

VAŽNOST RAZVOJA TERAPIJE FAGIMA U ERI ANTIBIOTSKE REZISTENCIJE

Jendriš, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:181976>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marija Jendriš

**VAŽNOST RAZVOJA TERAPIJE
FAGIMA U ERI ANTIBIOTSKE
REZISTENCIJE**

Završni rad

Zagreb, 2023.

BIOLOŠKI ODSJEK

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Marija Jendriš

**IMPORTANCE OF PHAGE THERAPY IN
ANTIBIOTIC RESISTANCE ERA**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

DEPARTMENT OF BIOLOGY

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Preddiplomski sveučilišni studij biologija na Zavodu za mikrobiologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dijana Škorić.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Važnost razvoja terapije fagima u eri antibiotske rezistencije

Marija Jendriš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Bakteriofagi su virusi koji inficiraju bakterije i moguće ih je koristiti u borbi protiv bakterija rezistentnih na antibiotike. Terapija fagima ne treba nužno zamijeniti antibiotike u liječenju već se može koristiti zajedno s njima čime se postiže sinergistički efekt. Kako bi fage dostavili sigurno na mjesto infekcije koriste se različiti tipovi pripravaka – tekući, suhi (u obliku praška) i pripravci s inkapsuliranim fagima. Svi oblici pripravaka imaju svoje prednosti i nedostatke te se daljnja istraživanja trebaju usredotočiti na poboljšanje stabilnosti, učinkovitosti i sigurnosti isporuke. Zasada, inkapsulacija faga u liposome, hidrogel ili na površinu vlakana pokazuje obećavajuće rezultate. Omogućava fagima dolazak na mjesto infekcije, lakšu penetraciju u tkiva i štiti ih od razgradnje. Trebalo bi dodatno istražiti i razmotriti mogućnost razvoja sintetskih faga koji bi imali promjenjivu domenu za vezanje na receptore. Takve fage bi mogli koristiti u terapiji protiv širokog spektra bakterijskih infekcija.

Ključne riječi: problemi terapije, transport, sociobiologija faga, sinergistički efekt, inkapsulacija

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Dijana Škorić

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

Importance of phage therapy in antibiotic resistance era

Marija Jendriš

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Bacteriophages are viruses that infect bacteria. Bacteriophages can be used to treat diseases caused by antibiotic-resistant bacteria. That does not mean that phage therapy should replace antibiotics instead, it can be used with them which results in a synergetic effect. To ensure phages are safely delivered to the site of infection, various types of preparations are used – liquid, solid (in powder form) and preparations with encapsulated phages. Each form of preparation has its advantages and disadvantages and further research should focus on improving stability, effectiveness and delivery safety. Currently, the encapsulation of phages in liposomes, hydrogels and on the fiber surface shows the most promising results. These types of preparations allow phages to reach the site of infection, protects them from degradation and facilitates tissue penetration. Additional research and consideration should be given to the development of synthetic phages with variable receptor-binding domains. Such phages could be used in therapy against a broad spectrum of bacterial infections.

Keywords: therapy problems, transport, phage sociobiology, synergetic effect, encapsulation

Thesis is deposited in the Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Dijana Škorić

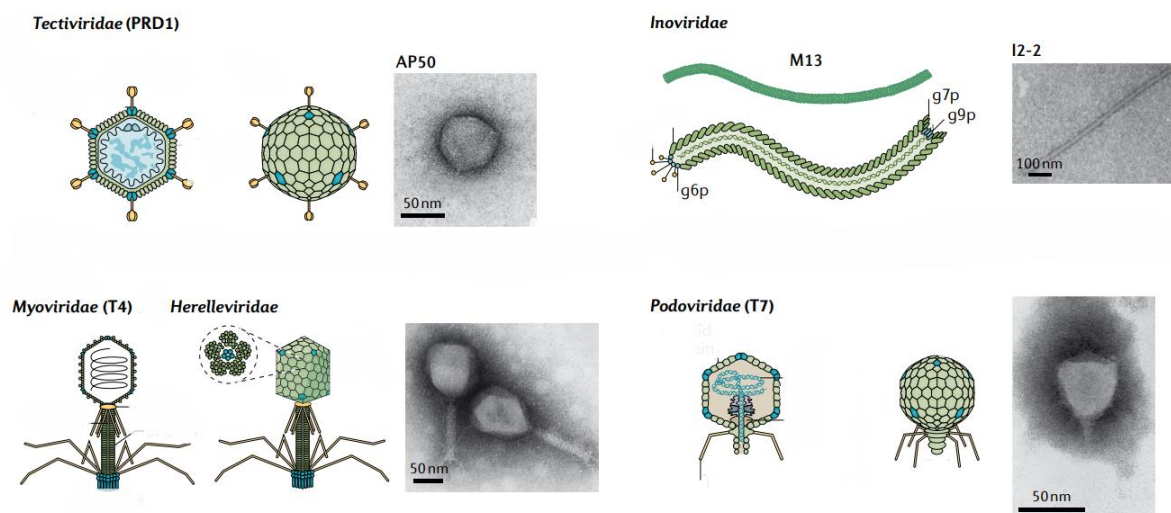
Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. RASPRAVA.....	6
2.1 Priprema terapije bakteriofagima i mogući problem.....	6
2.2. Isporuka faga na mjesto liječenja	6
2.2.1 Tekući pripravak.....	6
2.2.2. Suhi pripravak	7
2.2.3 Inkapsulacija.....	7
2.3 Sociobiologija faga	11
2.4. Rezistencija na bakteriofage	12
2.5. Specifičnost bakteriofaga.....	13
3. ZAKLJUČAK	14
4. LITERATURA.....	15
5. ŽIVOTOPIS	19

1.UVOD

Britanski znanstvenik Frederick William Twort je 1915. g. objavio rad u časopisu Lancet u kojem prvi opisuje virusnu infekciju kod bakterija i izvještava o otkriću filtrabilnog bakterijskog virusa. Taj virus je kasnije Felix d'Herelle, francusko-kanadski mikrobiolog, nazvao bakteriofagom.

