

Bakteriofagi - potencijal za prevladavanje antibiotske rezistencije

Klinčić, Tibor

Professional thesis / Završni specijalistički

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:586435>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO – BIOKEMIJSKI FAKULTET

Tibor Klinčić

Bakteriofagi

- **potencijal za prevladavanje antibiotske rezistencije**

Specijalistički rad

Zagreb, 2016. godina

Poslijediplomski specijalistički studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Gordana Maravić Vlahoviček

Specijalistički rad obranjen je dana 9. veljače 2016. na Farmaceutsko – biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom:

1. Izv. prof. dr. sc. Maja Šegvić Klarić
2. Doc. dr. sc. Sandra Šupraha Goreta
3. Dr. sc. Ivana Čepelak, professor emerita

Rad ima 92 listova.

Predgovor

Specijalistički rad izrađen je pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Gordane Maravić Vlahoviček, na Zavodu za biokemiju i molekularnu biologiju, Farmaceutsko – biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Najljepše se zahvaljujem svojoj mentorici izv.prof. dr.sc. Gordani Maravić Vlahoviček na pruženoj pomoći, utrošenom vremenu te savjetima tijekom pisanja rada.

SAŽETAK

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko – biokemijski fakultet

Zavod za biokemiju i molekularnu biologiju

Bakteriofagi – potencijal za prevladavanje antibiotske rezistencije

CILJ ISTRAŽIVANJA:

Cilj istraživanja je načiniti opsežan pregled dosadašnjih spoznaja i zahtjeva za razvoj i primjenu bakteriofaga kao potencijala za suzbijanje infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijskim sojevima.

Hipoteze istraživanja su:

1. Mehanizam djelovanja bakteriofaga razlikuje se od mehanizma djelovanja standardnih antibiotika pa razvoj rezistencije može biti odgođen ili se rezistencija može prevladati.
2. Bakteriofagi predstavljaju potencijal za izbjegavanje trenutne krize nedostatka učinkovitih antibiotika, uslijed povećanog razvoja i širenja bakterijske rezistencije.
3. Optimizacijom i razvojem bakteriofagi mogu poslužiti kao nadopuna terapiji antibioticima.

MATERIJAL I METODE:

Pregledom znanstvene literature su opisane trenutne spoznaje o bakteriofagima, njihov mehanizam biološkog djelovanja i interakcije s bakterijskim stanicama. Osim regulatornih, sagledani su i zahtjevi kakvoće te sigurnosti koje bi bakteriofagi trebali zadovoljiti. Razmatrana je terapijska širina, bakterijska rezistencija na bakteriofage, izazovi pri proizvodnji te mogućnosti modifikacije bakteriofaga. Prikazani su dosadašnji rezultati dobiveni primjenom bakteriofaga u suzbijanju bakterijskog rasta te prednosti i nedostaci u odnosu na trenutno dostupnu antibakterijsku terapiju.

REZULTATI:

Predloženo istraživanje pruža uvid u dosadašnje dostupne rezultate te zahtjeve koje je potrebno zadovoljiti kako bi bakteriofagi bili korišteni kao terapija infekcija uzrokovanih

rezistentnim sojevima. Interes za primjenu litičkih faga predstavlja njihova mogućnost samoumnazanja na mjestu infekcije u prisutnosti patogenih bakterija, što je potvrđeno ispitivanjem učinkovitosti *in vivo*. Potrebno je detaljnije utvrditi farmakološke zahtjeve takve terapije. Za proširenje terapijske širine optimalni bi bili kokteli bakteriofaga. U te svrhe potrebno je genotipski i fenotipski definirati izolate bakteriofaga, kako bi se izbjegao razvoj rezistencije kod ciljanih bakterija. Navedeno je značajno i sa sigurnosnog aspekta, da se izbjegnu neželjeni učinci na ljudsko zdravlje. Optimizacija i proizvodnja bi trebala biti u skladu sa zahtjevima dobre proizvođačke prakse uz kvalitetu ugrađenu u proizvod. Redefiniranje regulatornih zahtjeva i provođenje svih faza kliničkih ispitivanja omogućilo bi dostupnost na tržištu takvih pripravaka a) za suzbijanje bakterijskih infekcija, za koje nema drugog učinkovitog odgovora, ili b) kao nadopuna antibiotskoj terapiji, obzirom da je utvrđen sinergizam između faga i antibiotika.

ZAKLJUČAK:

Bakteriofagi predstavljaju značajan, ali trenutno nedovoljno razvijen potencijal za korištenje u terapijske svrhe za suzbijanje bakterijskih infekcija, koji se može koristiti samostalno ili pak kao potpora antibiotskoj terapiji. Osim toga, budući da se mogu modificirati metodama genetičkog inženjerstva mogli bi poslužiti i za dostavu cjepiva ili DNA u genskoj terapiji. Smjer razvoja i potencijalnu primjenu bakteriofaga definirat će rezultati budućih multidisciplinarnih istraživanja, što će ovisiti o rezultatima kliničkih ispitivanja te potvrdi učinkovitosti i sigurne primjene kod ljudi prema regulatornim zahtjevima Europske Unije i Sjedinjenih Američkih Država.

SUMMARY

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Department of Biochemistry and Molecular Biology

Bacteriophages - the potential to overcome antibiotic resistance

OBJECTIVES:

The main aim is to make a comprehensive review of recent studies and requests for the development and application of bacteriophages as a potential to combat infections caused by resistant bacterial strains.

Hypotheses are:

1. Mechanism of action of bacteriophages is different from the mechanism of action of standard antibiotics and the development of resistance can be delayed or resistance can be overcome.
2. Bacteriophages represent the potential for avoiding the current crisis due to the lack of effective antibiotics as a result of increased development and spread of bacterial resistance.
3. By optimization and development bacteriophages can be used as a supplement to antibiotics.

MATERIAL AND METHODS:

A review of scientific literature describes the current knowledge of bacteriophages, their mechanism of biological action and interaction with the bacterial cells. In addition to regulatory, perceived are also requirements about quality and security that bacteriophages should fulfill. The therapeutic range, bacterial resistance to bacteriophages, challenges and opportunities in the production of modified bacteriophages were also considered. Results which are obtained in use bacteriophages to combat bacterial growth so far and their advantages and disadvantages compared to currently available antibacterial therapy are also shown.

RESULTS:

The proposed research provides insight into obtained results of scientific research and requirements which have to be met in order to make bacteriophages suitable for the

treatment of infections caused by bacterial strains resistant to antibiotics. Interest in the application of lytic phages is based on their ability of selfreplication on the site of the infection and in the presence of pathogenic bacteria, as it was confirmed by examining *in vivo* efficacy. It is necessary to further define the pharmacological requirements of such therapy. Use of bacteriophage cocktails would represent optimal extension of their therapeutic applications. For this purpose it is necessary to define genotype and phenotype of bacteriophage isolates, in order to avoid the development of resistance in the target bacteria, as well as to avoid adverse effects on human health. Optimization of the production should be in accordance with the requirements of good manufacturing practice and quality built into the product. Redefinition of regulatory requests and pass of all clinical trials phases would allow the availability of such preparations on the market a) for the use in the control of bacterial infections, for which there is no effective response, or b) as a supplement to antibiotic therapy, based on the determined synergism between phages and antibiotics.

CONCLUSION:

Bacteriophages are an important, but currently not sufficiently developed potential for use in suppression of bacterial infections, that can be used alone or as support to antibiotic therapy. In addition, since they can be modified by the methods of genetic engineering, it could be possible to use them for delivery of DNA vaccines or gene therapy. Development course and potential for the use of bacteriophages will be defined by the future multidisciplinary research, which will depend on the results of clinical trials and confirmation of the efficacy and safety for use in humans according to the European Union and the United States of America regulatory requirements.

Sadržaj specijalističkog rada

SAŽETAK	III
SUMMARY	V
SADRŽAJ	VII
1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA	1
1.1 Antibakterijski lijekovi - povijesni pregled.....	4
1.2 Antibakterijska terapija pod pritiskom bakterijske rezistencije.....	5
1.3 Evolucijski aspekt bakterijske rezistencije	7
1.4 Trenutno značajnije rezistentne i virulentne bakterijske vrste	9
1.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1.4.2 <i>Burkholderia cepacia</i> kompleks	10
1.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
1.4.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
1.4.5 <i>Escherichia coli</i>	12
1.4.6 <i>Acinetobacter baumannii</i>	12
1.4.7 <i>Enterococcus faecium</i> i <i>Enterobacter species</i>	12
1.5 Strategija razvoja novih antibakterijskih lijekova kao posljedica rezistencije	13
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3. MATERIJAL I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI.....	17
3.1 Bakteriofagi.....	18
3.1.1 Životni ciklus bakteriofaga	20
3.1.2 Mehanizam litičkog životnog ciklusa bakteriofaga	21
3.1.3 Lizogeni ciklus.....	23
3.2 Rezistencija bakterija na infekciju bakteriofagima	23
3.3 Odgovor bakteriofaga na bakterijsku rezistenciju	25
3.4 Dosadašnja komercijalna primjena bakteriofaga	26
3.5 Moguće primjene bakteriofaga u svrhu suzbijanja bakterijskih infekcija.....	28
3.5.1 Upotreba bakteriofaga u dijagnostičke svrhe	28
3.5.2 Terapija bakteriofagima	29
3.5.3 Eksperimentalni podaci o primjeni bakteriofaga u terapijske svrhe	31
3.5.4 Litički enzimi bakteriofaga	39
3.6 Europski regulatorni okvir.....	41

3.7 Razmatranje zahtjeva za kliničke studije	42
3.8 Osnovni farmakološki zahtjevi.....	47
3.9 Odnos faga i bakterije za procjenu i predviđanje učinkovitosti terapije.....	50
3.10 Fiziološki parametri izolata za proizvodnju	51
3.11 Proizvodnja i stabilnost	53
3.12 Prednosti i nedostaci u odnosu na antibiotike.....	54
3.13 Ostale mogućnosti primjene bakteriofaga.....	55
3.13.1 Modifikacija ovojnice faga – " <i>PHAGE DISPLAY</i> "	55
3.13.2 Fagi kao sustavi za dostavu cjepiva.....	56
3.13.3 Fagi kao dostavljači genske terapije i ciljanih gena	57
4. RASPRAVA	60
5. ZAKLJUČAK	70
6. LITERATURA	72
7. ŽIVOTOPIS	82

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Genetičku osnovu jednostaničnih i višestaničnih organizama čine isti građevni elementi koji su organizirani u molekule DNA. DNA sadrži informaciju za održavanje staničnih funkcija životnog ciklusa jedinke pojedine vrste pa tako i za bakterije koje su neizostavni sudionici u razvoju života na Zemlji, te su ključne u održavanju cjelokupnog ekosustava. To potvrđuje i činjenica da brojčano premašuju ljudsku populaciju za red veličine 10^{22} , po masi za 10^8 , prisutne su na Zemlji 1000 puta dulje od ljudi, a mogu imati i do 50 000 generacija usporedno s jednom ljudskom generacijom (1). Obzirom na njihovu sveprisutnost, i u ljudskom organizmu obitavaju kao komenzali. No ponekad slučajnim unosom i promjenom fiziološkog statusa moguća je i kolonizacija patogenim vrstama kojima genetički mehanizmi omogućavaju uspješno parazitiranje na štetu organizma čovjeka. Imunosni sustav se pri tome ne može uvijek samostalno i u potpunosti oduprijeti infekciji takvim bakterijama kojima evolucijski procesi i međusobne interakcije trajno poboljšavaju patogenost i virulenciju.

Evolucija obuhvaća sve žive organizme, stoga razvoj pojedinih staničnih funkcija i struktura na razini DNA informacije, ima u osnovi isto ili slično ishodište. Tako je i s biokemijskim procesima koji sudjeluju u staničnom metabolizmu. Kako bi se spriječile bakterijske infekcije u ljudskom organizmu bilo je potrebno pronaći selektivne antibakterijske tvari, koje su u većoj mjeri sigurne za domaćina, a toksične za patogeni mikroorganizam. Osnovu su predstavljale razlike u odvijanju biokemijskih procesa kao i uloga specifičnih staničnih struktura. Stoga su biokemijske reakcije kojima se odvija sinteza jednostavnih ugljikovih spojeva (npr. sinteza malih molekula aminokiselina i nukleotida) te sinteza makromolekula (npr. proteina, nukleinskih kiselina, peptidoglikana) pretpostavljene kao mogući ciljevi djelovanja antibakterijskih lijekova. Tako su sredinom 20. stoljeća izolirani antibiotici relativno sigurni za primjenu koji su u bakterijskoj stanici učinkovito inhibirali sintezu folne kiseline, peptidoglikana itd.

Od prve uspješne primjene antibakterijske terapije je prošlo mnogo godina i od tada je istraživanjima i industrijskim razvojem otkriveno mnoštvo učinkovitih djelatnih tvari. No bakterijske su stanice pod konstantnim evolucijskim pritiskom uspješno razvile mehanizme otpornosti na antibakterijska sredstva. Otpornost je, kao i druge stanične karakteristike definirana genetičkom informacijom koja se može prenositi unutar iste ili različitih vrsta bakterija, vertikalnim (uslijed mutacije kromosoma) ili horizontalnim (čimbenici su npr. plazmidi, transpozoni, genske kazete i integroni) prijenosom. Za prijenos između istih ili srodnih vrsta odgovorni su mehanizmi poput konjugacije (konjugacijski plazmidi), transdukcije i transpozicije (uvjetovano bakteriofagima) te transformacije (unos dijela strane DNA u genom).

Otpornost uvjetuju strukturni geni. Proteini koji nastaju ekspresijom takvih gena svojom strukturom ili djelovanjem mogu inaktivirati ili izmijeniti molekule antibiotika ili zaobići njihovo djelovanje. Neki od primjera bakterijske zaštite od antibiotika predstavljaju stvaranje beta-laktamaza, promjene u strukturi receptora, npr. proteina koji vežu penicilin (*engl.* penicilin binding proteins; PBP), zaštita ribosoma, izmjena metaboličkog puta, kao i promjene karakteristika stanične membrane u smislu propusnosti ili djelovanja membranskih efluks crpki.

Unazad 20 godina zabrinjava porast otpornosti na antibiotsku terapiju, posebice uzročnika infekcija kao što su meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*, vankomicin rezistentni *Enterococcus*, rezistentne vrste iz porodice *Enterobacteriaceae*, kao i bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* koje stvaraju beta-laktamaze proširenog spektra (2).

Zbog navedenog postoji bojazan da ulazimo u postantibiotsko razdoblje i stoga je nužno razmatrati i razvijati alternativne mogućnosti sprječavanja bakterijskih infekcija, posebice uzročnika koji su višestruko rezistentni i za koje ponekad jedino koktel antibiotika pokazuje zadovoljavajući učinak. U tu svrhu potrebno je razmotriti bakteriofage kao potencijalno oružje u prevladavanju antibiotske rezistencije.

1.1 Antibakterijski lijekovi - povijesni pregled

Termin antibakterijski lijekovi prvenstveno asocira na antibiotike. Takva asocijacija nije nimalo neobična zato što otkriće i kontinuirani razvoj te kategorije lijekova zasigurno predstavlja jedan od najznačajnijih događaja modernog doba. Svrha im je osigurati i održavati zdravlje ljudske populacije od ugroze patogenih mikroorganizama. Naziv antibiotik je uveo Selman Waksman kako bi opisao učinak tvari koje stvaraju mikroorganizmi, a služe im kao mehanizam zaštite od drugih mikroorganizama. On je definirao antibiotike kao prirodne tvari s bakteriostatskim i baktericidnim učinkom, a poznat je po otkriću streptomicina (ekstrahiran iz streptomiceta *Streptomyces griseus*) te kao pionir u pretraživanju tla sa svrhom otkrivanja djelatnih tvari s antibakterijskim djelovanjem. Danas se pod terminom antibiotik smatra ne samo prirodna tvar već i sintetizirani kemijski spoj koji ima bakteriostatski, antibakterijski i fungicidni učinak (3).

Antibiotičko doba započelo je prije definiranja termina antibiotik. 1904. godine Erlich je otkrio salvarzan, kemičari Klarer i Mietzsch su sintetizirali, a Domagk testirao sulfonamide. Flemingovo otkriće penicilina 1928. kao i masovna proizvodnja i distribucija 1945. značilo je pravi začetak razvoja i primjene antibiotika. Fleming je također, upozorio na potencijalnu mogućnost razvoja rezistencije na penicilin (4). Gotovo u istom vremenskom razdoblju početaka razvoja antibiotika, još u predantibiotičkoj eri, otkriveni su bakteriofagi što je bilo vrlo značajno stoga što su pretpostavljeni kao potencijalno sredstvo za suzbijanje bakterijskih infekcija. Frederick W. Twort je pri pokušajima uzgoja virusa boginja 1915. godine primijetio kako mikrokoki kao kontaminanti agarnog medija ne pokazuju uobičajen rast, već da su neke od kolonija mukoidne, vodenaste ili staklaste. Daljnjim ispitivanjem zaključio je da se radi o životnom obliku niže organizacijske strukture od bakterija, koji može predstavljati akutnu infekciju kolonija mikrokoka. Neovisno o njegovom opažanju, Felix d'Herelle je 1917. otkrio antagoniste bakterija koji uzrokuju njihovu lizu u tekućem mediju, kao i smrt stanica te plakove na agarnim pločama s bakterijskom kulturom. Zaključio je da se radi o ultravirusima koji parazitiraju u bakterijskoj stanici te ih je nazvao bakteriofagima (5).

d'Herelle je uveo primjenu bakteriofaga u medicinu objavljujući iskustvena ispitivanja širom svijeta, primijenio je liječenje invazivnih infekata intravenoznim pripravkom faga. Opažanja je objavio 1931. godine, godinu dana nakon uvođenja sulfonamida u primjenu za suzbijanje bakterijskih infekcija. Sami počeci primjene bakteriofaga bili su široko kritizirani zato što se nije razumjela njihova prava priroda. To ima smisla obzirom na neznanje o osnovnoj ulozi DNA i RNA kao genetičke osnove koja je bitna za razumijevanje biologije faga. Bilo je dostupno mnoštvo nereproducibilnih rezultata, nedefiniranih protokola i nepravilne kontrole, temeljem kojih su znanstveni krugovi zaključili da je primjena faga

(litičkih filtrata) protiv bakterijskih infekcija proturječna i neuvjerljiva uz preporuku daljnjeg istraživanja. No primjena i proučavanje bakteriofaga aktivno su nastavljani u bivšem SSSR-u, Poljskoj i manje u Indiji (6).

Razvojem i primjenom antibiotika od tridesetih godina prošlog stoljeća te otkrićem penicilina, interes za bakteriofage je znatno smanjen. Bakteriofagi kao što su λ i T su proučavani kao modelni sustavi u novom polju molekularne genetike (DNA, mRNA, mehanizmi genske regulacije). U iste svrhe su dalje kontinuirano proučavani i korišteni kao istraživačko oruđe, dok je njihova biološka i praktična važnost bila potisnuta u drugi plan. U posljednje vrijeme njihov značaj ponovno dolazi do izražaja s posebnim potencijalom za primjenu kao alternativa antibioticima pri liječenju infekcija uzrokovanih bakterijskim sojevima rezistentnim na jedan ili više antibiotika, a koriste se i razvijaju kao dostavljači DNA, vakcina i genske terapije.

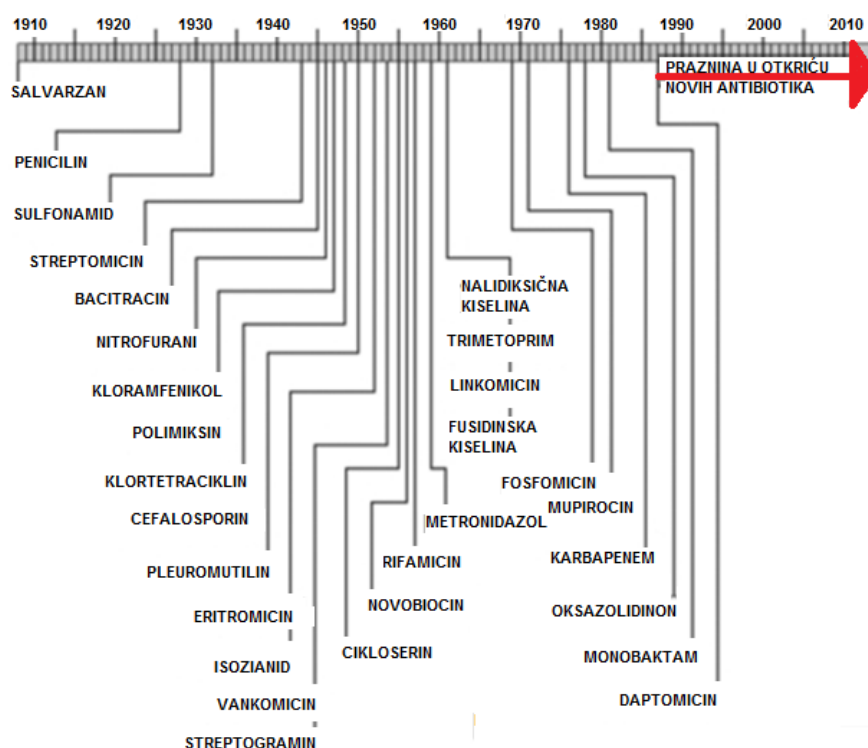
Kroz cijelo vrijeme ljudske povijesti tradicionalno iskustveno se koriste i biljni pripravci koji imaju antibakterijski učinak iako se prije otkrića mikroskopa i bakterija kao uzročnika infekcije nije moglo znati o čemu se radi ukoliko je došlo do spontanog ili nekim pripremkom potpomognutog poboljšanja ili izlječenja npr. rana. Ukoliko se radi o biljnim pripravcima, većinom sekundarni metaboliti biljaka predstavljaju osnovu na temelju koje se može govoriti o antibakterijskom djelovanju. To su primarno flavonoidi, ukupno 14 grupa koje se razlikuju prema kemijskoj prirodi i položaju supstituenta na osnovnoj strukturi dva fenilbenzopirana. Također su značajni alkaloidi - heterociklički spojevi dušika te terpeni, fenoli i polifenoli. Navedeni spojevi danas su važniji nego u počecima antibiotičke ere zato što predstavljaju zanimljivu strategiju za razvoj budućih bioaktivnih tvari korisnog terapijskog potencijala, a u *in vitro* ispitivanjima pokazuju više ili manje izraženo antibakterijsko djelovanje (7).

1.2 Antibakterijska terapija pod pritiskom bakterijske rezistencije

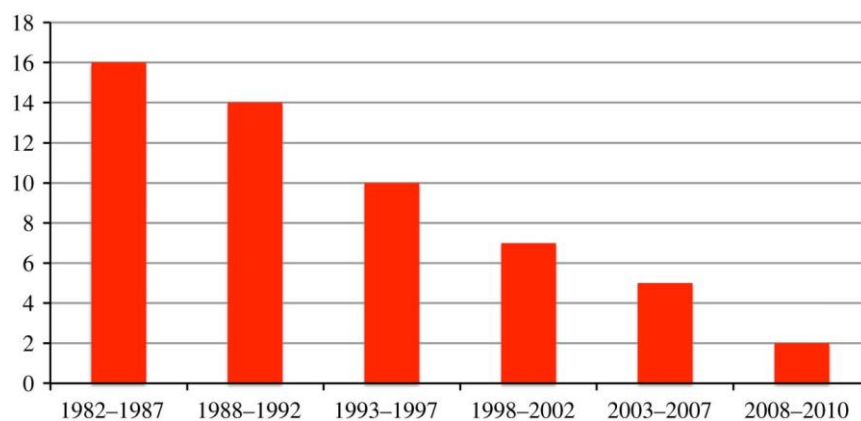
Od otkrića i primjene penicilina došlo je do značajnog pomaka u smanjenju bolesti i smrtnosti uzrokovanih bakterijskim infekcijama. Daljnjim otkrićima novih djelatnih tvari te njihovim usavršavanjem u kasnijoj polovici 20. stoljeća antibiotici su farmaceutskoj industriji donijeli ogromnu zaradu i doprinijeli njenom razvoju. Tako je postala visoko unosan sektor trgovine koja počiva na istraživanju i znanosti. Do 70-ih godina prošlog stoljeća razvoj antibiotika se smatrao sigurnim ulaganjem. Provođena su intenzivna istraživanja tradicionalnih mikrobnih izvora aktinomiceta i filamentoznih gljiva, zato što je većini antibiotika osnovna struktura prirodnog podrijetla dok je manjem broju osnova kemijski sintetizirana. Padom broja zanimljivih i novootkrivenih molekula, bez kojih su danas

nezamislivi medicinski zahvati kao što je izmjena zglobova ili pak transplantacija organa, porastao je interes industrije za druga terapijska područja, posebice kronične neinfektivne bolesti (8).

Osim što su iscrpljene sve opcije dostupnih molekula, daljnji razvoj antibiotika je skup i teško dostižan, a uslijed sve veće bakterijske rezistencije na antibiotike većina farmaceutskih tvrtki zatvorila je svoje jedinice za istraživanje i razvoj antibiotika. Stoga se vrijeme od 1990. do danas čini kao praznina, u usporedbi s prethodnim razdobljem koje se naziva zlatno doba antibiotika (9). Intenzivno razdoblje proizvodnje kao i pad u broju novoodobrenih antibiotika prikazano je na slikama 1 i 2.



Slika 1. Vremenski prikaz otkrića i razvoja antibiotika (preuzeto i prilagođeno iz 9).



Slika 2. Pad u broju novih odobrenih antibiotika u proteklih 30 godina

(preuzeto i prilagođeno iz 8).

Nekoliko je zahtjeva koje bi trebali zadovoljiti novi antibakterijski lijekovi: da na njih nema razvijene rezistencije, da budu širokog spektra djelovanja u svrhu smanjenja razvoja rezistencije, da ne pokazuju unakrsnu nepodudarnost s drugim lijekovima i da prate trenutne ljudske potrebe (10).

1.3 Evolucijski aspekt bakterijske rezistencije

Svi antibiotici koji su uvedeni u kliničku primjenu imaju ograničen period učinkovitosti. Razlog tome je što se prije ili kasnije očekuje razvoj rezistencije. Rezistencija na prve antibiotike penicilin i streptomycin, otkrivena je ubrzo nakon njihova otkrića. No njenu pojavu i širenje unutar bakterijskih populacija nije uvjetovao početak uporabe antibiotika u ljudskoj populaciji. To potvrđuje otkriće molekula DNA starih oko 30 000 godina, kojima je unutar strukture utvrđena prisutnost gena koji uzrokuju beta-laktamsku i tetraciklinsku rezistenciju, a također i gena odgovornih za sintezu glikopeptidnih antibiotika (vankomicin). Obzirom da su se bakterije razvile prije 3,8 milijarde godina, dugotrajni evolucijski procesi su im omogućili razvoj genskih skupina odgovornih za biosintezu spojeva i struktura za samozaštitu (11). Takve skupine gena predstavljaju rezistom koji je u današnje vrijeme sve složeniji zbog pokretljivosti genetičkih elemenata i frekvencije alela te razine ekspresije gena koji uvjetuju rezistenciju. Ponekad ekspresiju takvih gena određuju specifični uvjeti pa se rezistencija kao fenotipska karakteristika tek tada ispoljava (12). Antibiotička rezistencija može biti posljedica mutacija ili stečena horizontalnim prijenosom gena (13).

Horizontalni prijenos genetičkog materijala unutar vrste ili između različitih vrsta, predstavlja glavni mehanizam bakterijske evolucije. Proces je moguć na više načina: unosom gole DNA iz vanjskog izvora (transformacija), transdukcijskim unosom dijela strane DNA (bakteriofagima), transferom plazmida konjugacijom ili pak česticama sličnim fagima. Osim navedenog dostupni su i manje poznati mehanizmi prijenosa genetičkog materijala između bakterijskih stanica. Tako npr. bakterije *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* mogu direktno izmjenjivati citoplazmatske molekule pomoću 130 nm širokih i 1 µm dugačkih nanocjevčica, koje se formiraju simultano u bakterijskim stanicama prilikom bliskog kontakta. Takav prijenos omogućuje i transfer nekonjugativnih plazmida koji omogućuju nasljednu antibiotičku rezistenciju (14). Važno je istaknuti kako sojevi koji stvaraju antibakterijske tvari imaju kromosomske zaštitne elemente unutar skupine gena koji kodiraju za sintetski put antibiotika (15).

