

# Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi

## Bacteriophage therapy

Tomaž Bratkovič, Andrej Preželj

**Povzetek:** Ideja o uporabi bakteriofagov za zdravljenje okužb, povzročenih z bakterijskimi patogeni, je stara že skoraj stoletje. Nerazumevanje biologije bakteriofagov in pomanjkanje nadzorovanih kliničnih raziskav, predvsem pa odkritje antibiotikov, so bakteriofagno terapijo po začetnem zagonu v zahodnih državah pahnilo v pozabo. Vse bolj pereč problem odpornosti bakterijskih patogenov proti klinično pomembnim antibiotikom je v zadnjem desetletju obudil zanimanje za bakteriofagna zdravila. Znanje, ki je rezultat sodobnih raziskav, ponuja realno možnost novih terapevtskih pristopov in odpira tudi nekatera povsem nova področja uporabe bakteriofagov.

**Ključne besede:** bakterijske okužbe, bakteriofagi, antibiotiki, encibiotiki

**Abstract:** The use of bacteriophage for combating bacterial infections was proposed almost a century ago. However, after the initial enthusiasm the idea quickly faded in the West with the discovery of antibiotics, accompanied by lack of phage biology understanding and insufficient proof of therapeutic efficacy of bacteriophage medicines due to inappropriately designed clinical trials. Today, as we are faced with accelerating emergence of bacterial resistance to antibiotics, the idea of bacteriophage-based drugs was brought back to life. Knowledge gathered over all these years offers a solid foundation on which to build new therapeutic approaches and develop alternative areas of bacteriophage application.

**Keywords:** bacterial infections, bacteriophages, antibiotics, enzybiotics

## 1 Bakterijski virusi

*Bakteriofagi* (krajše: *fagi*) so preprosti virusi, ki se razmnožujejo izključno v bakterijskih celicah. Odkril jih je francosko-kanadski mikrobiolog Félix d'Herelle. Pri svojih raziskavah je opazil, da so v nekaterih bakterijskih kolonijah na agarjem gojišču prisotna drobna področja, kjer bakterije ne uspevajo. Pri prenosu takih kolonij v bakterijsko kulturo v tekočem gojišču je že v nekaj urah opazil, da je prišlo do odmrta vseh bakterij in posledično do zbitritve gojišču. Sklepal je, da je vzrok mikroorganizem, ki se kot zajedalec »hrani« z bakterijami – od tod izhaja tudi ime *bakteriofag* (grško »tisti, ki je bakterije«). Enak pojav (naknadno poimenovan Twort-d'Herelle-ov fenomen) je pred d'Herelle-om opisal angleški bakteriolog Frederick Twort, a je delovanje zmotno pripisal za bakterije toksičnemu proteinskem dejavniku (1, 2).

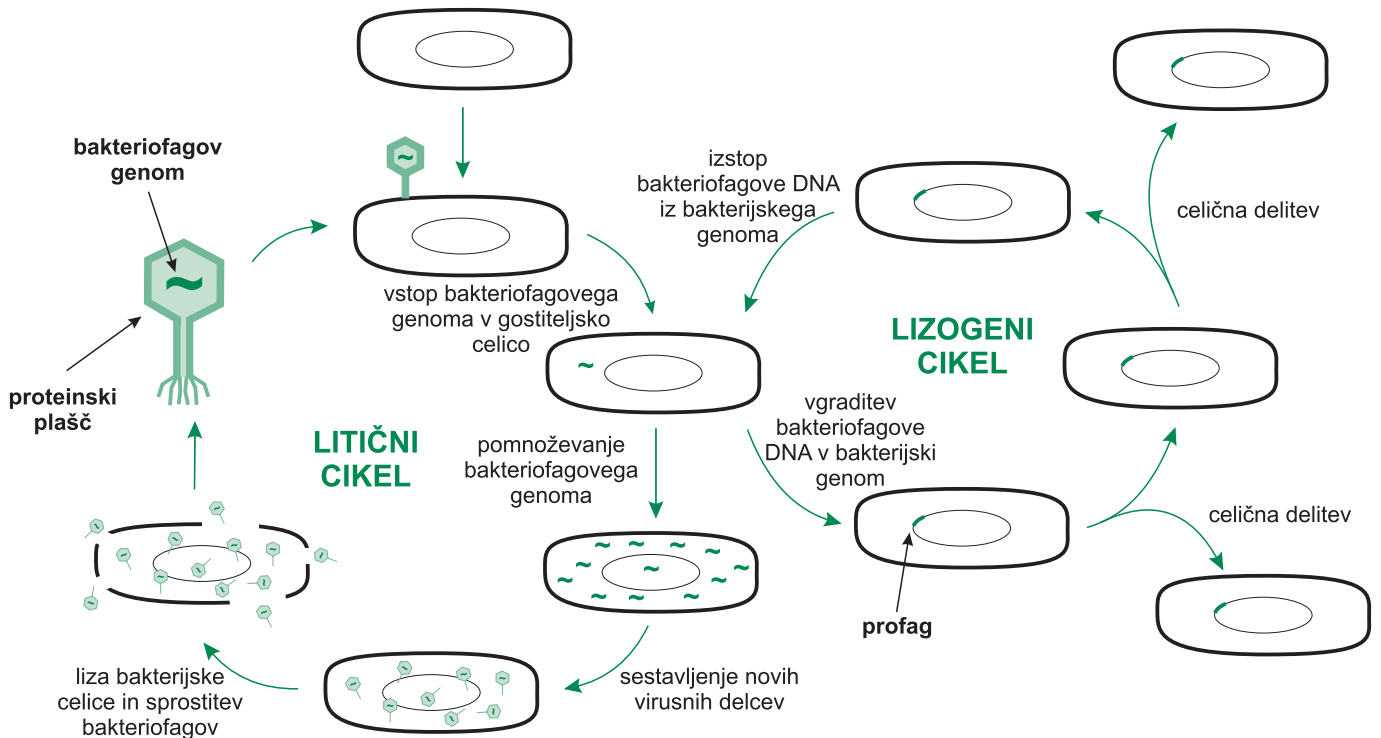
Fagi so v naravi prisotni skoraj povsod. Najdemo jih v slanin in sladkih vodah, v prsti, v hrani in tudi v pitni vodi. V prebavnem traktu živali in človeka predstavljajo pomemben del normalne gastrointestinalne flore. Ocenjujejo, da je njihovo celokupno število reda velikosti  $10^{31}$ , kar je približno desetkrat več, kot je velikost celokupne svetovne bakterijske populacije (3, 4).