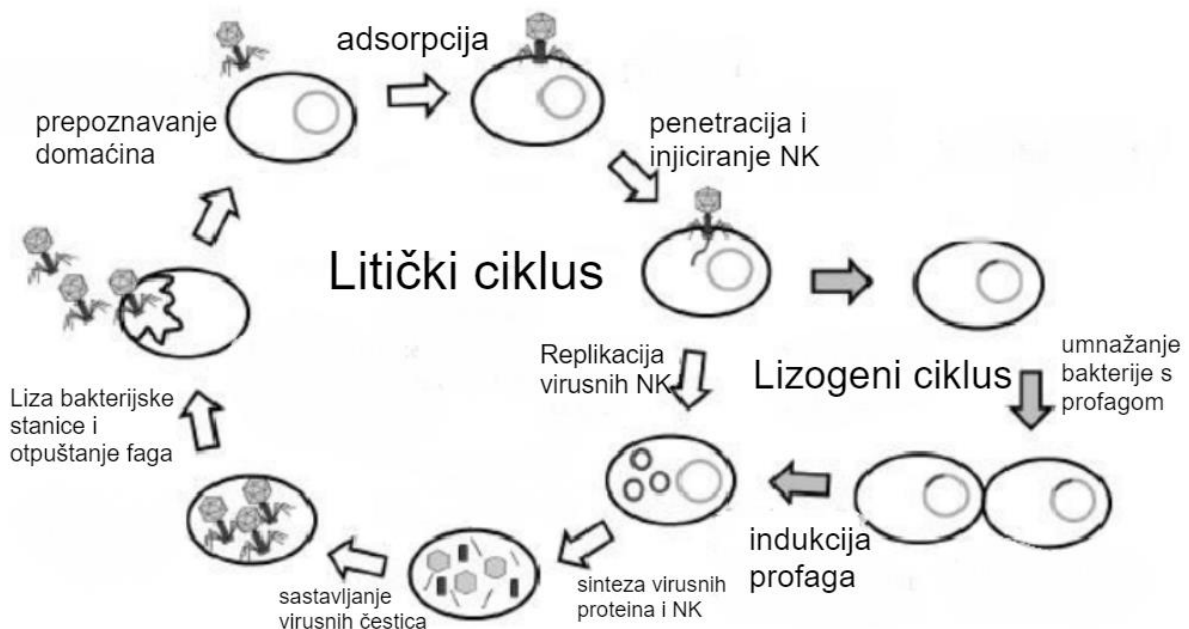
Bakteriofag, fag ili bakterijski virus, spada u grupu virusa koji inficiraju bakterije. Genom bakteriofaga se sastoji od RNA ili DNA, koje mogu biti dvolančane ili jednolančane. Sama veličina genoma može varirati od nekoliko tisuća baza, gdje je najmanji bakteriofag *Leuconostoc fag L5* veličine 2 435 baznih parova (bp), do nekoliko stotina tisuća bp poput „jumbo“ bakteriofaga koji imaju više od 200 000 bp. Genom je okružen proteinskom kapsidom. Sama kapsida može biti poliedarska tj. imati ikozaedarsku simetriju, ili složenija, u kojoj je poliedarska glava povezana s repom koji ima helikalnu simetriju. Postoje i fagi s kapsidama helikalne simetrije s česticama koje su zbog toga nitaste, odnosno imaju oblik tanke savitljive niti (Slika 1.). Najčešći oblik bakteriofaga (s „glavom i repom“) ima kao genomski materijal dvolančanu DNA (engl. *double stranded DNA*, dsDNA). Od faga s glavom i repom 75% ima pravilnu ikozaedarsku kapsidu, a 15% izduženu kapsidu poravnatu s duljom osi repa (Dion, i sur., 2020).



Slika 1. Shematski prikaz različitih morfologija faga uz slike dobivene transmisivskim elektronskim mikroskopom (TEM). Gore lijevo poliedarska kapsida s ikozaedarskom simetrijom (porodica *Tectiviridae*), dolje lijevo i desno poliedarska glava povezana s helikalnim repom (porodice *Myoviridae*, *Herelleviridae* i *Podoviridae*) i gore desno čestice oblika tanke savitljive niti (porodica *Inoviridae*) (Prerađeno iz Dion i sur., 2020)

Razlikujemo dva ciklusa kod bakteriofaga: **litički** i **lizogeni** (Slika 2.).

Litički ciklus možemo podijeliti na 4 faze. U prvoj fazi virus se veže za specifična vezna mjesta na bakterijskoj površini (receptore) i pritom ubaci svoj genomski materijal u stanicu. Nakon adsorpcije i prodiranja, virus „prisiljava“ bakteriju da sintetizira virusne nukleinske kiseline (mRNA i nove genome) i proteine. Nakon sinteze virusnih komponenata, nove čestice faga se sastavljaju te ulaze u zadnji korak ciklusa - izlazak iz stanice. U tom koraku kod litičkog ciklusa fagi liziraju stanicu i oslobađaju se. **Lizogeni ciklus** započinje kao i litički, no u lizogenom ciklusu fag ne preuzima na prikazani način replikacijski mehanizam stanice već se dsDNA ugradi u bakterijski kromosom te replicira zajedno s njim. Takav oblik dormantnog genoma faga naziva se profag. Bakterija s profagom nastavlja se normalno dijeliti i funkcionirati, no u slučaju nepovoljnih uvjeta, poput UV zračenja, genomski materijal faga se aktivira i eksprimira (inicijacija faga) te fag ulazi u litički ciklus (Prescott, i sur., str. 301). Upravo zbog velike raznolikosti faga i postojanja litičkog ciklusa, možemo ih koristiti u terapiji protiv bakterijskih bolesti. Terapija bakteriofagima se temelji na njihovoj sposobnosti da „napadnu“ specifičnu bakteriju i liziraju ju. Različiti bakteriofagi inficiraju različite bakterije, pa čak i bakterijske sojeve, pa je za uspješnu terapiju potrebno izolirati odgovarajuću vrstu i soj bakteriofaga za određenu bakteriju.