Uslijed njihove ekspresije na različite načine je omogućeno preživljavanje bakterije nosioca takvih gena (Tablica 1). Najčešći način je promjena propusnosti bakterijske stijenke kako bi se smanjila mogućnost ulaska antibiotika na mjesto djelovanja unutar stanice. Osim toga rezistenciju uvjetuju djelotvorne efluks crpke, enzimski sustavi za modifikaciju ili razgradnju antibiotika, alternativni metabolički putevi, u odnosu na one inhibirane antibiotikom, modificirane mete djelovanja antibiotika, ili pak povećano stvaranje enzima koji je meta antibiotika (17).

Tablica 1. Mehanizmi rezistencije na učestale antibiotike (preuzeto i prilagođeno iz 16).

SKUPINA ANTIBIOTIKA	PRIMJER	META	MEHANIZMI REZISTENCIJE
β-laktami	penicilini (ampicilin), cefalosporini (cefamicin), penemi (meropenem), monobaktami (aztreonam)	sinteza peptidoglikana	hidroliza, efluks crpke, izmijenjena meta
aminoglikozidi	gentamicin, streptomycin, spektinomycin	translacija	fosforilacija, acetilacija, nukleotidilacija, efluks crpke, izmijenjena meta
glikopeptidi	vankomicin, teikoplanin	sinteza peptidoglikana	reprogramiranje biosinteze peptidoglikana
tetraciklini	minociklin, tigeciklin	translacija	monooksigenacija, efluks crpke, izmijenjena meta
makrolidi	eritromicin, azitromicin	translacija	hidroliza, glikozilacija, fosforilacija, efluks crpke, izmijenjena meta
linkozamidi	klindamicin	translacija	nukleotidilacija, efluks crpke, izmijenjena meta
streptogramini	sinercid	translacija	C-O liaza (tip B streptogramini), acetilacija (tip A streptogramini), efluks crpke, izmijenjena meta
oksazolidinoni	linezolid	translacija	efluks crpke, izmijenjena meta
fenikoli	kloramfenikol	translacija	acetilacija, efluks crpke, izmijenjena meta
kinoloni	ciprofloksacin	DNA replikacija	acetilacija, efluks crpke, izmijenjena meta
pirimidini	trimetoprim	C ₁ metabolizam	efluks crpke, izmijenjena meta
sulfonamidi	sulfametoksazol	C ₁ metabolizam	efluks crpke, izmijenjena meta
rifamicini	rifampin	transkripcija	ADP-ribozilacija, efluks crpke, izmijenjena meta
lipopeptidi	daptomicin	stanična membrana	izmijenjena meta
kationski peptidi	kolistin	stanična membrana	efluks crpke, izmijenjena meta

Naravno, osim evolucijskog faktora, rezistenciji doprinosi terapijska primjena antibiotika, te uslijed toga njihova zastupljenost u okolišu, u smislu selektivnog pritiska. Unazad 60 godina od uvođenja u široku primjenu, milijuni su metričkih tona antibiotika proizvedeni i korišteni u različite svrhe. Takvo zagađenje Zemlje antibioticima ili njihovim razgradnim spojevima značajno doprinosi razvoju rezistentnih bakterijskih vrsta, što predstavlja dobar primjer Darwinovih zaključaka o selekciji i preživljavanju (16). Osim na antibiotike, bakterijske stanice imaju i mehanizme obrane od bakteriofaga koji su većinom specifični za pojedinu bakterijsku vrstu. U usporedbi s antibioticima koji imaju definiranu kemijsku strukturu, bakteriofagi su biološki sustavi koji su podložni evolucijskim promjenama i prilagodbi te se odnos bakterija i bakteriofaga može sagledavati kao međusobno natjecanje u smislu egzistencijalnog opstanka.

1.4 Trenutno značajnije rezistentne i virulentne bakterijske vrste

Bakterijska rezistencija na antibiotike predstavlja veliki izazov za ljudsko zdravlje, posebice uslijed širenja gena nositelja rezistencije, kao i pojave i širenja višestruko rezistentnih patogena. Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti (*engl.* European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)) kao i analogna američka organizacija (*engl.* Centers for Disease Control and Prevention (CDC)) izdali su standardiziranu terminologiju za definiranje različitih profila rezistencije. Pojam *multi-drug resistant* (MDR) odnosi se na soj koji ima stečenu rezistenciju barem na jedan antibiotik u tri ili više antibakterijskih kategorija, *extensively-drug resistant* (XDR) predstavlja ekstremno rezistentan soj koji nije osjetljiv na barem jedan agens u dvije ili manje antibakterijske kategorije te *pandrug-resistant* (PDR) označava soj koji ne pokazuje osjetljivost niti na jedan agens od svih antibakterijskih kategorija. Nekoliko je bakterijskih vrsta potrebno posebno istaknuti kao primjere, obzirom da predstavljaju problem današnjice, posebice kao uzročnici bolničkih infekcija (18).

Većina njih pripada u tzv. ESKAPE skupinu patogena koju čine *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* vrste. Sam naziv ESKAPE izveden od početnih slova spomenutih bakterijskih vrsta na engleskom jeziku znači bijeg, što u ovom slučaju podrazumijeva i karakteristiku bakterija da uspješno izbjegavaju biocidni učinak antibiotika razvojem rezistencije. Zato se u bliskoj budućnosti očekuje pojava sve većih izazova za učinkovitu antibakterijsku terapiju. Bolje razumijevanje njihove virulencije, rezistencije, prijenosa i patogeneze presudno je za razvoj novih i učinkovitijih antibiotika (19).

1.4.1 *Staphylococcus aureus*

Ova bakterijska vrsta prvi je puta zabilježena krajem 19. stoljeća. Radi se o gram-pozitivnim kokima, čija se patogenost u ljudi očituje kroz tri osnovna sindroma i to kao: upalne/gnojne promjene na koži, sistemske upale kao što su osteomijelitis, endokarditis, upala pluća i bakterijemija te sindrom toksičnog šoka i stafilokoknog trovanja hranom (20). Karakteristika ove bakterijske vrste je stvaranje velikog broja egzoproteina, faktora virulencije, koji omogućavaju kolonizaciju i razvoj bolesti u stanicama sisavaca. Gotovo svi sojevi stvaraju nukleaze, proteaze, lipaze, hijaluronidaze, kolagenaze te četiri vrste hemolizina koji imaju ulogu uništavanja staničnih membrana. Uz navedene, pojedini sojevi stvaraju i pirogeni-toksin, antigene koji uzrokuju sindrom toksičnog šoka, enterotoksine, te leukocidin (21). Potrebno je spomenuti i protein A koji se nalazi na površini stanice i čija je uloga onemogućiti opsonizaciju i fagocitozu (22). Bolnički sojevi pokazuju visoku rezistenciju na antibiotike, posebice meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) kod kojega je često prisutna višestruka rezistencija na nekoliko antibiotika. Osim na metacilin, neke sojeve karakterizira rezistencija i na drugu generaciju beta-laktamskih antibiotika, aminoglikozide, makrolide, tetracikline, kloramfenikol i linkozamide te su stoga trenutno vankomicin, linezolid i daptomicin zadnja mogućnost izbora pri liječenju (23, 24). Postoji bojazan da bi moglo doći do širenja vankomicin rezistentnog *S. aureus* (VRSA), čiju rezistenciju uvjetuje transpozon Tn1546 prisutan u genomu bakterije *Enterococcus faecalis* (25).

1.4.2 *Burkholderia cepacia* kompleks

Bakterijsku skupinu čini 17 trenutno poznatih, blisko povezanih gram-negativnih vrsta koje je teško razlikovati fenotipski, već je razlikovanje moguće genetičkim metodama (26). Prvi puta je pripadnik ove skupine izoliran 1950. godine. Karakteristika skupine je sposobnost razgradnje mnoštva kompleksnih aromatskih spojeva. Za ljudsku populaciju ovo je vrlo problematičan oportunistički patogen, posebice za oboljele od cistične fibroze te imunokompromitirane bolesnike. Vrlo je zabrinjavajuće što sojevi imaju sposobnost preživljavanja u mnogim proizvodima kao što su lijekovi, kozmetika, dezinficijensi, kao i u otopinama s vrlo malo hranjivih sastojaka. Značajni faktor virulencije predstavlja stvaranje lipaze pri invaziji plućnog epitela. Pojedini sojevi izlučuju metaloproteinaze s proteolitičkom aktivnošću prema proteinima izvanstaničnog matriksa, kolagenu tipa IV i fibronektinu te ključnim proteinima imunskog sustava uključujući alfa-1 proteinazni inhibitor i interferon gama 1, čime se dodatno iskazuje sposobnost ka razaranju plućnog tkiva te neutralizaciji imunološkog odgovora. Lipopolisaharidni sloj vanjske membrane je drugačiji, u odnosu na

ostale gram-negativne bakterije te uzrokuje rezistenciju prema antibakterijskim peptidima, a ima i pro-upalni učinak (27). Ova skupina bakterija rezistentna je na gotovo sve komercijalne antibiotike: aminoglikozide, kinolone i beta-laktame, što omogućuje učinkovit sustav efluks crpki, sposobnost stvaranja biofilma kao i modifikacija stanične ovojnice čime se smanjuje prodiranje antibiotika u stanicu (28).

1.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa je gram-negativna štapičasta bakterijska vrsta i oportunistički patogen koji uzrokuje infekcije kod imunokompromitiranih bolesnika, primjerice kod oboljelih od malignih bolesti, cistične fibroze ili kod pacijenata s teškim opekotinama. Kod takvih bolesnika može uzrokovati infekcije gotovo svih organskih sustava, a smrtnost iznosi blizu 50 %. Produkira izvanstanične enzime alkalnu proteazu i elastazu, citotoksin, hemolizine fosfolipazu i lecitinazu kao glavne čimbenike virulencije. Iako ova vrsta ima prirodno razvijenu rezistenciju na mnoge antibiotike zabrinjavajuća je povećana incidencija rezistencije bolničkih sojeva, a tome pridonosi i sposobnost formiranja biofilma, vanjska membrana i prisutnost plazmida koji nosi gene antibiotske rezistencije. Protiv ove bakterijske vrste su učinkoviti fluorokinoloni, gentamicin i imipenem, iako nisu svi učinkoviti protiv svih sojeva (29). Za rezistentne sojeve koriste se kombinacije lijekova, a pokušava se razviti i cjepivo, kao i molekularni modulatori koji bi služili kao blokatori ekspresije receptora za bakterijsku međustaničnu komunikaciju (*engl.* quorum sensing) (30).

1.4.4 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae je gram-negativna bakterijska vrsta koja kolonizira probavni sustav, kožu i nazofarinks kod ljudi. U prošlosti je bila značajna kao uzročnik teških upala pluća, no to se vremenom izmijenilo te je postala jedan od vodećih uzročnika bolničkih infekcija. Tome je pridonijela stečena rezistencija na antibiotike, jer iako kromosom kodira samo za neke penicilaze, rezistenciju omogućuju plazmidi kao nositelji višestruke rezistencije. Prije 30-ak godina je za *K. pneumoniae* bila uobičajena rezistencija na aminoglikozide. Naknadno je vrsta postala zanimljiva kao nositelj plazmida koji kodiraju za beta-laktamaze proširenog spektra, aktivne protiv novijih cefalosporina. Genske izmjene i nagomilane mutacije dovele su do rezistencije na fluorokinolone. Plazmidima je uvjetovano i širenje New Delhi metalo-beta-laktamaze-1 koja bakterijama osigurava rezistenciju na karbapeneme (19). Posebice zabrinjava mogućnost prijenosa takve rezistencije među različitim vrstama, uslijed kojih su mogućnosti terapije ograničene.

1.4.5 *Escherichia coli*

E. coli je gram-negativna bakterija normalno prisutna u probavnom sustavu ljudi. Poznato je više od 700 serotipova na temelju somatskog O i flagelnog antigena H, no manji dio sojeva je patogen te se klasificira prema faktorima virulencije. Patogeni sojevi uzročnici su infekcija urinarnog sustava, meningitisa novorođenčadi te gastroenteritisa. Bolesti su povezane s faktorima virulencije koje eksprimira pojedini soj, kao što su adhezini, invazini, toksini. Tako na primjer patogeni soj O157:H7 stvara enterohemoragični verotoksin koji uništava male krvne žile probavnog sustava, pluća i bubrega. Iako je *E. coli* smatrana jednom od najosjetljivijih vrsta na antibiotike unutar porodice *Enterobacteriaceae*, to se u zadnjem desetljeću promijenilo. Pojedini sojevi pokazuju sve veći trend primanja gena za rezistenciju horizontalnim prijenosom, prvenstveno od bakterije *K. pneumoniae* (19).

1.4.6 *Acinetobacter baumannii*

Ovaj gram-negativni oportunistički patogen je vrlo otporan na okolišne uvjete. Osim vanjske membrane koja bakteriji osigurava rezistenciju na neke od antibiotika, vrsta ima razvijene efluks crpke kao i smanjenu ekspresiju vanjskih membranskih porina. Faktor virulencije predstavlja jedan od proteina vanjske membrane, protein OmpA koji inducira apoptozu epitelnih stanica. Genetički materijal sadrži integrone koji uvjetuju rezistenciju na antibiotike te teške metale. Integrone omogućuju skupljanje gena za rezistenciju na jednom mjestu unutar genoma, što se očituje i kao sposobnost prikupljanja gena za beta-laktamaze širokog spektra pa tako neki sojevi pokazuju rezistenciju na sve poznate antibiotike, uključujući imipenem i kolistin. Takvi sojevi predstavljaju veliki problem zato što u slučaju infekcije nije moguće definirati učinkovit terapijski odgovor (31, 32).

1.4.7 *Enterococcus faecium* i *Enterobacter species*

Rezistencija enterokoka na beta-laktamske antibiotike je gotovo 99 %, pokazuju i visoku rezistenciju na vankomicin i ostale glikopeptidne antibiotike, a noviji antibiotici nemaju značajniji klinički učinak. Koloniziraju kožu, kao i predmete, te se stoga povezuju s infekcijama uzrokovanim korištenjem nesteriliziranih medicinskih proizvoda. Obzirom na navedeno *Enterococcus faecium* predstavlja jedan od najrezistentnijih bolničkih oportunističkih patogena (19,33). Isto tako se i višestruko rezistentni *Enterobacter* spp.

smatraju vrlo ozbiljnim uzročnicima bolničkih infekcija, na koje djelotvoran učinak ima svega nekoliko antibiotika, kao što su kolistin i tigeciklin.

1.5 Strategija razvoja novih antibakterijskih lijekova kao posljedica rezistencije

U potrazi za novim antibioticima u zadnjem desetljeću korištene su strategija genomskog pristupa koja se zasniva na racionalno odabranoj meti te strategija reverzne genomike koja polazi od spoja sa zanimljivom antibakterijskom aktivnošću (34). Genomskim pristupom bilo je potrebno sekvencirati genom patogenih bakterijskih vrsta te pri tome identificirati esencijalne evolucijski očuvane nukleotidne sljedove gena koji kodiraju za mete, a da nisu podudarni s nekim od gena iz stanica sisavaca. Velika pozornost pridavala se probiru visokog protoka (*engl.* high throughput screening; HTS) aktivnih tvari te su pretraživane postojeće baze podataka u svrhu identifikacije molekula koje bi se vezale na mete u bakterijskoj stanici. Pri tome je vrlo značajno bilo identificirati novu metu, dok je manja pozornost posvećena karakteristikama molekule da se što lakše unosi u stanicu, izbjegne učinak efluks crpki ili prilagodi mutiranim ciljanim staničnim strukturama (35).

Trenutno je validirano pet velikih meta na koje bi potencijalni molekularni kandidati mogli djelovati uz optimalan antibiotski učinak. To su: 1) put biosinteze peptidoglikana/staničnog zida (beta-laktami i glikopeptidi vankomicinskog tipa), 2) mehanizmi sinteze bakterijskih proteina (većina antibakterijskih spojeva sa ciljnim djelovanjem na ribosom), 3) blokada DNA replikacije i transkripcije (djelovanje na DNA-girazu i RNA-polimerazu), 4) biosinteza folata te 5) razaranje stanične membrane (daptomicin) (36).

Iako je dostupno veliko mnoštvo molekula s antibakterijskim djelovanjem, glavni problem metoda orijentiranih na metu predstavlja činjenica da je većina potencijalnih inhibitora neučinkovita *in vivo*. Vrlo malo molekula sa zadovoljavajućim karakteristikama bi se moglo definirati kao vodeće strukture za daljnji razvoj, kako sintetskih tako i prirodnih spojeva. Intenzivnim korištenjem HTS i kombinatorne kemije potisnute su klasične metode pretraživanja, a istraživanje prirodnih struktura kao osnova je postepeno napušteno. Takav pristup zasigurno nije dostatan za dobivanje potencijalnih kandidata za antibiotike, već može biti dopuna postupcima otkrivanja varijacija prirodnih spojeva, za koje je pretpostavljeno da će biti uspješni terapeutici sutrašnjice, naravno uz mogućnost kemijske i genetičke modifikacije (37).

Osim navedenog, izazov pri razvoju novih molekula s antibakterijskim djelovanjem predstavljaju zahtjevi koje definira pravilo od 5 Lipinskog. Radi se o kemijskom algoritmu kojim se pokušava pronaći molekule s fizikalno-kemijskim osobinama sličnim poznatim

lijekovima za oralnu primjenu. Molekule koje zadovoljavaju ovo pravilo bi trebale biti lipofilne, veličine do 500 Da, te imati prihvatljive farmakokinetičke parametre: apsorpcije, distribucije, metabolizma i ekskrecije u tijelu. Navedenim algoritmom se ne može pretpostaviti farmakološko djelovanje potencijalne djelatne tvari. Problem predstavljaju i struktura gram-negativnih bakterija, rizik toksičnosti, kliničke studije te skroman povrat uloženog novca obzirom na zahtjeve multidisciplinarnosti i vremena (38).

Genomski pristup razvoja nije dao željene rezultate, a post-genomske mogućnosti su optimiziranje postojećih antibiotskih klasa kroz modifikacije, kao što su potenciranje aktivnosti (npr. povećanjem afiniteta vezanja za više sličnih proteina koji čine metu, uvođenjem dodatnih interakcija sa ciljnom strukturom, uključivanje dodatne vezne domene, uvođenje dodatnog mehanizma djelovanja te izbjegavanje efluks mehanizama) ili razvoj posve novih klasa antibiotika. Jedna od njih je i razvoj i primjena bakteriofaga u terapijske svrhe.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je sagledati trenutnu situaciju i zahtjeve za razvoj i primjenu bakteriofaga kao potencijala za suzbijanje infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijskim sojevima.

Hipoteze istraživanja su:

1. Mehanizam djelovanja bakteriofaga razlikuje se od standardnih antibiotika, smanjena je mogućnost razvoja rezistencije koja može biti odgođena ili prevladana obzirom da su bakteriofagi biološki sustavi za razliku od kemijskih struktura.
2. Bakteriofagi predstavljaju potencijal za izbjegavanje trenutne krize nedostatka učinkovitih antibiotika uslijed povećavanja bakterijske rezistencije.
3. Optimizacijom i razvojem bakteriofagi mogu poslužiti kao nadopuna antibioticima.

3. MATERIJALI I METODE

- SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

3.1 Bakteriofagi

Bakteriofagi ili fagi su bakterijski virusi građeni od proteinske ovojnice kapside, unutar koje se nalazi nukleinska kiselina kao genetički materijal. Približno su 50 puta manji u odnosu na bakterijsku stanicu. Budući da se kao paraziti ne mogu sami umnažati, bakteriofagi su se, kao i drugi virusi, specijalizirali za unos DNA u bakterijsku stanicu domaćina, čime započinju infekciju koja može imati različiti tijek obzirom na životni ciklus bakteriofaga (39). Poznato je 13 porodica bakteriofaga koje su definirane prema njihovim karakteristikama (Tablica 2).

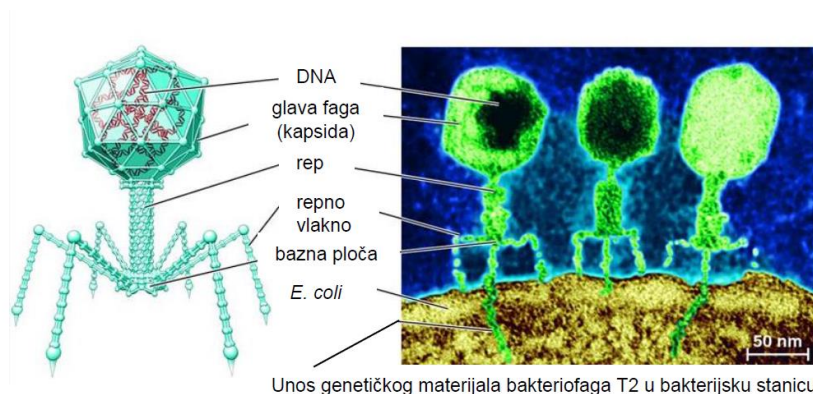
Tablica 2. Karakteristike glavnih skupina bakteriofaga (preuzeto i prilagođeno iz 40,41).

simetrija	nukleinska kiselina	Porodica	rod	vrsta	specifičnost strukture	Infekcija	oslobađanje	primjer
binarna	DNA,ds,L	<i>Red Caudovirales:</i>	15	4950		V ili U	liza	T4,λ,T7
		<i>Myoviridae</i>	6	1243	kontraktilni rep			
		<i>Siphoviridae</i>	6	3011	dugačak rep			
		<i>Podoviridae</i>	3	696	kratak rep			
kubna	DNA,ss,C	<i>Microviridae</i>	4	40		V	liza	ΦX174
	ds,C,T	<i>Corticoviridae</i>	1	3?	kapsida, lipidi	V	liza	PM2
	ds,L	<i>Tectiviridae</i>	1	18	unutarnji lipoproteini	V	liza	PRD1
	RNA,ss,L	<i>Leviviridae</i>	2	39		V	liza	MS2
	ds,L,S	<i>Cystoviridae</i>	1	1	ovojnica, lipidi	V	liza	Φ6
uzvojnička	DNA, ss, C	<i>Inoviridae</i>	2	57	niti ili štapići	U	ekskrecija	fd, L51
	ds, L	<i>Lipothrixviridae</i>	1	6?	ovojnica, lipidi	U	liza	TTV1
	ds, L	<i>Rudoviridae</i>	1	2	sličan TMV	U	ekskrecija	SIRV1
pleomorfna	DNA, ds, C, T	<i>Plasmaviridae</i>	1	6	ovojnica, lipidi	U	ekskrecija	L2
	ds,C,T	<i>Fuselloviridae</i>	1	8?	vretenast, bez kapside	U	ekskrecija	SSV1

C, kružna; L, linearna; S, segmentirana; T, superuzvojnica;
 ss, jednolančana; ds, dvolančana
 V, virulentan - litički; U, umjereni – lizogeni

Veliki broj otkrivenih vrsta bakteriofaga je slične građe koju čini glava i rep, dok su ostali poliedarski, pleomorfni ili filamentozni. Mogu imati genetički materijal u obliku DNA ili RNA. Pojedine vrste karakterizira visoka specifičnost za pojedinu bakterijsku vrstu. Specifičnost uvjetuju molekularne strukture na površini čestice bakteriofaga kojima

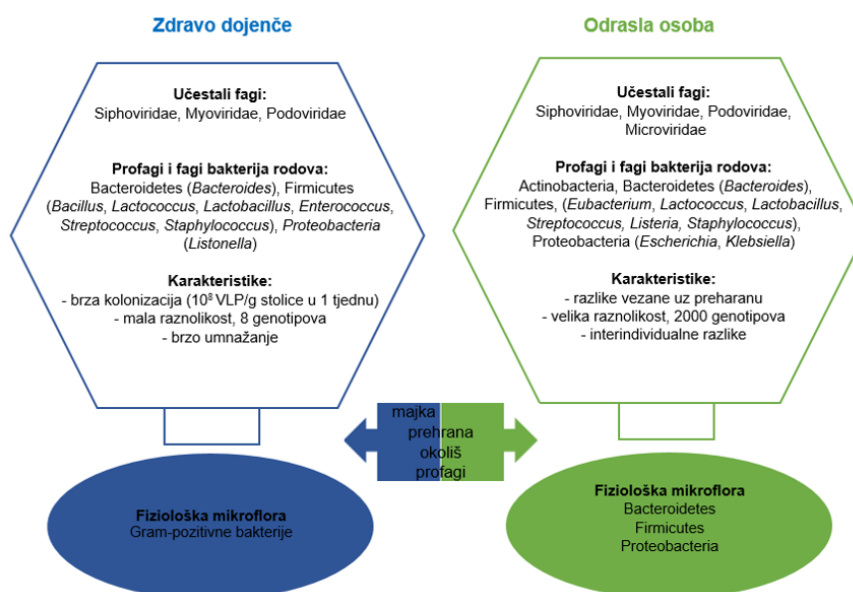
prepoznaju receptore za vezanje na bakterijsku stanicu. Nakon vezanja i unosa nukleinske kiseline u stanicu (Slika 3), obzirom na daljnji tijek životnog ciklusa bakteriofagi se klasificiraju kao litički, lizogeni, pseudolizogeni te bakteriofagi kronične infekcije (6).



Slika 3. Prikaz strukture bakteriofaga T2 (preuzeto i prilagođeno iz 42).

Shematski prikaz strukture T2 bakteriofaga i unos genetičkog materijala bakteriofaga T2 u stanicu *E. coli* (elektronska mikroskopija).

Osim što su rasprostranjeni u okolišu, bakteriofagi su prisutni i u ljudskom organizmu (Slika 4). Već tjedan dana od rođenja mogu se izolirati iz stolice novorođenčeta u koncentraciji 10^8 virusu sličnih čestica (*engl.* viral like particles; VLP) po gramu stolice, stoga se smatra da su sastavni dio ljudskog mikrobioma, zajedno s bakterijama probavnog sustava (43).



Slika 4. Odnos faga i fiziološke mikroflore u novorođenčeta i odraslog čovjeka (preuzeto i prilagođeno iz 43).

3.1.1 Životni ciklus bakteriofaga

Parazitiranjem unutar bakterije domaćina bakteriofagi koriste stanične replikacijske mehanizme i resurse. Ovisno o vrsti slijede dva najčešća životna ciklusa: litički i lizogeni, koji se međusobno razlikuju po stupnjevima (Tablica 3).

Tablica 3. Usporedba litičkog i lizogenog životnog ciklusa bakteriofaga

	Litički ciklus	Lizogeni ciklus
1	vezanje	vezanje
2	penetracija	penetracija
3	biosinteza	profag
4	sazrijevanje	stanična dioba
5	otpuštanje virusnih čestica	biosinteza
6		dozrijevanje
7		otpuštanje virusnih čestica

Oba ciklusa imaju u konačnici isti cilj, a to je umnažanje virusa. Razlika je u tome što tijekom litičkog ciklusa započinje cijeli postupak umnažanja genetičkog materijala i sinteza sastavnica virusne strukture bez odgode (Slika 5), dok se lizogeni ciklus može opisati kao odgođeni litički ciklus, ovisan o nizu faktora. U litičkoj fazi ciklusa u jednoj stanici može nastati i do 100 kopija virusnih čestica prije nego što dođe do lize stanice. Osim navedena dva životna ciklusa neke od bakteriofaga karakterizira pseudolizogeni način razvoja. U ovom slučaju nakon infekcije stanice ne dolazi do lizogenije u smislu dugotrajne integracije u genom domaćina, niti pokretanja mehanizama litičkog ciklusa. Pretpostavljalo se je da pseudolizogenija karakterizira fage bakterijskih stanica koje opstaju u stresnim uvjetima okoline, te da su zato inertni. Nakon što je ovaj način životnog ciklusa faga uočen i unutar bakterijskih stanica koje se normalno razmnožavaju i rastu, znanstvenici su zaključili da pseudolizogeni ciklus ima određeni značaj u interakciji između faga i bakterije domaćina. Moguće je da litički fag tako, zadržavanjem unutar bakterijske stanice, svojim alternativnim životnim ciklusom izbjegava pogubne uvjete okoline (npr. UV zračenje, pH, temperatura). Još jedna prednost je u tome što pseudolizogeni fagi (neki od umjerenih faga) nisu posve ovisni o mehanizmima DNA popravka kako bi izašli iz hibernacije i započeli litičku fazu životnog

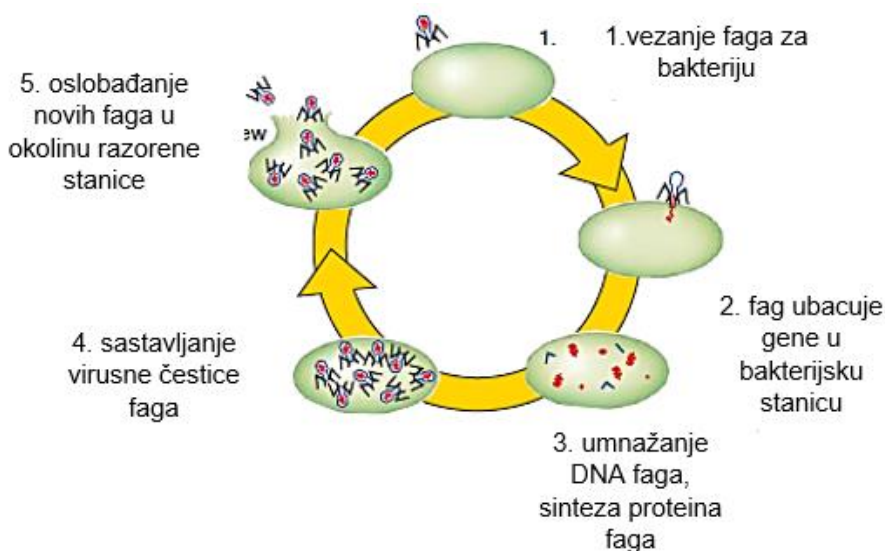
ciklusa. Za bolje razumijevanje i značaj ovog fenomena potrebno je provoditi daljnja istraživanja (45). Specifičan slučaj predstavljaju bakteriofagi kronične infekcije koji ne uzrokuju lizu inficirane stanice već ih karakterizira životni ciklus u kojem se iz stanice oslobađaju pupanjem s membrane. To je karakteristika filamentoznih bakteriofaga kao što je M13. Takav proces otpuštanja čestica faga u okolinu se odvija kronično i ne uništava inficiranu bakterijsku stanicu (46).

