plazmidu LacI/IPTG (Lac operón regulácia).

Testovaním kmeňa *E. coli* na pevných pôdach s obsahom IPTG prišli ku výsledkom, že fágy nie sú schopné zlyzovať 100% baktérii, čo je pravdepodobne spôsobené vznikom mutácii. Autori uvažovali, že vložením mnohonásobnej kópie jedného génu smrtiaceho génu, alebo použitím viacerých naraz je možno zabrániť mutácii.

Hagens a kol. (2004) reagovali na problém uvoľnenia endotoxínov pri fágovej terapii a navrhli a otestovali nereplikovateľný geneticky modifikovaný fág s génom pre restričnú endonukleázu. Princíp spočíva v expresii restričnej endonukleázy v baktérii počas infekcie, ktorá spôsobí nevratné zmeny v genóme baktérie a smrť bez porušenia bunkovej steny a následného vyplavenia endotoxínov.

Na experiment použili vláknitý fág Pf3 proti *Pseudomonas aeruginosa*, ktorý je častý pôvodca nemocničných nákaz. Nahradili gén kódujúci proteín zabezpečujúci export fágov za gén pre restričnú endonukleázu BgiIIR. Genóm bakteriofágu Pf3 neobsahuje restričné miesta pre BgiIIR. Pre porovnanie použili lytický bakteriofág Pt1, ktorý bol rovnako účinný ako modifikovaný Pf3 (99% účinnosť). Pri použití fágu Pt1 sa zvýšili hladina endotoxínov 32 až 60 krát na rozdiel od modifikovaného Pf3, kde sa zvýšila iba 5 až 7 krát in vitro.

Jednej skupine pokusných myší BALB/c aplikovali Pt1 a druhej modifikovaný Pf3. 60 minút po infikovaní. Po 24 hodinách v skupine liečenej s modifikovaným Pf3 prežilo 95% myší na rozdiel od skupiny liečenej Pt1, kde iba prežilo iba 60% myší. Rozdiel bol spôsobený toxickou sepsou vyvolanou vyplavením endotoxínov po lýze baktérii.

Yacoby a kol. (2006) vytvorili vláknitý fág ako nosič, ktorý je schopný bezpečne preniesť antibiotikum až k baktérii. Ako modelové antibiotikum použili chlórampfenikol z dôvodov hemolytického účinku. Bakteriofág označili špecifickými protilátkami na zvýšenie špecificity proti baktérie *Staphylococcus aureus*.

Chlórampfenikol naviazali labilnou esterickou väzbou. Tá rozštiepi v blízkosti cieľovej baktérie vplyvom bakteriálnych esteráz a vytvorí mikroprostredie okolo baktérie s vysokou koncentráciou antibiotika. Stabilita esterickej väzby sa ukázala ako vyhovujúca (15% miera uvoľnenia po 1 hodine inkubácie v konskom sére).

Protilátky boli naviazané na povrch bakteriofágov ZZ doménov,

Testy ukázali, že modifikované fágy boli tak účinné, ako voľne použitý chlórampfenikol s 20 krát vyššou koncentráciou. Špecifické protilátky riešia problém s vznikom rezistencie. Možným problém je nešpecifické uvoľnenie antibiotika v sére a preto je nutné túto metódu otestovať in vivo.

Predchádzajúce štúdie ukázali, že modifikáciou bakteriofágov je možné vyriešiť niektoré nedostatky terapie s prírodnými fágmi, ako problémy s replikačnou schopnosťou, prenos toxických génov, alebo vznik toxickému šoku z vyplavenia endotoxínov. Ale niektoré nedostatky pretrvávajú. Konkrétne fakt, že RES vycytáva i modifikované fágy, čo nie len znižuje účinnosť liečby, ale v prípade použitia fágu ako nosiča pre antimikrobiálny agens môže vyvolať nežiadúce účinky uvoľnením antibiotika zo zachytených fágov.