Slika 2. Litički i lizogeni ciklus bakteriofaga, NK- nukleinska kiselina (Prerađeno iz Doss i sur., 2017)

Prvi zabilježen slučaj terapije bakteriofagima proveo je Felix d'Herelle 1919. godine kako bi izliječio „kokošju koleru“ uzrokovanu bakterijom *Salmonella gallinarum*. Nakon uspješnog liječenja „kokošje kolere“, d'Herelle je zajedno s profesorom Victorom Hutinelom, direktorom dječje bolnice Hospital des Enfant-Malades u Parizu, u kolovozu 1919. proveo još jedno uspješno kliničko istraživanje, no ovaj put na djeci koja su bolovala od dizenterije (Letarov i sur., 2020). Pravi zamah terapija bakteriofagima doživljava 1921. nakon objavljivanja d'Herellove knjige „Bakteriofag i njegova uloga u imunitetu“ (franc. Bactériophage et son rôle dans l'immunité). Knjiga se prevodi na engleski i kasnije na ruski; terapija se počinje koristiti diljem svijeta te se otvaraju laboratoriji za komercijalnu proizvodnju terapijskih faga.

Prvi takav laboratorij je otvorio D'Herelle u Parizu i bilo je moguće kupiti komercijalne fagne koktele tj. otopine s tri ili više bakteriofaga kao što su- Bacté-Coli-Phage, Bacté-Intesti-Phage, Bacté-Dysentérie-Phage, Bacté-Pyo-Phage i Bacté-Rhino-Phage sve do 1978 godine. Komercijalni laboratoriji u SAD-u (Eli Lilly Company, E.R. Squibb & Sons i Swan-Myers) prestali su s komercijalnom proizvodnjom ranije, već 1940-ih, nakon otkrića i s početkom industrijske proizvodnje **antibiotika**. Otkrićem antibiotika penicilina, gubi se interes za terapiju bakteriofagima te se ona postupno prestaje koristiti u Europi i SAD-u, osim za liječenje tifusne groznice koja je bila otporna na antibiotike poznate u to doba. Otkrićem kloramfenikola (1948./49. g.), kojim se uspješno liječi tifusna groznica, terapija bakteriofagima nastavlja se koristiti samo u Poljskoj i Sovjetskom Savezu te se više ne koristi u SAD-u (Abedon i sur., 2011).

Terapija s bakteriofagima bio je skup i kompliciran proces pošto je najuspješnija terapija bila da se za svakog pacijenta izolira specifični soj bakteriofaga za specifičan soj bakterije koja predstavlja problem, te tada komercijalno proizvedeni kokteli nisu bili toliko djelotvorni. Nasuprot tome, antibiotici su bili jeftiniji za proizvodnju, jedan antibiotik je djelovao na više različitih sojeva bakterija i tada nisu bile problem bakterije rezistentne na antibiotike.

Općenito, **antibiotici** su mikrobnih proizvoda ili njihovi derivati koji mogu ubiti druge mikroorganizme osjetljive na njih ili inhibirati njihov rast. Neki lijekovi poput sulfonamida i kloramfenikola se znaju nazivati antibioticima iako su zapravo sintetski kemoterapijski agensi. Antibiotici mogu djelovati različitim mehanizmima, no najbolji antibiotici su oni koji utječu na mehanizam koji bakterija ima, a eukariotske stanice nemaju. Tako penicilin inhibira sintezu peptidoglikana bakterijske stanične stijenke dok nema učinka na stanice domaćina jer nemaju staničnu stijenku i time omogućava lizu bakterijskih stanica. Još neki mehanizmi djelovanja antibiotika, osim inhibicije sinteze stanične stijenke, su: promjena strukture i permeabilnosti

stanične membrane bakterija vezanjem na njih, djelovanjem kao metabolički antagonisti tj. sprječavanjem sinteze određenog metabolita bakterije, inhibicijom sinteze bakterijskih proteina i inhibicijom sinteze nukleinskih kiselina.

Unatoč velikoj efikasnosti antibiotika, bakterije imaju razne načine **obrane protiv antibiotika**. Vrlo čest način obrane je promjena transporta antibiotika u stanicu. Tako se fosforilacijom streptomocina sprječava njegov unos u stanicu ili mutacijom u genu za TetA i TetG proteine bakterija mijenja se struktura stanične membrane i tetraciklin „curi“ iz stanice te ne dolazi do svoje mete – ribosoma. Također, mnoge bakterije mogu pumpati antibiotik van stanice pomoću antibiotik/proton antiporterske pumpe (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis* i *Staphylococcus aureus*). Neke inaktiviraju antibiotik njegovom kemijskom modifikacijom npr. sintezom enzima betalaktamaze koja razgrađuje betalaktamski prsten penicilina. Također, mogu promijeniti metu antibiotika ili mogu zaobići metabolički blok sintezom izoenzima. Svi ovi mehanizmi mogu biti determinirani genima na plazmidu bakterija koje onda nazivamo **R plazmidi** pošto nose gene za rezistenciju na antibiotike. Geni za rezistenciju se mogu prenositi između bakterija horizontalnim prijenosom gena (eng. *horizontal gene transfer*, HGT) tj. konjugacijom, transdukcijom i transformacijom. Tijekom konjugacije cijeli R plazmid se prenosi, a tijekom transdukcije i transformacije samo dio gena. Zbog česte upotrebe antibiotika, sve više bakterija je rezistentno na više od jednog antibiotika (eng. *multidrug resistance*, MDR) te se traže alternative u liječenju bolesti uzrokovanih antibiotik rezistentnim bakterijama pogotovo onih uzrokovanih bakterijama iz grupe **ESKAPE** (akronim od bakterija *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter spp.*).

Jedna od alternativa koja se trenutačno istražuje te pokušava poboljšati je terapija s bakteriofagima, no i kod terapije s fagima može doći do bakterijske rezistencije. **Bakterija** može razviti rezistenciju tj. boriti se **protiv virusne infekcije** na više načina. Prvi način uključuje blokiranje adsorpcije faga na bakteriju bilo blokiranjem receptora, proizvodnjom kompetitivnog inhibitora ili proizvodnjom izvanstaničnog matriksa. Drugi način uključuje sistem superinfekcijske ekskluzije (eng. *superinfection exclusion*, Sie) u kojem već postojeća virusna infekcija preventira sekundarnu infekciju s istim ili blisko srodnim virusom. Treći način je putem restriksijsko-modifikacijskog sustava koji štiti i prepoznaje metiliranu DNA bakterije, no stranu nemetiliranu DNA razgrađuje restriksijskim enzimima. Zadnji način je putem CRISPR-Cas sustava koji prepoznaje i razgrađuje stranu DNA s kojom je stanica prethodno došla u kontakt (Labrie i sur., 2010). Rezistentnost bakterija na fage nije jedini problem koji je potreban riješiti za uspješnu terapiju s bakteriofagima. U nastavku teksta naslovljenom

Rasprava ću opisati probleme koji se javljaju te kako se mogu riješiti i terapija poboljšati za buduće primjene.