3.1.2 Mehanizam litičkog životnog ciklusa bakteriofaga

Bakteriofagi koje karakterizira litički životni ciklus pretpostavljeni su kao najučinkovitiji za razvoj antibakterijskih terapijskih sredstava. To su virulentne vrste bakteriofaga koje uvijek uzrokuju uništenje bakterijske stanice. Primjer takvog bakteriofaga predstavlja bakteriofag T4 (44). Prvi stupanj litičkog ciklusa bakteriofaga predstavlja vezanje na bakterijsku stanicu i unos genetičkog materijala. Vezanje ovisi o specifičnosti strukture receptora koji se nalaze na površini bakterijske stanice. Vezni receptori su prvenstveno proteini unutar strukture peptidoglikana, staničnog zida gram-negativnih bakterija, kao što su porini koji formiraju transmembranske kanale, sekrecijski transportni proteini i slično. Osim navedenog, receptor za vezanje predstavljaju i lipopolisaharidne strukture vanjske membrane sastavljene od lipida A, jezgre i O - lanca polimernih ugljikohidrata. Kod gram-pozitivnih bakterija stanični zid čine peptidoglikan i teihoična kiselina uz veliki udio alanina te zajedno tvore površinske antigene bakterijskih stanica. Tako se na primjer bakteriofagi 3C, 52A, 71, 77 i 79 specifični za *S. aureus*, ireverzibilno vežu na specifičan kompleks peptidoglikana i teihoične kiseline ove bakterijske vrste.

Mnogi bakteriofagi se vežu i na ostale komponente bakterijske stanice kao što su pili, flagele, kapsularni polisaharidi ili pak kapsularni Vi antigen gram-negativnih bakterija. Specifično vezanje bakteriofaga na bakterijsku stanicu čine dva stupnja: reverzibilno i ireverzibilno vezanje, što je uvjetovano fizikalno kemijskim parametrima: temperaturom, pH, prisutnošću određenih iona ili tvari. Na primjer, bakteriofag T4 se repnim nastavcima veže na specifične receptore vanjske membrane stanice. Takvo vezanje uzrokuje konformacijske promjene u građi bakteriofaga čime se aktiviraju i kratki nastavci za vezanje, dolazi do kontrakcije vrata i pri tome struktura nalik igli probija vanjsku membranu te se oslobađa lizozim koji je strukturni dio igle. Lizozim razara peptidoglikanski sloj, a kontakt molekularne strukture igle s fosfatidilglicerolom unutarnje membrane služi kao signalni mehanizam za početak transporta genetičkog materijala iz glave bakteriofaga u bakterijsku stanicu. Obzirom da igla bakteriofaga T4 ne probija unutarnju membranu, nije posve razjašnjen unos genetičkog materijala u stanicu, ali je utvrđeno da pri tom procesu značajnu ulogu ima elektrokemijski potencijal unutarnje membrane bakterijske stanice (47).

Kasna faza razvoja infekcije započinje replikacijom genetičkog materijala. Litički ciklus je reguliran kaskadno, što znači da je ekspresija pojedinih skupina gena uvjetovana prisutnošću odgovarajućeg signala. Prethodna skupina eksprimiranih gena uvijek kodira barem za jedan regulator potreban za replikaciju sljedećeg niza gena (transkripcijska je regulacija stupnjevita). U tom smislu na primjeru bakteriofaga λ , primarno se prepisuju rani geni koji kodiraju za bitne regulatorne proteine *N* i *cro* pomoću mRNA polimeraze bakterijske stanice čijim djelovanjem je uvjetovano daljnje nastajanje regulatornih struktura, odgovornih za prepisivanje srednjih ili kasnih gena. Nakon toga sintetiziraju se replikacijski enzimi, te strukturne jedinice faga. Litički ciklus započinje ukoliko su eksprimirani geni kasne faze. Iako su mnogi autori pretpostavljali kako do lize dolazi uslijed nakupljanja jednog enzima za lizu staničnog zida, ipak je u taj proces uključeno mnoštvo genskih produkata - proteinskih faktora lize. Obzirom na složenu građu stanice gram-negativnih bakterija, liza se odvija u tri koraka kojim se destabiliziraju unutarnja membrana, peptidoglikanski sloj i vanjska membrana. Pri standardnoj lizi ključan je protein holin koji se nakuplja u citoplazmatskoj membrani (stoga je kontrola litičkog procesa na razini membrane) čijom se aktivacijom stvaraju mikronske pukotine, a posljedica toga je da topljivi endolizin može pristupiti i razgraditi peptidoglikanski sloj. Paralelni primjer standardnom mehanizmu lize pretpostavlja aktivnost pinholina koji za razliku od holina djeluje na način da u membrani stvara male heptamerne kanale, pore, kojima se depolarizira membrana. Pinholini su povezani s djelovanjem SAR endolizina koji se nakupljaju u periplazmi kao inaktivni enzimi. Uslijed narušavanja proton-motorne sile djelovanjem pinholina, endolizini prelaze u aktivnu konformaciju te razaraju peptidoglikanski sloj, a treća skupina proteina - spanin kompleks narušava integritet vanjske membrane stanice (48). Na taj način dolazi do lize bakterijske stanice i oslobađanja bakteriofaga u okolni prostor (Slika 5).



Slika 5. Životni ciklus bakteriofaga T2 (preuzeto i prilagođeno iz 44).

3.1.3 Lizogeni ciklus

Vrste bakteriofaga koji nisu virulentni već umjereni, imaju karakteristiku da genetički materijal integriraju u genom inficirane stanice ili se on zadrži u citoplazmi u obliku bakterijskog plazmida. U oba slučaja replikativni mehanizmi bakterije domaćina umnažaju takve genetičke strukture te se one nasljeđuju iz jedne u drugu bakterijsku generaciju. Bakterije inficirane umjerenim bakteriofagima zovu se lizogeni, a bakteriofag integriran u genom domaćina profag. Uslijed promjena u okolišu koje nepovoljno djeluju na bakterijsku stanicu lizogenija se prekida te se inducira litički ciklus. Kako bi se bakterijska stanica oduprla uvjetima koji ugrožavaju njen opstanak, aktiviraju se bakterijski mehanizmi zaštite. Primjer takvog mehanizma je SOS odgovor u kojem sudjeluje niz proteina. Jedan od njih je RecA s važnom regulatornom ulogom za ugroženu stanicu, ali on djeluje i na inaktivaciju CI represora bakteriofaga (49). Odsustvo represora omogućuje izrezivanje genoma bakteriofaga iz genoma bakterije te daljnji tijek litičkog ciklusa.

Životni ciklus faga najbolje je proučen na primjeru bakteriofaga λ koji može imati litički ili lizogeni ciklus. Hoće li se odvijati jedan ili drugi ovisi o koncentraciji proteaza u citoplazmi bakterijske stanice. Transkripcijski aktivator CII bakteriofaga podložan je proteolizi, stoga ukoliko je razina proteaza niska, nakupljeni CII aktivira transkripciju integraze i represora litičkih promotora CI za uspostavu lizogenije. U slučaju visoke koncentracije proteaza CII se degradira i tada glavnu ulogu ima Cro protein koji gasi ekspresiju ranih gena bakteriofaga uslijed čega se uspostavlja litički ciklus.

3.2 Rezistencija bakterija na infekciju bakteriofagima

Problem rezistencije na komercijalno dostupne antibiotike je rezultat prilagodbe bakterijskih stanica u svrhu preživljavanja. Osim na antibiotike, bakterijske stanice su stoga razvile i nekoliko mehanizama kojima se suprotstavljaju infekciji bakteriofagima. Primarni mehanizam je sprječavanje vezanja faga na površinu bakterijske stanice. U tu svrhu se na površini bakterijske stanice u većoj mjeri stvaraju određene molekule. Dostupni su znanstveni radovi koji navode primjere bakterijskih rodova *Lactococcus*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Klebsiella* i *Staphylococcus*, koji ovisno o vrsti, mogu u većoj mjeri na površini stanice stvarati lipide, galaktozni ili ramnozni sloj, proteinski sloj ili kapsulu. Na taj način se maskiraju tj. prikrivaju receptori i postaju manje dostupni za vezanje faga (50,51).

Sprječavanje vezanja faga na bakterijsku stanicu moguće je i uslijed gubitka veznih receptora ili pak manjih promjena u strukturi receptora. Oba slučaja su posljedica nasumičnih mutacija u genomu bakterijske stanice. Kod nekih bakterijskih vrsta genomskom reorganizacijom uslijed mjesno-specifične rekombinacije moguća je izmjena površinskih proteina s velikom učestalošću. Takvu sposobnost ima bakterija *Hemophilus influenzae*. Na isti način *Salmonella typhimurium* ima mogućnost izmjenjivati antigene karakteristike bičeva kao i *E. coli* antigene karakteristike pili. Krajnji je rezultat moguća otpornost na fage, koji se na taj način ne mogu vezati za promijenjene stanične strukture (50).

Značajno je spomenuti i mehanizam kojim fag ili profag koji je inficirao stanicu priječi sekundarnu infekciju ili superinfekciju drugim ili sličnim fagima. Fag uzročnik primarne infekcije nosi u svom genomu informaciju za sintezu proteina koji sprječavaju oslobađanje i unos DNA u stanicu iz kapside faga koji pokušava dodatno inficirati takvu stanicu. Tako se osigurava rezistencija bakterijske stanice od infekcije novim bakteriofagima (52).

Osim mehanizama prevencije adhezije faga na površinske receptore, bakterijske stanice raspolažu restriksijsko-modifikacijskim mehanizmom kojeg čini niz specifičnih restriksijskih endonukleaza. Njihova je uloga uklanjanje strane dvolančane DNA iz citoplazme. Uz endonukleaze bitna je i aktivnost DNA metil-transferaze koja specifično modificira određene dušične baze bakterijskog genoma u mjestu prepoznavanja restriksijske endonukleaze. Na taj način se razlikuje unesena DNA koja podliježe razgradnji od bakterijske koja je zaštićena od endonukleaznog djelovanja. Dodatne mogućnosti genetičkog prerasporeda mogu rezultirati promjenom aktivnosti metil-transferaze što za posljedicu ima promjenu obrasca metilirane DNA. Time se mijenja razina ekspresije različitih gena pa posljedično i bakterijskog fenotipa, a stoga i otpornosti na bakteriofage. Primjer su bakterije iz rodova *Helicobacter pylori*, *Pasteurella haemolytica*, *Neisseria meningitidis* i *Neisseria gonorrhoeae* (50).

Neke od bakterijskih vrsta su razvile i kompleksan sustav prilagodljive imunosti, tzv. sustav CRISPR-Cas (*engl.* clustered regularly interspaced short palindromic repeat). On omogućava bakterijskoj stanici koja je preživjela infekciju fagom da u genom pohrani informaciju o kontaktu s patogenom. Unutar bakterijskog genoma stanice nalaze se ponavljajuće palidromske sekvence između kojih se pohranjuju kratki fragmenti DNA bakteriofaga i strukturni geni za Cas proteine. Transkripcijom navedenih dijelova genoma nastaju kratke interferirajuće RNA molekule na koje se vežu Cas proteini. Takve strukture stupaju u interakciju sa stranom DNA unesenom u stanicu. Značaj Cas proteina je da privlače endonukleaze kako bi se degradirala vezana strana DNA te da sudjeluju u procesu uključivanja novih fragmenata strane DNA unutar CRISPR lokusa u svrhu poboljšanja stanične imunosti (53,54).

Kako bi se oduprle bakteriofagima koji se umnažaju u velikom broju novih čestica, neke bakterijske stanice mogu aktivirati i sustav abortivne infekcije. Takav sustav uključuje restriksijske enzime koji degradiraju sve DNA molekule prisutne u stanici bez obzira na podrijetlo. Krajnji rezultat djelovanja navedenog mehanizma je uništenje i faga i inficirane stanice, ali se povećava mogućnost preživljavanja neinficiranih stanica prisutnih u mikrookolini obzirom da ne nastaju nove aktivne virusne čestice za širenje infekcije (51,55).

Opisan je i novi mehanizam isključivanja bakteriofaga (*engl.* bacteriophage exclusion; BREX) kojim raspolažu neke od bakterija u svrhu zaštite od lizogenih i litičkih faga. Uključuje metilaciju DNA bakterijske stanice i inhibiciju umnažanja DNA faga, ali pri tome se DNA faga ne uklanja niti degradira nukleazama (56).

3.3 Odgovor bakteriofaga na bakterijsku rezistenciju

Prethodno su bili navedeni mehanizmi kojima se bakterije nastoje suprotstaviti infekciji uzrokovanoj bakteriofagima, što za krajnji rezultat u većini slučajeva rezultira smrću bakterijske stanice. Za navedene mehanizme bakteriofagi su razvili protumjere.

Najjednostavnijim se čini mehanizam kojim se zaobilazi bakterijski pokušaj da se zamaskiraju ili prekriju stanični receptori na koje se bakteriofagi vežu. Tako neki fagi u svojoj fenotipskoj strukturi imaju enzime za razgradnju izvanstaničnih polisaharida (*engl.* extracellular polysaccharides; EPS). Njihovo djelovanje probija bakterijske zaštitne strukture kao što je na primjer kapsula i omogućava fagu dostupnost receptora za vezanje. Takav fag je $\phi 15$ koji parazitira na *Pseudomonas spp.* i stoga ima mogućnost razgradnje biofilma (57).

U slučaju mutacije receptora na površini bakterijske stanice fagi mogu prilagođavati svoje proteine koji se vežu na receptor (*engl.* receptor binding proteins; RBP) kako bi prepoznali promijenjene strukture bakterijskog receptora. Dobar primjer je bakteriofag λ koji se veže na receptor LambB bakterije *E. coli*. Ukoliko se uslijed mutacije bakterijskog genoma smanji ekspresija takvog receptora, fag ima mogućnost prilagodbe na način da uz LambB cilja i receptor OmpF. Za navedeno su potrebne četiri mutacije u strukturi repa bakteriofaga. Slične mutacije omogućavaju prepoznavanje promijenjene strukture receptora na površini bakterijske stanice. Tako fag $\phi X174$ koji parazitira na *E. coli* zbog što bolje prilagodbe može imati mutirane proteine za vezanje. Osim toga se dodatno prilagođava fenotip što rezultira učinkovitijim unosom DNA u stanicu kao i količinom virusa koji se oslobađa na kraju infekcije. Isto tako, bakteriofag T7 svojom prilagodbom ima mogućnost zaobići mutacije koje rezultiraju promjenama u lipopolisaharidnoj strukturi stanice na način, da vezanje postaje neovisno o

njima. Navedeni primjeri pokazuju kako su geni faga odgovorni za prepoznavanje ciljane bakterije jedni od najbrže promjenjivih gena uslijed selektivnog pritiska koevolucije bakterija i faga (58). Bakterijski restriksijsko-modifikacijski mehanizam fagi mogu izbjeći ukoliko uslijed mutacije izgube sekvence koje prepoznaju restriksijske endonukleaze. Neki bakteriofagi kao T4 i P1 unutar genoma sadrže i informaciju za sintezu inhibitora restriksijskih enzima. Genom bakteriofaga T7 kodira za sintezu inhibitora koji direktno blokira restriksijske enzime *E. coli*, a stvaranje inhibitora započinje odmah nakon unosa DNA u stanicu. Unos genoma bakteriofaga u stanicu je dvostupanjski. U prvom stupnju se unosi manji dio genoma koji kodira za inhibitor. Gen za inhibitor je mali te stoga nema restriksijska mjesta, a nakon uspješne sinteze inhibitora ostatak se genoma bakteriofaga uspješno unosi u stanicu. Restriksijsko djelovanje enzima na genom bakteriofaga se zaobilazi i modifikacijom DNA. Umjesto uobičajenih dušičnih baza uvode se zamjenske, timin se zamjenjuje s 5-hidroksimetiluracilom ili citozin s hidroksimetilcitozinom. Dodatno se na modificirane baze mogu vezati i ugljikohidratni ostaci (51).

Novije studije, dostupne u zadnjih nekoliko godina donose rezultate koji pokazuju kako bakteriofagi mogu uspješno prevladavati i kompleksan sustav prilagodljive imunosti CRISPR-Cas kojim raspolaže veliki broj bakterijskih vrsta. Geni bakteriofaga kodiraju za inhibitore bakterijskog sustava prilagodljive imunosti te onemogućuju njegovu aktivnost ne samo protiv genoma bakteriofaga koji inficira takvu bakterijsku stanicu nego i strane molekule DNA koja može ući u stanicu na neki drugi način. Osim što bakteriofagima omogućava rezistenciju, takav mehanizam ima i značajnu ulogu u horizontalnom prijenosu gena među bakterijama (59).

Bakterije i bakteriofagi se neprestano međusobno natječu za opstanak razvojem novih i prevladavanjem postojećih mehanizama rezistencije. To predstavlja dobru osnovu koja bi se mogla iskoristiti za razvoj terapije ukoliko se optimiziraju drugi zahtjevi za primjenu bakteriofaga. Za razliku od bakteriofaga, primjena antibiotika iziskuje s vremenom prilagodbu strukture djelatne tvari ili primjenu posve nove molekule čiji je razvoj vrlo dugotrajan postupak, zato čovjek nije u mogućnosti u svakom trenutku imati odgovor na bakterijsku evoluciju i s njom povezanu antibiotsku rezistenciju.

3.4 Dosadašnja komercijalna primjena bakteriofaga

Pripravci bakteriofaga su do sada našli komercijalnu primjenu u poljoprivredi, u prehrambenoj industriji, kao čimbenici biokontrole i sigurnosti te kao dijagnostičko oruđe. Obzirom da su specifični za pojedine bakterijske vrste u svrhu ispitivanja *in vivo* učinkovitosti,

za biokontrolu ili terapiju koristi se većinom jedna vrsta faga. U slučaju veće komercijalne primjene, kako bi se proširio spektar djelovanja na različite bakterijske vrste, potrebno je koristiti pripravke koji sadrže više faga u formulaciji (60). Osnove za istraživanje i pretpostavljenu primjenu bile su sljedeće činjenice: bakteriofagi su u prirodi sveprisutni i imaju ulogu u kontroli bakterijskih populacija, prisutni su u ljudskom i životinjskim organizmima unutar kojih, s ostalim mikroorganizmima čine kompleksan biosustav, neprestano se unose u organizam korištenjem neobrađene hrane te vodom koja po mlilitru može sadržavati 2×10^8 čestica faga, što rezultira njihovom prisutnošću u crijevima, zubnim naslagama te slini (61,62).

Američka agencija za hranu i lijekove (*engl.* Food and Drug Administration; FDA) je 2006. godine odobrila za primjenu preventivni pripravak ListShield™ za ograničavanje rasta i kontaminacije hrane bakterijom *Listeria monocytogenes*. Pripravak sadrži koktel litičkih faga te se može dodati direktno u hranu (63). Odobrenjem navedenog proizvoda bakteriofagi su po prvi puta dobili status: općenito prepoznati kao sigurni (*engl.* Generally Recognized As Safe; GRAS). Osim toga odobreni su i preparati za dekontaminaciju živih životinja protiv bakterija *E. coli* i *Salmonella* kao i preparati kojim se tretiraju voće i biljke kako bi se spriječilo propadanje i potencijalna trovanja hranom uzrokovana bakterijama (62). Neki od odobrenih pripravaka navedeni su u tablici 4.

Tablica 4. FDA odobreni pripravci koji sadrže fage za primjenu u gotovoj hrani
(preuzeto i prilagođeno iz 62).

Pripravak	Regulatorno odobrenje	Primjena
Agryphage Omnilytics SAD	(2005) EPA primjena u poljoprivredi	u poljoprivredi za voće i povrće
ListShield™ Intralix, Inc. SAD	(2006) FDA i USDA odobrena direktna primjena na hranu	hrana spremna za uporabu (meso), morski plodovi, površine i okolina koja je u kontaktu s hranom
LISTEX™ Micros EBI Food Safety Nizozemska	(2006) FDA, USDA odobrenje GRAS (2007) EFSA, Health Canada, BAG (Švicarska), FSANZ (Australija)	meso, meso spremno za uporabu, riba, sir
Ecoshield Intralix, Inc. SAD	(2011) FDA odobren kao sigurno i prikladno antibakterijsko sredstvo	crveno meso za daljnju obradu
SalmoFresh Intralix, Inc. SAD	FDA odobrenje GRAS	piletina, riba i morski plodovi svježe i obrađeno voće i povrće

Europska agencija za sigurnost hrane (*engl.* European Food and Safety Authority; EFSA) 2009. godine je odobrila preparate faga kao dodatke organski uzgojenoj hrani, a 2012. godine slično regulatorno tijelo Australije i Novog Zelanda odobrilo je primjenu faga u procesuiranju hrane (64).

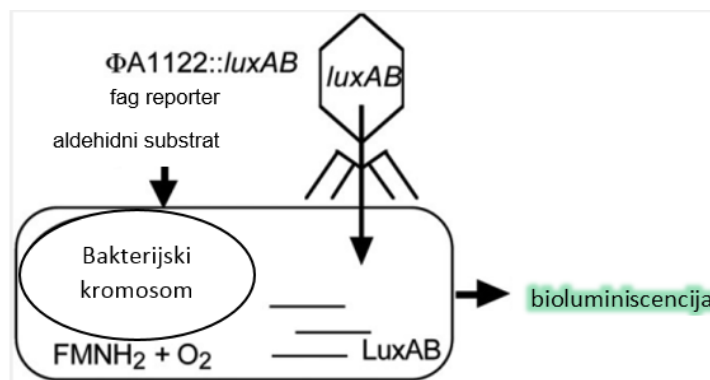
3.5 Moguće primjene bakteriofaga u svrhu suzbijanja bakterijskih infekcija

3.5.1 Upotreba faga u dijagnostičke svrhe

Specifičnost faga za pojedine domaćine omogućuje njihovo korištenje za tipizaciju bakterijskih vrsta kao i što bržu detekciju patogenih bakterija. U navedene svrhe se mogu koristiti fagi divljeg tipa ili fagi poboljšani genetičkim inženjerstvom. Određivanje bakterijske vrste na jednostavan način, moguće je nanošenjem različitih vrsta faga iz banke bakteriofaga na ploče s naciepljenom bakterijskom kulturom koju se želi identificirati. Prisutnost plakova zbog liziranih bakterija na podlozi upućuje na bakterijsku osjetljivost prema poznatom fagu, što navodi na zaključak o kojoj je bakterijskoj vrsti riječ. Takvim bankama faga moguće je detektirati brojne vrste patogenih bakterija kao što su *Bacillus*, *Burkholderia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Pasteurella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* i *Yersinia*. Banke faga nalaze se pohranjene u ustanovama kao što je International Federation of Enteric Phage Typing (<http://www.hpa.org.uk/cfi/lep/sru.htm>) i National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada (<http://www.phac-aspc.gc.ca>). U slučaju primjene prilagođenih ili genetički izmjenjenih faga, na strukturne dijelove bakteriofaga kao što su rep, repna vlakna, kapsida ili nukleinska kiselina mogu se vezati molekule fluorescentne boje.

Osim navedenog, moguće je koristiti i tzv. reporter gen fuzioniran unutar genoma bakteriofaga za primjenu. Takav reporter gen kodira za funkcionalni protein. Ukoliko je infekcija uspješna, translacijom reporter gena nastaju proteini koje se može detektirati određenim metodama na temelju njihovih karakteristika. Primjer takvih proteina su zeleni fluorescentni protein (*engl.* green fluorescent protein) kojeg karakterizira fluorescencija, luciferaza koju karakterizira bioluminiscencija ili beta-galaktozidaza čija se aktivnost može detektirati kolorimetrijski. Detekcija uspješnosti infekcije bakterijske stanice poznatim fagom moguća je i praćenjem otpuštanja specifičnih staničnih komponenata nakon specifične lize. Neke od njih su adenosin trifosfat (ATP), adenilat-kinaza kao i drugi unutarstanični enzimi čiju aktivnost je moguće pratiti. Slika 6. prikazuje jednu od mogućnosti uporabe faga za identifikaciju bakterija koje su patogene za ljude. Osim navedenog, također je moguće

koristiti genetički modificirane fage kojima se promijene karakteristike kapside, te su razvijene metode za detekciju takvih faga nakon uspješne lize. Dostupni su i komercijalni kitovi za određivanje patogena iz uzoraka hrane, vode, sputuma, krvi, seruma i urina. Za kliničku dijagnostiku dostupni su kitovi kojima se razlikuje MRSA od sojeva stafilokoka koji su osjetljivi na meticilin, kao i sojeve *Mycobacterium tuberculosis* otporne na rifampicin, a moguća je i detekcija virusa npr. virus hepatitisa B (66, 67).



Slika 6. Prikaz jedne od mogućnosti za korištenje faga za identifikaciju patogena

Yersinia pestis (preuzeto i prilagođeno iz 65).

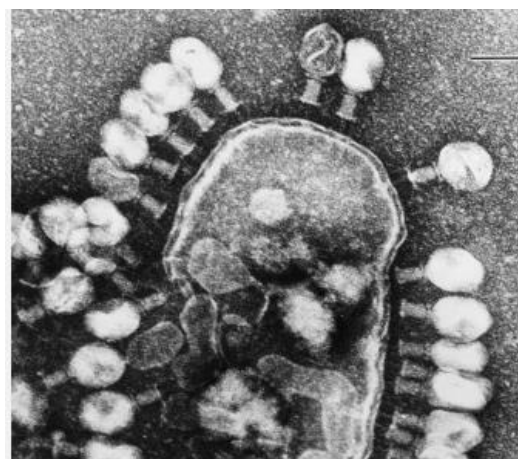
Bakterijski *luxAB* reporter geni su integrirani u genom bakteriofaga za dijagnostiku uzročnika kuge, takav fag je $\phi A1122::luxAB$ reporter fag. U slučaju da se u mediju za kultivaciju nalazi bakterija *Yersinia pestis*, fag reporter inficira bakterijsku stanicu. Korištenjem staničnih mehanizama transkripcije i translacije producira se luciferaza (LuxAB). Enzim u prisutnosti reduciranog flavin mononukleotida (FMNH₂), kisika i egzogeno dodanog aldehida katalizira složenu reakciju pri čemu nastaje jedan od produkata koji emitira svjetlost (maksimum emisije na približno 490 nm).

3.5.2 Terapija bakteriofagima

Za ovu svrhu primjene pretpostavljeni su litički fagi koji nakon vezanja (Slika 7.a) i infekcije specifično uništavaju ciljanu patogenu bakteriju u vremenu od 30-40 minuta. Lizom stanice se oslobađa veliki broj novonastalih virusnih čestica (Slika 7.b) koje mogu inficirati ostale prisutne bakterije iste vrste (eksponencijalno umnažanje). Prva primjena faga za suzbijanje bakterijske infekcije datira iz 1920. godine, a u većem dijelu Europe je zanemarena zbog razvoja industrije antibiotika, dok su u bivšem SSSR-u, Bliskom Istoku kao i nekim dijelovima Europe izolirani i klinički korišteni brojni sojevi, a istraživanja su provođena znatno duže zbog manje dostupnosti antibiotika (70).