Genetsko so bakteriofagi izjemno heterogena skupina. Pri najmanjših tvorijo genom vsega štirje geni, dedni material največjih pa gradi tudi do štiristo genov. Genska informacija je prisotna bodisi v obliki enoverižne ali dvoverižne RNA oziroma DNA, v linearni ali ciklični obliki. Ne glede na morfološko pestrost oblik je vsak virusni delec

(virion) zgrajen iz osrednje nukleinske kisline, ki jo obdaja proteinski plašč (3). Praviloma so bakteriofagi glede na gostitelja ne le vrstno, temveč pogosto celo sevno visoko specifični. Primarni dejavnik, ki določa gostiteljsko specifičnost, so površinske strukture na bakterijskih celicah, po svoji naravi proteini ali ogljikovi hidrati. Le-te bakteriofag izkorišča kot receptorje za pritrditev na bakterijo (3, 5). Skladno s heterogenostjo bakteriofagov imajo ti tudi nadvse različne življenjske cikle. V splošnem ločimo *litične* (*virulentne*) in *lizogene* (*temperatne*) bakteriofage (slika 1).

## 2 Zgodovina zdravljenja bakterijskih okužb z bakteriofagi

d'Herelle je svoje poskuse iz laboratorija kmalu prenesel na živali. Glede na njegova navajanja mu je uspelo močno omejiti epidemijo bakterijskega gastroenteritisa med kokošmi, tako da jim je v hrano dodajal bakteriofage, specifične za bakterijo *Salmonella gallinarum*. Uspešen naj bi bil tudi pri zaježitvi epidemije hemoragične septikemije pri vodnih bivoli, katerim je bakteriofage, specifične za bakterijo *Pasteurella multocida*, injiciral intravensko (7). Poskuse je nato nadaljeval še na sebi, članih družine in sodelavcih. Opočumljen z rezultati je d'Herelle poskusil tudi z zdravljenjem okužb pri bolnikih. Številna poročila pričajo, da je bilo mogoče v dobi pred odkritjem antibiotikov z d'Herelle-ovo metodo odpraviti prej neozdravljive bolezni bakterijskega vzroka, kakršne so bubonska kuga, krvave griže



Slika 1. Primerjava *litičnega* (levo) in *lizogenega* cikla (desno) (prirejeno po 6). Nekateri bakteriofagi so stabilno *litični* in svoje DNA *ne* vgrajujejo v genom gostiteljske bakterije. Bakteriofag po okužbi bakterije izkorišča celične mehanizme za pomnoževanje lastnega genoma in sintezo strukturnih proteinov ovojnice. Nazadnje bakteriofagi izzove smrt celice in pomnoženi virusni delci se sprostijo iz lizirane bakterije. *Lizogeni* bakteriofagi svoj dedni material vgradijo v genom gostiteljske celice (tak latentni bakteriofag imenujemo *profag*), ki se tako prenaša na vse hčerinske bakterije, nastale z vegetativno delitvijo okužene celice. Ob indukciji profag izstopi iz bakterijskega genoma (občasno »odnese« s seboj tudi del bakterijskega genoma in ga naknadno vgradi v genom nove gostiteljske celice; proces imenujemo *transdukcija*). Bakteriofag nato vstopi v t. i. litični cikel, pri tem nastajajo novi bakteriofagi.