2. RASPRAVA

2.1 Priprema terapije bakteriofagima i mogući problem

Kako bi osmislili što uspješniju terapiju bakteriofagima moramo ju prilagoditi pojedincu odnosno tipu i mjestu infekcije. Moramo razmotriti probleme koji mogu nastati tijekom terapije i riješiti ih. Najvažniji problemi koje susrećemo su: **način prijenosa bakteriofaga na mjesto infekcije, sociobiologija bakteriofaga, javljanje rezistencije na bakteriofage i njihova specifičnost** da djeluju na samo određene vrste bakterija ili sojeve tih vrsta. Također kako bi se osiguralo da je terapija sigurna moraju određeni uvjeti biti zadovoljeni: koriste se isključivo litički fagi koji nemaju faktore virulencije, potvrđuje se njihova antimikrobna aktivnost protiv ciljanog patogena i određuje se točan identitet patogena, te se pročišćavaju od endotoksina i bakterijskih ostataka.

2. 2. Isporuka faga na mjesto liječenja

Isporuka faga na mjesto infekcije predstavlja veliki problem jer fagi ne mogu penetrirati u tkiva, imunosni sustav ih može „napasti“ i odstraniti, proteine faga brzo razgrađuju enzimi, dodatno fagi se mogu inaktivirati niskim pH-om želudca.

Kako bi se fagi sigurno i uspješno dostavili na mjesto infekcije bez da se inaktiviraju ili razgrade pripremaju se različiti tipovi pripravaka koji se mogu dostaviti na više načina. Pripravci tj. suspenzije faga mogu se dostavljati u tri oblika: tekućem, suhom (u prahu) ili inkapsulirani.

2.2.1 Tekući pripravak

Standardni pripravci faga su **tekući**, filtracijom i centrifugom očišćeni od liziranih bakterijskih stanica te na različite načine prerađeni kako bi se odstranili bakterijski produkti i endotoksini poput lipopolisaharida (LPS). Endotoksini se mogu odstraniti: korištenjem blagog deterdženta deoksiholata popraćeno ultrafiltracijom (Hashemi i sur., 2013), pomoću organskih

otapala 1-oktanol ili 1-butanol (Szermer-Olearnik i sur., 2015) i sličnim pripravcima. Moguće je odstraniti endotoksine i bez korištenja organskih otapala već radeći višestruka centrifugiranja pri malim brzinama, mikrofiltracijom i ultrafiltracijom s križnim protokom (Luong i sur., 2020).

Takvi tekući pripravci mogu se lako proizvoditi i skladištiti na niskim temperaturama nekoliko godina bez drastične redukcije u njihovoj učinkovitosti, ovisno o stabilnosti pojedinog faga iako Luong i suradnici (2020) preporučuju skladištenje pripravka na 4° C do 6 mjeseci. Tekući pripravci mogu se koristiti na različite načine: stavljanjem direktno na ranu u obliku vlažnih obloga, u obliku kapi za oči, nos i uho te oralno. Za oralnu upotrebu potrebno je prvo neutralizirati želučanu kiselinu, nekoliko minuta prije primjene faga, sodom bikarbonom ili mineralnom vodom s bikarbonatima (Sulakvelidze i sur., 2001).

2.2.2. Suhi pripravak

Osim tekućih pripravka moguće je pripremiti **fage u obliku praha**. Pripravak u obliku stabilnog praška može se dobiti **liofilizacijom** ili **sušenjem raspršivanjem** (eng. *spray drying*, SD). Kada se priprema **liofilizacijom**, smrznuti koktel faga se dehidrira uz aditive kako bi se spriječila agregacija faga, njihova inaktivacija tijekom rehidratacije ili inaktivacija usred oštećenja uzrokovanih osmotskim promjenama. Aditivi mogu biti razni šećeri (npr. glukoza, sukroza, želatin itd.), aminokiseline (npr. glutamat), proteini (npr. laktoferin) i kompleksije molekule poput kaseina ili peptona. Ovakvi uzorci pripremljeni liofilizacijom čija veličina može varirati od nekoliko nanometara do nekoliko mikrometara mogu zadržati svoju aktivnost do 20 mjeseci skladištenjem na 4 ° C (Manohar i sur., 2019).

Pripremom praška metodom **SD**, protein se izlaže visokim temperaturama, jakim silama smicanja i dehidracijskom stresu. Kako ne bi došlo do denaturacije proteina faga, temperatura toplog zraka treba se držati ispod 40° C. Ovakvom pripremom dobiva se prah s česticama veličine 1-5 µm s neznatno smanjenom učinkovitošću (Leung i sur., 2016).

Ovakvi pripravci u obliku praška se mogu koristiti za liječenje respiracijskih bolesti uzrokovanih bakterijama nebulizacijom s inhalatorom.

2.2.3 Inkapsulacija

Posljednji oblik pomoću kojih se suspenzija faga može dostaviti na mjesto infekcije je inkapsulacija. Cilj inkapsulacije je napraviti čestice koje su slične po veličini i fizikalno-

kemijskim svojstvima, ne agregiraju tijekom produkcije ili aplikacije i imaju približno jednak broj faga po inkapsuliranoj čestici. Inkapsulacija dodatno osigurava dolazak faga na mjesto infekcije i štiti ih od razgradnje enzimima, kiselinama ili od strane imunološkog sustava. Fagi mogu biti **inkapsulirani** na različite načine: u obliku liposoma, transferosoma, hidrogela, filma, vlakna, niosoma, nanoemulzija i nanočestica (Slika 3.).

Transferosomi su liposomi koji sadrže deterdžent te za razliku od slobodnih faga mogu bolje prodrijeti u kožu i pružaju viši stupanj zaštite mekih tkiva (Chhibber i sur., 2017).