#### 4.2.2. Bakteriofágy viazané na membránu:

Je to vlastne znehybnenie fágových častíc, na alebo v membráne, čím sa zabráni vycytaniu RES.

Jeden z týchto systémov vyvinuli na Eliavovom inštitúte, PhageBioDerm. Biodegradateľná membrána, ktorá obsahuje fágy ciprofloxacín, benzocáin a alfa-chymotrypsín. V Británii vytvorili znehybnené fágy na nylonových pásičkách, ktoré sa dajú použiť proti MRSA kmeňom (Kropinski a kol., 2006).

### 4.3. Fágové produkty – endolýzíny

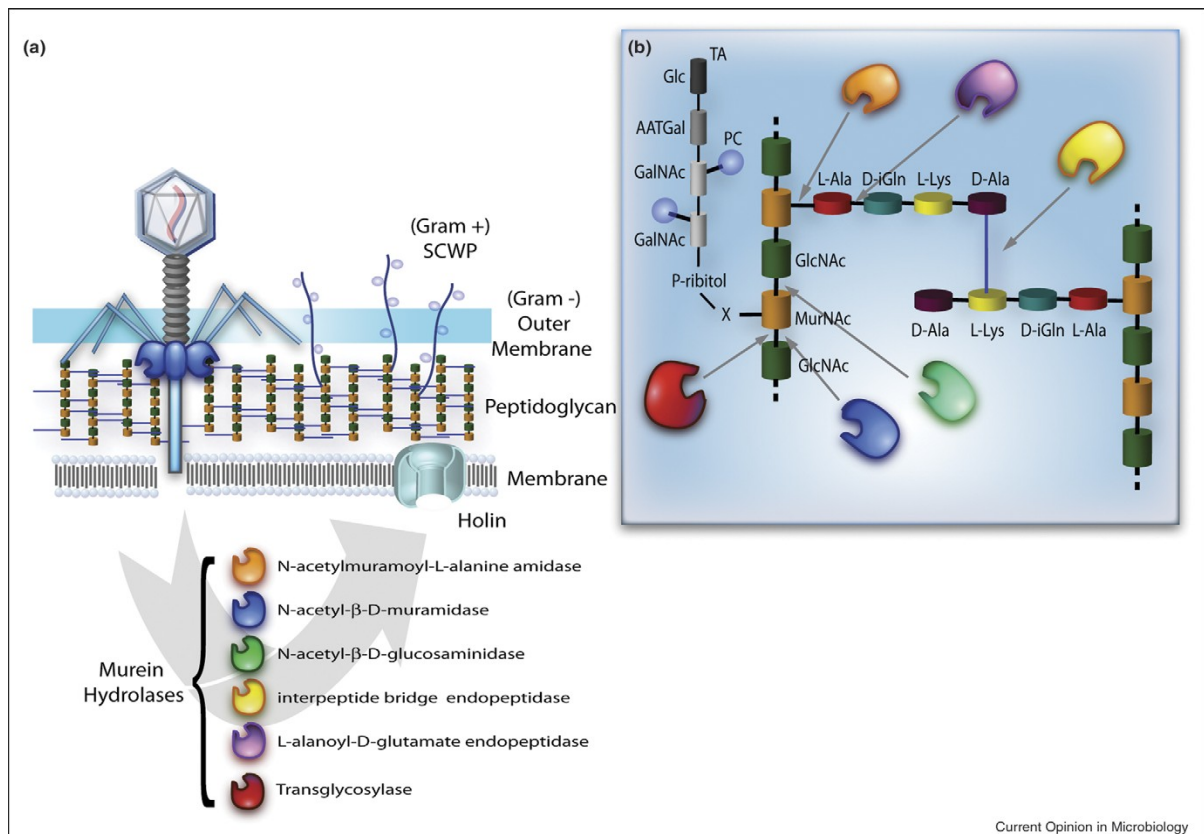
Lýzíny (nazývané tiež endolýzíny) sú peptidoglykan hydrolázy exprimované v bakériách, ktoré sú infikované bakteriofágmi. Expressia prebieha neskorej fázy lytického cyklu. Ich úlohou je rozštiepenie peptidoglykálu v bunkovej stene, aby sa uvoľnili fágové častice poslednej fázy lytického cyklu (Borysowski, 2006).