Figure 1. Comparison of *lytic* (left) and *lysogenic* cycle (right) (6). Some phages are stably *lytic* and do *not* integrate their DNA into hosts' genomes. Upon infecting the bacterium phage uses the cell's mechanisms to replicate the viral genome and produce capsid proteins. Multiplied virions are released from bacterium through cell lysis. *Lysogenic* phages, on the other hand, integrate their genetic material into host cells' genomes (such dormant phages are called *prophages*) and are thus transferred to all daughter cells (bacterial clones). Following induction, prophage enters the lytic cycle, forming new virions. Sometimes a lysogenic phage transfers parts of old host genome to newly infected bacteria in a process known as *transduction*.

in kolera (1, 7). Tako imenovana *bakteriofagna terapija* je postala v dvajsetih letih prejšnjega stoletja zelo popularna, sam d'Herelle pa naj bi si prislužil celo nominacijo za Nobelovo nagrado za medicino (8).

Do štiridesetih let prejšnjega stoletja je več farmacevtskih podjetij v Franciji in Združenih državah Amerike tržiło zdravila, ki so vsebovala bakteriofage, vendar pa je splet okoliščin (odkritje betalaktamskih antibiotikov), kot tudi nepoznavanje roko vanja s pripravki botrovalo negativnim odzivom Sveta za farmacijo in kemijo (Council on Pharmacy and Chemistry) uglednega Ameriškega zdravniškega združenja (American Medical Association). Očitki novi tehnologiji so leteli predvsem na pomanjkanje ustrezno izvedenih kliničnih raziskav, ki bi nedvoumno potrjevale učinkovitost bakteriofagnih zdravil (2, 7).

V nasprotju z Zahodom se je uporaba bakteriofagov v Vzhodni Evropi ohranila vse do devetdesetih let prejšnjega stoletja. Največja centra

bakteriofagne terapije sta aktivna še danes. V Wrocławu deluje Hirsfeldov inštitut za imunologijo in eksperimentalno terapijo, v Tbilisiju pa Eliavin inštitut za bakteriofage, mikrobiologijo in virologijo (slednjega je soustanovil sam d'Herelle). Sovjetski in poljski zdravniki so poročali o 80-90 % uspešnosti v boju s trdovratnimi bakterijskimi patogeni, pogosto odpornimi proti različnim skupinam antibiotikov. Zahodni svet je obdržal znanstveno sporno, politično motivirano odklonilno stališče do bakteriofagne terapije, verjetno tudi zaradi nedostopnosti novejših znanstvenih literature in načelnem zavračanju vsega sovjetskega (1, 5, 7). Kot zanimivost naj omeniva, da so še v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja pod pokroviteljstvom Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) v Pakistanu potekale klinične raziskave, v okviru katerih so potrdili primerljivo učinkovitost zdravljenja kolere s tetraciklinskimi antibiotiki in visokimi odmerki bakteriofagov, danim *per os* (7).

### 3 Sodoben pogled na bakteriofagno terapijo

Bakteriofagna terapija, v svojih začetkih skrajno revolucionarna tehnologija, je bila za tedanji svet pred svojim časom. Takratno znanje s področja mikrobiologije in medicine je ni dohajalo, zato je bila njena terapevtska vloga in tržna uveljavitev vnaprej obsojena na neuspeh. Poleg tega je ob uvedbi antibiotikov v klinično prakso sprva kazalo na dokončno zmago človeštva nad patogenimi bakterijami in o alternativnih metodah zdravljenja bakterijskih okužb niso razmišljali.

Danes je potreba po alternativnih zdravljenjih okužb velika. Ena od možnih rešitev je identifikacija novih tarč in razvoj protimikrobnih učinkovin z novimi mehanizmi delovanja, torej kemoterapevtikov, proti katerim bakterije še niso odporne. Še vedno veliko vlagajo tudi v razvoj zaviralcev bakterijskih proteinov, ki so nosilci odpornosti. Nekatere takšne učinkovine so že učinkovita podpora uveljavljenim antibiotikom. Na drugi strani sta napredek v poznavanju biologije bakteriofagov ter razvoj biomedicinskih tehnologij v zadnjem desetletju omogočila ponovno znanstveno ovrednotenje bakteriofagne terapije. Primerjavo lastnosti antibiotikov in bakteriofagov kot protibakterijskih zdravil podaja preglednica 1.