Liposomi su sferične nanočestice okružene lipidnim dvoslojem unutar kojeg se nalaze fagi u vodenoj otopini. Liposomi mogu penetrirati kroz bakterijski biofilm, spriječiti denaturaciju proteina faga želučanom kiselinom i enzimima, ući u stanicu endocitozom ili fuzijom sa staničnom membranom i inaktivirati enteroinvazivne patogene (*E.coli*, *Listeria* i *Mycobacteria*). Mogu se proizvesti metodom filma, metodom dehidratacije-rehidratacije, uparavanjem V/U emulzija (eng. *reverse phase evaporation*, REV ili mikrofluidima (visokotlačnom homogenizacijom) (Vanić, 2012). Mikrofluidima, soniranjem i ekstruzijom kroz membranu mogu se proizvesti liposomi određenih veličina, no takvi liposomi mogu i dalje promijeniti svoju veličinu fuzijom ili agregacijom što predstavlja problem kod npr. intravenske administracije. U liposome se mogu integrirati pasivizirajuće molekule koje imunski sustav ne prepoznaje, poput polietilen glikola (PEG), kako bi se spriječila interakcija između biomolekula i povećalo vrijeme zadržavanja faga na mjestu infekcije. Vrijeme zadržavanja ovisi i o veličini liposoma te se povećava obrnuto proporcionalno s njegovom veličinom. Izgradnjom liposoma kationskim lipidima može se dodatno povećati vrijeme zadržavanja, prilikom sinteze kationskih liposoma povećati inkapsulacija za 50% i omogućiti bolja disperzija čestica u otopini (Loh i sur., 2021). U istraživanju Colom i suradnici (2015) koristili su koktel faga inkapsuliranih u pozitivno nabijene liposome te proučavali njihovu efikasnost u liječenju bakterija roda *Salmonella* kod peradi. Pratili su postotak slobodnih i inkapsuliranih faga prisutnih u cekumu peradi te nakon 72h detektirali inkapsulirane fage u 38.1% životinja, a slobodne u samo 9.5%. Dodatno, pratili su vrijeme zadržavanja faga nakon prestanka terapije. Odmah nakon prestanka terapije slobodni fagi nisu detektirani u uzorcima cekuma dok su inkapsulirani fagi detektirani i nakon tjedan dana. Liposom kao sredstvo za prijenos faga ima mnoge prednosti, no potrebna su dodatna istraživanja kako bi riješili problem agregacije liposoma, gubitka faga tijekom pripreme za inkapsulaciju i niske učinkovitosti inkapsulacije. Trebali bi istražiti nove metode inkapsulacije i proučiti koji su lipidi idealni za korištenje te mogu li se neke dodatne molekule inkorporirati kako bi se spriječila agregacija.

Hidrogel je integrirana polimerna mreža, proizvedena jednostavnom reakcijom jednog ili više monomera, koja nabubri u vodi. Terapija fagima može se dostaviti u obliku hidrogela inkapsuliranjem faga unutar polimera ili njihovom imobilizacijom na čvrstim nosačima. Imobilizirani fagi ne aktiviraju proupalne citokine ni stimuliraju stvaranje protutijela, iz sistemske cirkulacije prelaze u jetru i slezenu gdje ostaju aktivni i s produljenom efikasnošću odstranjuju bakterije koje se prenose krvlju. Uloga hidrogela je zaštita fage od želučanih kiselina i povećanje efikasnosti njihovog djelovanja. Inkapsulirani fagi unutar hidrogela imaju veću antibakterijsku aktivnost od slobodnih faga i mogu spriječiti stvaranje biofilмова bakterija *E. coli*, *P. aeruginos*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae* i *Staphylococcus epidermis* (Loh i sur., 2021).

Hidrogel može biti u obliku tankog filma proizvedenog iz jestivih materijala poput izolata proteina sirutke (eng. *whey protein isolate*, WPI) unutar kojeg su inkapsulirani fagi. WPI – filmovi su jako krhki u usporedbi s vlaknima što se može popraviti dodatkom plastifikatora npr. glicerola. Ovakvi hidrogelovi se mogu koristiti kao jestivi premazi i omogućuju produljeno skladištenje faga na sobnoj temperaturi bez značajnog gubitka aktivnosti. Kada WPI- film dođe u kontakt s vodom, velike koncentracije faga se otpuštaju iz filma unutar 3h inkubacije i inaktiviraju ciljane bakterije. Ovakvi jestivi biofilmovi mogu se koristiti kao antimikrobni materijali za pakiranje hrane (Vonasek i sur., 2013).

Hidrogel napravljen od polivinilnog alkohola (PVA), natrijevog alginata (SA) i faga čini hibridnu membranu koja ima dvostruku funkciju – stvara idealan okoliš za zacjeljivanje rana i dostavlja fage na mjesto infekcije. Ovakva hibridna membrana može dodatno sadržavati i antibiotik te se koristiti za liječenje infekcija opekline (Kaur i sur., 2019).

Za prevenciju infekcija može se napraviti „pametni“ sustav ili ti sustavi koji reagiraju na određeni podražaj (promjena pH, temperature itd.) i oslobađaju ugrađene/imobilizirane bakteriofage. Takav „pametni“ sustav je razvijen za dugotrajne urinarne katetre. Katetri su premazani s gel/fag solucijom tj. dvoslojnim hidrogelom čiji je gornji sloj građen od polimera poli(meti metakrilat-ko-metakrilne kiseline) i reagira na povišenje pH. Povišenjem pH iz donjeg sloja se oslobađaju bakteriofagi koji razgrađuju biofilm i odgađaju začepljenje katetra (Milo i sur., 2017). Mogu se napraviti i zavoji za sprječavanje infekcija kojima je okidač povišena temperatura prilikom čega se oslobađaju bakteriofagi i inhibira se rast bakterija. (Loh i sur., 2021).