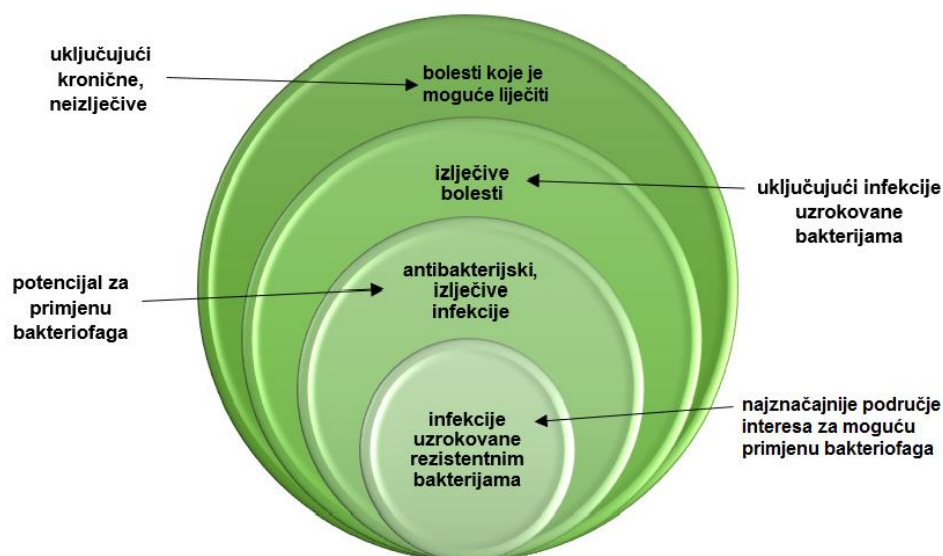


Slika 7.a T4 fagi vezani na površini *E. coli*
(preuzeto i prilagođeno iz 68).



Slika 7.b Bakteriofag lizira *E. coli*
(preuzeto i prilagođeno iz 69).

Osim navedenog, u većini slučajeva izvještaji o primjeni bakteriofaga kao terapijskih sredstava sadržavali su rezultate prikazane kao kvalitativne podatke, bez dovoljno kliničkih detalja ili kontrola u razvoju terapije (71). Pretpostavljeni potencijal primjene u medicini prikazan je na slici 8. Za samu primjenu moguća su dva pristupa kako bi se postigao odgovarajući titar faga koji se održava tijekom antibakterijske terapije. Aktivni tretman podrazumijeva dostavu faga u titru koji sam po sebi nije dostatan za potpuno uništenje prisutnog uzročnika. Pri tome parametar višestrukosti infekcije (*engl.* multiplicity of infection; MOI) - omjer između broja dodanih čestica infektivnog virusa i poznatog broja stanica u kulturi iznosi ≤ 1 te znači da dostavljeni fagi brojčano ne bi nadmašili broj prisutnih bakterija, ali se očekuje aktivno umnažanje na mjestu djelovanja. Postoji razlika između teorijske i stvarne vrijednosti MOI. Teorijska vrijednost MOI ne uzima u obzir vrijeme difuzije, agregacije ili gubitaka faga. Infekcija mora biti litička i produktivna, a ciljane bakterije mora biti prisutna u broju koji podržava umnažanje faga. Fag mora imati što bržu izmjenu generacija u titru, kojom u konačnici brojčano nadmaši i uništi prisutne bakterije. Za razliku od aktivne terapije, pasivni tretman u svrhu sprječavanja infekcije se oslanja na dostavu početnog titra faga koji je po broju veći u odnosu na broj prisutnih bakterija, a time se želi postići učinak infekcije svih bakterijskih stanica uz vrijednost $\text{MOI} \geq 10$ (73). U tu svrhu je uz MOI značajno definirati i ostale parametre za procjenu učinka bakteriofaga, ne samo na bakterijsku stanicu već i na makroorganizam, što će biti spomenuto kasnije.



Slika 8. Područje potencijalne primjene bakteriofaga u medicini

(preuzeto i prilagođeno iz 72).

Za očekivati je komercijalnu primjenu bakteriofaga prvenstveno za tretman infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijama na antibiotike

3.5.3 Eksperimentalni podaci o primjeni bakteriofaga u terapijske svrhe

Dostupni radovi izvještavaju o eksperimentalnim podacima primjene bakteriofaga u svrhu kontrole sistemskih infekcija modelnih organizama, od 80-ih godina prošlog stoljeća do danas. Modeli su razvijani za različite bakterije, a primjer nekih su višestruko rezistentni sojevi bakterija: *P. aeruginosa*, *E. coli* i *K. pneumoniae*, vankomicin-rezistentni *E. faecium*, *S. aureus* i *Chronobacter turicensis*. Većina sojeva su direktno izolirani iz pacijenata. Najčešće je korišten model miša iako su korišteni i zečevi, telad, prašćići, pilići i štakori. Modeli infekcija kojima se ispitala učinkovitost bakteriofaga su bili sistemska infekcija s bakterijemijom, infekcije središnjeg živčanog sustava, pluća, apscesi jetara, enteritisi, infekcije mokraćnog sustava, kože i rana. U većini radova koji se bave modelom sistemske bakterijemije, put primjene ispitivanog pripravka faga je parenteralni, točnije intraperitonealna injekcija (6).

Parenteralnom primjenom nastoji se postići što je moguće veća distribucija faga putem cirkulacije, uz napomenu da način primjene (intramuskularno, subkutano ili intraperitonealno) ima značajan utjecaj na uspješnost terapije. Znanstvenici su ispitivanjem učinkovitosti primjene faga u suzbijanju lokalne i sistemske infekcije uzrokovane bakterijom *Vibrio vulnificus* na mišu, zaključili kako je intravenozna primjena najučinkovitija za dostavu u tijelo inficirane životinje, što je slučaj i prilikom primjene većine lijekova koje je moguće primijeniti na taj način (74). Osim dostupnih, razvijaju se i novi modeli za procjenu učinka bakteriofaga pri suzbijanju infekcije. Takav primjer je modelni organizam ličinke dudovog svilca koji se koristi i kod ispitivanja učinkovitosti antibiotika.

Model ličinke dudovog svilca uspoređen je s modelom miša za ispitivanje učinkovitosti bakteriofaga protiv MRSA te je potvrđen kao korisna alternativa modelima sisavaca (75). Nekoliko je novijih studija u kojima su fagi primijenjeni parenteralno. Tako su Takemura-Uchiyama i suradnici ispitivali učinkovitost virulentnog faga S13' na MRSA. Modelni organizam bio je miš kojem je inducirana plućna infekcija sa smrtonosnom sepsom. Nakon 5 dana stopa preživljavanja jedinki koje su primile pripravak faga bio je 67 % u odnosu na 10 % u skupini koja nije primila pripravak faga, a takav trend se zadržao i 10. dana. Rezultati su pokazali značajnije preživljavanje miševa koji su 6 h od infekcije primili intraperitonealno 0,2 ml pripravka faga čija je koncentracija bila $5,0 \times 10^{10}$ vijabilnih jedinki faga koje formiraju plak (*engl.* plaque-forming units; PFU)/mL. Potvrđena je prisutnost te umnažanje faga u krvi, plućima i jetri što upućuje na uspješnu distribuciju u organizmu, na mjestima gdje je detektirana bakterija. Ispitana je i sigurnost primjene pripravka te nisu ustanovljeni negativni učinci na tretirane životinje. Praćeni su bili indikatori ozbiljnosti infekcije, citokini IL-6 i TNF- α . Oba su pokazivala pad u koncentraciji u odnosu na kontrolnu skupinu (TNF- α ne toliko značajno koliko IL-6). Stoga su autori zaključili kako primjena faga smanjuje ozbiljnost infekcije i poboljšava izgled za preživljavanje. Iako je fag omogućio preživljavanje miševima koji su ga primili te je kod njih značajno smanjena koncentracija patogena u jetri, slezeni i krvi, u plućima nije dobiven tako značajan pad u broju prisutnih bakterija u usporedbi s kontrolnom skupinom, što autori tumače mogućim nedostacima tijekom obrade modela (76).

Idući primjer predstavlja ispitivanje učinkovitosti litičkog bakteriofaga KP 1513 u suzbijanju infekcije uzrokovane višestruko rezistentnim sojem bakterije *K. pneumoniae*, izoliranog iz bolesnika s upalom pluća. Ispitivanje je provedeno također na mišu kao modelnom sustavu letalne pneumonije. Primarno je potvrđena učinkovitost faga *in vitro*, a nakon toga je modelni organizam inficiran rezistentnim bakterijskim sojem intranazalnim unosom 20 μ L (2×10^8 CFU) u tu svrhu pripremljene kulture. 2 h nakon infekcije miševa

podjeljenih u skupine, intranazalno su aplicirani pripravci faga u količini od 2×10^9 , 2×10^8 i 2×10^7 PFU. Smrtnost miševa koji nisu primili pripravak faga bila je 100 %. Skupina miševa koja je primila 2×10^9 PFU pokazala je najveći trend preživljavanja od 80%. Skupina koja je primila 2×10^8 PFU preživljavanje jedinki je bilo 60 %, dok je svega 30 % jedinki preživjelo iz skupine koja je primila količinu od 2×10^7 PFU. Postoci preživljavanja su određeni 24 h nakon infekcije, a isti rezultat je zabilježen i nakon 72 h. Osim što je dokazana učinkovitost primjene u svrhu značajnog smanjenja broja patogenih bakterija u organizmu, autori izvještavaju o povezanosti primijenjenih faga sa smanjenjem intenziteta upalnog procesa modelnog organizma, što je dokazano pregledom zahvaćenog plućnog tkiva te značajnim smanjenjem koncentracija citokina IL-6 i TNF- α *in vivo* (77).

Model penumonije miša korišten je i za ispitivanje učinkovitosti terapije dvije vrste bakteriofaga, 536 P1 i 536 P7, te usporedbe s učinkom antibiotika ceftriaksona na visoko virulentni soj *E. coli* 536. Autori izvještavaju da je učinak bakteriofaga u suzbijanju infekcije uspješan kao i učinak antibiotika, sa 100 %-im preživljavanjem miševa. Također, potvrđuju da mogućnost prilagodbe i izolacije optimalnog bakteriofaga značajno doprinosi učinkovitosti suzbijanja infekcije (78).

Za razliku od prethodnih primjera gdje su korišteni miševi, za ispitivanje učinkovitosti u suzbijanju infekcije uzrokovane višestruko rezistentnim sojem *E. coli* S242 koji uzrokuje sepsu i meningitis, kao modelni organizam korištena je mladunčad štakora. Patogeni bakterijski soj je izoliran iz novorođenčeta s fatalnim meningitisom (najteža infekcija koju uzrokuje *E. coli* i koja ubija četvrtinu zaraženih pojedinaca). Model sepse je induciran intraperitonealnim unosom patogenog bakterijskog soja, a meningitisa intratekalnim unosom istog soja. Od tri vrste bakteriofaga izolirana iz okoliša, pročišćen je i optimiziran soj EC200^{PP} koji je pokazao najširi spektar učinkovitosti (lizira 7 od 63 sojeva *E. coli*) kao i dobru distribuciju s farmakokinetičkog aspekta (najvišu koncentraciju 10^7 PFU/mL doseže u krvi 2 h nakon intraperitonealnog unosa, a nakon 24 h još se može odrediti u koncentraciji od 10^3 PFU/mL). Prisutnost faga je detektirana u slezeni i bubrezima u većoj koncentraciji, a utvrđeno je i da prolaze krvno moždanu barijeru. Za subkutanu primjenu određeno je da se vršna koncentracija faga u krvi postiže 6 h nakon primjene te iznosi 10^5 PFU/mL. Životinje koje su korištene za model sepse tretirane su pripravkom faga 7 h ili 24 h nakon infekcije unosom 10^8 PFU. Svi štakori su preživjeli nakon tretmana pripravkom faga primijenjenog nakon 7 h od infekcije te su hemokulture bile negativne, dok je primjena tretmana nakon 24 h rezultirala preživljavanjem 50 % jedinki do petog dana praćenja. Zanimljiva je pojava bakterijskih mutanata u krvi štakora tretiranih 24 h nakon infekcije. Mutanti su daljnjim ispitivanjem pokazali da imaju značajno umanjenu virulenciju, što je posljedica tretmana s EC200^{PP}.

Model meningitisa pokazao je kako se intraperitonealnim unosom 10^8 PFU EC200^{PP} faga 1 h nakon injektiranja 200 CFU patogena u cisternu magnu postiže sterilnost likvora nakon 24 h. Primjena bakteriofaga sa zakašnjenjem od 7 h također je osigurala preživljavanje ispitivanih jedinki iako je 60 % kultura likvora upućivalo na prisutnost patogena (petog dana su uz normalne kolonije detektirani i mutanti). Ponavljanjem postupka uz primjenu koncentracije 2×10^6 bakterija (kao što je slučaj kod meningitisa ljudi) i intraperitonealnim unosom 10^8 PFU EC200^{PP} faga 1 h nakon infekcije sve su životinje preživjele u periodu praćenja bez pojave bakterijemije. Pri tome koncentracije faga su bile 10 puta veće u likvoru nego u krvi, uslijed čega je zaključeno da fag, iako teže, ipak prolazi krvno likvorsku barijeru te omogućuje preživljavanje pri klinički značajnoj koncentraciji bakterijskih stanica (79).

Osim parenteralne primjene značajni su i drugi mogući putevi primjene bakteriofaga u svrhu suzbijanja infekcija. Oralnom primjenom bi se djelovalo primarno na uzročnike alimentarnih infekcija kao i druge gastrointestinalne patogene. Takav primjer predstavlja provedeno ispitivanje učinkovitosti bakteriofaga protiv enteroagregativne *E. coli* (EAEC). Učestalost pojavnosti dijareje kod djece u zemljama u razvoju te kod putnika u tranzitu koju uzrokuje ovaj intestinalni patogen je u porastu. Često je prisutan u probavnom sustavu ljudi kliconoša. Na modelu intestinalne kolonizacije miša ispitana je učinkovitost koktela tri virulentna faga koji su smanjili prisutnost patogena u crijevima, a pri tome nisu imali utjecaj na ostalu crijevu floru (80).

Druga skupina autora provela je nedavno *in vivo* ispitivanje na miševima kojim se željelo utvrditi postoji li imunosni odgovor (upala) organizma na oralni unos terapijskih doza faga T7 pretpostavljenog za suzbijanje infekcije uzrokovane *E. coli* (ATCC 8739). Osim skupine koja je primala fage druga skupina je primala mišji norovirus (MNV) koji nije patogen za miševe. Dobiveni rezultati su pokazali da je T7 uzrokovao minimalan upalni odgovor, slabiji od odgovora na prisutan MNV. Histološkom analizom crijeva miševa nisu uočene nikakve promjene. Stoga su znanstvenici zaključili kako je T7 siguran za oralnu primjenu (81) kao i T4 za intraperitonealnu primjenu o kojoj su izvjestili Miernikiewicz i suradnici 2013. (82).

Uz navedene podatke, postoje i izvještaji o profilaktičkoj primjeni koktela bakteriofaga u Gruziji. Sredinom prošlog stoljeća 17 044 djece je primilo oralni koktel faga protiv *Shigella* spp. a dobiveni podaci su pokazali 3,8 puta veću incidenciju dizenterije u kontrolnoj skupini koja nije primila koktel (83).

Gruzijski institut Eliava se u prošlosti intenzivno bavio problematikom bakteriofaga. Prikupljena iskustva su preuzele ruske farmaceutske kuće koje unutar države kroz sustav ljekarni omogućuju dostupnost koktela bakteriofaga za različite infektivne bolesti.

Jedan je takav pripravak faga za oralnu primjenu „ColiProteus“ protiv bakterija *E.coli* i *Proteus*. Prema dostupnim podacima s interneta farmaceutska tvrtka „Microgen“ ga trenutno proizvodi i plasira na rusko tržište (Slika 9).

[Home](#) / [Products](#) / [Bacteriophages](#) / E.coli-Proteus bacteriophage

E.coli-Proteus bacteriophage



TRADE NAME
E.coli-Proteus
bacteriophage

DOSAGE FORM
Solution for oral, local and
external administration

SHELF LIFE
2 years

MANUFACTURER
NPO Microgen, 44,
Gruzinskaya str., Nizhny
Novgorod, Nizhny
Novgorod region, 603050
Russia

Presentation

Solution for oral, local and external administration, 20 ml or 100 ml vials. Eight 20 ml vials or one 100 ml vial in each cardboard package with a package insert.

Ingredients

The drug is a mixture of sterile filtrates of phage lysates of *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* and enteropathogenic *Escherichia coli* of different serogroups, the most important in the etiology of inflammatory and enteric diseases.

Excipients:

Preservative - 8-hydroxyquinoline sulfate monohydrate - 0.0001 g/ml (estimated content);
or 8-hydroxyquinoline sulfate monohydrate - 0.0001 g/ml (equal to 8-hydroxyquinoline sulfate, estimated content).

Indications

Treatment and prevention of purulent inflammatory and enteric diseases, dysbacteriosis caused by bacteria *Proteus* and enterotoxigenic *Escherichia coli* in the complex therapy:

- diseases of the ear, nose, throat, respiratory tract and lungs - inflammation of the sinuses, middle ear, tonsillitis, pharyngitis, laryngitis, tracheitis, bronchitis, pneumonia, pleurisy;
- surgical infections - festering wounds, burns, abscesses, pyogenic cellulitis, boils, carbuncles, hidradenitis, felon, perirectitis, mastitis, bursitis, osteomyelitis;
- urogenital infections - urethritis, cystitis, pyelonephritis, colpitis, endometritis, salpingo-oophoritis;
- enteric infections - gastroenterocolitis, cholecystitis, intestinal dysbacteriosis;
- Generalized septic diseases;
- purulent inflammatory diseases of newborns - omphalitis, pyoderma, conjunctivitis, gastroenterocolitis, sepsis, etc.;
- Other diseases caused by *Escherichia coli* and *Proteus*.

An important condition for the effective phage therapy is a preliminary determination of the phage sensitivity of the pathogen.

Slika 9. Primjer oglašavanja pripravka bakteriofaga dostupno na službenoj internetskoj stranici tvrtke Microgen (*preuzeto i prilagođeno iz 84*).

Osim navedenog, ista tvrtka na tržište stavlja i nekoliko drugih pripravaka bakteriofaga za ljudsku primjenu (Tablica 5).

Tablica 5. Neki od pripravaka bakteriofaga na ruskom tržištu

(preuzeto i prilagođeno iz 85).

Pripravak (naziv na engleskom jeziku)	Deklarirano djelovanje
Streptococcus bacteriophage	specifična liza streptokoka
<i>E. coli</i> bacteriophage	specifična liza <i>E. coli</i>
Complex pyobacteriophage	litičko djelovanje na stafilokok, streptokok i enterokok, <i>Proteus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>P. aeruginosa</i> i <i>E. coli</i>
<i>Klebsiella</i> purified polyvalent bacteriophage	litičko djelovanje <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozaenae</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i>
Sextaphag polyvalent pyobacteriophage	polivalentni pripravak protiv stafilokoka, streptokoka i enterokoka, te vrsta <i>Proteus</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> i <i>E. coli</i>
Intesti-bacteriophage	Specifična liza: <i>E. coli</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , Enterococcus, stafilokok, <i>P. aeruginosa</i> te vrsta iz roda <i>Salmonella</i> i to <i>S. flexneri</i> (serovar 1, 2, 3, 4, 6), <i>S. sonnei</i> , <i>S. paratyphi</i> A, <i>S. paratyphi</i> B, <i>S. typhimurium</i> , <i>S. infantis</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. oranienburg</i> , <i>S. enteritidis</i>

Obzirom da u Europi i SAD nema podataka o sastavu i sigurnosti primjene pripravka „ColiProteus“, McCallin i suradnici su ga odlučili ispitati. Elektronskom mikroskopijom i metagenomskom analizom ustanovili su u sastavu prisutnost 17 vrsta bakteriofaga, od kojih su najzastupljeniji bili fagi slični fagima T7, T4 i T1. Značajno je istaknuti kako drugi fag po zastupljenosti nije bilo moguće identificirati, a također je u manjoj mjeri ustanovljena prisutnost faga za koje se zaključuje da nisu namjerno dodani kao dio formulacije. Sigurnost je sagledana s dva aspekta. Dostupne baze podataka koje sadrže do sada poznate neželjene gene korištene su za utvrđivanje podudarnosti sa sekvencama genoma faga u pripravku. Ispitivanjem podudarnosti sekvenci nisu dobiveni zabrinjavajući rezultati koji bi narušili sigurnost primjene.

Postoje i podaci o provedenom manjem sigurnosnom istraživanju na zdravim dobrovoljcima u Bangladešu: pet odraslih osoba, petero djece u dobi od 5-10 godina i petero djece ispod pet godina starosti. Praćeni su biokemijski i hematološki parametri, a iako nisu svi rezultati bili u granicama referentnih intervala, autori zaključuju da primjena visokih doza bakteriofaga nije uzrok tome, zato što su takve vrijednosti bile zabilježene i prije početka

tretmana. Također, pojavu nekih simptoma tijekom ispitivanja autori ne povezuju s primjenom faga, već ih povezuju s uvjetima života ispitanika. Tijekom oralne primjene nije uočena pojava osipa ili alergijskih reakcija, a fagi nisu otkriveni u krvi kao niti protutijela na fage u serumu (86).

Za suzbijanje gastrointestinalnih infekcija i primjene bakteriofaga na usta značajan limitirajući čimbenik je pH želuca koji može uzrokovati inaktivaciju bakteriofaga, ovisno o njegovoj osjetljivosti. Da bi se izbjegao problem pada u aktivnosti pripravka moguće je primijeniti dostavne sustave te se tako za dostavu faga na željeno mjesto djelovanja može primijeniti uklapanje mikroinkapsulizacijom, pomoću npr. alginata, maltodekstrina ili pektina (87, 88).

Još jednu od važnijih mogućnosti primjene svakako predstavlja dostava bakteriofaga u pluća putem aerosola. To ima poseban značaj za imunokompromitirane bolesnike ili one koji pate od cistične fibroze ili kronične granulomatozne bolesti. U većini slučajeva kod takvih pacijenata dolazi do komplikacija uslijed kolonizacije patogenih bakterija kao što su *Burkholderia cepacia* kompleks ili *Pseudomonas*.

Novijim istraživanjem koje su proveli Semler i suradnici 2014. godine pokušala se procijeniti učinkovitost dostave virulentnih faga aerosolom u pluća miševa kod kojih je inducirana infekcija visokorezistentnim sojevima *Burkholderia cenocepacia* kao dominantnog predstavnika navedenog bakterijskog kompleksa. U radu su korištena dva bakterijska soja visoko rezistentna na veliki broj antibiotika. Sojevi su izolirani od pacijenata koji boluju od cistične fibroze. Ispitivano je pet različitih vrsta bakteriofaga koji bi bili najbolji izbor za suzbijanje infekcije, a najboljeg kandidata karakterizira uspješno umnažanje u visokom titru $\geq 10^9$ PFU/mL i zadržavanje litičke aktivnosti primjenom u modelnom organizmu.

Dobiveni rezultati su pokazali da pet različitih bakteriofaga koji su zasebno primijenjeni jednokratno, jedan dan nakon infekcije smanjuju broj prisutnih bakterija u plućima od 1,5 do 5 redova veličine. Takav rezultat je u nekim slučajevima sličan najboljem terapijskom učinku koji se može postići uporabom dostupnih antibiotika. Uočen je pad u broju čestica faga kada se usporedi njihov broj u početku, 2 h nakon aplikacije i trećeg dana. Određivanjem količine prisutnih faga u plućima na mjestu djelovanja autori su potvrdili uspješnost njihovog umnažanja. Fag KS12 koji je uzrokovao pad u broju bakterijskih stanica soja *B. cenocepacia* K56-2 za pet redova veličine korišten je za usporedbu učinkovitosti intraperitonealne dostave faga, u odnosu na aerosolnu dostavu. Nakon 2 h od intraperitonealne primjene broj faga u plućima je iznosio 5×10^7 PFU po g plućnog tkiva dok je za dostavu aerosolom nakon istog vremena ustanovljen titar od 2×10^4 PFU po g plućnog

tkiva. U obje skupine inficiranih životinja, kojima su fagi dostavljeni intraperitonealno ili aerosolom, dva dana nakon tretmana prisutan broj bakteriofaga po životinji bio je isti i iznosio je 1×10^4 PFU. Broj bakterija prisutnih u plućima bio je sličan u kontrolnoj skupini i skupini kojoj su fagi primijenjeni intraperitonealno, dok je kod skupine koja je primila aerosolnu terapiju pad u broju bakterijskih stanica bio dva reda veličine u usporedbi sa kontrolnim uzorcima.

Navedeni rad potvrdio je kako broj primijenjenih faga kao i interakcije između faga i bakterija imaju značajan učinak na terapijsku učinkovitost. MOI ne smije biti manji od 10. Dostava faga u pluća aerosolom je učinkovitija, u odnosu na intraperitonealnu dostavu zato što zbog anatomije pluća fagi ne mogu doći posve u kontakt s prisutnim bakterijama putem krvotoka u plućima. Autori preporučuju mogućnost koncentriranja faga anionskom izmjenjivačkom kromatografijom te daju prednost aerosolnoj terapiji, u odnosu na intranazalnu primjenu (89).

Važno je spomenuti i fenomen sinergizma antibiotika i bakteriofaga kad se primjenjuju u kombinaciji. Na modelu ličinke voskovog moljca proučavan je sinergistički učinak subinhibitornih koncentracija antibiotika s primjenom bakteriofaga (*engl.* phage – antibiotic synergy; PAS). Iako su bakterijske stanice rezistentne na antibiotike koji se primjenjuju u kombinaciji s fagom te se u potpunosti ne razumije mehanizam djelovanja takvih kombinacija, uočeno je da fagi na taj način mogu imati pospješeni baktericidni učinak na bakterije *Burkholderia cepacia* kompleksa kao i sličnih patogena kao što je *Pseudomonas* ili *Escherichia coli* (90, 91, 92). Da bi se bolje shvatilo i potencijalno iskoristilo ovaj mehanizam potrebna su daljnja istraživanja fenomena. Svakako je nužno napomenuti kako u nekim slučajevima primjena antibiotika može djelovati negativno ukoliko ipak postiže baktericidni učinak. Na taj način se smanjuje broj dostupnih bakterija u kojima se fagi mogu umnožavati, a mrtve stanice još uvijek mogu služiti kao mete za adheziju bakteriofaga u smislu ireverzibilnog vezanja. Uslijed toga došlo bi do gubitka u broju vijabilnih čestica faga koje bi inače mogle inficirati žive prisutne bakterije.

Još jedan značajan primjer predstavlja potencijalna topikalna primjena bakteriofaga. U novije vrijeme provedena su i *in vivo* ispitivanja terapijskog učinka faga pri liječenju umjetno stvorenih rana inficiranih višestruko rezistentnim sojem *Acinetobacter baumannii* na štakorima kojima je kemijski induciran dijabetes melitus. Korišteno je 38 dijabetičnih štakora koji su podijeljeni u pet grupa. Kontrolnoj grupi 1 nije inducirana infekcija rane, grupi 2 je rana inficirana s 400 μ L bakterijske kulture s 10^8 jedinica koje formiraju koloniju (*engl.* Colony Forming Units; CFU). Nakon 48 h na očišćenu ranu je nanoseno 400 μ L 3×10^9 PFU/mL u spreju. Grupi 3 je rana inficirana sojem kao i grupi 2 bez daljnjeg tretmana, grupa 4 je

inficirana patogenom bakterijom kao i prethodne, a nakon 48 h intramuskularno je primijenjen antibiotik kolistin. Grupi 5 rana nije inficirana, ali je tretirana fagima kao i u preostalim skupinama koje su ih primile, a u svrhu procjene infektivnog učinka samih faga. Iz rezultata su autori zaključili kako fagi značajno smanjuju vrijeme trajanja epitelizacije i zatvaranja rane. 48 h nakon infekcije svi inficirani štakori razvili su apsces. Inficirani štakori koji nisu primili nikakvu terapiju uginuli su osmog dana. Grupa štakora koja je bila kontrola za ispitivanje upalnog potencijala bakteriofaga nije ni nakon četiri dana razvila apsces niti su fagi izazvali upalni učinak. Grupi koja je primila terapiju fagima šest dana nakon infekcije bris apscesa nije pokazivao prisutnost bakterija, dok je grupa koja je primila antibiotik i nakon 14 dana imala pozitivan rezultat obriska. Određivanjem količine prisutnih faga kod tretiranih životinja ustanovljeno je brojčano više faga nego što ih je prvotno primijenjeno, čime je potvrđena uspješnost umnažanja na mjestu primjene, uz uvjet da je prisutna ciljana bakterija. Ukoliko u tkivu na mjestu ozljede nisu prisutne ciljane patogene bakterije, bakteriofagi se ne mogu umnažati. To je potvrđeno analizom rezultata grupe životinja koje su primile samo fage (93).