#### 4.3.1. Štruktúra peptidoglykanu:

Peptidoglykan je polymér, ktorý tvorí základ bakteriálnej bunkovej steny. Pozostáva z opakujúcich sa monomérov N-acetylglukoamín a N-acetylmurámovej kyseliny, ktoré sú zviazané s  $\beta$ -1,4-glykozidickými väzbami. Na prekríženie týchto polysacharidových vlákien slúžia tetrapeptidové reťazce, ktoré sú naviazane na laktylovu skupinu kyseliny murámovej amino väzbami.

Gram pozitívne baktérie (streptokoky, stafylokoky, enterokoky, bacily, listérie atď.) majú tetrapeptidy previazané medzi peptidovou väzbou. Ich hrubá bunková (15-80 nm) stena pozostáva viacerých peptidoglykan vrstiev spojených s kyselinou teichoovou. Nemajú vonkajšiu bunkovú membránu.

Gram negatívne (enterobaktérie – *E.coli*, yersínie, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa* atď.) majú tetrapeptidy previazané medzi peptidovým mostíkom. Ich tenká bunková stena (10 nm) je tvorená iba jedinou vrstvou peptidoglykan, ktorá je obklopená membránou z oboch strán (Borysowski, 2006).



Obr. 10: Štruktúra peptidoglykanu a bunkovej steny G<sup>+</sup> baktérii (Hermoso, 2007)

#### 4.3.2. Enzymatických charakter endolyzínov:

Lyzíny väčšinou majú dve funkčné domény, z ktorých jedna štiepi peptidoglykanové väzby (na N-konci) a druhou sa viaže na špecifický receptor v bunkovej stene (na C-konci).

Endolyzíny podľa enzymatickej špecificity delíme do 5 tried:

- N-acetylmuramidázy (lyzozýmy)
- Endo- β-N-acetylglucosaminidázy
- Lytické transglykosylázy, ktoré štiepia sacharidovú zložku peptidoglykanu.
- Endopeptidázy, ktoré štiepia peptidovú zložku.
- N-acetylmuramoyl-L-alanín amidázy, ktoré štiepia amínovú väzbu medzi zložkami (Hermoso, 2007).

#### 4.3.3. Mechanizmus účinku endolýzínov:

Bakteriálny receptor, na ktorý sa viaže C-koncová doména endolýzínov sa líši od receptorov, ktorými sa bakteriofág viaže na povrch baktérie, A zároveň bolo zistené, že hostiteľská špecificita u väčšiny endolýzínov nepresahuje úzke spektrum hostiteľov fágov, z ktorých pochádzajú.

Endolýzíny potrebujú dosiahnuť peptidoglykan, ktorý je chránený bunkovou membránou. K tomuto účelu slúžia malé hydrofóbne proteíny menom holíny. Tie sú schopné depolarizovať membránu a vytvoriť dieru v membráne čím umožnia endolýzínom dosiahnuť peptidoglykan. Okrem holínov infikovaná bunka produkuje aj antiholíny, ktoré inhibujú aktivitu holínov až do presne určeného okamžiku lýzy. Nahromadené holíny v priebehu krátkej doby vytvoria masívne diery v bunkovej mebráne a endolýzíny rozštiepia peptidoglykan. Nastane lýza baktérie a uvoľnenie miliónov bakteriofágov do prostredia.

Boli objavené tri endolýzíny, ktoré využívali sekrečný systém hostiteľa (host *sec* system) aby prešli bunkovou membránou k peptidoglykan bez holínov:

Lys44 z fágu fOg44, ktorý infikuje *Oenococcus oeni*; lyzín Lyz z *E.coli* fágu P1 a endolýzín Lyz z bakteriofágu phig1e, ktorý napáda *Lactobacillus plantarum*. (Borysowski a kol. 2006)

#### 4.3.4. Využitie v terapii

Pretože peptidoglykan u Gram negatívnych baktérií je prekrytý bunkovou membránou endolýzíny sú schopné lyzovať iba Gram pozitívne baktérie pri terapeutickom použití.