Fagi mogu biti inkapsulirani unutar ili imobilizirani na površinama vlakna. Takva **imobilizacija faga pomoću vlakna** može se koristiti: u obliku obloga/zavoja za rane, kao antimikrobni materijal za pakiranje hrane, te za detekciju, identifikaciju i imobilizaciju mikroba

pomoću faga. Vlakna u koje će se fagi inkapsulirati proizvode se elektropredenjem tj. pravljenjem nanovlakana iz polimerne otopine pod utjecajem elektrostaticke sile. Moguća je simultana inkapsulacija faga u vlakna uz uvjet da fag može izdržati električno polje do 40 kV/cm na pet minuta. Vlakna napravljena elektropredenjem su mekana, fleksibilna i porozna. Neki od materijala koji se koriste za proizvodnju vlakna su: celuloza diacetat, polietilen oksid i polivinilpirolidon. Ovisno o izboru materijala može se kontrolirati otpuštanje faga. Otpuštanje faga je posredovano bubrenjem vlakana, njihovom razgradnjom (biološkim, kemijskim ili fizičkim sredstvima) i jednostavnim otapanjem polimera, ako su topivi u vodi. Negativno nabijeni fagi mogu se elektrostatskim vezanjem imobilizirati na površini pozitivno nabijenih materijala poput: nanovlakna aluminijevog oksida, kemijski modificiranog silicija i polivinilamin celuloze. Fagi kovalentno vezani za biorazgradive polimere mogu se koristiti kao zavoji za rane u koje dodatno mogu ugraditi i druge supstance poput antibiotika ili lijekova protiv boli. Nogueira i suradnici (2017) su razvili zavoj za rane građen od polikaprolaktonskih nanovlakana za koja su kovalentno vezane kapside bakteriofaga, ostavljajući repove slobodne za interakciju s bakterijama. Zavoj je i nakon 25 pranja mogao reducirati broj bakterija.

Lokalna dostava bakteriofaga

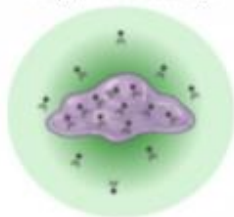
Štiti od:

Temperature Kiselina i enzima Imunosnog sustava

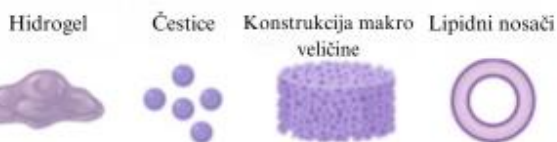


Omogućava:

Produljeno oslobađanje



Načini inkapsulacije:



Mogući biomaterijali:

Biopolimeri

Sintetički polimeri

Alginat
Fibrin
Kitozan

PLGA
HMPC
PEG

Inkorporacija bakteriofaga:

Ugradnjom

Inkapsulacijom

Adhezijom na površinu



Slika 3. Mogući načini i materijali koji se koriste za prijenos faga inkapsulacijom, mogući načini inkorporacije faga u materijale te pozitivne strane prijenosa inkapsulacijom. (Prerađeno iz Rotman i sur., 2020)

2.3 Sociobiologija faga

Terapija bakteriofagima iskorištava interakcije bakteriofaga i bakterija tj. „napad“ bakterija bakteriofagima kako bi se organizam izliječio od bakterijske bolesti, no ove interakcije mogu biti i negativne. Lizogenskom konverzijom, bakterija može steći nova genetska svojstva koja mogu rezultirati patogenošću npr. dobije toksine kodirane fagom koji povećavaju bakterijsku virulentnost ili gene za otpornost na antibiotike. Haaber i suradnici (2016) su demonstrirali kako otpuštanje faga iz subpopulacije bakterijskih stanica *S. aureus* omogućuje populaciji koja sadrži profage da stekne korisne gene od konkurentskih sojeva koji su osjetljivi na fage prisutne u istom okruženju. Naime, fagi inficiraju konkurentske bakterije i liziraju ih te prilikom pakiranja DNA u svoje kapside spakiraju i dijelove bakterijske DNA. Vraćanjem takvih transducirajućih čestica u populaciju bakterija koje sadrže profag potiče se transfer gena i omogućuje bakterijskim stanicama da steknu otpornost na antibiotike. Zato je, potrebno koristiti litičke fage, uz neke iznimke. U slučaju da je osoba u životnoj opasnosti i za tu određenu bakteriju nema striktno litičkih faga ili se ne stignu pronaći i izolirati litički fagi može se odobriti korištenje lizogenih faga. Osim kod lizogenih faga problem interakcije bakterija i faga te moguća izmjena gena javlja se i kod litičkih faga. Genetika i ponašanja litičkih faga nisu dovoljno istraženi. Zasada znamo da genomi litičkih faga mogu kodirati pomoćne proteine koji mijenjaju fiziologiju bakterije, no ne razumijemo u potpunosti na koje načine djeluju. Nadalje, ne razumijemo ni što se točno zbiva tijekom abortivne infekcije gdje se DNA faga izbaci u stanicu i dođe do ekspimiranja dijela gena, no ne dođe do sinteze novih virusa. Tada bakterijski domaćin može potencijalno služiti i kao rezervoar strane, u ovom slučaju fagne DNA (Gordillo Altamirano i Barr, 2019). Kako bi izbjegli potencijalnu gensku transdukciju Peng i suradnici (2019) razvili su kontroliranu terapiju fagima fototermalnom ablacijom specifičnih bakterijskih vrsta koristeći zlatne nanoštapiće putem kimernih faga. Dizajnirali su kimerne fage koji se specifično vežu na gram-negativne organizme poput *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Vibrio cholerae* i *Xanthomonas campestris*. Biokonjugirani fagi s nanoštapićima (eng. *phanorods*) mogu na taj način selektivno ciljati i uništavati specifične bakterijske stanice korištenjem fototermalne ablacije. Zračenjem biokonjugiranih faga X-zrakama uništavaju se fagi, sprječava njihova replikacija i izmjena gena te se omogućava kontrola nad doziranjem. U svakom slučaju, potrebna su dodatna istraživanja kako bi bolje razumjeli interakcije litičkih faga i bakterija te razvili nove kontrolirane terapije.

2.4. Rezistencija na bakteriofage

Bakterije mogu na razne načine postati rezistentne na bakteriofage. Tijekom terapije konstantno se prati osjetljivost bakterija na bakteriofage te u slučaju da se razvije otpornost, izolira se novi bakteriofag na koji su osjetljive (Sulakvelidze i sur., 2001). Dodatno, kako bi smanjili mogućnost pojave rezistencije tijekom terapije koristimo koktel bakteriofaga što osigurava da čak i ako bakterija postane tolerantna na jedan od faga, bude osjetljiva na ostale iz koktela. Također, kombiniranom terapijom s antibioticima i fagima postiže se sinergistički efekt i učinkovitije liječenje. Sinergistički efekt se pokazao snažnijim kada su se antibiotici dodavali nakon tretmana s fagima (Gordillo Altamirano i Barr, 2019). Primjer sinergističkog djelovanja antibiotika i faga možemo vidjeti u istraživanju koje su proveli Kaur i suradnici (2012). Oni su modificirali metodu dvoslojnog agara (eng. *double layer agar*, DLA) dodatkom subletalnih doza tri različite klase antibiotika. Koristili su fag MR-5 i meticilin-rezistentne bakterije *S. aureus* te pratili veličinu plakova koje fagi tvore na bakterijskoj kulturi kao mjeru sinergije - što su veći plakovi, veći je sinergistički efekt. Kod linezolida, tetraciklina i ketolidnih antibiotika veličina plakova se povećala za tri puta te je od njih linezolid imao najjače sinergističko djelovanje.