Trenutno je v svetu le nekaj deset manjših in srednje velikih biotehnoloških podjetij, ki predstavljajo prvi val razvoja tehnologij za uporabo bakteriofagov v humani in veterinarski medicini, poljedelstvu in prehrabeni industriji (9). V nadaljevanju predstavlja pogled na bakteriofagno terapijo skozi oči sodobne znanosti vključno z nekaterimi novimi koncepti in biotehnološkimi pristopi v načrtovanju protimikrobnih (bakteriofagnih) zdravil prihodnosti.

#### 3.1 Klasična bakteriofagna terapija

Etični standardi biomedicinskih raziskav v današnjem času so neprimerljivi s tistimi z začetka 20. stoletja, ko je d'Herelle pričel z uvajanjem bakteriofagne terapije. Takó zavedanje o podrobnem dogajanju med bakteriofagovim življenjskim ciklom in potencialnim imunskim odzivom, ki bi utegnil spremljati vnos bakteriofagov v organizem, vzbuja številne tehtne pomisleke o varnosti bakteriofagnih zdravil. A z današnjim znanjem zagovorniki bakteriofagne terapije lahko kritikom in skeptikom ponudijo sprejemljive rešitve.

Osnovna zahteva za zagotovitev varnosti bakteriofaga kot zdravila je, da izberemo vrsto, ki je stabilno litična in ne prenaša genetskega materiala s transdukcijo med bakterijami (glej tudi sliko 1). Lizogeni bakteriofagi niso zgolj manj učinkoviti, temveč ob njihovi uporabi obstaja tudi nevarnost horizontalnega prenosa antibiotične odpornosti, bakterijskih toksinov in virulentnih dejavnikov. Pri tem se lahko prej nenevarni bakterijski sevi pretvorijo v patogene. Transdukcija je sicer možna tudi pri litičnih bakteriofagih, a je precej manj verjetna (3, 10). Z določitvijo nukleotidnega zaporedja fagnega genoma in naknadno bioinformatično analizo je pred načrtovano uporabo določenega bakteriofaga smiselno preveriti, ali so v genomu prisotni geni, ki kodirajo znane alergene, toksine in virulentne dejavnike (3). Endotoksine, ki izvirajo iz liziranih gostiteljskih celic, v katerih pomnožujejo bakteriofage v bioreaktorjih, je z modernimi separacijskimi tehnikami, kot sta ultracentrifugiranje in ionsko-izmenjevalna kromatografija, mogoče učinkovito odstraniti (3). Pri sterilizaciji bakteriofagnega zdravila je potrebno izbrati metode, ki

zagotavljajo ohranitev infektivnosti bakteriofagov, in validirati pogoje shranjevanja (6). Vsekakor pa je najpomembneje preveriti učinkovitost bakteriofaga kot bakteriolitika na živalskem modelu bakterijske okužbe, saj se posamezne bakteriofagne vrste v pogojih *in vivo* obnašajo različno (6). Skurnik in sod. (6, 11, 12) so ugotovili, da bakteriofaga PY100 in  $\phi$  YeO3-12, dana mišim *per os* (v neodvisnih raziskavah), ne zaščitita živali pred naknadno izzvano okužbo z bakterijo *Yersinia enterocolitica*, čeprav so v kulturah *in vitro* opazili popolno lizo bakterij. Drugi raziskovalci poročajo o visoki učinkovitosti svojih bakteriofagov, ki so statistično značilno zmanjšali umrljivost pri miših po intraperitonealnem injiciranju v času do 5 ur po okužbi z virulentnima bakterijama *Enterococcus faecium* (13) in *Staphylococcus aureus* (14).