3.5.4 Litički enzimi bakteriofaga

Litički enzimi faga su specifične molekule koje se eksprimiraju kao rekombinantni proteini, a svrha im je da omoguće oslobađanje novih čestica faga iz inficirane stanice. Djeluju destruktivno na strukturu membranskog sustava bakterijske stanice na način da hidroliziraju peptidoglikanski sloj staničnog zida uslijed čega dolazi do osmotske lize i smrti stanice u roku od nekoliko sekundi (94).

Lizini bakteriofaga specifični za gram-pozitivne bakterije imaju molekulsku masu 25-40 kDa, a strukturu im čine dva genska produkta, PlyCA i PlyCB. Katalitička aktivnost im je endo- β -N-acetilglukozamidazna ili N-acetilmuramidazna (lizozimi) s djelovanjem na ugljikohidratne strukture (γ -D-glutaminil-L-lizin endopeptidazna s djelovanjem na peptidne strukture te N-acetilmuramoid-L-alanin amidazna kojom se hidroliziraju amidne veze koje povezuju glikanski lanac s peptidnm strukturama). Obzirom da djeluju na jedinstvene i esencijalne molekule u strukturi staničnog zida otpornost bakterija na njihovo djelovanje je vrlo rijetka. Specifičnost ovih enzima je da učinkovito djeluju na stanične strukture bakterijskih vrsta ili soj bakterije za koji je fag specifičan, stoga imaju uzak spektar djelovanja što je vrlo korisno u slučaju primjene kod ljudi i životinja jer ne ugrožavaju fiziološku floru. Međutim, ipak je ustanovljeno kako lizini enterokoknih faga imaju letalniji učinak i na ostale gram-pozitivne patogene kao što su *S. pyogenes* i *S. agalactiae*. Lizini su korišteni u nekoliko

studija na animalnim modelima sepse, endokarditisa, faringitisa, upale pluća, meningitisa i dekolonizacije sluznice i kože. Pri tome je ustanovljeno da u usporedbi s antibioticima pokazuju baktericidnu aktivnost u roku nekoliko minuta, učinkoviti su pri uništavanju biofilma kao čimbenika infekcije (95).

Značajno je istaknuti uočen sinergistički učinak faga s određenim antibioticima. Tako npr. lizin Cpl-1 pneumokoknog faga sinergistički djeluje u kombinaciji s gentamicinom ili penicilinom, te lizini stafilokoknih faga s glikopeptidnim antibioticima. Učinkovitost lizina je provjerena na životinjama (modeli kolonizacije oralne, nazalne i vaginalne sluznice) te je ustanovljeno kako jednokratno primijenjeni lizini smanjuju prisutnost patogenih bakterija pneumokoka ili streptokoka grupe B za nekoliko redova veličine. Iako imaju kratko vrijeme poluživota (15-20 min), kod miševa kojima je intravenoznim unosom *S. pneumoniae* inducirana sepsa, intravenoznim jednokratnim bolusom koji je sadržavao 2 mg Cpl-1 omogućeno je preživljavanje tijekom 48 h, za razliku od kontrolne skupine čije je preživljavanje bilo 20 %. Sličan rezultat je dobiven i na mišjem modelu upale pluća uzrokovane transnazalnim unosom pneumokoka. 24 h nakon infekcije kod životinja je potvrđena teška upala pluća i primijenjen je Cpl-1 svakih 12 h. Takvom primjenom lizina bakteriofaga došlo je do značajnog smanjenja u broju patogenih bakterija, nije razvijena bakterijemija te je preživljavanje tretiranih životinja bilo 100 % (96).

Obzirom na njihovu proteinsku strukturu, pri sistemske primjeni lizina može se očekivati reakcija imunosnog odgovora tretiranog organizma. Korištenjem zečjeg hiperimunog seruma protiv Cpl-1 lizina koji djeluje negativno na pneumokok, *in vitro* je ustanovljeno usporavanje, ali ne i potpuni izostanak litičke aktivnosti. Slični rezultati su dobiveni za lizine bakteriofaga specifičnih za *S. aureus* i *S. pyogenes*.

Nešto drugačiji rezultati dobiveni su tijekom provedenog *in vivo* ispitivanja na miševima koji su tri puta intravenozno primili lizin Cpl-1. U svim miševima je utvrđena prisutnost protutijela na lizin Cpl-1, ali u samo jednom od šest miševa ustanovljen je umjereni inhibitorni učinak protutijela na aktivnost lizina Cpl-1. U slučaju sistemske primjene moguće je stoga očekivati povećanje citokinske aktivnosti - upalni odgovor ovisan o količini lizina koji se dostavlja tijekom tretmana. Prilagodbom doze lizina to se može izbjeći. Imunogeničnost lizina za sistemske primjene može biti umanjena PEG-ilacijom, pri čemu se gubi dio aktivnosti, ali se dobije znatno bolja farmakokinetika (97).

Osim prirodnih lizina, fuzijom različitih lizinskih domena moguće je proizvesti kimerne lizine, tzv. kimeolizine, koji pokazuju poboljšanu topljivost, šire antibakterijsko djelovanje, visoku aktivnost ili povećan kapacitet vezanja. Druga mogućnost je proizvodnja i primjena artilizina. To su kreirani enzibiotici koji nastaju fuzijom fragmenata lizina s peptidima ili

proteinima koji im poboljšavaju topljivost, povećavaju aktivnost ili mijenjaju afinitet vezanja. Primjenjivi su protiv gram-negativnih bakterija kako bi se razorila vanjska membrana stanice koja inače onemogućava pristup peptidoglikanskom sloju (98).

3.6 Europski regulatorni okvir

Većina je podataka o primjeni bakteriofaga u terapijske svrhe dostupna iz zemalja istočne Europe, zato se ne može očekivati da bi ih regulatorna tijela ocjenjivala prema trenutno važećim okvirima koji su definirani Direktivom 2001/83/EZ. Ona je većim dijelom prilagođena zahtjevima za odobravanje lijekova klasične kemijske strukture, kojima se tako može lakše utvrditi zadovoljavaju li zahtjeve učinkovitosti primjene, kakvoće i sigurnosti. Međutim, neke od članica Europske unije imaju nacionalnu legislativu kojom se definiraju specifični proizvodi i tehnike. Tako se primjerice u Poljskoj terapija fagima tretira kao eksperimentalno liječenje kojim se kao djelomično testiranom dijagnostičkom, terapijskom ili profilaktičkom metodom direktno pokušava proizvesti korist za pacijenta (99).

Europska agencija za lijekove (*engl.* European Medicines Agency; EMA) napravila je korak dalje prema razumijevanju trenutnih i budućih zahtjeva kao i potrebe za novim lijekovima, stoga je osnovala radnu skupinu za inovacije. Skupinu čine znanstveni, regulatorni i pravni stručnjaci koji imaju savjetodavnu ulogu za pitanja koja se nameću pri razvoju inovativnih lijekova. Iako je to dobar početak, potrebna je i politička volja te lobiranje zainteresiranih strana kako bi došlo do izmjena i uključivanja novih regulatornih okvira u postojeće. Sama svrha je omogućiti bolesniku dostupnost novih terapijskih sredstava kako bi se poboljšala kvaliteta života ili uklonila životna ugroza (100). Trenutno, osim regulatornih prepreka kojim je definiran razvoj današnjih lijekova dodatni limitirajući faktor interesu za razvoj bakteriofaga kao terapeutika predstavlja problem intelektualnog vlasništva. Ne može se očekivati da industrija investira u razvoj nečega što ne bi moglo biti zaštićeno kako bi se generirala financijska dobit u odnosu na konkurenciju.

Prema definiciji iz Direktive 98/44/EC termin „biološki materijal“ se odnosi na sve materijale koji sadrže genetičku informaciju i mogu se sami reproducirati ili biti reproducirani u nekomu biološkom sustavu. Ista Direktiva donosi stav da biološki materijal koji je izoliran iz svog prirodnog okoliša ili proizveden putem tehničkog postupka može biti predmet izuma čak i ako se prethodno već javljao u prirodi (101). Bakteriofagi ispunjavaju kriterije definirane u navedenoj Direktivi, ali pošto su divlji tipovi faga široko rasprostranjeni u okolišu i stoga dostupni za izolaciju teško se mogu patentirati. Moguće bi bilo patentirati genetički

prilagođene fage čije fiziološke i morfološke karakteristike odstupaju od faga divljeg tipa. No nije definirana najmanja potrebna razina izmjene temeljem koje bi se regulatorno razlikovao divlji od prilagođenog tipa. Takvi noviteti bi se morali kategorizirati kao genetički modificirani organizmi. Stoga bi se moglo nametnuti i ograničenje za primjenu takvih faga što se može zaključiti iz Direktive 2001/18/EZ. Njihova masovnija primjena bi se mogla smatrati kao namjerno uvođenje u okoliš genetički modificiranih organizama (102). Zato je potrebno definirati, ali i zadovoljiti opsežne zahtjeve o procjeni rizika kako bi se dugoročno izbjegla ugroza zdravlja ljudske populacije kao i ravnoteža okoliša.

Bez obzira na trenutnu krutost regulatornog sustava, problem intelektualnog vlasništva ili pak zahtjeva neprestanog razvoja, neke od kompanija su krenule u opsežan i skup konvencionalni postupak dobivanja odobrenja za primjenu pripravaka bakteriofaga u terapijske svrhe uz nadu da će zbog daljnjeg napretka i potreba ljudske vrste regulatorni zahtjevi biti prilagođeni u određenoj mjeri stupnju znanstvenih spoznaja i potreba. To je uz određene prilagodbe moguće. Naravno, razvoj i stavljanje takve terapije u promet iziskuje zadovoljavanje zahtjeva dobre proizvođačke prakse (*engl.* good manufacturing practice; GMP), predkliničkih i svih triju faza kliničkih ispitivanja. U svrhu definiranja okvira kvalitete i sigurnosti predlaže se koncept kakvoće ugrađene u proizvod (*engl.* Quality by Design; QbD) koji je primjenjiv za razvoj i proizvodnju biofarmaceutika te su definirani realni zahtjevi za sigurnost i kvalitetu održive terapije fagima. Prijedlog takvog koncepta oslanja se na osnove Direktive 2004/23/EZ Europskoga parlamenta i Vijeća o određivanju standarda kvalitete i sigurnosti za postupke darivanja, nabave, testiranja, obrade, čuvanja, skladištenja i raspodjele tkiva i stanica ljudskog podrijetla te Direktive Komisije 2006/17/EZ i 2006/86/EZ uz suglasnost stručnjaka iz različitih područja uključenih u problematiku (103).

3.7 Razmatranje zahtjeva za kliničke studije

Većina znanstvenih radova sadrži informacije kako su preparati bakteriofaga korišteni u prošlosti za terapijske svrhe bili slabo karakterizirani. Pretpostavlja se da su sadržavali mali broj virusnih čestica sposobnih za infekciju, zato što su tretirani topline i kemikalijama, zbog želje da ih se učini što sigurnijima za primjenu. Iz navedenog proizlazi kako je sigurnost primjene primarni zahtjev. Stoga karakteristike pripravaka terapijskih bakteriofaga ne bi smjele odstupati od definiranih zahtjeva koji se odnose na bilo koji drugi standardni lijek ili cjepivo, ali bi trebalo uzeti u obzir neke specifičnosti. Prvenstveno se ovdje misli na sposobnost samoumnažanja. Svakako bi bilo potrebno definirati koncentraciju na mjestu

infekcije kao i eliminaciju iz organizma kako bi se dobio definirani režim doziranja, ukoliko je potrebna primjena više od jedne doze (104).

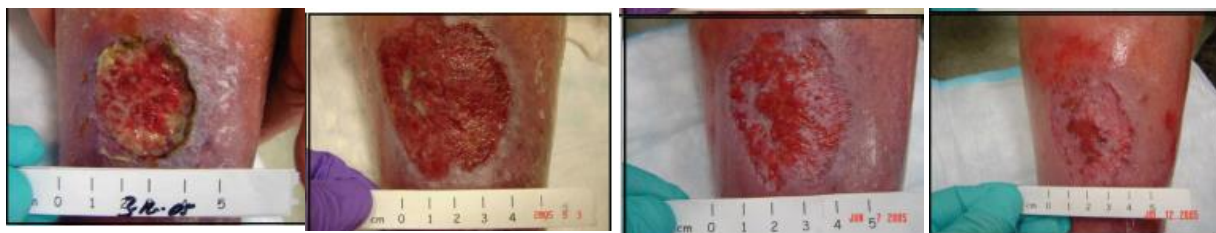
Nadalje, ukoliko bi se koristilo fage koji su karakterizirani uzgojem *in vitro*, ne može se očekivati u potpunosti ista učinkovitost *in vivo*. Jedan od razloga je razlika u učestalosti vezanja (adsorpcije) faga na stanicu. Na vezanje utječu razlike u kemijskom sastavu ili uvjeti okoline. Značajnu ulogu predstavlja i broj virusnih čestica koji se oslobađa pri razaranju bakterijske stanice kao i periodi latencije. Navedena odstupanja mogu imati za posljedicu sporije umnažanje bakteriofaga na mjestu očekivanog djelovanja, a samim time i sporiji očekivani terapijski odgovor (39). Dodatni problem može predstavljati i ciljani patogeni mikroorganizam, zato što po svojim fenotipskim karakteristikama može odstupati u većoj ili manjoj mjeri od bakterijskog soja na kojem je utvrđivana učinkovitost u laboratoriju. *In vitro* uzgoj i kultivacija se provode pri optimalnim uvjetima što u potpunosti ne odgovara uvjetima *in vivo*. Zato bi bilo potrebno u formulacije uključivati više faga, da se umanju moguća neučinkovitost jedne vrste u stvarnim uvjetima (105).

Da bi se dobilo odobrenje nadležnih institucija za širu primjenu, potrebno je dokazati sigurnost i učinkovitost primjene bakteriofaga ne samo ispitivanjima *in vitro* i *in vivo* već i provođenjem kliničke studije. U te svrhe bilo bi potrebno definirati ciljnu populaciju, tj. u takvo ispitivanje uključiti pacijente koji pate od infekcija uzrokovanih rezistentnim bakterijskim sojevima. Životinjski modeli podupiru sigurnost primjene bakteriofaga protiv bakterijskih patogena kao što su *P. aeruginosa*, *S. aureus*, vankomicin rezistentni *E. faecium*, *C. difficile* i *K. pneumoniae*.

Dostupne studije provedene u svrhu utvrđivanja sigurnosti i učinkovitosti primjene sadrže podatke o korištenju jednog ili kombinacije do osam sojeva bakteriofaga u broju od 10^5 do 3×10^9 PFU, primijenjenih od nanogramskih do mikrogramskih količina. Ispitivanja sigurnosti na ljudima uključivala su lizate stafilokoknih faga kao i koktele protiv *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *E. coli*. Pri tome su stafilokokni lizati primijenjeni intranazalno, topikalno, oralno, subkutano i intravenozno uz pojavu manje značajnih nuspojava. Takvi lizati imaju odobrenje od 1990. godine, no klinička primjena je obustavljena. U Švicarskoj su provedene studije na dobrovoljcima u svrhu utvrđivanja sigurnosti oralne primjene bakteriofaga protiv *E. coli* te dobiveni rezultati nisu ukazali na moguće probleme (106). Studija je ponovljena na 15 dobrovoljaca u Bangladešu, uz razliku da su primijenjene 100 puta veće doze koktela od 9 vrsta T4 faga, a dobiveni rezultati također nisu ukazali na pojavu neželjenih reakcija (107).

Slični rezultati su dobiveni i za topikalnu primjenu koktela bakteriofaga protiv uzročnika infekcije kao što su *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *E. coli*. Ispitivanje je provedeno pri

centru za njegu rana u Lubbocku, SAD, a fazu I kliničkih ispitivanja odobrila je FDA. Ta je studija omogućila daljnji nastavak potpuno definiranih, placebo kontroliranih, dvostruko slijepih i nasumičnih ispitivanja kliničkih studija faze II, koje je provela tvrtka Biocontrol Limited. Također, neke od studija su nedvojbeno dokazale uspješnost učinkovitosti primjene u slučajevima kada je uzročnik osjetljiv na razvijenu terapiju, što upućuje na značaj identifikacije patogena prije početka terapije. Takvi primjeri stoga vode prema uspješnoj fazi III kliničkih ispitivanja (106). Učinak faga primjenjenih topikalno prikazan je na slikama 10-14.



12.3.2005

3.5.2005

7.6.2005

17.7.2005

Slika 10. Uspješnost topikalne primjene terapije fagima u trajanju od 4 mjeseca (preuzeto i prilagođeno iz 108).

Primijenjeni su fagi za suzbijanje infekcije uzrokovane višestruko rezistentnim sojem bakterije *Pseudomonas spp.* koji je uzrokovao ulcerozne promjene tkiva i krvnih žila na nozi pedesetogodišnje žene te nije bilo poboljšanja unutar godine dana tijekom koje su primjenjivani antibiotici. Zacjeljivanje rane je postignuto unutar 4 mjeseca primjene.



13.12.2004



19.1.2005



23.1.2005



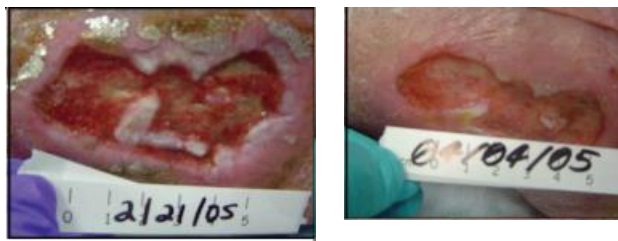
28.1.2005



11.2.2005

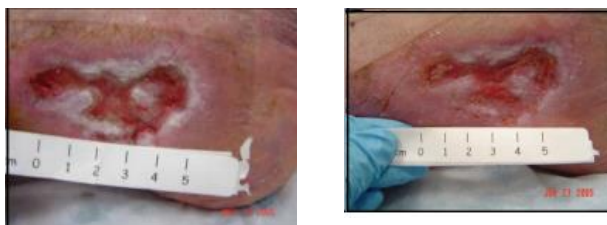
Slika 11. Uspješnost topikalne primjene terapije fagima u trajanju od 6 tjedana (preuzeto i prilagođeno iz 108).

Na slici 11 prikazan je tijek liječenja pripravkom bakteriofaga rane inficirane višestruko rezistentnim sojem *P. aeruginosa* umjereno osjetljivim na amikacin i rezistentnim na ostale antibiotike. Oporavak je uslijedio nakon 6 tjedana. Specifičnost terapije fagima je formiranje epitelnog tkiva kao otoka unutar rane, što nije slučaj pri uobičajenom zacjeljivanju rane.



21.2.2005

4.4.2005



16.5.2005

27.6.2005

Slika 12. Uspješnost topikalne primjene terapije fagima u trajanju od nekoliko mjeseci (preuzeto i prilagođeno iz 108).

Primjer učinka bakteriofaga na oporavak ulcerozne rane na nozi 73-godišnje žene. Unutar nekoliko tjedana od primjene koktela bakteriofaga došlo je do značajnog oporavka i pojave reepitelizacije tkiva koje je bilo zahvaćeno kroničnom infekcijom.



Inicijalna lezija

0 dan: primjena
faga

10. dan

30. dan

90. dan

Slika 13. Primjena pripravka faga PhagoBioDerm na biopolimernom nosaču pri cijeljenju rane osamdesetogodišnje pacijentice (preuzeto i prilagođeno iz 109). Pripravak je učinkovit protiv *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Streptococcus* i *Proteus*.



17.2.2005



10.3.2005



7.4.2005



5.5.2005

Slika 14. Uspješnost topikalne primjene terapije fagima u trajanju od 11 tjedana (*preuzeto i prilagođeno iz 108*). Primjer učinka bakteriofaga na oporavak opekline pacijenta koji boluje od autoimune bolesti te prima visoke doze kortikosteroida i metotreksata. Nakon višemjesečne bezuspješne terapije rane inficirane sojem MRSA, primjenom bakteriofaga unutar 11 tjedana došlo je do znatnog poboljšanja, što je posebice značajno jer se radi o imunokompromitiranom bolesniku.

Trenutno je u tijeku projekt Phagoburn kojim se želi procijeniti učinak bakteriofaga u liječenju opekotina kod ljudi inficiranih bakterijama *E. coli* i *P. aeruginosa*, a evaluacija će biti realizirana kroz rezultate kliničkih studija faze I i II. Ovaj projekt financira Europska Komisija u svrhu istraživanja i razvoja (110).

Nekoliko je ključnih zahtjeva za sigurnost primjene koji se moraju uzeti u obzir prilikom kliničkih ispitivanja. Iako se bakteriofagi smatraju sigurnima za primjenu zato što ne stupaju u interakcije s eukariotskom stanicom, preparati za primjenu ne smiju sadržavati ostatke bakterijskih stanica zaostale tijekom proizvodnog postupka. U protivnom takvi bi pripravci unosom u organizam mogli prouzročiti toksičan ili pirogeni učinak. Primjer je mogući Herxheimerov učinak koji bi bio povezan s otpuštanjem velike količine endotoksina uslijed lize bakterijske stanice (iako to nije uočeno kod primjene bakteriofaga, te se smatra da produljeni bakteriolitički efekt smanjuje naglo oslobađanje takvih tvari) (111).

Svakako treba uzeti u obzir i sposobnost nekih od litičkih faga da transdukcijom potencijalno prenose neželjene gene koji uvjetuju antibiotsku rezistenciju ili virulencijske faktore čime se pojačava patogenost. Sve bakteriofage bi stoga prije primjene u kliničkim

ispitivanjima bilo potrebno detaljno identificirati te ispitati njihovu učinkovitost i biološku aktivnost. Pripravak koji se primjenjuje bi trebao biti dobiven optimiziranim proizvodnim postupkom uz definiranu čistoću, sterilnost i stabilnost proizvoda te definirane uvjete pohrane.

Za primjenu u studijama i potencijalnu terapiju potrebno je uzeti u obzir metode izolacije i pročišćavanja bakteriofaga. Izbor za primjenu može biti koktel bakteriofaga sa širom terapijskom učinkovitošću. Također moguć je i izbor ciljano jedne vrste faga na temelju laboratorijske provjere. U svrhu izolacije učinkovitog faga svakako je u interesu usmjeravanje i probir prema fagima koji pokazuju najveće baktericidno djelovanje te onih čiji laboratorijski uzgoj teži prema optimalnom, pri čemu se nakon umnažanja virusne čestice moraju učinkovito izdvojiti iz lizata bakterijskih stanica (112).

3.8 Osnovni farmakološki zahtjevi

Princip primjene faga kao antibakterijske terapije je relativno jednostavan. Jedna ili više vrsta bakteriofaga dokazano učinkovitih u laboratoriju protiv bakterijskog patogena daje se pacijentu u svrhu terapijskog suzbijanja identificiranog osjetljivog uzročnika. Pri tome sistemska distribucija nije uvijek uvjet ukoliko se želi tretirati lokalnu infekciju. U idealnom slučaju fagi uništavaju ciljane bakterije, posredstvom enzima razgrađuju biofilm ukoliko postoji te pojačavaju bakterijsku osjetljivost na djelovanje imunskog sustava. Njihova baktericidna aktivnost uglavnom je povezana s umnažanjem na mjestu infekcije u neposrednoj blizini populacije neinficiranog patogena. Zbog navedene karakteristike se mogu smatrati kao samodozirajući sustav za koji je potrebno utvrditi uvjete pri kojima povećanje populacije faga uspješno korelira sa smanjenjem broja stanica bakterije domaćina (113).

Nadalje, citotoksični učinak se ispoljava samo kod bakterija na koje se mogu ireverzibilno vezati. Dodatni sigurnosni značaj predstavlja karakteristika faga da imaju uski spektar, to znači da je jedna vrsta uglavnom specifična za jednu bakterijsku vrstu. Mnogi autori su pokušali primijeniti stečene spoznaje definiranja farmakokinetičkih i farmakodinamičkih odnosa antibiotika i bakterijskih stanica na paralelne modele sa ciljem razumijevanja *in vivo* procesa, u odnosu bakteriofagi - bakterijska populacija. Osnovni parametri korišteni u diferencijalnim jednadžbama za definiranje umnažanja faga u tekućem mediju uz konstantu adsorpcije su i prosječan broj faga koji se oslobađaju pri lizi inficirane stanice, te period latencije (vrijeme lize).

Na navedene parametre utječu određeni faktori koje je teško definirati i koji značajno kompliciraju relacije, stoga se farmakološki zahtjevi razlikuju u odnosu na ostale antibakterijske terapije.

Čestice faga nisu metabolički aktivne, ali nisu kemijski inertne. Da bi započela infekcija, virus mora stupiti u kontakt i vezati se na stanicu adsorpcijom. Primarni čimbenik je afinitet virusa za površinu bakterijske stanice što se može sagledavati kao afinitet lijeka prema meti ili osjetljivost bakterije prema specifičnom antibakterijskom pripravku. Afinitet vezanja je značajan za određivanje minimalne učinkovite koncentracije kojom fag djeluje na bakteriju, u ovisnosti o svojoj gustoći. Opisuje ga konstanta adsorpcije koja predstavlja vjerojatnost adsorpcije faga na bakteriju u jedinici vremena (114).

Pri definiranju konstante adsorpcije nije uzet u obzir dvostupanjski proces reverzibilne i ireverzibilne adsorpcije, a isto tako vrijeme lize stanice može sadržavati podatak u kojem je adsorpcija identična infekciji, stoga je u vrijeme lize uključeno određeno kašnjenje. Zbog navedenih ograničenja teško je koristiti modele za kvantitativnu procjenu učinkovitosti zato što se zanemaruje nehomogena difuzija, reakcija imunskog sustava, kao i vremenske i prostorne varijacije u vrijednostima parametara. Bez obzira što takvi modeli nisu točni za *in vivo* sustave ipak daju korisne kvalitativne podatke o dinamici koja ovisi o inicijalnoj dozi i posljedičnoj replikaciji čime se može razlikovati pasivna od aktivne terapije. Konstanta adsorpcije je i važan pokazatelj ravnoteže. U slučaju da je visoka (oko 10^{-8} mL/min ili viša), pokazuje da fag uspješno smanjuje bakterijsku populaciju na nisku vrijednost. U slučaju da je konstanta manja za 2-3 reda veličine, fag nema utjecaj na kontrolu broja bakterija. Bez obzira na veliku brojčanu zastupljenost bakteriofaga minimalan je njihov učinak na smanjenje broja bakterijskih stanica. Ukoliko genetički ujednačena bakterijska populacija parazitira na mjestu koje nije dostupno za djelovanje bakteriofaga ili pak pokazuje fenotipsku rezistenciju, to kvantitativno utječe na konstantu adsorpcije faga. Konstanta adsorpcije je zasigurno ključan faktor koji određuje uspješnost terapije, a značajni su i veći prosječan broj faga koji se oslobađaju pri lizi i kraće vrijeme latencije, no nije poznato na koji način na navedene faktore ima utjecaj *in vivo* okruženje (113).

Abedon je pri definiranju farmakokinetičkih parametara korisnih za određivanje doziranja terapije fagima naglasio značaj gustoće faga kao ključni čimbenik koji predstavlja potencijal za uništavanje bakterijskih stanica. Osnovni parametri koje uvjetuje gustoća faga su stoga: minimalna inhibitorna koncentracija (*engl.* minimum inhibitory concentration; MIC) koja limitira daljnje umnažanje bakterija i minimalna baktericidna koncentracija (*engl.* minimum bactericidal concentration; MBC) koja dovodi do uništavanja prisutnih bakterija. Oba parametra se uobičajeno definiraju za antibiotike, i nisu posve značajni u slučaju terapije

bakteriofagima. Tome je razlog specifična baktericidna kinetika koju karakterizira da jedan fag u slučaju uspješne infekcije uzrokuje smrt stanice, pri tome se povećava broj oslobođenih novonastalih čestica u okolinu lizirane bakterijske stanice. No u svakom slučaju podaci o MIC i MBC su korisni za procjenu količine faga koja je potrebna kako bi se spriječilo daljnje napredovanje infekcije ili uništile prisutne bakterije (114, 115).

Liza bakterijske stanice je posljedica uspješnog vezanja bakteriofaga na specifični receptor, a uspješno vezanje uvjetuje prisutnost dovoljnog broja bakterijskih stanica kako bi se održao titar bakteriofaga u početnoj fazi primjene. Razrađeni su matematički modeli koji opisuju interakcije bakterije i faga, ali je svakako potrebno više podataka kako bi se mogli validirati i nadograditi, posebice zato što neki od njih pretpostavljaju uvjete slobodne cirkulacije, bez ograničavajućih faktora kao što su otežan pristup, smrtnost bakterija ili moguće interakcije (104).