Iako je rezistencija na bakteriofage predstavljena u ovom radu kao problem, ona ne mora nužno biti negativna. Više istraživanja je pokazalo da razvijanjem rezistencije na bakteriofag MDR bakterije mogu ponovno postati osjetljive na antibiotike. Chan i suradnici (2016) su izolirali litički fag OMKO1 koji se unosi u bakteriju *Pseudomonas aeruginosa* vezanjem za porin M (OprM) te testirali što se događa kad se pojavi rezistencija na ovaj fag. Porin M je dio sustava MexAB i MexXY pomoću kojih se antibiotici antiporterom izbacuju izvan stanice. Kako bi bakterije postale rezistentne na bakteriofag mutiraju receptor OprM pomoću kojeg fag ulazi u stanicu i time gube mogućnost izbacivanja antibiotika izvan stanice tj. bakterije se resenzibiliraju na njih.

2.5. Specifičnost bakteriofaga

Specifičnost bakteriofaga predstavlja problem i prednost u terapiji bakteriofagima. Prednost specifičnosti je što uništava samo ciljne patogene bakterije za razliku od antibiotika koji uništavaju i komenzalne bakterije. Komenzalne bakterije su vrlo bitne za opće zdravlje pojedinca te je narušavanje ravnoteže mikrobiote (disbioza) povezano s brojnim bolestima od probavnih tegoba do mentalnih i neurodegenerativnih poremećaja. S druge strane, specifičnost faga predstavlja problem jer zahtijeva točnu dijagnozu infekcije i identifikaciju patogene bakterije, nekad i do razine soja što je vremenski zahtjevan proces te se nekad ni ne nađu odgovarajući litički fagi. Ovaj problem se može riješiti dizajniranjem sintetskih faga koji bi mogli „napasti“ bilo koju bakteriju koju želimo uz uvjet da znamo njezin sastav membrane. Leptihn i Loh (2022) spekuliraju da bi se mogao sastaviti sintetski fag s modularnim strukturama koje sadrže zamjenjive domene za vezanje na receptore različitih bakterija što bi omogućilo infekciju više vrsta bakterija. Dizajniranjem takvih sintetskih faga riješio bi se i problem sociobiologije faga (ne bi postojala opasnost da fag preda gene bakterijama koji povećavaju njihovu virulentnost ili ih čine otpornim na antibiotike) te rezistencije na bakteriofage jer bi jednostavno mogli napraviti novi fag s receptorom za drugo vezno mjesto.

3. ZAKLJUČAK

U doba antibiotik-rezistentnih bakterija terapija bakteriofagima postaje sve popularnija. Tijekom terapije susrećemo se s raznim problemima kao što su: transport bakteriofaga na mjesto infekcije, sociobiologija bakteriofaga, rezistencija na bakteriofage i njihova specifičnosti. Metoda transporta faga na mjesto infekcije ovisi o tipu pripravka bakteriofaga: tekući, suhi ili inkapsulirani. Inkapsulirani fagi mogu se prenositi na mjesto infekcije u obliku transferosoma, liposoma, hidrogela, filma, vlakna, niosoma, nanoemulzija i nanočestica. Ovakav oblik prijenosa štiti fage od želučanih kiselina, enzima, imunskog sustava te im olakšava penetraciju u tkiva. Problem sociobiologije lizogenih faga i bakterija rješava se korištenjem litičkih faga, no još uvijek nemamo potpuno razumijevanje u genetiku litičkih faga te su potrebna dodatna istraživanja kako bi utvrdili jesu li interakcije litičkih faga i bakterija štetne. Zasad, ovaj problem se može riješiti korištenjem biokonjugiranih faga sa zlatnim nanoštapićima koji se mogu jednostavno uništiti X-zračenjem. Također, mogli bi riješiti problem korištenjem sintetskih faga, no ova opcija je zasad samo teoretska. Korištenjem sintetskih faga koji imaju zamjenjive domene za vezanje na receptor, osim problema sociobiologije bakteriofaga, mogli bi se riješiti i problemi specifičnosti te rezistencije na bakteriofag. Problem specifičnosti ujedno je i prednost terapije jer „napadanjem“ samo određenih sojeva bakterija ne uništavaju se nama bitne komenzalne bakterije. Dodatno, osim sintetskim fagima problem rezistencije može se riješiti pripremom koktela faga, izoliranjem novog faga na koji je bakterija osjetljiva ili korištenjem antibiotika. Korištenjem antibiotika uz terapiju s bakteriofagima javlja se sinergistički efekt. Kako bi sinergistički efekt bio jači preporuča se dodavanje antibiotika u terapiju nakon tretmana s fagima. Kao i specifičnost bakteriofaga, pojava rezistencije na bakteriofage ne mora nužno biti negativna. Istraživanja su pokazala da pojavom rezistencije na bakteriofage bakterije često ponovno postanu senzibilne na neke antibiotike. Najbolje je koristiti terapiju s bakteriofagima uz antibiotike čime se smanjuje korištenje antibiotika, postiže sinergistički efekt te osigurava da se manje rezistentnih bakterija pojavi – bilo na antibiotike ili bakteriofage.