Hermoso a kol. (2007) píše o prvom pokuse vytvoriť rekombinantný endolýzín a jeho použití proti streptokokom skupiny A v teste na myšiach, ktorý urobil Fischetti a kol. v roku 2001. Táto práca vytvorila záujem o štúdium endolýzínov na terapiu proti Gram pozitívnym baktériám.

Deutch a kol (2004) opísali endolýzín MurLH z fágu  $\Phi$ -0303, ktorý infikuje *Lactobacillus helveticus*. Zistili, že je schopný lyzovať 11 rôznych druhov: *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Brevibacterium linens*, *Leuconostoc lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium* a *Bacillus subtilis*.

Yoong a kol. (2004) opísali účinky endolyzínu PlyV12 exprimovaného z bakteriofágu phi1, ktorý infikuje *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*, ktoré často u pacientov so zníženou imunitou spôsobujú endokarditidy, abscesy brucha a bakteriémie (sepsy).

Dokázali lýzu in vitro viacerých infekčných baktérii ako VRE, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyogenes* (streptokok skupiny A), streptokoky skupiny B, C, E, F, L, N a *Staphylococcus aureus*.. Z baktérii prirodzenej fluóry lyzuje iba *Streptococcus gordonii*. Napriek výbornej schopnosti PlyV12 lyzovať množstvo ľudských patogénov zatiaľ nikto neurobil klinický test in vivo (na zvieratách či ľuďoch).

O'Flacherty a kol. (2005) vložili gén na expersiu endolyzínu LysK z bakteriofága K (širokospektrálny bakteriofág proti stafylokokom) do baktérie *Lactococcus lacti*. Laktokokový lyzát obsahujúci LysK bol schopný lyzovať množstvo stafylokokov ako napr. *Staphylococcus aureus* - MRSA, VRSA, Teikoplanin rezistentný *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. hemolyticus* atď.

Endolyzín LysK má dve katalytické domény na N-konci: CHAP (cysteín a histidín závislá amidohydroláza/peptidáza) a centrálnu doménu (N-acetylmuramoyl-L-alanín amidázu) a na SH3b na receptor sa viažucu doménu na C-konci. Zistilo sa, že LysK nestráca lytické schopnosti po odstrihnutí SH3b domény.

Horgan a kol. (2009) úspešne odskúšali samostatnú CHAP katalitickú doménu LysK lyzínu proti rezistentným kmeňom stafylokokov (v rátane MRSA). Porovnali CHAP doménu s ostatnými známymi endolyzínmi, ktoré sú schopné lýzy stafylokokových kmeňov (phi11, MV-L a HysH5). a phi11 odstránením prídavných domén lytické schopnosti, MV-L a LysH5 lyzoval iba *S. aureus*, *S. simulans* a *S. epidermitidis*. Orezaním LysK endolyzínu iba na CHAP katalytickú doménu sa výrazne znížila veľkosť bielkoviny (menšie bielkoviny lepšie prenikajú do orgánov a menej aktivizujú imunitný systém).

Skurnik a Strauch (2005) referovali o použití bakteriocínov z chvostíku bakteriofágu, ktorý infikuje *Yersinia enterocolitica*. Tento enzým tvorí dieru v bunkovej stene, ktorou daný bakteriofág vstrekne svoju nukleovú kyselinu do baktérie. Predpokladá sa, že vytvorením viacerých otvorov v bunkovej stene nastane výrazná strata iónov a následný osmotický jav baktériu lyzuje. Pri experimentálnej skúške na myšiach došlo iba krátkodobému uzdraveniu. Potom i po opakovanom podaní bakteriocín nebol schopný dostatočne zabrániť infekcii. Teda použitie bakteriocínov pochádzajúcich z chvostíkov bakteriofágov nie je vhodné na terapiu.