Farmakokinetične lastnosti bakteriofagov niso primerljive s klasičnimi učinkovinami. Praviloma se zadržujejo in pomnožujejo na samem mestu okužbe le v prisotnosti gostiteljske bakterije, kar je s terapevtskega in toksikološkega vidika ugodno, znižuje pa tudi potrebo po večkratnem odmerjanju (1, 7). Po intravenskem dajanju se bakteriofagi razporedijo v večino organov, kar omogoča njihovo uporabo za različne tipe infekcij. Zanimivo je, da se (vsaj nekatere vrste) kljub precejšnji velikosti učinkovito absorbirajo iz prebavnega trakta in prehajajo celo v urin (4). Iz organizma se pospešeno odstranjujejo, za kar je pretežno odgovoren retikuloendoteljski sistem. Nekateri bakteriofagi so dokazano imunogeni in izzovejo tvorbo nevtralizacijskih protiteles (4). Slednja za uspešnost bakteriofagne terapije naj ne bi bila omejujoč dejavnik, saj je kinetika bakterijske lize veliko hitrejša kot humoralni imunski odziv (1), vendar so poskusi zdravljenja ponovne okužbe z isto vrsto bakteriofaga manj uspešni. O zanimivem odkritju poročajo Merrill in sod. (15). Razvili so metodo za izolacijo različnih bakteriofagov, ki jih imunski sistem ne prepozna. Mišim so intraperitonealno injicirali enterofag  $\lambda$ , ga po določenem času izolirali iz odvzetih vzorcev krvi, pomnožili *in vitro* v kulturah mutatorske bakterije *Escherichia coli* in očiščene ponovno injicirali poskusnim živalim. Po desetih dneh takšne selekcije *in vivo* (čas pred odvzemanjem vzorcev krvi so postopoma podaljševali) in pomnoževanja *in vitro* so uspeli izolirati bakteriofagni klon, na katerega se mišji imunski sistem ni odzval in je bil zato uspešnejši pri odpravljanju ponovno povzročenih okužb. Rezultat pojasnjujejo z mutacijo antigenskih determinant na bakteriofagni ovojnici.

Težave pri praktični uporabi bakteriofagnih zdravil bi zaradi gostiteljske specifičnosti utegnili povzročati potreba po hitri in točni etiološki diagnostiki – identifikaciji vrste in seva patogena. To nekdam zamudno in pogosto nemogočo nalogo je mogoče premagati s sodobnimi tehnologijami, kakšni sta DNA-mikromreže ali verižna reakcija s polimerazo (PCR) (3). V preteklosti so poskušali doseči širši spekter delovanja bakteriofagnih zdravil s pripravo kombinacije različnih bakteriofagov, ki so lizirali večino sevov nekega patogena, t. i. *fagnih koktejl*ov. Po drugi strani so smiselne tudi kombinacije različnih bakteriofagov, ki imajo skupnega gostitelja, saj je verjetnost, da bi patogen razvil odpornost proti vsem, zanemarljiva. Pri razvoju potencialnih bakteriofagnih zdravil se bo potrebno omejiti le na tiste patogene, ki predstavljajo največje težave in izzive za sodobno zdravljenje (multirezistentne bakterije kot so MRSA (*Staphylococcus aureus* odporen proti metilicinu), VRE (enterokoki odporni proti vankomicinu) in *Pseudomonas aeruginosa*). Z vidika regulatornih

Preglednica 1. Primerjava protibakterijskih lastnosti bakteriofagov in antibiotikov (zgornji del tabele) ter nekaterih razvojnih značilnosti obeh vrst zdravil (spodnji del tabele) (prirejeno po 1, 3).

Table 1. Comparison of antibacterial properties of phages and antibiotics (upper part) and some specific development issues concerning both types of drugs (lower part of table) (1, 3).