Dostupna određena gustoća čestica ili titar faga se definira kao broj virusnih čestica koje uzrokuju plakove po mililitru lizata. Titar faga može varirati ovisno o broju čestica primijenjenih tijekom terapije (doziranje) kao i o farmakokinetičkim značajkama kao što su broj čestica koje dopiru do ciljane bakterije te potencijal faga da se replicira na mjestu infekcije. Mogućnost samoreplikacije može kompenzirati nedostatak inicijalnog broja na način tradicionalnog doziranja, osim ukoliko bakterija ne posjeduje abortivni mehanizam uslijed čega infekcija takve stanice rezultira smrću bakterije, ali i spriječavanjem širenja novih virusa. Značaj samoreplikacije je u tome što se distribucijom razrjeđuje viruse u odnosu na originalnu dozu. Posebice se to odnosi na neprokrvljena tkiva, a količina virusnih čestica je na mjestu primjene veća nego što će biti na mjestu djelovanja (114).

Navedeno bi bilo zanemarivo ukoliko je mjesto primjene ujedno i mjesto djelovanja. Osim razrjeđenja uslijed distribucije treba uzeti u obzir i metabolizam te eliminaciju kao čimbenike koji djeluju na promjenu koncentracije svakog lijeka u organizmu. U slučaju terapije fagima metabolička modifikacija u jetri se izostavlja, ali fagi podliježu inaktivaciji putem mononuklearno fagocitnog sustava (retikuloendotelnog sustava) ili djelovanjem protutijela. To je posebice značajno pri ponovljenoj ili dugotrajnijoj sistemskoj primjeni. Inaktivacija protutijelima nije značajna u većoj mjeri jer je imunogenost bakteriofaga vrlo raznolika, stoga primjena jednog izolata neće rezultirati stvaranjem protutijela specifičnih za drugi izolat faga. Eventualno veći problem od samog smanjenja broja faga u organizmu predstavlja ozbiljna reakcija imunološkog sustava uslijed sistemske primjene, iako se ne mora nužno pojaviti obzirom da su organizmi izloženi brojnim fagima tijekom života te nema značajnih pokazatelja njihovog utjecaja na zdravstveno stanje. Dodatno, neki fagi koji se unose na usta pokazuju smanjenu imunogeničnost u formulacijama. Također, kod nekih faga

samo mala površina virusa predstavlja epitop za neutralizaciju protutijelima. Mutacije faga mogu omogućiti zaobilazanje mononuklearnog fagocitnog sustava iako za sada nije sigurno jesu li takve mutacije učinkovite u različitim vrstama, u odnosu na vrstu u kojoj su stvorene. Eliminacija putem bubrega ne predstavlja bitniju ulogu. Osim spomenutog, potrebno je uzeti u obzir potencijalnu toksičnost samog virusa, ili anafilaktičku reakciju koja se osim na virusne čestice može javiti na pomoćne tvari i nosače koji mogu zaostati u formulaciji tijekom proizvodnje ili bakterijske toksine sojeva koji su korišteni za proizvodnju. Istaknute probleme je moguće očekivati i povezivati sa svakim lijekom čija je struktura proteinske prirode. U svakom slučaju, potrebno je provesti učinkovito pročišćavanje kako bi se izbjegle komplikacije. Trebalo bi razmatrati i moguću primijenu manje koncentracije faga nego je teoretski potrebno, ukoliko će dostavom na mjestu djelovanja broj faga biti dostatan (114, 116).

3.9 Odnos faga i bakterije za procjenu i predviđanje učinkovitosti terapije

Sposobnost bakteriofaga da inficira bakterijsku stanicu je nužan uvjet za uspješnost infekcije pa tako i terapije. No to ne znači da je to i dovoljan uvjet, zato što nemaju svi fagi isti učinak na bakterije, te stoga ne omogućuju oporavak organizma od bakterijske infekcije. Za uspješnost primjene potrebno je detaljno identificirati karakteristike faga na temelju kojih bi se mogla birati optimalna vrsta za terapijske svrhe. Brojnim istraživanjima su pojedinačno definirane osnovne karakteristike i zahtjevi na kojima bi se trebao temeljiti daljnji razvoj, no njihov pojedinačni značaj za uspješnost primjene daleko je od razjašnjenog. Značajno bi bilo utvrditi na koji način i u kojem omjeru po jedinici vremena su fagi i bakterijske stanice rasprostranjeni u organizmu domaćina, što za sada nije posve moguće te je limitirajući faktor utvrđivanja empirijske dinamike. Za sada se mogu promatrati indirektni učinci koje uzrokuju fagi u okolini, a što se reflektira na dinamiku bakterijskih stanica. Tako se indirektno mogu pratiti parametri imunološkog odgovora koji potpomognut djelovanjem faga može prevladati infekciju (fagi smanjuju broj prisutnih bakterija, a one koje ostanu prisutne su oslabljene djelovanjem lizina i dostupnije u slučaju razaranja biofilma). Pri tome se ne smije zanemariti i mogući negativan učinak ukoliko se djelovanjem faga oslobodi veća količina endotoksina u kratkom vremenskom periodu. Drugi način za praćenje uspješnosti učinka faga je usporedna metoda, gdje se uspoređuje karakteristika faga koji pokazuju visoki učinak na bakterijsku populaciju, u odnosu na one s niskim učinkom (čemu mogu pridonijeti mehanizmi unosa DNA u bakterijsku stanicu ili preuzimanja domaćina, brzina rasta, veličina virusne čestice i sl). Tako se utvrđuje korelacija uspjeha terapije s dinamičkim karakteristikama. Kako bi se poboljšala učinkovitost terapije potrebno je sagledati i razloge zašto bakterija uspijeva izbjeći

adsorpciju *in vivo*, te provjeriti rezistenciju na fage izbora, kao i poznate mete bakteriofaga kako bi se onemogućilo izbjegavanje adsorpcije (113). Još uvijek nije jasno koje karakteristike su značajne za uspjeh terapije i dovodi li dinamička superiornost faga i do terapijske superiornosti.

3.10 Fiziološki parametri izolata za proizvodnju

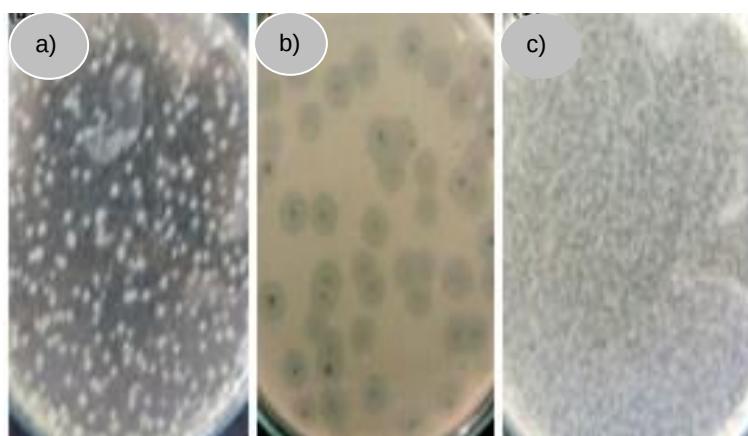
Obzirom na sastav i karakteristike moguća su dva pristupa kojima bi se pripravci bakteriofaga kao terapijsko sredstvo mogli predati na odobravanje regulatornim tijelima. To su definirane fiksne kombinacije ili pripravci stalno podložni reformulaciji (spremani za uporabu kod šire populacije, u odnosu na pripravak prilagođen specifičnim potrebama u smislu individualizirane terapije). Individualna terapija bi u slučaju monofagnog pripravka, kakav se većinom koristi u ispitivanjima učinkovitosti na modelima *in vivo*, svakako predstavljala veće troškove prije same primjene. Pripravke za širu primjenu trebalo bi formulirati kao manje ili više kompleksne koktele koji sadrže dovoljno različitih faga čijim se djelovanjem zahvatio širi spektar najzastupljenijih bakterijskih vrsta. I u jednom i u drugom slučaju potrebno bi bilo imati dostupne banke faga (60).

Banke faga bi sadržavale fage kojima je detaljno utvrđen identitet kao i biološka aktivnost. Za potrebe istraživanja ili razvoja učinkovite terapije obzirom na njihovu sveprisutnost, fagi se izoliraju iz okoliša, često iz otpadnih voda ili se nabavljaju iz dostupnih banaka bakteriofaga kao što je „Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology“ u Tbilisiju, Gruzija (117).

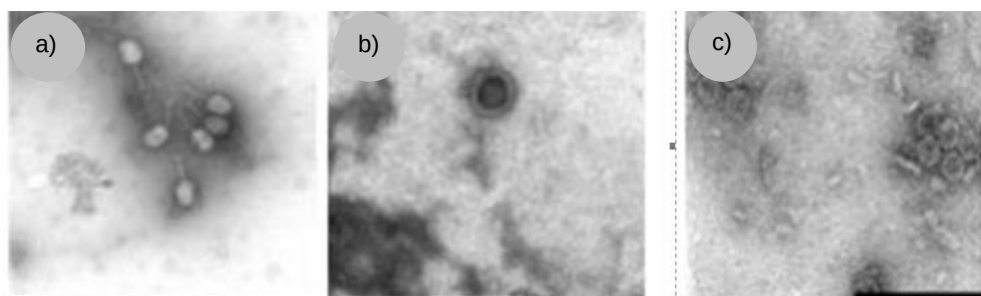
U slučaju da se želi izolirati potencijalnu terapijsku vrstu iz okoliša, tada se okolišni uzorak pomiješa s kulturom bakterija za koju se ciljano želi identificirati fag. Nakon inkubacije iz hranjivog medija se uklanjaju bakterijske stanice, a preostalim fagima se ispituje učinkovitost izazivanja lize bakterijskih stanica na krutom hranjivom mediju. Virulentni fagi uzrokuju velike providne plakove (Slika 15), te ukoliko se na taj način utvrdi prisutnost faga, lizat medija se dalje koristi za reizolaciju, pročišćavanje i pohranu (u 50 %-tnom glicerolu na -70 °C). Tijekom daljnjeg procesa određuje se niz parametara. Period latencije definira se razlikom u vremenu od inokulacije i prvog pada optičke gustoće korištene bakterijske vrste domaćina, dok se količina novonastalih čestica nakon infekcije može izraziti kao razlika u PFU prije inokulacije i nakon infekcije (119).

Morfologija se određuje transmisijском elektrоnskom mikroskopijom (TEM) (Slika 16), a broj faga se može odrediti protočnom citometrijom ili epifluorescentnom mikroskopijom, iako su dostupne i metode identifikacije specifičnih fragmenata DNA ili poznatih gena (120).

Broj vijabilnih faga koji imaju potencijal da inficiraju bakterijsku stanicu se izražava u PFU, a prati se na čvrstim hranjivim podlogama za bakterije. Čistoća genetičkog materijala se može odrediti nekom od molekularno bioloških tehnika kao što je polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata (*engl.* Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP), lančana reakcija polimeraze (*engl.* Polymerase Chain Reaction; PCR) ili elektroforeza pulsirajućeg polja te usporedbom dobivenih rezultata s referentnim standardima (104).



Slika 15. Kruta hranjiva podloga s plakovima koje su uzrokovali bakteriofagi: kulture a) *E.coli*, b) *K pneumoniae*, c) *P. aeruginosa* (*preuzeto i prilagođeno iz 118*).



Slika 16. Transmisijска elektrоnska mikrografija bakteriofaga: bakterija a) *E.coli*, b) *K pneumoniae*, c) *P. aeruginosa* (*preuzeto i prilagođeno iz 118*).

3.11 Proizvodnja i stabilnost

Kultivacija bakteriofaga za potrebe terapije provodi se na više načina. Za laboratorijski uzgoj koristi se posuđe manjeg volumena, a proizvodnja većih razmjera odvija se korištenjem jednokratnih polietilenskih vreća od 10 L ili pak u bioreaktorima. Kod sva tri načina uzgoja moguće je postići titar od 10^9 PFU/mL uz optimiranje uvjeta i medija za uzgoj.

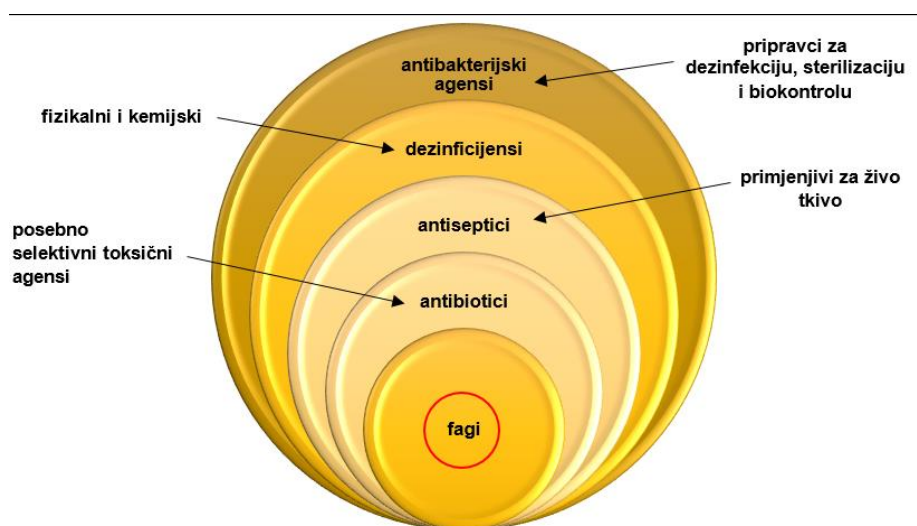
Nakon uzgoja pročišćavanje lizata provodi se centrifugiranjem pri nižim okretajima da se uklone stanični ostaci. Fagi se koncentriraju ultracentrifugiranjem, adsorpcijskom i anionskom izmjenjivačkom kromatografijom ili precipitacijom s etilenglikolom uz ekstrakciju kloroformom. Na primjeru bakteriofaga T4 u slučaju PEG precipitacije i korištenja ultracentrifuge dobiveno je iskorištenje do 90 % uz uvjet da se dodatkom 20 % saharoze ublaži djelovanje gravitacijske sile na morfologiju faga. Primjena srednje brzine centrifugiranja kao i ultrafiltracije, adsorpcijske kromatografije na DEAE-celulozi te izmjenjivačke kromatografije ne predstavljaju problem u smislu značajnijeg gubitka titra faga, ali problem mogu predstavljati bakterijski endotoksini koji mogu zaostati u pročišćenim uzorcima. Tijekom proizvodnog postupka moguće je identificirati fage u svakom koraku proizvodnog procesa korištenjem masene spektrometrije, čime se potvrđuje čistoća pripravka, odnosno da osim željenih faga nema kontaminanata (116,121).

Nakon proizvodnog postupka ovisno o vrsti faga i otpornosti na temperaturu provodi se sterilizacija. Temperatura čuvanja također ovisi o vrsti faga u pripravku. T4 bakteriofagi mogu biti stabilni dulji vremenski period, do dvije godine pri temperaturi od $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ uz gubitak inicijalnog titra od pola reda veličine. Dodatkom magnezijevih iona takvom pripravku pospješuje se tolerancija na temperaturu od $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ dulje od mjesec dana. Obzirom na navedeno za svaku vrstu bakteriofaga ili koktel potrebno je definirati zadovoljavajuće parametre proizvodnog postupka i pohrane – stabilitetne podatke (121).

Uz temperaturu, značajni parametar predstavlja i pH, a primjenjivi puferi moraju biti definirani za svaki soj. Sterilnost proizvoda treba zadovoljavati farmakopejske zahtjeve koji su primjenjivi za biološke terapeutike. Cjelokupni proizvodni postupak treba biti u skladu s GMP protokolima i zahtjevima, a svi procesni detalji detaljno opisani u dokumentaciji za registraciju (104).

3.12 Prednosti i nedostaci u odnosu na antibiotike

Bakteriofagi mogu djelovati na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije koje su višestruko rezistentne na antibiotike. Bakterijska rezistencija na bakteriofage je također moguća, ali obzirom da se radi o biološkim sustavima oni je za razliku od antibiotika mogu nadvladati. Ciljano djelovanje na jednu bakterijsku vrstu svakako može predstavljati prednost obzirom da se ne ugrožava prirodno prisutna fiziološka bakterijska flora, kao što je to slučaj uslijed primjene antibiotika. Prednost primjene u odnosu na antibiotik predstavlja i umnažanje bakteriofaga na ciljnom mjestu djelovanja samo dok je prisutna patogena bakterija. No uzak spektar djelovanja u usporedbi s ostalim antibakterijskim agensima (Slika 17) je ograničavajući faktor u slučaju kada se nastoji postići djelotvoran učinak u što kraćem periodu.



Slika 17. Antibakterijski agensi - specifičnost djelovanja na biološki materijal

(preuzeto i prilagođeno iz 72).

Antibakterijski agensi mogu biti fizikalni i kemijski, te mogu imati štetno, kao i usko specifično djelovanje na žive stanice.

Ukoliko se ne bi koristio koktel bakteriofaga posebice za rezistentne sojeve, prije terapije je potrebno ciljano identificirati bakteriju kako bi se uspješno mogao primijeniti definirani monofagni pripravak (122). U slučajevima kada bi se birao posve novi fag s optimalnim učinkom to bi znatno produljilo vrijeme za početak moguće terapije. Nakon unosa fagi se kroz organizam vrlo brzo i lako rasprostrane te infiltriraju različita tkiva i organe.

Brojne prekliničke studije na modelnim životinjama kao i primjena kod dobrovoljaca izvještavaju o dobroj podnošljivosti pripravaka bez značajnijih nuspojava, što nije slučaj kod primjene antibiotika. Nadalje, rezultati pojedinih istraživanja potvrđuju pozitivan imunomodulatorni učinak bakteriofaga, što ne znači da imunosni sustav ne stvara protutijela protiv bakteriofaga. Zabrinjavati može moguća primjena uslijed koje bi došlo do naglog oslobađanja endotoksina posebice gram-negativnih bakterija nakon lize velikog broja bakterijskih stanica, no taj problem se pojavljuje i prilikom uporabe trenutno dostupnih antibiotika u slučaju brzog baktericidnog djelovanja. U usporedbi s antibioticima za bakteriofage trenutno ne postoje definirani regulatorni zahtjevi za optimalnu primjenu kod ljudi (vrijeme, doza i putevi primjene) zato što se ne smatraju lijekovima. Financijski aspekt u usporedbi s razvojem antibiotika svakako bi bio mnogo povoljniji (106).

3.13 Ostale mogućnosti primjene bakteriofaga

3.13.1 Modifikacija ovojnice faga – "PHAGE DISPLAY"

Postupcima genetičkog inženjerstva moguće je koristiti bakteriofage kao ekspresijski sustav polipeptida od određenog interesa. To se izvodi na način da se unutar sekvence gena odgovornih za proteine ovojnice uvede fragment strane DNA koji kodira za peptide ili proteine. Uslijed umnažanja i dozrijevanja takvog faga na površini omotača se eksprimiraju željeni proteini, a takve nove čestice virusa imaju različiti potencijal za primjenu. Bakteriofagi s izmijenjenom vanjskom ovojnicom se pohranjuju u banke faga koje se tada pretražuju za izbor željenog peptida ili protein s praktičnom primjenom, primjerice protein koji ima afinitet vezanja za cijelu bakterijsku stanicu, molekularne sastavnice staničnih enzima ili pak faktora virulencije. Veliki broj takvih banaka su razvile pojedine grupe istraživača, a samo je mali broj komercijalno dostupan. Najčešće se koriste bakteriofag M13 i slični filamentozni fagi, bakteriofag λ te T7. Donedavno ovaj način modifikacije faga je korišten u proizvodnji monoklonskih protutijela za terapiju karcinoma ili upalnih procesa. Danas ova tehnologija pruža mogućnost probira novih peptida i protutijela koji imaju afinitete vezanja na široki raspon antigena kao što su proteini, peptidi, nukleinske kiseline i ugljikohidrati. To omogućava razvoj novih terapeutika protiv infektivnih bolesti kao i detekciju patogena i agenasa koji predstavljaju biološku opasnost u okolišu. Primjer primjene takvih izmijenjenih faga je i dostava terapeutika do ciljane bakterijske stanice: većih koncentracija antibiotika, inhibitora sinteze staničnog zida gram-negativnih bakterija kao što je *Pseudomonas spp.*, inhibitora ureaze virulencijskog faktora *Helicobacter pylori*, peptida koji vezanjem na stanicu inhibiraju rast *A. baumannii*. Značajna primjena je i detekcija spora *Bacillus anthracis*,

identifikacija epitopa virusa humane imunodeficijencije (*engl.* human immunodeficiency virus; HIV) i detekcija drugih virusa, osiguravanje veće specifičnosti ili afiniteta vezanja npr. kationskih peptida (124).

3.13.2 Fagi kao sustavi za dostavu cjepiva

Dostava cjepiva fagima moguća je direktnim unosom faga koji nose antigene na površini kapside, primjenom faga za dostavu ekspresijske kasete koja kodira za određeni antigen ili kombinacijom obaju pristupa što se naziva hibridnim cjepivom. Hibridno cjepivo u ovom slučaju je DNA s eukariotskim promotorom upakirana u česticu faga, a promijenjena ovojnica faga sadrži na sebi isti antigen za koji kodira DNA unutar kapside. Očekuje se da takvo cjepivo stimulira i staničnu i humoralnu imunost (125). To je potvrđeno na miševima uspješnom primjenom bakteriofaga T4 za dostavu rekombinantnog gena F1-V i proteina vezanog na kapsidu kao cjepiva protiv uzročnika kuge (125, 126).

Također, uz ovu tezu postoji mogućnost dodatne modifikacije virusne ovojnice kako bi bilo moguće što preciznije ciljati određeni stanični tip za dostavu vakcine. Takvu moguću dodatnu modifikaciju predstavljaju primjerice galaktozni ostaci za ciljano vezanje faga na hepatocitne receptore koji vežu galaktozu. Mogućnost predstavlja i vezanje specifičnih peptida na ovojnicu faga za ciljanje dendritičnih ili Langerhansovih stanica. Banke faga koji na ovojnici nose antigen mogu biti pretražene specifičnim protuserumom za izolaciju novih zaštitnih antigena ili mimetopa – peptida koji oponašaju sekundarnu strukturu i antigene karakteristike ugljikohidrata, proteina ili lipida, unatoč tome što takvi peptidi imaju različitu primarnu strukturu u odnosu na molekule koje oponašaju. Serum konvalescenata također može biti korišten za pretraživanje banke faga kako bi se otkrio potencijalni antigen, odnosno protein izložen na kapsidi specifičan za neku bolest, a da prethodno nije potrebno znati ništa o njegovoj strukturi. Dokazano je da nemodificirani fagi mogu biti korišteni za dostavu DNA cjepiva mnogo učinkovitije nego dosadašnjom primjenom plazmidne vakcinacije. Gen odgovoran za antigenu strukturu pod kontrolom eukariotske transkripcijske kasete se klonira u bakteriofag, a pročišćene cijele čestice se injiciraju u domaćina. U usporedbi sa standardnom vakcinacijom dokazano je znatno veće stvaranje protutijela kod miševa i zečeva (125).

Prednost faga kao dostavljača cjepiva je u tome što su stabilni u širem pH području, ne umnažaju se u eukariotskoj stanici te ne uzrokuju nuspojave. Glavni problem predstavlja pravilna struktura i koncentracija epitopa na površini faga kako bi se pobudio imunosni

sustav. Također je bitan izbor puta primjene. Uz uobičajenu intramuskularnu ili subkutanu, moguća je pretpostaviti i oralnu dostavu uz uvjet da se fagu onemogućí infekcija flore probavnog sustava. Bakteriofagi mogu biti dostavni sustavi za raznovrsna cjepiva i to antitumorska, antibakterijska, antivirusna, antiparazitarna, antifungalna te za cjepiva protiv sredstava ovisnosti. Za razvoj antitumorskih cjepiva najbolji antigeni su telomerase, tirozinaze, gp 100, MAGE, Melan-A, Ras i sl. jer je njihova ekspresija u tumorskom tkivu povećana u odnosu na zdrave stanice. Za razvoj antibakterijskih, antivirusnih i antiparazitarnih cjepiva proučavaju se epitopi koji bi rezultirali stimulacijom imunskog sustava u svrhu suzbijanja infekcije. To su npr. adhezini kao faktori virulencije *K. pneumoniae*, membranski proteini *P. aeruginosa*, glikoproteini herpes simpleks virusa ili proteini kapside humanog papiloma virusa, površinski proteini pojedinih razvojnih oblika uzročnika malarije i sl. Značajnu potencijalnu primjenu predstavlja i mogućnost razvoja cjepiva koje bi služilo za suzbijanje problema ovisnosti o nikotinu, kokainu, metamfetaminu i opijatima. Osnovu za takvu potencijalnu primjenu podržava istraživanje kojim je utvrđeno kako fagi intranazalnom primjenom mogu prodrijeti u središnji živčani sustav te inhibirati psihostimulatorni učinak kokaina ukoliko na strukturi ovojnice imaju izložene proteine koji vežu kokain. U iste svrhe mogli bi biti korišteni i enzimi koji imaju metaboličku aktivnost prema navedenim spojevima (127).

3.13.3 Fagi kao dostavljači genske terapije i ciljanih gena

Fagi, posebice bakteriofag λ i filamentozni bakteriofagi su krajem 20. stoljeća pretpostavljeni kao potencijal za dostavu gena eukariotskoj stanici u terapijske svrhe. Koncept je sličan korištenju faga kao sustava za dostavu cjepiva, ali s iznimkom da se ovdje radi o dostavi gena koji moraju svojom ekspresijom rezultirati terapijskim učinkom. Ovojnica štiti DNA od degradacije, i također može biti prilagođena na način da na površini ima vezane različite ligande. Prilagodba ovojnice na taj način umanjuje negativnu karakteristiku bakteriofaga da ne posjeduju prirodni tropizam za eukariotske stanice (128).

Vezani ligandi omogućuju ciljanje specifičnih staničnih linija i ulazak u pojedina tkiva što je preduvjet za učinkovitu gensku terapiju. Daljnje poboljšanje predstavlja kombinacija faga s humanim virusima kako bi se unos u stanicu i integracija proveli što uspješnije. Trenutno se tehnikama genetičkog inženjerstva nastoji razviti takve vektore. Moguća primjena bila bi pri genskoj terapiji karcinoma. U tu svrhu su posebice zanimljivi himerni konstrukti virusa sličnih adenovirusima i filamentoznih bakteriofaga M13 (*engl.* adeno-associated virus phage; AAV/P). Ovakav vektor se zbog izmijenjenog proteina ovojnice

može vezati za $\alpha_v\beta$ receptor koji je eksprimiran u stanicama i žilama tumorskog tkiva, a odsutan je ili jedva eksprimiran u granicama detekcije u normalnim stanicama tkiva i endotela (129).

Stanični receptori ključni za endocitozu uvjetovanu receptorima prepoznaju specifične proteinske strukture na ovojnici bakteriofaga i tako čestica faga ulazi u eukariotsku stanicu. Unutar stanice nekoliko je mehanizama koji predstavljaju izazov za dostavu DNA u jezgru. Tako na primjer proteolitički enzimi endosoma čine jednu od prepreka. Nju je moguće zaobići korištenjem faktora koji ometaju djelovanje endosoma ili proteina kojima se izbjegava djelovanje endosoma, primjerice uporabom proteina Pb kapside adenovirusa te hemaglutininom HA-2 virusa gripe. Druge dvije prepreke su lizosom kojem aktivnost ovisi o katepsinima B i L, te proteosom. Djelovanje ovih staničnih struktura se može selektivno inhibirati. Klorokin ima svojstvo selektivnog inhibitora proteolitičke aktivnosti katepsina B i L, glavnih proteaza lizosoma. Njegovom primjenom moguće je izbjeći lizosomsku degradaciju čestica faga. Negativno djelovanje proteosoma na strukturu bakteriofaga moguće je inhibirati molekulama bortezomibom i MG132. To su reverzibilni inhibitori podjedinice 26S proteosom kompleksa, pri čemu MG132 ima inhibitorni učinak i na katepsine lizosoma. Zadnju prepreku u dostavi predstavlja jezgrina membrana, što se može riješiti na način da se u strukturu faga uvede signal za lokalizaciju u jezgru. U tu su svrhu kod bakteriofaga λ istraživači koristili peptide transdukcijske domene HIV-a ili peptide majmorskog virusa 40 (*engl.* Simian vacuolating virus 40; SV40). Novija istraživanja donose podatke kako i terminalni proteini (TP) bakteriofaga Φ 29, Nf, PRD1, Bam35 i Cp-1 također omogućuju dostavu linearne DNA u jezgru stanice sisavaca. Korištenje bakteriofaga u svrhu dostave terapijskih gena bi bilo relativno sigurno obzirom da postoji interakcija između stanica sisavaca i bakteriofaga, no ne i mogućnost infekcije. Proučavanjem takvih interakcija ustanovljeno je kako bakteriofagi pokazuju povećani afinitet vezanja na tumorske stanice te da kao antigeni mogu stimulirati humoralnu imunost. U stimulaciji imunostnog sustava eukariota glavnu ulogu imaju proteini ovojnice bakteriofaga. Zamjenom aminokiselina u sastavu takvih proteina moguće je osigurati dulji poluživot u cirkulaciji domaćina te zaobilaženje djelovanja specifičnih protutijela (112,130). Za neke pripravke faga se provode klinička ispitivanja, ali se čini da je potrebno još istraživanja kako bi se takva genska terapija mogla primijeniti kod ljudi.