Borysowski a kol. (2006) referuje, že Dp-1 fágu lyzuje aj opuzdrené kmene *Streptococcus pneumoniae*, endolyzín PlyGBS fágu NCTC 11261, ktorý infikuje *Streptococcus agalaciae* je schopný lyzovať streptokoky skupín B, D, L a *S. pyogenes* a lyzín PlyG bakteriofágu  $\gamma$  je schopný ničiť kľúčiacie spóry *Bacillus anthracis*. Taktiež bola vyvinutá metóda na identifikáciu antraxových spór. Reakcia PlyG so spórami uvoľňuje ATP, ktoré môže byť merané limunometrom (luciferin/luciferáza).

Hermoso a kol. (2007) referuje o teste kokteilu NAM-amidázy z Dp-1 fágu a Cp-1 lyzozým (Cp-1 fág) proti *Streptococcus pneumoniae* s veľmi dobrými výsledkami. Doporučuje aby enzýmy s pomalou kinetikou sa použili do kokteíl. Proti *Listeria monocytogenes*, častým patogénom v mlieku bol vytvorený rekombinatný kmeň *Lactococcus lactis* produkujúci endolyzín.

Baktéria *Staphylococcus simulans* produkuje enzým s podobným účinkom aký majú fágové endolyzíny. Nazýva sa lysostafín a štiepi glycil-glycínové väzby stafylokokovej peptidoglykan. Narozdiel od bakteriálnych enzýmov, ktoré opravujú peptidoglykan v bunkovej stene, lysostafín vždy nevratne rozrušuje peptidoglykan, a preto sa uvažuje o jeho spojení s autolýzou bunky. Lisostafín je účinný proti *Staphylococcus aureus*, vrátane MRSA. Výhodná jeho produkcia s rekombinatných laktobacilmi v mliekarenskom priemysle.

Nebol pozorovaný vznik rezistencie baktérií proti endolyzínom ani po vyvolanej mutácii. Je to spôsobené tým, že katalytické jadro rozpoznáva pre baktériu životne potrebnú látku (napr. cholín u pneumokokov, alebo polyramózu, ktorá je nutná pre rast Streptokokov skupiny A).

Hlavné obmedzenie použitia endolyzínov je prirodzená odolnosť Gram negatívnych baktérii, ale proti Gram pozitívnym baktériám sa osvedčili. Síce toxický účinok lyzínov nebol potvrdený (iba bakteriálny lyzín lysostafín má schopnosť viazať a degradovať elastín, pretože má vysoký obsah glycínu), ale mechanizmus rozpustenia bunkovej steny môže vyvolať toxický šok podobne ako pri terapii s prírodnými fágmi.

Endolyzíny sú schopné vyvolať imunitnú odpoveď. Síce reakcia s protilátkami nevyvoláva inaktiváciu enzymatickej aktivity, ale ďalšie mechanizmy imunitného systému (fagocytóza, RES apod.) môžu zabráňovať prístupu k patogénnym baktériám a tým znižovať účinnosť liečby. Borysowski a kol. (2006) referovali, že naviazaním PEG na molekuly lyzínu sa výrazne zníži afinita protilátok k endolyzínu.

## 5. Záver

Fágová terapia má potenciál sa stať bežne dostupnou liečbou bakteriálnych ochorení pre mnohé výhody ako schopnosť účinne zabíjať na antibiotiká rezistentné bakteriálne kmene a v podstate žiadne vedľajšie účinky. Pre zavedenie nového liečiva na fágovú terapiu je nutné mať dôkladne preskúmaného daného fága. Presne určiť rozsah bakteriálnych kmeňov, ktoré je schopný lyzovať, sekvenovať genóm pre vylúčenie prítomnosti génov pre toxíny, rezistenciu na antibiotiká, iných faktorov virulencie a schopnosti prejsť do lyzogénneho cyklu.