4. LITERATURA

1. Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, *1*(2), 66–85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>
2. Chan, B. K., Siström, M., Wertz, J. E., Kortright, K. E., Narayan, D., & Turner, P. E. (2016). Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, *6*(1), 26717. <https://doi.org/10.1038/srep26717>
3. Chhibber, S., Shukla, A., & Kaur, S. (2017). Transfersomal phage cocktail is an effective treatment against methicillin-resistant staphylococcus aureus-mediated skin and soft tissue infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(10), e02146-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02146-16>
4. Colom, J., Cano-Sarabia, M., Otero, J., Cortés, P., Maspoch, D., & Llagostera, M. (2015). Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against salmonella spp. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(14), 4841–4849. <https://doi.org/10.1128/AEM.00812-15>
5. Dion, M. B., Oechslin, F., & Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(3), 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
6. Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J., & Barekzi, N. (2017). A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses*, *9*(3), 50. <https://doi.org/10.3390/v9030050>
7. Gordillo Altamirano, F. L., & Barr, J. J. (2019). Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews*, *32*(2), e00066-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18>

8. Haaber, J., Leisner, J. J., Cohn, M. T., Catalan-Moreno, A., Nielsen, J. B., Westh, H., ... Ingmer, H. (2016). Bacterial viruses enable their host to acquire antibiotic resistance genes from neighbouring cells. *Nature Communications*, 7(1), 13333. <https://doi.org/10.1038/ncomms13333>
9. Hashemi H, Pouyanfard S, Bandehpour M, Mahmoudi M, Bernasconi M, Kazemi B, Mokhtari-Azad T. Efficient endotoxin removal from T7 phage preparations by a mild detergent treatment followed by ultrafiltration. *Acta Virol*. 2013;57(3):373-4. PMID: 24020765.
10. Hathaway, H., Alves, D. R., Bean, J., Esteban, P. P., Ouadi, K., Mark Sutton, J., & Jenkins, A. T. A. (2015). Poly(N-isopropylacrylamide-co-allylamine) (PNIPAM-co-ALA) nanospheres for the thermally triggered release of Bacteriophage K. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 96, 437–441. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.09.013>
11. Kaur, P., Gondil, V. S., & Chhibber, S. (2019). A novel wound dressing consisting of PVA-SA hybrid hydrogel membrane for topical delivery of bacteriophages and antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 572, 118779. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118779>
12. Kaur, S., Harjai, K., & Chhibber, S. (2012). Methicillin-resistant staphylococcus aureus phage plaque size enhancement using sublethal concentrations of antibiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8227–8233. <https://doi.org/10.1128/AEM.02371-12>
13. Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>

14. Leptihn, S., & Loh, B. (2022). Complexity, challenges and costs of implementing phage therapy. *Future Microbiology*, 17(9), 643–646. <https://doi.org/10.2217/fmb-2022-0054>
15. Letarov, A. V. (2020). History of early bacteriophage research and emergence of key concepts in virology. *Biochemistry (Moscow)*, 85(9), 1093–1112. <https://doi.org/10.1134/S0006297920090096>
16. Leung, S. S. Y., Parumasivam, T., Gao, F. G., Carrigy, N. B., Vehring, R., Finlay, W. H., ... Chan, H.-K. (2016). Production of inhalation phage powders using spray freeze drying and spray drying techniques for treatment of respiratory infections. *Pharmaceutical Research*, 33(6), 1486–1496. <https://doi.org/10.1007/s11095-016-1892-6>
17. Loh, B., Gondil, V. S., Manohar, P., Khan, F. M., Yang, H., & Leptihn, S. (2021). Encapsulation and delivery of therapeutic phages. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(5), e01979-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01979-20>
18. Luong, T., Salabarria, A.-C., Edwards, R. A., & Roach, D. R. (2020). Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy. *Nature Protocols*, 15(9), 2867–2890. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0346-0>
19. Manohar, P., & Ramesh, N. (2019). Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. *Scientific Reports*, 9(1), 15242. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51742-4>
20. Milo, S., Hathaway, H., Nzakizwanayo, J., Alves, D. R., Esteban, P. P., Jones, B. V., & Jenkins, A. T. A. (2017). Prevention of encrustation and blockage of urinary catheters by *Proteus mirabilis* via pH-triggered release of bacteriophage. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(27), 5403–5411. <https://doi.org/10.1039/C7TB01302G>
21. Nogueira, F., Karumidze, N., Kusradze, I., Goderdzishvili, M., Teixeira, P., & Gouveia, I. C. (2017). Immobilization of bacteriophage in wound-dressing nanostructure.

- Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 13(8), 2475–2484.
<https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.08.008>
22. Peng, H., Borg, R. E., Dow, L. P., Pruitt, B. L., & Chen, I. A. (2020). Controlled phage therapy by photothermal ablation of specific bacterial species using gold nanorods targeted by chimeric phages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(4), 1951–1961. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913234117>
23. Prescott, L.M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2005) *Microbiology* (6th ed.). McGraw-Hill Higher Education
24. Rotman, S. G., Sumrall, E., Ziadlou, R., Grijpma, D. W., Richards, R. G., Eglin, D., & Moriarty, T. F. (2020). Local bacteriophage delivery for treatment and prevention of bacterial infections. *Frontiers in Microbiology*, 11, 538060. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.538060>
25. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.649-659.2001>
26. Szermer-Olearnik, B., & Boratyński, J. (2015). Removal of endotoxins from bacteriophage preparations by extraction with organic solvents. *PLOS ONE*, 10(3), e0122672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122672>
27. Vanić, Ž. (2012). Liposomi kao nosači lijekova: metode priprave. *Farmaceutski glasnik*, 68. (7-8), 457-466. Preuzeto s <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:376525>
28. Vonasek, E., Le, P., & Nitin, N. (2014). Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release. *Food Hydrocolloids*, 37, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.09.017>

5. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu 01.07.2001. godine. Završila sam Osnovnu školu Miroslava Krleže u Zagrebu (2008.-2016.). Već od osnovne su me zanimale više prirodne znanosti zbog čega sam upisala Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga (2016.-2020.). Ovdje sam otkrila svoju ljubav prema Biologiji te odlučila upisati preddiplomski studij Biologija na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu (2020.-2023.). Već na prvoj godini Biologije, nakon slušanja predmeta Mikrobiologija shvatila sam da je to polje u kojem se vidim u budućnosti. Tada sam isto prvi puta čula za terapiju bakteriofagima te me ideja fascinirala dovoljno da sada napišem Završni rad o važnosti terapije bakteriofagima. Ove godine sam upisala diplomski Mikrobiologija i Biotehnologija na Lund Sveučilištu u Švedskoj. Slobodno vrijeme volim provoditi s prijateljima i obitelji ili uz dobru knjigu/seriju.