Konstruirani fagi osim za eukariotske stanice, mogu biti korišteni i za dostavu gena ubojica u patogene bakterije. Takvi geni se mogu integrirati u kromosom bakterije ili biti dio plazmidne DNA kojeg je bakterija primila. Inficirana bakterija može biti uništena uslijed ekspresije toksičnog peptida ili uslijed kombinacije unutarstanične ekspresije toksičnog peptida i litičkog rasta faga. Fagima je moguća i dostava prilagođenih plazmida u bakterijsku

stanicu. Na primjer plazmidna DNA može sadržavati sekvence koje kodiraju za stabilniji toksin duljeg poluživota i sekvence koje kodiraju za nestabilni antitoksin kraćeg poluživota. Stanice koje sadrže plazmid uspiju preživjeti zbog stalne proizvodnje plazmidnog antitoksina, dok stanice koje nisu zadržale plazmid ugibaju. Takav pristup bi imao učinak na ograničavanje brojčanog porasta bakterija (131).

Osim dostave gena ubojica moguća je i dostava gena za reverziju rezistencije na antibiotike npr. nalidiksinsku kiselinu ili streptomycin. Izraelski znanstvenici su korištenjem konstruiranih umjerenih bakteriofaga postigli rezistencijsku reverziju mutanata *E. coli*. To je izvedeno na način da je u genom bakterije transdukcijom unesena sekvenca koja kodira za divlji tip *rpsL* gena. Mutacija *rpLs* gena je ključna za razvoj rezistencije na streptomycin. Divlji tip gena je kod *E. coli* dominantan alel i njegova ekspresija u stanici doprinosi reverziji osjetljivosti bez obzira na prisutnost mutiranog alela koji je recesivan. Osim toga alel divljeg tipa može biti prilagođen na način da ima podudarnost u svega 62 % u odnosu na mutirani alel unutar bakterijskog genoma. Takvom dodatnom prilagodbom onemogućuje se homologna rekombinacija između unesenog dominantnog alela i mutiranog recesivnog alela koji uvjetuje rezistenciju. Ovakav pristup bi uz zadovoljavanje sigurnosnih zahtjeva mogao biti dobra osnova za slabljenje virulencije bolničkih bakterijskih sojeva koji obitavaju na radnim površinama i medicinskoj opremi te ponekad izbjegnu antiseptičke mjere (132).

4. RASPRAVA

Zadnjih desetljeća javlja se sve veći problem bakterijske rezistencije na dostupne antibiotike što potencijalno predstavlja ograničenja i opasnost u zdravstvenom sustavu u smislu osiguravanja odgovarajuće razine zaštite zdravlja različitim skupinama bolesnika. Posebice se to odnosi na bolesnike kojima je imunološki sustav dodatno narušen nekom od bolesti za koje nema lijekova koji bi rezultirali potpunim izlječenjem.

Kod takvih bolesnika teži se održavanju zdravstvenog stanja unutar prihvatljivih kontrolnih granica kroničnog tijeka uz osiguravanje što je moguće više kvalitete života. Razvoju rezistencije patogenih bakterijskih sojeva doprinijela je široka primjena antibiotika ne samo u zdravstvu već i drugim područjima ljudskog djelovanja.

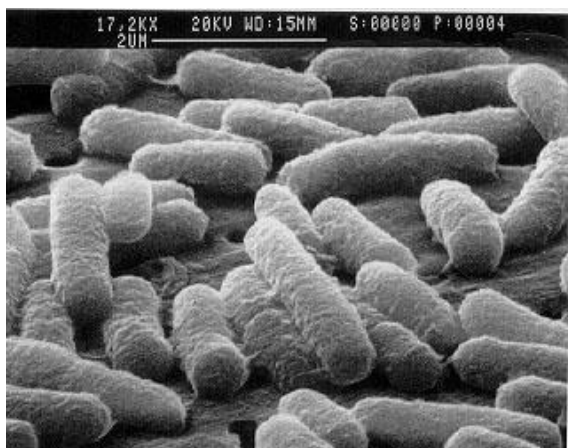
Nekontrolirana primjena koja graniči sa zlouporabom rezultirala je velikom zastupljenošću antibiotičkih molekula i njihovih razgradnih produkata u okolišu čime se dodatno stimulira razvoj i prijenos rezistencijskih mehanizama među bakterijskim vrstama.

Trenutno najveći problem predstavljaju višestruko rezistentni bolnički sojevi koje je ponekad nemoguće suzbiti čak i višestrukom kombinacijom antibiotika. Prije masovne antibiotičke proizvodnje i primjene za suzbijanje bakterijskog rasta korišteni su bakteriofagi, tj. lizati bakteriofaga obzirom da je u laboratorijskim uvjetima utvrđeno kako virulentni sojevi vrlo učinkovito uništavaju bakterije.

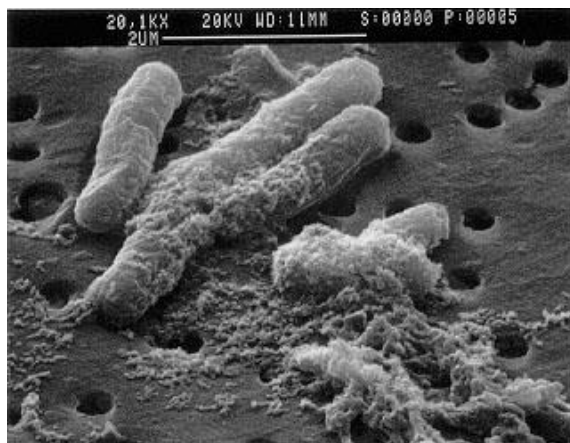
Životni ciklus bakteriofaga usko je vezan uz bakterijske vrste koje parazitiraju i kojima se prilagođavaju prema evolucijskim zahtjevima, stoga su široko rasprostranjeni svugdje gdje su prisutne bakterije pa tako i u probavnom sustavu ljudi i životinja, u tekućoj vodi, tlu, kanalizaciji, strvinama, itd.

Zbog njihove sveprisutnosti lako ih je izolirati iz okoliša, a zbog karakteristika da djeluju baktericidno (Slika 18) te da su prilagodljivi, visokoučinkoviti, sigurni za ljude, i prisutni uz bakterijske stanice tijekom evolucijskog razvoja mogu se činiti kao gotovo savršeno antibakterijsko sredstvo.

Osim navedenog, izbor novog faga s baktericidnim učinkom za određenu bakterijsku vrstu u smislu pretrage, izolacije i karakterizacije je puno brži i učinkovitiji nego je to slučaj kod razvoja antibiotičke molekule.



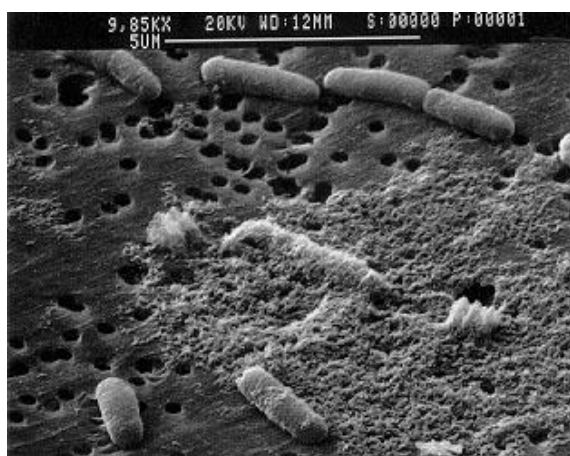
a)



b)



c)



d)

Slika 18. Slike dobivene elektronskom mikroskopijom stanica bakterije *E. coli* i čestica bakteriofaga K1F (preuzeto i prilagođeno iz 133).

a) Neinficirane stanice *E. coli*

b) Stanice *E. coli*, soj EV36 lizirane nakon infekcije bakteriofagom K1F. Nelizirane stanice još nisu inficirane fagom.

c) K1F bakteriofag (nakupine virusnih čestica)

d) Stanice *E. coli*, soj EV36 lizirane nakon infekcije bakteriofagom K1F. Nelizirane stanice još nisu inficirane fagom.

Gotovo jedno stoljeće od njihovog otkrića ponovno se razmatraju kao potencijal za suzbijanje rasta rezistentnih bakterijskih sojeva. Razlog tome je razvoj znanosti i tehnologije uslijed čega je moguće bolje razumijeti biologiju faga kao i molekularne mehanizme koji im omogućavaju parazitiranje bakterijske stanice. Posebno su značajna znanstvena istraživanja bakteriofaga u terapijske svrhe. Od 80-tih godina prošlog stoljeća dostupni su radovi

gruzijских i poljskih znanstvenika koji izvještavaju o primjeni bakteriofaga kao eksperimentalne terapije u ljudi nakon što antibiotska terapija nije dala učinka.

Liječene su bakterijske infekcije uzrokovane stafilokokom, te gram-negativnim bakterijama iz rodova *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus* i *Pseudomonas*, a bakteriofagi su primijenjeni kao terapija nakon izolacije i detekcije uzročnika te ispitivanja osjetljivosti izolata na specifičnu vrstu bakteriofaga. Lizati bakteriofaga primjenjivani su oralno, topikalno, u obliku kapi za nos i uši te kao otopine za ispiranje nosne šupljine, pleure i peritonealne šupljine. Izvještaji govore o 100 %-tnoj učinkovitosti primjene u slučaju gnojnog meningitisa i furunkuloze te visoke učinkovitosti i kod septikemije različite etiologije (134, 135).

Za primjenu u terapijske svrhe u većini radova se navodi zahtjev da bakteriofagi moraju biti strogo litičke prirode. Litički ciklus znači da virulentni fag nakon što inficira stanicu u kratkom vremenu uzrokuje lizu inficirane stanice uz oslobađanje velike količine novih virusa sposobnih inficirati prisutne patogene bakterije iste vrste u okolini.

Obzirom na dostupne podatke čini se da primjena litičkih faga u terapijske svrhe ima nekoliko prednosti u odnosu na antibiotsku terapiju iako je mehanizam djelovanja osim krajnjeg cilja uništenja bakterijske stanice u potpunosti drugačiji. Vrste bakteriofaga koje su umjerene i koje karakterizira lizogeni životni ciklus nisu primjenjive za navedenu svrhu zato što svoj genom integriraju u strukturu genoma bakterije domaćina ili se ponašaju kao plazmidna DNA unutar stanice kroz duže vremensko razdoblje. Takvi bakteriofagi mogu potencijalno prenositi genetičke informacije među bakterijskim vrstama te na taj način doprinositi širenju antibiotske rezistencije.

Prednost i interes za primjenu litičkih faga kao antibakterijske terapije prvenstveno predstavlja njihova mogućnost samoumnažanja na mjestu infekcije u slučaju prisutnosti dovoljne količine patogenih bakterija koje bakteriofagi mogu parazitirati. Tijek infekcije bakterijske stanice uzrokovane litičkim fagom se odvija u nekoliko stupnjeva, a konačni rezultat je uvijek smrt inficirane stanice. Zbog sposobnosti samoumnažanja početna primjenjena koncentracija bi trebala imati manji značaj za primjenu faga nego što je to slučaj kod primjene antibiotika. Što je veći broj prisutnih bakterijskih stanica to će se bakteriofagi više umnožiti i proširiti na mjestu djelovanja, a smanjenjem broja patogena smanjit će se i broj virusa koji se na kraju eliminiraju iz organizma.

Za razliku od toga, nakon primjene jedne doze antibiotika postiže se maksimalna koncentracija na mjestu primjene koja se u ovisnosti o vremenu počinje smanjivati uslijed razgradnje ili ekskrecije. Primjenom jedne vrste bakteriofaga cilja se jedna patogena vrsta mikroorganizma, pri čemu bakterijska fiziološka flora eukariotskog organizma nije ugrožena.

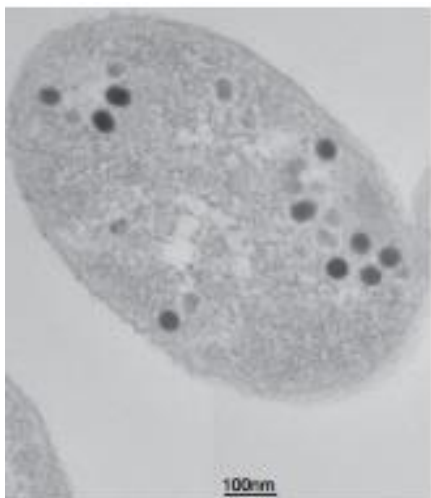
To nije slučaj s primjenom antibiotika, obzirom da je tijekom dugotrajnije primjene osim poremećaja crijevne flore moguća i kolonizacija oportunističkim patogenim mikroorganizmima (bakterija i gljiva) ukoliko su otporni na primijenjeni antibiotik. Doprinos učinkovitosti primjene faga u terapijske svrhe svakako predstavlja razumijevanje biologije i fiziologije soja ili sojeva koji bi se koristili u terapiji. Detaljnom identifikacijom i karakterizacijom nakon izolacije moguće je ukloniti prepreke koje proizlaze iz činjenice da je u okolišu prisutan veliki broj različitih vrsta i sojeva sa različitim karakteristikama. Detaljnom analizom genoma bakteriofaga bilo bi moguće i sagledati mogućnost razvoja rezistencije bakterija na bakteriofage kao i interakcije s imunološkim sustavom te detaljnije razumijevanje farmakologije bakteriofaga.

Infekcija bakteriofagom započinje nakon što se virusna čestica veže za bakterijsku stanicu specifičnim strukturama koje prepoznaju vezne receptore. U većini slučajeva određena vrsta bakteriofaga je prilagođena da inficira samo jedan ili nekoliko bakterijskih sojeva. Iako navedeno u određenom smislu predstavlja prednost, također znatno limitira potencijalnu primjenu bakteriofaga obzirom na usku terapijsku širinu u usporedbi s antibioticima koji mogu imati širok spektar djelovanja. Takva specifičnost djelovanja kao i afinitet vezanja prema jednoj bakterijskoj vrsti koji odstupa u *in vivo* i *in vitro* uvjetima (Slika 19) posebno bi mogli biti problem u slučaju potrebe hitnog djelovanja kada zbog teškog stanja pacijenta vremenski ne bi bilo moguće provesti standardnu identifikaciju bakterijskog patogena.

Rješenju ovog problema mogao bi doprinijeti razvoj brze molekularne dijagnostike kojom bi se u kratkom roku identificiralo bakterijsku vrstu uz primjenu antibiotika širokog spektra koji bi usporio umnažanje patogena, te nakon toga primjena pripravka faga koji iskazuju najintenzivniji litički učinak protiv identificirane bakterije. Noviji dostupni radovi donose informacije o ispitivanjima provedenim na *in vivo* modelima, a iz dobivenih rezultata se može zaključiti da istovremena primjena nekih antibiotika zajedno s bakteriofagima ima sinergistički učinak na smanjenje broja prisutnih patogenih mikroorganizama. Iako je taj pozitivan učinak uočen, ne zna se dovoljno o mehanizmima i razlozima uslijed čega do njega dolazi, ali je svakako značajan i vrijedan daljnjeg ispitivanja. Osim brze identifikacije patogena u svrhu što učinkovitijeg djelovanja u kratkom roku moguća bi bila i primjena polivalentnih faga koji imaju sposobnost infekcije nekoliko bakterijskih vrsta.

Do sada su u ispitivanjima učinkovitosti primjene na životinjskim modelima koja se spominju u ovom radu korišteni pripravci koji sadrže jednu ili nekoliko vrsta bakteriofaga. Takva primjena bila bi moguća i u stvarne terapijske svrhe u smislu individualiziranog pristupa. Na taj način se terapija prilagođava pojedinačno za svakog pacijenta uz korištenje

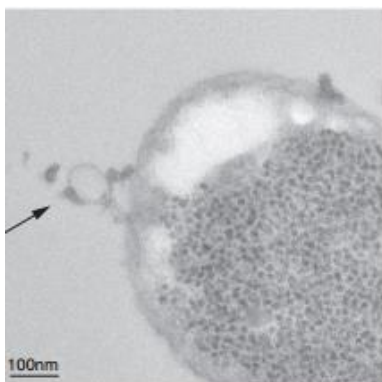
faga kojima je učinkovitost primjene ispitana u laboratoriju neposredno prije same terapije za bakterijski soj izoliran od pacijenta.



a)



b)



c)



d)

Slika 19. Usporedba intenziteta infekcije in vitro i in vivo bakterije *E. coli* bakteriofagom sličnim T4 (preuzeto i prilagođeno iz 57).

Samo neke od bakterija *E. coli* iz kolona miša pokazuju prisustvo intracelularnih faga kao dokaz uspješne infekcije (b), u usporedbi sa *E. coli* inficiranom tijekom laboratorijskog uzgoja na hranjivom mediju (a), također vidljivo je samo nekoliko adsorbiranih bakteriofaga na bakterijskoj stanici iz kolona miša d), dok je pri laboratorijskom uzgoju bakterija na hranjivom mediju, nakon infekcije bakteriofagima, takva situacija posve uobičajena i adsorpcija bakteriofaga na bakterijske stanice se javlja u većoj mjeri c).

Kao optimalno rješenje problema specifičnosti i uskog spektra djelovanja, a u svrhu šire primjene svakako bi bio zanimljiviji razvoj pripravaka koji sadrže više vrsta bakteriofaga -

koktel bakteriofaga. Informacije o stručnoj primjeni u zemljama gdje je to trenutno moguće govore o formulacijama koje sadrže više desetaka vrsta bakteriofaga uz često korištenje individualnog pristupa. Izvješća koja donose takve podatke ipak nisu u skladu s trenutnim regulatornim zahtjevima EU i SAD-a te je takva primjena za sada nezamisliva. To ne znači da će tako biti i u budućnosti posebno ukoliko se daljnjim multidisciplinarnim istraživanjima te kliničkim studijama potvrdi djelotvornost uz minimalan rizik primjene u ljudi, uz prilagodbu regulatornih okvira i primjenu proizvodnih zahtjeva kakvoće proizvoda.

Uključivanje većeg broja faga u formulaciju povećalo bi troškove razvoja i proizvodnje iako bi u konačnici takav pristup bio ekonomski isplativiji. S druge strane, zabrinutost može predstavljati mogući utjecaj takvog pripravka na ostale bakterije prisutne u organizmu koje nisu primarni cilj takve terapije. U idealnom slučaju u formulacije bi trebalo uključiti dovoljno različitih vrsta faga koji imaju spektar djelovanja samo na patogene bakterije koje su poznate kao najčešći uzročnici infekcija koje bi se liječile.

Primjena koktela bakteriofaga ne samo da bi mogla isključiti negativnost uskog spektra djelovanja već bi mogla omogućiti učinkovitiju primjenu u smislu zaobilaženja pojavnosti rezistencije na bakteriofage. Tijekom evolucije bakterijske stanice su razvile raznovrsne mehanizme rezistencije koje im omogućavaju opstanak u prisutnost antibiotika. Takvi mehanizmi postoje i za zaobilaženje infekcije bakteriofagima. Prema literaturnim podacima učestalost razvoja takve rezistencije je 10 puta manja nego što je to slučaj s antibioticima. Najjednostavniji primjer razvoja rezistencije je pojava točkaste mutacije kojom može doći do izmjene u strukturi površinskog antigena bakterijske stanice, a koji je nužan za vezanje faga za bakteriju. Uslijed takve mutacije fag više nema mogućnost vezanja. Genetčki materijal faga također je podložan mutacijama koje doprinose evolucijskom razvoju. Na taj način se i virusi prilagođavaju te stoga uspješno mogu inficirati bakterijske stanice kojima su promijenjeni proteinski vezni receptori. Osim toga, ukoliko bi se koristili kokteli bakteriofaga, posebice ukoliko bi korišteni fagi imali vezne afinitete za različite površinske antigene bakterijske stanice, mala je vjerojatnost da bi moglo doći do razvoja rezistencije. Ukoliko bi se i razvila bakterijska rezistencija na jedan soj, ostali prisutni sojevi iz koktela bakteriofaga mogli bi učinkovito inficirati bakterijske stanice.

Razvojem i probirom sojeva bilo bi moguće napraviti banku bakteriofaga koje karakterizira specifičnost da za vezanje koriste površinske antigene bakterijske stanice koji su više konzervativni, da na molekularnoj razini ne podliježu učestalim mutacijama ili pak da se vežu na manje specifične površinske receptore. Također, smanjenju rezistencije na bakteriofage mogao bi doprinijeti i izbor faga koji se u vrlo kratkom vremenu ireverzibilno vežu za bakterijsku stanicu i započinju infekciju te ih karakterizira oslobađanje velike količine

novih infektivnih virusnih čestica tijekom lize stanica. Iako je primjena koktela bakteriofaga primamljiva mogućnost, takav pristup ima neke dodatne zahtjeve koje treba detaljno definirati. Razlog za zabrinutost može predstavljati prvenstveno sigurnost primjene u odnosu na interakcije s imunološkim sustavom, a također i farmakološki zahtjevi koji su kompleksni za primjenu već i jedne vrste faga.

Većina novijih radova o učinkovitosti primjene izvještava kako u modelnih organizama nisu uočene značajnije nuspojave, a interakcije s imunološkim sustavom su nezamjetne. Neki od radova donose podatke koji ukazuju da fagi osim na smanjenje broja bakterija u modelnom organizmu imaju i pozitivan učinak na smanjenje intenziteta upalnog procesa. Dostupni su i podaci kako primjena kod ljudi ne izaziva značajnije nuspojave, no navedeno tek treba biti potvrđeno detaljnim kliničkim studijama. Dodatni zabrinjavajući čimbenik je i oslobađanje velikih količina endotoksina koji bi mogli biti oslobođeni u organizmu uslijed istovremene lize velikog broja stanica gram-negativnih bakterija, iako je takva pojava moguća i tijekom primjene nekih od antibiotika. Glavni razlog zašto se fage smatra sigurnima za primjenu je činjenica da se neprestano unose u ljudski organizam te ne stupaju u interakciju s eukariotskom stanicom u smislu prijenosa genetičkog materijala. Obzirom na njihovu proteinsku strukturu velika većina se ubrzo nakon primjene uklanja iz cirkulacije pomoću retikuloendotelnog sustava. No istraživanjima je otkriveno da se provođenjem uzastopne primjene i izolacije u eksperimentalnim životinjama u konačnici može izolirati fage koji stoga imaju prilagođenu ovojnicu uslijed čega im se cirkulacija u organizmu produlji na znatno duži vremenski period.

Iako rezultati mnoštva radova podupiru pretpostavke o učinkovitosti primjene bakteriofaga kao antibakterijskog sredstva *in vivo*, njihov farmakološki aspekt u smislu farmakokinetike nije dovoljno istražen, a uobičajena farmakokinetika za lijekove nije u potpunosti primjenjiva. Za razliku od antibiotika i drugih lijekova čija koncentracija nakon primjene lijeka polako počinje padati u ovisnosti o vremenu, za bakteriofage se nakon primjene u prisutnosti ciljane bakterijske stanice na mjestu djelovanja očekuje porast u broju funkcionalnih čestica faga od početka primjene, dok se broj bakterijskih stanica treba smanjivati. Učinkovitost bakteriofaga uvjetovana je mogućnošću njihovog dopremanja na ciljno mjesto, kao i dostupnosti ciljnog mjesta djelovanja (74). No ponekad je sama dostava na mjesto djelovanja ograničavajući faktor obzirom na veličinu čestica bakteriofaga u usporedbi s malim molekulama uobičajenih lijekova. Ipak, iz znanstvene literature dostupan je podatak o mogućnosti prodora faga u krvotok nakon oralne primjene. Oralnom dostavom moguće je tretirati infekcije gastrointestinalnog sustava, no pri tome treba uzeti u obzir fiziologiju bakteriofaga i njihovu sposobnost uspješnog prolaska kisele barijere želuca. U tu svrhu uzimaju se u obzir različiti farmaceutski oblici ili istovremena primjena antacida kako

na mjestu djelovanja ne bi došlo do značajnijeg gubitka u smislu vijabilnih čestica sposobnih uzrokovati infekciju bakterijske stanice. U ostalim slučajevima svakako su značajni izvještaji koji govore o učinkovitosti parenteralne tj. intraperitonealne primjene pripravaka faga. Svakako je potrebno provoditi daljnja istraživanja kojima bi se detaljnije definiralo učinkovitost puta primjene kao i optimiziralo moguće sustave za dostavu ovisno o željenom mjestu djelovanja.

U slučaju primjene koktela bakteriofaga problem dostave dovoljne količine na ciljano mjesto djelovanja još više dolazi do izražaja obzirom da se u koktelu povećava broj vrsta, a time se smanjuje udio pojedine vrste u ukupnom broju formulacije koja bi se primjenjivala. Stoga bi najuspješnija strategija bila unos najvećeg mogućeg broja bakteriofaga na mjesto gdje je najveća koncentracija patogena, što je relativno lako u slučaju površinskih lezija kože. Bilo bi značajno koristiti fage koji imaju slične karakteristike u smislu trajanja vremenskog perioda od adsorpcije do započinjanja infekcije kao i generacijsko vrijeme. Svakako je potrebno provoditi daljnja detaljna istraživanja kojima bi se definirao odnos između koncentracija patogenih bakterija te primjenjivih doza bakteriofaga. To je bitno zato što optimiziranje broja dostavljenih faga u jednoj dozi u odnosu na prisutan broj bakterijskih stanica posebice u slučajevima sustavne primjene ima veliki značaj za postizanje produktivne infekcije bakterija bakteriofagima.

Primjena bakteriofaga u terapijske svrhe ne bi smjela biti provedena dok se u detalje ne utvrdi i razumije biologija bakteriofaga koji se želi koristiti, a učinkovitost i sigurnosti moraju biti testirani na životinjskim modelima i potvrđeni kliničkim ispitivanjima. Pripravak mora sadržavati virusne čestice sposobne za infekciju ciljane, prethodno identificirane bakterijske vrste. Proizvodni zahtjevi moraju biti takvi da u pripravcima za potencijalnu primjenu nema niti minimalne količine dijelova bakterijskih stanica korištenih za umnažanje terapijskih faga, a koji bi unosom u ljudski organizam mogli pogubno djelovati na pacijenta, posebice se ovdje misli na prisutnost endotoksina koji bi potencijalno mogli zaostati u pripravku. Uklanjanje neželjenih sastojaka omogućuju moderne metode izdvajanja i pročišćavanja čime je moguće dobiti pripravak siguran za primjenu.

Limitirajući faktori za bakteriofage kao terapijsko sredstvo svakako su ekonomski aspekt i intelektualno vlasništvo. Posljednjih desetljeća industrija nije značajnije ulagala u razvoj i proizvodnju novih antibiotika zbog velikih troškova i male zarade. Stoga je teško očekivati da bi bakteriofagi mogli zainteresirati proizvođače, dodatan razlog može biti i to što njihova primjena nije patentabilna, a dostupni su za izolaciju iz prirode. Naravno da tvrtke mogu zaštititi sojeve koje su detaljno ispitale i definirale im biološku aktivnost, no konkurencija time nije spriječena da izolira vlastiti soj iz prirode. Eventualno zanimljivima se

mogu činiti genetički izmijenjeni i prilagođeni bakteriofagi kao sustavi koji se koriste u dijagnostici, ispitivanju novih molekula, molekularnim mehanizmima dostave cjepiva ili genske terapije u eukariotsku stanicu, kao i lizini bakteriofaga. Još jedan negativan aspekt šire prihvatljivosti bakteriofaga kao potencijalnog terapijskog sredstva može predstavljati činjenica da se radi o aktivnim virusnim česticama koje nose genetičku informaciju za replikaciju nukleinskih kiselina te strukturnih proteina, što može izazvati odbojnost kod stručnjaka i laika. Ovaj aspekt je manje značajan ukoliko bi se pažljivom znanstvenom metodologijom uspješno uklonili drugi ozbiljniji limitirajući čimbenici.