Síce bakteriofágy samotné nie sú pre človeka toxické, ale septický šok z náhleho uvoľnenia veľkého množstva endotoxínov z lyzovaných baktérií môže u oslabených pacientov vyvolať vážne komplikácie. Riešením by bolo použitie nereplikovateľných modifikovaných fágov, ktoré nesú toxický gén reštrikčnej endonukleázy.

Za najväčší problém považujem schopnosť RES viazať bakteriofágy (prírodné i modifikované) a tým výrazne znížiť účinnosť liečby (u myši došlo ku úplnému vychytaniu v priebehu niekoľkých hodín). Tiež bakteriofágy navodzujú produkciu protilátok v ľudskom tele, ale nie je zrejmé ako dlho tieto protilátky pretrvávajú v organizme po skončení liečby.

Tu sa naskytuje riešenie v podobe endolyzínov, ktoré sú výrazne menšie a tým aj ťažšie odbúrateľné imunitným systémom. Ich hlavným problémom je neschopnosť lyzovať Gram negatívne baktérie.

Nasadeniu v komerčnej výrobe paradoxne robí problémy nízka výrobná cena a všeobecná znalosť fágov. Teda farmaceutické spoločnosti váhajú s nasadením na trh, pretože často izolovaného fága si nemôžu patentovať ani iným spôsobom chrániť a spolu s lacnou výrobou nebude schopná dostatočne presadiť svoj výrobok. Inými slovami sa im to neoplatí. Ale výrobu modifikovaných fágov a endolyzínov je možno patentovať a preto verím, že budúcnosť fágovej terapie je práve v nich.

## 6. Zoznam použitých skratiek

<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide, dimetyl sulfoxid.
<b>GMO:</b>	Genetically Modified Organism, geneticky modifikovaný organizmus
<b>IPTG:</b>	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, izopropyl- $\beta$ -D-1-tiogalaktopyranozid.
<b>MRSA:</b>	Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , Meticilín rezistentný kmeň <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>NK</b>	nukleová kyselina.
<b>CO-MRSA</b>	community-acquired, or community-associated <i>Staphylococcus aureus</i> , získaný v komunite meticilín rezistentný <i>Stafylococcus aureus</i>
<b>PFU</b>	Plaque forming unit, plaky tvoriaca jednotka.
<b>RES</b>	reticuloendothelial system, retikuloendotelový system.
<b>VRE</b>	Vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i> , Vankomycín rezistentné enterokoky.
<b>VRSA</b>	Vankomycin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> , Vankomicín rezistentný <i>Staphylococcus aureus</i>

## 7. Použitá literatúra

Bacteriophages.ppt

**Borysowski, J.,** Weber-Dabrowska, B., Górski, A. (2006): Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med (Maywood)*, 231(4) pp. 366-377

**Bruttin, A. a Brüssow, H.** (2005): Human Volunteers Receiving Escherichia coli Phage T4 Orally: a Safety Test of Phage Therapy. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, pp. 2874–2878

**Chen, J., Novick, R., P.** (2009): Phage-mediated intergeneric transfer of toxin genes. *Science*, 323(5910), pp. 139-141

**Deutsch, S.,M.,** Guezenec, S., Piot, M., Foster, S., Lortal, S.. (2004): Mur-LH, the broad-spectrum endolysin of *Lactobacillus helveticus* temperate bacteriophage phi-0303. *Appl Environ Microbiol.* 70(1), pp. 96-103

**Dublanchet, A.,** Bourne, S. (2007): The epic of phage therapy. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 18(1), pp. 15-18

**Fruciano, D.E.,** Bourne, S. (2007): Phage as an antimicrobial agent: d’Herelle’s heretical theories and their role in the decline of phage prophylaxis in the West. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 18(1), pp. 19-26

**Grones, J.** 2005. *Základy molekulárnej bakteriológie.* 2005, Vydavateľstvo KARTPRINT. ISBN 80-88870-50-X

**Hermoso, J.,A.,** García, J.,L., García, P. (2007): Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol*, 10(5), pp. 461-472

**Horgan, M.,** O’Flynn, G., Garry, J., Cooney, J., Coffey, A., Fitzgerald, G., F., Ross, R., P., McAuliffe, O. (2009): Phage lysin LysK can be truncated to its CHAP domain and retain lytic activity against live antibiotic-resistant staphylococci. *Appl Environ Microbiol*, 75(3), pp. 872-874.