Bakteriofagi	Antibiotiki	Opomba
So glede na gostitelja vrstno/sevno specifični, zato je verjetnost sekundarnih okužb manjša.	Vplivajo tudi na normalno bakterijsko floro, kar lahko vodi v sekundarne (npr. glivične) okužbe.	Hitra mikrobiološka diagnostika je predpogoja za uspešno izbiro protimikrobnega zdravila, kar v primeru visoko specifičnih bakteriofagov lahko obravnavamo tudi kot pomanjkljivost.
Se pomnožujejo na mestu okužbe in se sicer hitro odstranijo iz organizma.	Telo jih presnavlja in izloča. Ne zadržujejo se samo na mestu okužbe.	Teoretično zadostuje en sam odmerek bakteriofagnega zdravila. Po preboleni bolezni fagi hitro zapustijo organizem.
Novejše raziskave opravljene na poskusnih živalih in zdravih prostovoljcih niso odkrile resnejših stranskih učinkov pri dajanju bakteriofagnih zdravil.	Številni antibiotiki imajo stranske učinke, npr. so alergogeni, ototoksični, nefrotoksični, izzovejo sekundarne okužbe ipd.	Litični bakteriofagi bi lahko izzvali septični šok zaradi obsežne lize bakterijskih celic, pri čemer se sprostijo endotoksini. Bakteriofagi sicer so imunogeni, vendar se praviloma še pred pojavom nevtralizacijskih protiteles odstranijo iz organizma. Ob ponovni okužbi je bakteriofagna terapija z isto vrsto bakteriofaga manj učinkovita.
Razvoj odpornosti patogene bakterije proti eni vrsti bakteriofaga ne predstavlja nevarnosti, saj ostane bakterija občutljiva na druge bakteriofage.	Razvoj odpornosti proti antibiotiku ni omejen na patogene bakterije in se lahko prenaša med različnimi bakterijskimi vrstami.	Antibiotiki vršijo selekcijski pritisk na širok spekter bakterijskih vrst, tako patogene kot tiste, ki so del normalne flore.
Odkrivanje oz. izolacija novih bakteriofagov je relativno hiter (nekaj tedenski) in cenovno ugoden proces.	Razvoj novega antibiotika je zamuden in predvsem finančno izjemno zahteven proces (10-12 let).	Bakteriofagi so se več kot tri in pol milijarde let razvijali skupaj z gostiteljskimi bakterijami, zato je zelo verjetno, da je mogoče odkriti oz. izolirati »nove« bakteriofage, ki napadajo bakterijske celice, odporne proti določenim vrstam bakteriofagov ali antibiotikov.
Pričakovane so težave pri poskusu registracije bakteriofagnih zdravil, posebej pri zmeseh več bakteriofagov z različno specifičnostjo, ki bi učinkovali proti širšemu spektru bakterij (bakteriofagni koktejli), in potrebnih zamenjavah aktivnih bakteriofagov pri nastopu bakterijske odpornosti.	Smernice/pogoji za registracijo novih antibiotičnih zdravil so dobro definirani.	Regulatorni organi (še) ne ponujajo smernic za registracijo bakteriofagnih zdravil.
Bakteriofagna zdravila so problematična z vidika intelektualne lastnine in patentne zaščite.	Zaščita intelektualne lastnine v primeru antibiotikov in antibiotičnih zdravil načeloma ni sporna.	V Vzhodni Evropi je bakteriofagna terapija neprekinjeno v uporabi več kot 80 let, kar onemogoča patentiranje zaradi pomanjkanja novosti (prior art). Patentna zaščita gensko spremenjenih bakteriofagov in terapevtskih pripravkov z bakteriofagi ni sporna.
Pripravki z bakteriofagi zahtevajo posebne pogoje shranjevanja za ohranitev infektivnosti bakteriofagov.	Antibiotiki so fizikalno-kemijsko stabilni, zdravila imajo zato relativno dolg rok uporabe.	Nekatere vrste bakteriofagov so občutljive na nizko, druge na visoko temperaturo. Nekatere vrste izkazujejo dobro stabilnost kot liofilizati (> 1 leto pri sobni temperaturi).

organov je uporaba variabilnih bakteriofagnih mešanic nesprejemljiva, saj za vsako kombinirano zdravilo zahtevajo ločeno izvedbo kliničnih študij za posamezne učinkovine (10). S tem povezani astronomski stroški razvoja bakteriofagnih zdravil in problematična zaščita intelektualne lastnine vsaj zaenkrat odvrata večja farmacevtska podjetja od vlaganj v razvoj te skupine zdravil.

### 3.2 Gensko spremenjeni bakteriofagi

Bakteriofagi imajo kot bakteriolitične učinkovine številne pomanjkljivosti. Razvoj onipotentnega oz. širokospektralnega bakteriofaga s tehnologijo rekombinantne DNA je le malo verjeten (3). Kljub temu ostaja nakaj upanja za razvoj bakteriofaga, ki bi uspešno prepoznal večino sevov nekega patogena. Določeni bakteriofagi namreč svoj genom v gostiteljsko bakterijo vnesejo tako, da s posebnimi encimi vanjo »zvrtajo« luknjo (6). Bakteriofag, ki bi v genomu vseboval zapise za več hidrolaz, ki bi bile sposobne razgraditi različne površinske strukture na bakteriji, bi tako izkazoval širši antibakterijski spekter delovanja.

Številni kritiki bakteriofagne terapije se bojijo septičnega šoka, ki bi utegnil nastopiti ob sprostitvi endotoksinov pri obsežni bakterijski lizi (pojav je dokumentiran tudi pri uporabi antibiotikov). Poleg tega bi visoka lokalna koncentracija novonastalih bakteriofagov sama lahko sprožila imunsko reakcijo (10). Matsuda in sod. (16) so zato razvili bakteriofag z okvarjenim litičnim sistemom. Bakteriofag je v mišjem modelu sepse okužil bakterije *E. coli*, se v njih pomnoževal in povzročil bakterijsko smrt, a ni izzval lize. Učinkovitost bakteriofagne terapije je bila celo višja kot pri uporabi betalaktamskega antibiotika. Hagens in Bläsi (17) sta pripravila dve različici gensko spremenjenega nitastega bakteriofaga M13 (vrste, ki sicer ni baktericidna). V genomu matičnega bakteriofaga sta vgradila gen za endonukleazo (encim, ki prepozna določena nukleotidna zaporedja in cepi dvovertično DNA) ali holin (protein, ki z umestitvijo v membrano bakterij v njej tvori pore). Ugotovila sta, da bakteriofaga *in vitro* delujeta baktericidno, a je sproščanje endotoksinov v gojišče v primerjavi s kulturami, okuženimi z litičnimi bakteriofagi, zanemarljivo majhno. Na podoben način so Westwater in sod. (18) kot *dostavni sistem* za vnos genov, kodirajočih specifične antibakterijske toksine, uporabili fagmidni sistem M13, a so uspeli učinkovitost protibakterijskega delovanja dokazati tudi *in vivo* v mišjem modelu bakteriemije.