Bez obzira na prepreke, pobornici primjene faga tvrde da su mnogi od problema više percepcijske prirode nego stvarni te da tehnički izazovi mogu biti ispunjeni. U slučaju potpune rezistencije mogli bi se koristiti kao samostalno sredstvo za suzbijanje bakterijske infekcije u terapijske svrhe, ili pak kao prateća terapija za tretiranje infekcija uzrokovanih sojevima djelomično osjetljivih na antibiotike, a u svrhu sprečavanja pojave rezistentnih mutanata. Primjena bakteriofaga u svrhu suzbijanja rasta patogenih mikroorganizama za sada je odobrena u Gruziji i Rusiji te u Poljskoj kao eksperimentalno liječenje. Također se pretpostavlja da bi mogli biti učinkoviti kao dostavljači genske terapije, posebice fagi prilagođeni genetičkim inženjerstvom. Osim u medicini, bakteriofagi imaju potencijal za primjenu također i u stomatologiji, veterini, prehrambenoj industriji te poljoprivredi. Mnoge druge grane ljudskog djelovanja uspješno primjenjuju bakteriofage.

Trenutni i budući utjecaj na potrebe istraživanja i razvoja bakteriofaga kao i ostalih antibakterijskih sredstava predstavlja sve više rastuća rezistencija bakterija na dostupne antibiotike. Bez učinkovitog odgovora na bakterijske infekcije, posebice uzrokovane višestruko rezistentnim sojevima ne može se zamisliti moderan svijet kao i blagodati moderne medicine. Daljnji porast antibiotičke rezistencije bakterijskih vrsta kao i zanemarivanje razvoja antibiotika može dovesti do situacije kada medicina neće imati drugog izbora nego usvojiti terapiju fagima kao jedinu dostupnu mogućnost za sve veći broj inače neizlječivih infekcija.

5. ZAKLJUČAK

Zaključak i ciljevi za budućnost

1. Bakteriofagi predstavljaju značajan ali trenutno nedovoljno razvijen potencijal za korištenje u terapijske svrhe kao samostalna sredstva ili pak kao potpora antibiotskoj terapiji.
2. Predstavljaju potencijal da budu korišteni kao dostavljači genske terapije ili cjepiva, posebice zbog toga što su podložni prilagodbi genetičkim inženjerstvom.
3. Bez obzira na podatke o uspješnosti kliničke primjene iz zemalja bivšeg SSSR-a i Istočne Europe, potrebno je provesti klinička ispitivanja te potvrditi učinkovitost i sigurnost primjene u ljudi prema trenutnim regulatornim zahtjevima u EU i SAD. Moguće je da će multidisciplinarnim pristupom neki regulatorni zahtjevi zbog specifičnosti problematike biti redefinirani. Također je potrebno prilagoditi proizvodne postupke zahtjevima dobre proizvođačke prakse za biološke terapeutike.
4. Primjena u drugim područjima ljudskog djelovanja kao što je poljoprivreda i prehrambena industrija u svrhu suzbijanja bakterijskog rasta im je prepoznata i odobrena te se smatraju sigurnima za primjenu.
5. Smjer razvoja i potencijalnu primjenu bakteriofaga definirat će rezultati budućih istraživanja.

6. LITERATURA

1. Breedlove B, Cohen M. After the Resistance: The Alamo Today. *Emerg Infect Dis* 2014;20(7):1268-9.
2. Brötz-Oesterhelt H, Sass P. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. *Future Microbiol* 2010;5(10):1553-79.
3. Bush K. The coming of age of antibiotics: discovery and therapeutic value. *Ann NY Acad Sci* 2010;1213(1):1-4.
4. Aminov R. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front Microbiol* 2010;1:1-7.
5. Summers WC. Bacteriophage Research: Early History. U: Kutter E, Sulakvelidze A. ur. Bacteriophages. CRC Press; 2005, str. 5-27.
6. Wittebole X, De Roock S, Opal S. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 2013;5(1):226--35.
7. Savoia D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol* 2012;7(8):979-90.
8. Cole ST. Who will develop new antibacterial agents? *Phil Trans R Soc B* 2014; 369: 20130430.doi:10.1098/rstb.2013.0430.
9. Harbarth S, Theuretzbacher U, Hackett J, Adriaenssens N, Anderson J, Antonisse A. Antibiotic research and development: business as usual? *J Antimicrob Chemother* 2015;70(6):1604-7.
10. Laxminarayan R, Powers J. Antibacterial R&D incentives. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10(10):727-8.
11. Wright G, Poinar H. Antibiotic resistance is ancient: implications for drug discovery. *Trends Microbiol* 2012;20(4):157-9.
12. Perry J, Westman E, Wright G. The antibiotic resistome: what's new? *Curr Opin Microbiol* 2014;21:45-50.
13. Martínez J, Baquero F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Upsala J Med Sci* 2014;119(2):68-77.
14. Jansen G, Aktipis C. Resistance Is Mobile: The Accelerating Evolution of Mobile Genetic Elements Encoding Resistance. *J Evol Med* 2014;2:1-3.
15. Cox G, Wright G. Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* 2013;303(6-7):287-92.
16. Davies J, Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol Mol Biol R* 2010;74(3):417-33.
17. van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Front Microbiol* 2011;2:1-27.
18. Theuretzbacher U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *J Glob Antimicrob Resist* 2013;1(2):63-9.
19. Pendleton J, Gorman S, Gilmore B. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11(3):297-308.
20. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J i sur. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. *Infect Immun* 2002;70(2):631-41.
21. Dinges M, Orwin P, Schlievert P. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(1):16-34.
22. *Staphylococcus aureus*
Available at: http://textbookofbacteriology.net/staph_5.html. Accessed February 14, 2015.
23. Khodaverdian V, Pesho M, Truitt B i sur. Discovery of Antivirulence Agents against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Ch* 2013;57(8):3645-52.
24. Nikaido H. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem* 2009;78(1):119-46.

25. Gardete S, Tomasz A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest 2014;124(7):2836-40.
26. Agnoli K, Schwager S, Uehlinger S i sur. Exposing the third chromosome of *Burkholderia cepacia* complex strains as a virulence plasmid. Mol Microbiol 2011;83(2):362-78.
27. McClean S, Callaghan M. *Burkholderia cepacia* complex: epithelial cell-pathogen confrontations and potential for therapeutic intervention. J Med Microbiol 2009;58(1):1-12.
28. Sousa S, Ramos C, Leitão J. Burkholderia cepacia Complex: Emerging Multihost Pathogens Equipped with a Wide Range of Virulence Factors and Determinants. Int J Microbiol 2011;2011:1-9.
29. *Pseudomonas*
Available at: http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas_2.html. Accessed February 19, 2015
30. O'Loughlin C, Miller L, Siryaporn A, Drescher K, Semmelhack M, Bassler B. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. P Natl Acad Sci USA 2013;110(44):17981-6.
31. Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator R D. *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. Virulence 2012;3(3):243-50.
32. Gordon N, Wareham D. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. Int J Antimicrob Agents 2010;35(3):219-26.
33. Willems R, Top J, van Schaik W i sur. Restricted Gene Flow among Hospital Subpopulations of *Enterococcus faecium*. MBio 2012;3(4):e00151-12. doi:10.1128/mBio.00151-12.
34. Gwynn M, Portnoy A, Rittenhouse S, Payne D. Challenges of antibacterial discovery revisited. Ann NY Acad Sci 2010;1213(1):5-19.
35. Livermore D, Blaser M, Carrs O i sur. Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. J Antimicrob Chemother 2011;66(9):1941-4.
36. Walsh C, Wencewicz T. Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. J Antibiot 2013;67(1):7-22.
37. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. J Antibiot 2012;65(8):385-95.
38. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. Nat Rev Drug Discov 2013;12(5):371-87.
39. Ly-Chatain MH. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy. Front Microbiol 2014;5:51-8.
40. Classification and Basic Properties of Bacteriophages
Available at: http://www.phage.org/images/thebacteriophages/0020_table_001.pdf. Accessed May 3, 2015.
41. Selected Properties of Major Phage Groups
Available at: http://www.phage.org/images/thebacteriophages/0020_table_002.pdf. Accessed May 3, 2015.
42. The structure of T2 bacteriophage - Biology Forums Gallery
Available at: <http://biology-forums.com/index.php?action=gallery;sa=view;id=392>. Accessed October 3, 2015.
43. Dalmaso M, Hill C, Ross R. Exploiting gut bacteriophages for human health. Trends Microbiol 2014;22(7):399-405.
44. Hartwell L, Hood L, Goldberg M, Reynolds A, Silver L. Genetics: From Genes to Genomes. 4th ed. New York: McGraw-Hill; 2011.
45. Cenens W, Makumi A, Mebrhatu M, Lavigne R, Aertsen A. Phage–host interactions during pseudolysogeny. Bacteriophage 2013;3(1):e25029.doi:10.4161/bact.25029.
46. Chronic Infection
Available at: http://www.archaealviruses.org/terms/chronic_infection.html. Accessed October 4, 2015.

47. Rakhuba D, Kolomiets E, Szwajcer Dey E, Novik G. Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Pol J Microbiol* 2010;59(3):145-55.
48. Young R. Phage lysis: Three steps, three choices, one outcome. *J Microbiol* 2014;52(3):243-58.
49. Refardt D, Rainey P. Tuning a genetic switch: experimental evolution and natural variation of prophage induction. *Evolution* 2009;64(4):1086-97.
50. Bikard D, Marraffini L. Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages. *Curr Opin Immunol* 2012;24(1):15-20.
51. Hyman P, Abedon S. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv Appl Microbiol* 2010;70:217-48.
52. Dy R, Richter C, Salmond G, Fineran P. Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. *Annu Rev Virol* 2014;1(1):307-31.
53. Barrangou R. CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2013;4(3):267-78.
54. Sorek R, Lawrence C, Wiedenheft B. CRISPR-Mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea. *Annu Rev Biochem* 2013;82(1):237-66.
55. Labrie S, Samson J, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol* 2010;8(5):317-27.
56. Goldfarb T, Sberro H, Weinstock E i sur. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J* 2015;34(2):169-83.
57. Brüssow H. Bacteriophage–host interaction: from splendid isolation into a messy reality. *Curr Opin Microbiol* 2013;16(4):500-06.
58. Samson J, Magadán A, Sabri M, Moineau S. Revenge of the phages: defeating bacterial defences. *Nat Rev Microbiol* 2013;11(10):675-87.
59. Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell K, Davidson A. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* 2012;493(7432):429-32.
60. Chan B, Abedon S, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol* 2013;8(6):769-83.
61. Clokie M, Millard A, Letarov A, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage* 2011;1(1):31-45.
62. Sarhan W, Azzazy H. Phage approved in food, why not as a therapeutic? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2015;13(1):91-101.
63. Denes T, Wiedmann M. Environmental responses and phage susceptibility in foodborne pathogens: implications for improving applications in food safety. *Curr Opin Biotech* 2014;26:45-9.
64. Keary R, McAuliffe O, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, Coffey A. Bacteriophages and their endolysins for control of pathogenic bacteria. U: Méndez-Vilas A. ur. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Formatex Research Center, Badajoz; 2013, 1028-40.
65. Schofield D, Sharp N, Westwater C. Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens. *Bacteriophage* 2012;2(2):105-21.
66. Smartt A, Xu T, Jegier P, Carswell J, Blount S, Saylor G et al. Pathogen detection using engineered bacteriophages. *Anal Bioanal Chem* 2011;402(10):3127-46.
67. Bakhshinejad B, Sadeghizadeh M. Bacteriophages and their applications in the diagnosis and treatment of hepatitis B virus infection. *WJG* 2014;20(33):11671-83.
68. Small Things Considered: Phage DNA: Going with the Flow
Available at: <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2011/09/phage-dna-going-with-the-flow.html>. Accessed October 3, 2015.
Bacteriophages attacking *E. coli*
69. Available at: <http://www.gettyimages.com/detail/photo/bacteriophages-attacking-e-coli-high-res-stock-photography/128583281>. Accessed October 3, 2015.

70. Jassim S, Limoges R. Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages 'The Living Drugs'. *World J Microbiol Biotechnol* 2014;30(8):2153-70.
71. Adhya S, Merrill CR, Biswas B. Therapeutic and Prophylactic Applications of Bacteriophage Components in Modern Medicine. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014;4(1):a012518.doi:10.1101/cshperspect.a012518.
72. Phage Therapy
Available at: <http://www.phage-therapy.org/>. Accessed October 3, 2015.
73. Gill J, Young R, Miller A, Miller P, Therapeutic applications of phage biology: history, practice and recommendations. U: Miller AA, Miller PF. ur. *Emerging Trends in Antibacterial Discovery: Answering the Call to Arms*. Caister Academic Press; 2011, str. 367-410.
74. Ryan E, Gorman S, Donnelly R, Gilmore B. Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *J Pharm Pharmacol* 2011;63(10):1253-64.
75. Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Kato S, Inoue T, Ujihara T, Ohara N i sur. Evaluating efficacy of bacteriophage therapy against *Staphylococcus aureus* infections using a silkworm larval infection model. *FEMS Microbiol Lett* 2013;347(1):52-60.
76. Takemura-Uchiyama I, Uchiyama J, Osanai M, Morimoto N, Asagiri T, Ujihara T i sur. Experimental phage therapy against lethal lung-derived septicemia caused by *Staphylococcus aureus* in mice. *Microbes Infect* 2014;16(6):512-17.
77. Cao F, Wang X, Wang L, Li Z, Che J, Wang L et al. Evaluation of the Efficacy of a Bacteriophage in the Treatment of Pneumonia Induced by Multidrug Resistance *Klebsiella pneumoniae* in Mice. *Biomed Res Int* 2015;2015:1-9.
78. Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, Ricard J. Treatment of Highly Virulent Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Pneumonia With Bacteriophages. *Crit Care Med* 2015;43(6):190-8.
79. Pouillot F, Chomton M, Blois H, Courroux C, Noelig J, Bidet P et al. Efficacy of Bacteriophage Therapy in Experimental Sepsis and Meningitis Caused by a Clone O25b:H4-ST131 *Escherichia coli* Strain Producing CTX-M-15. *Antimicrob Agents Ch* 2012;56(7):3568-75.
80. Maura D, Galtier M, Le Bouguenec C, Debarbieux L. Virulent Bacteriophages Can Target O104:H4 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the Mouse Intestine. *Antimicrob Agents Ch* 2012;56(12):6235-42.
81. Park K, Cha K, Myung H. Observation of inflammatory responses in mice orally fed with bacteriophage T7. *J Appl Microbiol* 2014;117(3):627-33.
82. Miernikiewicz P, Dąbrowska K, Piotrowicz A i sur. T4 Phage and Its Head Surface Proteins Do Not Stimulate Inflammatory Mediator Production. *PLoS ONE* 2013;8(8):e71036.doi:10.1371/journal.pone.0071036.
83. Xu Y, Liu Y, Liu Y, Pei J, Yao S, Cheng C. Bacteriophage therapy against *Enterobacteriaceae*. *Virol Sin* 2015;30(1):11-18.
84. *E. coli*-Proteus bacteriophage
Available at: <http://www.microgen.ru/en/products/bakteriofagi/bakteriofag-koli-proteynny/>. Accessed October 9, 2015.
85. Bacteriophages
Available at: <http://www.microgen.ru/en/products/bakteriofagi>. Accessed October 8, 2015.
86. McCallin S, Alam Sarker S, Barretto C, Sultana S, Berger B, Huq S i sur. Safety analysis of a Russian phage cocktail: From MetaGenomic analysis to oral application in healthy human subjects. *Virology* 2013;443(2):187-96.
87. Ma Y, Pacan J, Wang Q, Sabour P, Huang X, Xu Y. Enhanced alginate microspheres as means of oral delivery of bacteriophage for reducing *Staphylococcus aureus* intestinal carriage. *Food Hydrocolloid* 2012;26(2):434-40.

88. Dini C, Islan G, de Urreaza P, Castro G. Novel Biopolymer Matrices for Microencapsulation of Phages: Enhanced Protection Against Acidity and Protease Activity. *Macromol Biosci* 2012;12(9):1200-08.
89. Semler D, Goudie A, Finlay W, Dennis J. Aerosol Phage Therapy Efficacy in *Burkholderia cepacia* Complex Respiratory Infections. *Antimicrob Agents Ch* 2014;58(7):4005-13.
90. Kamal F, Dennis J. *Burkholderia cepacia* Complex Phage-Antibiotic Synergy (PAS): Antibiotics Stimulate Lytic Phage Activity. *Appl Environ Microb* 2014;81(3):1132-8.
91. Knezevic P, Curcin S, Aleksic V, Petrusic M, Vlaski L. Phage-antibiotic synergism: a possible approach to combatting *Pseudomonas aeruginosa*. *Res Microbiol* 2013;164(1):55-60.
92. Ryan E, Alkawareek M, Donnelly R, Gilmore B. Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;65(2):395-8.
93. Shivaswamy V, Kalasuramath S, Sadanand C i sur. Ability of Bacteriophage in Resolving Wound Infection Caused by Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Uncontrolled Diabetic Rats. *Microb Drug Resist* 2015;21(2):171-7.
94. Trudil D. Phage lytic enzymes: a history. *Virol Sin* 2015;30(1):26-32.
95. Pastagia M, Schuch R, Fischetti V, Huang D. Lysins: the arrival of pathogen-directed anti-infectives. *J Med Microbiol* 2013;62(Pt_10):1506-16.
96. Fischetti V. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol* 2008;11(5):393-400.
97. Fenton M, McAuliffe O, O'Mahony J, Coffey A. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioeng Bugs* 2010;1(1):9-16.
98. Yang H, Yu J, Wei H. Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. *Front Microbiol* 2014;5:1-6.
99. Verbeken G, Pirnay J, De Vos D i sur. Optimizing the European Regulatory Framework for Sustainable Bacteriophage Therapy in Human Medicine. *Arch Immunol Ther Exp* 2012;60(3):161-72.
100. European Medicines Agency - Human regulatory - Innovation Task Force
Available at:
http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000334.jsp. Accessed: October 17, 2015.
101. Directive 98/44/EC of the European Parliament and of the Council of 6 July 1998 on the legal protection of biotechnological inventions
Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:31998L0044>
Accessed: October 9, 2015.
102. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC - Commission Declaration
Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:32001L0018>
Accessed: October 9, 2015.
103. Pirnay J, Blasdel B, Bretaudeau L i sur. Quality and Safety Requirements for Sustainable Phage Therapy Products. *Pharm Res* 2015;32(7):2173-9.
104. Parracho H, Burrowes B, Enright M. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. *J Mol Genet Med* 2012;6:279-86.
105. Denou E, Bruttin A, Barretto C, Ngom-Bru C, Brüssow H, Zuber S. T4 phages against *Escherichia coli* diarrhea: Potential and problems. *Virology* 2009;388(1):21-30.
106. Lu T, Koeris M. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol* 2011;14(5):524-31.
107. Sarker S, McCallin S, Barretto C i sur. Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. *Virology* 2012;434(2):222-32.
108. Phagoburn: Evaluation of phage therapy for the treatment of burn wound infections
Available at: <http://www.phagoburn.eu/> Accessed May 24, 2015.

109. Expanded Phage Case Histories
Available at:
<http://ia600302.us.archive.org/24/items/woundcarecenterTexasexpanded/phagecasehistoric.pdf> Accessed September 10, 2015.
110. Markoishvili K, Tsitlanadze G, Katsarava R, Glenn J, Sulakvelidze A. A novel sustained-release matrix based on biodegradable poly(ester amide)s and impregnated with bacteriophages and an antibiotic shows promise in management of infected venous stasis ulcers and other poorly healing wounds. *Int J Dermatol* 2002;41(7):453-8.
111. Abedon S, Kuhl S, Blasdel B, Kutter E. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 2011;1(2):66-85.
112. Bakhshinejad B, Sadeghizadeh M. Bacteriophages as vehicles for gene delivery into mammalian cells: prospects and problems. *Expert Opin Drug Deliv* 2014;11(10):1561-74.
113. Bull J, Gill J. The habits of highly effective phages: population dynamics as a framework for identifying therapeutic phages. *Front Microbiol* 2014;5:618.
114. Abedon S. Phage Therapy: Eco-Physiological Pharmacology. *Scientifica* 2014;2014:1-29.
115. Abedon S. Phage therapy pharmacology: calculating phage dosing. *Adv appl Microbiol* 2011;77:1-40.
116. Fortier L, Moineau S. Phage Production and Maintenance of Stocks, Including Expected Stock Lifetimes. U: Clokie M, Kropinski A. ur. *Bacteriophages*. 1st ed. Humana Press; 2015, str. 203-19.
117. Merabishvili M, De Vos D, Verbeken G i sur. Selection and Characterization of a Candidate Therapeutic Bacteriophage That Lyses the *Escherichia coli* O104:H4 Strain from the 2011 Outbreak in Germany. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e52709. doi:10.1371/journal.pone.0052709.
118. Naghavi N, Golgoljam M, Akbari M. Effect of Three Sewage Isolated Bacteriophages on the Multidrug Resistant Pathogenic Bacteria. *J Biol Sci* 2013;13(5):422-6.
119. Khan Mirzaei M, Nilsson A. Isolation of Phages for Phage Therapy: A Comparison of Spot Tests and Efficiency of Plating Analyses for Determination of Host Range and Efficacy. *PLOS ONE*. 2015;10(3):e0118557. doi:10.1371/journal.pone.0118557.
120. Gill J, Hyman P. Phage Choice, Isolation, and Preparation for Phage Therapy. *Curr Pharm Biotechno* 2010;11(1):2-14.
121. Bourdin G, Schmitt B, Marvin Guy L i sur. Amplification and Purification of T4-Like *Escherichia coli* Phages for Phage Therapy: from Laboratory to Pilot Scale. *Appl Environ Microb* 2013;80(4):1469-76.
122. Eliava Phages
Available at: <http://eliavaphageny.com/phagevsantibiotics.html> Accessed October 10, 2015.
123. Taha RN, Abdulamir AS. Formulation of Therapeutic Phage Cocktails to Human Isolates of *Salmonella enterica* Serovar *enteritidis*. *J Appl Biol Sci* 2015;9(1):25-30.
124. Huang J, Bishop-Hurley S, Cooper M. Development of Anti-Infectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites. *Antimicrob Agents Ch* 2012;56(9):4569-82.
125. Haq I, Chaudhry W, Akhtar M, Andleeb S, Qadri I. Bacteriophages and their Implications on Future Biotechnology: A Review. *Viol J* 2012;9(1):9.
126. Tao P, Mahalingam M, Marasa B, Zhang Z, Chopra A, Rao V. *In vitro* and *in vivo* delivery of genes and proteins using the bacteriophage T4 DNA packaging machine. *P Natl Acad Sci USA* 2013;110(15):5846-51.
127. Bazan J, Całkosiński I, Gamian A. Phage display—A powerful technique for immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother* 2012;8(12):1829-35.
128. Asavarut P, O'Neill K, Syed N, Hajitou A. Chimeric adeno-associated virus and bacteriophage: a potential targeted gene therapy vector for malignant glioma. *Ther Deliv* 2014;5(9):975-90.

129. Pranjol M, Hajitou A. Bacteriophage-Derived Vectors for Targeted Cancer Gene Therapy. *Viruses* 2015;7(1):268-84.
130. Volcy K, Dewhurst S. Proteasome inhibitors enhance bacteriophage lambda (λ) mediated gene transfer in mammalian cells. *Virology* 2009;384(1):77-87.
131. Goodridge L, Use of genetically modified phages to deliver suicidal genes to target bacteria. U: Villa T, Veiga-Crespo P. ur. *Enzybiotics: Antibiotic Enzymes as Drugs and Therapeutics*. 1st ed. John Wiley & Sons, Inc; 2015, str. 253-68.
132. Edgar R, Friedman N, Molshanski-Mor S, Qimron U. Reversing Bacterial Resistance to Antibiotics by Phage-Mediated Delivery of Dominant Sensitive Genes. *Appl Environ Microb* 2011;78(3):744-51.
133. The Effects of K1F bacteriophage on the EV36 strain of *E. coli*. Available at: <http://www.optics.rochester.edu/workgroups/cml/me111/sp98-projects/courtney/>. Accessed October 4, 2015.
134. Weber-Dąbrowska B, Mulczyk M, Górski A, Bacteriophage Therapy of Bacterial Infections: An Update of our Institute's Experience. U: Górski A, Krotkiewski H, Zimecki M. ur. *Inflammation*. 1st ed. Springer; 2001, str. 201-9.
135. Dabrowska K, Switala-Jelen K, Opolski A, Weber-Dabrowska B, Gorski A. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol* 2005;98(1):7-13.

POPIS SKRAĆENICA

AAV/P	kimerni konstrukt adenovirusa i filamentoznog bakteriofaga M13 od <i>engl.</i> adeno-associated virus phage
AFD	Američka agencija za hranu i lijekove od <i>engl.</i> Food and Drug Administration
BAG	Švicarski savezni ured za javno zdravlje od <i>njem.</i> Bundesamt für Gesundheit
BREX	mehanizam isključivanja bakteriofaga od <i>engl.</i> bacteriophage exclusion
CDC	Američki centar za prevenciju i kontrolu bolesti od <i>engl.</i> Centers for Disease Control and Prevention
CFU	jedinice koje formiraju koloniju od <i>engl.</i> colony forming units
CRISPR-Cas	sustav prilagodljive imunosti, pravilno grupirani i raspoređeni kratki palindromski slijedovi od <i>engl.</i> clustered regularly interspaced short palindromic repeat
DEAE-celuloza	dietilaminoetil-celuloza
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EAEC	enteroagregativna <i>E. coli</i>
ECDC	Europski centar za prevenciju i kontrolu bolesti od <i>engl.</i> European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	Europska agencija za sigurnost hrane od <i>engl.</i> European Food and Safety Authority
EMA	Europska agencija za lijekove od <i>engl.</i> European Medicines Agency
EPA	Američka Agencija za zaštitu okoliša <i>engl.</i> Environmental Protection Agency
EPS	izvanstanični polisaharidi od <i>engl.</i> extracellular polysaccharides
ESKAPE	kratica sačinjena od početnih slova patogena: <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> i <i>Enterobacter</i> vrste
EU	Europska Unija
FSANZ	Regulatorno tijelo Australije i Novog Zelanda za odobravanje hrane od <i>engl.</i> Food Standards Australia New Zealand
GMP	dobra proizvođačka praksa od <i>engl.</i> good manufacturing practice
GRAS	općenito prepoznati kao sigurni od <i>engl.</i> generally recognized as safe
HIV	virus humane imunodeficijencije <i>engl.</i> human immunodeficiency virus
HTS	probir visokog protoka od <i>engl.</i> high throughput screening
IL-6	interleukin 6
MBC	minimalna baktericidna koncentracija od <i>engl.</i> minimum bactericidal concentration

MDR	višestruko rezistentan, odnosi se na soj koji ima stečenu rezistenciju barem na jedan antibiotik u tri ili više antibakterijskih kategorija <i>od engl.</i> multi-drug resistant
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija <i>od engl.</i> minimum inhibitory concentration
MNV	mišji norovirus
MOI	parametar višestrukosti infekcije - omjer između broja dodanih čestica infektivnog virusa i poznatog broja stanica u kulturi <i>od engl.</i> multiplicity of infection
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina
MRSA	meticilin rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
PAS	sinergistički učinak subinhibitornih koncentracija antibiotika i bakteriofaga <i>od engl.</i> phage – antibiotic synergy
PBP	proteini koji vežu penicilin <i>od engl.</i> penicilin binding proteins
PCR	lančana reakcija polimeraze <i>od engl.</i> polymerase chain reaction
PDR	panrezistentan, soj koji ne pokazuje osjetljivost niti na jedan agens od svih antibakterijskih kategorija, <i>engl.</i> pandrug-resistant
PEG	polietilenglikol
PFU	vijabilne jedinice faga koje formiraju plak <i>od engl.</i> plaque-forming units
QbD	kakvoća ugrađena u proizvod <i>od engl.</i> Quality by Design
RBP	proteini koji se vežu na receptor <i>od engl.</i> receptor binding proteins
RFLP	polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata <i>od engl.</i> restriction fragment length polymorphism
RNA	ribonukleinska kiselina
SAD	Sjedinjene Američke Države
SSSR	bivši Sovjetski Savez
SV40	majmunski virus 40 <i>od engl.</i> Simian vacuolating virus 40
TNF-α	faktor nekroze tumora alfa
USDA	Američko Ministarstvo poljoprivrede <i>od engl.</i> United States Department of Agriculture
VLP	virusu slične čestice <i>od engl.</i> viral like particles
VRSA	Vankomicin rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i>
XDR	ekstremno rezistentan soj koji nije osjetljiv na barem jedan agens u dvije ili manje antibakterijske kategorije, <i>od engl.</i> extensively-drug resistant