**Kropinski, A., M.** (2006): Phage Therapy - Everything Old is New Again. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 17(5), pp. 297-306

**Miedzybrodzki, R.,** Fortuna, W., Weber-Dabrowska, B., Górski. A. (2007): Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 3;61, pp. 461-465

**O’Flaherty S.,** Coffey, A., Meaney, W., Fitzgeral, G., F., Ross, R., P. (2005): The recombinant phage lysin LysK has a broad spectrum of lytic activity against clinically

relevant staphylococci, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, 187(20), pp. 7161-7164

**Sayamov R. M.** (1963): Treatment and Prophylaxis of Cholera with Bacteriophage. *Bull Org. mond. Sante*, 1963, 28, 361-367

**Skurnik, M., Strauch, E.** (2006): Phage Therapy: Facts and fiction. *International Journal of Medical Microbiology*, 296, pp. 5-14

**Skurnik, M., Pajunen, M., Kiljunen, S.** (2007): Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett*, 29(7), pp. 995-1003

**Sulakvelidze, A., Zempherira, A., Morris, J., G., Jr.** (2001): Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Mar. 2001, pp. 649-659

**Tabor, S., Richardson, C., C.** (1984): A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 82, pp. 1074-1078.

**Yoong, P., Schuch, R., Nelson, D., Fischetti, V., A.** (2004): Identification of a broadly active phage lytic enzyme with lethal activity against antibiotic-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *J Bacteriol*, 186(14), pp. 4808-4812

## Internetové zdroje

Internetový zdroj 1: <http://www.pdbj.org/emnavi/data/jdata/1101/snaps2.jpeptidoglykan>

Internetový zdroj 2: [http://en.citizendium.org/images/thumb/6/65/Older\\_d%27Herelle.jpeptidoglykan/200px-Older\\_d%27Herelle.jpg](http://en.citizendium.org/images/thumb/6/65/Older_d%27Herelle.jpeptidoglykan/200px-Older_d%27Herelle.jpg)

Internetový zdroj 3: [http://image.absoluteastronomy.com/images/topicimages/f/fr/frederick\\_twort.gif](http://image.absoluteastronomy.com/images/topicimages/f/fr/frederick_twort.gif)

Internetový zdroj 4: <http://www.eliava-institute.org/>

Internetový zdroj 5: <http://www.kolkhoba.org/544.jpeptidoglykan>

Internetový zdroj 6: [http://www.iitd.pan.wroc.pl/index\\_en.html](http://www.iitd.pan.wroc.pl/index_en.html)

Internetový zdroj 7: <http://www.phagetherapycenter.com>

Internetový zdroj 8: <http://www.highbeam.com/doc/1G1-131160005.html>

Internetový zdroj 9: <http://www.biochimpharm.ge>

Internetový zdroj 10: <http://www.phageinternational.com/>

Internetový zdroj 11: <http://www.sevapharma.cz/>

Internetový zdroj 12: [http://permanent.access.gpo.gov/lps1609/www.fda.gov/fdac/features/2007/107\\_virus.html](http://permanent.access.gpo.gov/lps1609/www.fda.gov/fdac/features/2007/107_virus.html)

Internetový zdroj 13: <http://www.mcb.uct.ac.za/tutorial/mcb2016f/phage-filamentous-150.jpg>

Internetový zdroj 14: <http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/Keogh/bacteriophage2.jpg>

Internetový zdroj 15: <http://www.microbiologybytes.com/virology/Phages.html>

Internetový zdroj 16: <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/phage/phage-lambda-plaque.gif>

Internetový zdroj 17: <http://www2.oakland.edu/biology/chaudhry/pics/VirusVectorsI.pdf>