Nenazadnje so gensko spremenjeni bakteriofagi zanimivi tudi z vidika patentne zaščite, kar bi k razvoju bakteriofagnih zdravil utegnulo privabiti podjetja, sposobna v raziskave vložiti več finančnih sredstev.

### 3.3 Encibiotiki

Z izrazom *encibiotik* (skovanka iz besed »encim« in »antibiotik«) označujemo rekombinantne proteinske produkte bakteriofagnih genov (t. i. *lizine*), ki sprožijo lizo bakterijske celice. Lizini so hidrolitični encimi (glikozidaze ali amidaze), ki po translokaciji v periplazemski prostor razgrajujejo peptidoglikansko celično steno. Ugotovili so, da encibiotiki delujejo baktericidno tudi z zunaje strani celice (vsaj pri po Gramu pozitivnih bakterijah). Žal je litični spekter lizinov ozek, saj je pogojen s prisotnostjo specifičnih ligandov (običajno ogljikovih hidratov; ki predstavljajo vezavne epitope), vezanih na peptidoglikansko mrežo. Lizini so dvodomenski proteini,

aktivnost obeh domen – encimske (hidrolitične) in vezavne – pa je neodvisna. Tako je mogoče s kombiniranjem različnih domen pripraviti encibiotike z novo specifičnostjo delovanja (19).

Encibiotiki so izjemno zanimivi kot protimikrobne učinkovine, saj (vsaj zaenkrat) v laboratorijskih poskusih zaporednih pasaj še niso zaznali razvoja bakterijske odpornosti, niti niso opazili, da bi se nanje imunski sistem poskusnih živali odzval s tvorbo nevtralizacijskih protiteles (19). Fischetti in sod. so dokazali visoko učinkovitost različnih encibiotikov proti različnim vrstam streptokokov in bakteriji *Bacillus anthracis* v pogojih *in vitro* in *in vivo* (20-23). Poseben izziv predstavljajo bakterijski biofilmi in metabolno manj aktivne bakterijske celice (24), ki pomembno prispevajo h kroničnemu poteku infekcij in so naravno odporni proti zdravljenju z antibiotiki in bakteriofagnimi terapevtiki.

### 3.4 Bakteriofagi kot orodje za identifikacijo novih protimikrobnih tarč

Bakteriofagi so obligativni znotrajcelični patogeni evbakterij in so kot taki razvili sposobnost izkoriščati gostiteljeve mehanizme za lastno pomnoževanje. To vključuje tudi oviranje številnih bakterijskih presnovnih poti, s čimer se večina energije usmeri v izražanje bakteriofagovih genov in replikacijo bakteriofagovega genoma. Bakteriofagne proteine, ki na različnih nivojih delujejo kot inhibitorji delitve bakterijske celice, je mogoče uporabiti pri identifikaciji in validaciji novih protimikrobnih tarč ali celo pri razvoju presejalnih testov za identifikacijo nizkomolekularnih protimikrobnih spojin s povsem novimi mehanizmi delovanja (25, 26).

### 3.5 Že uveljavljeni bakteriofagni profilaktiki

Redki izdelki, ki kot aktivno komponento vsebujejo bakteriofage, so se na nekaterih manj strogo nadzorovanih področjih uveljavili že tudi na Zahodu. V Združenih državah Amerike je od leta 2005 poljedelcem na voljo pesticid za preprečevanje in zatiranje bakterijskih boleznih paradiznika in paprike, povzročenih z bakterijama *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (27). Isti proizvajalec ponuja živinorejcem tudi pršilo, ki vsebuje bakteriofage, specifične za salmonelo (28). Namenjeno je omejevanju prisotnosti te bakterije na koži goveda, kar zniža verjetnost kontaminacije mesa pri klanju. FDA je v lanskem letu odobrila celo uporabo fagnega koktejlja v obliki pršila za zaščito pripravljenih mesnih jedi pred kontaminacijo z nevarno bakterijo *Listeria monocytogenes* (29). Edini avtorjema poznani primer uradno registriranega bakteriofagnega zdravila je obliž iz biorazgradljivih polimerov, impregniran z različnimi bakteriofagi, ki je bil nedavno v Gruziji odobren za zdravljenje trdovratnih kožnih okužb in okužb odprtih ran (2).

## 4 Zaključek

Napredki na področju biotehnologije, mikrobiologije in infektologije omogočajo ponovno znanstveno ovrednotenje sicer skoraj stoletje stare ideje o uporabi bakteriofagov za preprečevanje in zdravljenje bakterijskih okužb. Bakteriofagna terapija – četudi se nekoč uveljavi

kot del moderne medicine – ne bo nikoli zamenjala uporabe antibiotikov. Slednji ostajajo preveč pomembni, uspešni in potrebni, da bi popolnoma opustili njihovo uporabo. Bakteriofagi ponujajo kvečjemu potencialno dopolnitev antibiotičnega arzenala, namenjeno zlasti uničevanju multirezistentnih bakterijskih patogenov, ki predstavljajo naraščajočo grožnjo človekovemu zdravju (5, 19).

### 5 Literatura

1. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Moriss Jr. JG. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(3): 649-659.
2. Stone R. Stalin' forgotten cure. *Science* 2002; 298: 728-731.
3. Skurnik M, Pajunen M, Kiljunen S. Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett* 2007; 29: 995-1003.
4. Dabrowska K, Swita<sup>3</sup>a-Jelen K, Opolski A et al. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 7-13.
5. Pirisi A. Phage therapy – advantage over antibiotics? *Lancet* 2000; 356: 1418.
6. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Med Microbiol* 2006; 296: 5-14.
7. Summers WC. Bacteriophage therapy. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 437-451.
8. Häusler T. Viruses vs. superbugs. A solution to the antibiotic crisis? Macmillan, 2006.
9. Projan SJ. New (and not so new) antibacterial targets – from where and when will the novel drugs come? *Curr Opin Pharmacol* 2002; 2: 513-522.
10. Thiel K. Old dogma, new tricks – 21<sup>st</sup> Century phage therapy. *Nat Biotechnol* 2004; 22(1): 31-36.
11. Pajunen M, Kiljunen S, Skurnik M. Bacteriophage YeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, is related to coliphages T3 and T7. *J Bacteriol* 2000; 182: 5114-5120.
12. Pajunen M, Kiljunen SJ, Soderholm ME et al. Complete genomic sequence of the lytic bacteriophage YeO3-12 of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *J Bacteriol* 2001; 183: 1928-1937.
13. Biswas B, Adhya S, Washart P et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 2002; 70: 2004-210.
14. Matsuzaki S, Yasuda M, Nishikawa H et al. Experimental protection of mice against lethal *Staphylococcus aureus* infection by novel bacteriophage MR11. *J Infect Dis* 2003; 187: 613-624.
15. Merril Cr, Biswas B, Carlton R et al. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 3188-3192.
16. Matsuda T, Freeman TA, Hilbert DW et al. Lysis-deficient bacteriophage therapy decreases endotoxin and inflammatory mediator release and improves survival in a murine peritonitis model. *Surgery* 2005; 137(6): 639-646.
17. Hagens S, Blasi U. Genetically modified filamentous phage as bactericidal agents: a pilot study. *Lett Appl Microbiol* 2003; 37(4): 318-323.
18. Westwater C, Kasman LM, Schofield DA et al. Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(4): 1301-1307.
19. Fischetti VA, Nelson D, Schuch R. Reinventing phage therapy: are the parts greater than the sum? *Nat Biotechnol* 2006; 24(12): 1508-1511.
20. Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 2001; 294: 2170-2172.
21. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 4107-4112.
22. Schuch R, Nelson D, Fischetti VA. A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature* 2002; 418: 884-889.
23. Loeffler JM, Fischetti VA. Synergistic lethal effect of a combination of phage lytic enzymes with different activities on penicillin-sensitive and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(1): 375-377.
24. Lewis K. Persister cells, dormancy and infectious disease. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5(1): 48-56.
25. Liu J, Dehbi M, Moeck G et al. Antimicrobial drug discovery through bacteriophage genomics. *Nat Biotechnol* 2004; 22(2): 185-191.
26. Projan S. Phage-inspired antibiotics? *Nat Biotechnol* 2004; 22(2): 167-168.
27. OmniLytics obtains landmark EPA registration for bacteriophage usage; revolutionary AgriPhage products approved for use on tomato and pepper crops. *Business Wire*, February 15, 2006.
28. OmniLytics announces USDA/FSIS allowance of bacteriophage treatment of salmonella on livestock. *Business Wire*, March 29, 2007.
29. Bren L. Bacteria-eating virus approved as food additive. *FDA Consumer* 2007; January-February Issue.