

СУЧАСНІ ПІДХОДИ ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ У БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ЦІЛЯХ

Корзун А.Ю., Гордієнко К.І., Луценко Т.М.
КПІ ім. Ігоря Сікорського, nastia.korzun@gmail.com

Abstract

Despite of the development of various antibacterial drugs, the emergence of multidrug-resistant bacteria is a major problem today. Bacteriophages are agents of antibacterial treatment and have such advantages: specificity of lysis of target bacteria and low toxicity. Currently, there are a wide range of applications of these biological agents in the field of medicine, pharmacy and biotechnology.

Keywords: *bacteriophages, phage therapy, phage engineering, phage display, medical biotechnology.*

Вступ. Бактеріофаги, або фаги, – це віруси, які специфічно вражають та інфікують різні штами бактерій. Актуальність їхнього використання полягає у цільовій дії на резистентні бактерії, оскільки більшість інфекцій, спричинені ними, не можна подолати навіть ефективними антибіотиками [1]. Говорячи про антибіотики, відбувається сповільнення їхньої розробки через тривалість створення; наукові, нормативні та економічні перешкоди, що відповідно несе за собою проблему подолання антибіотикорезистентності. Наразі виділена велика кількість бактеріофагів, які є специфічними по відношенню до різних патогенних мікрорганізмів: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio* та ін. [2]. Це створює нові підходи до лікування шляхом застосування фагової терапії. Використовуючи геномну інженерію щодо фагів, їх можна налаштувати відповідно до певних характеристик бактерій для кращої ефективності дії.

Бактеріофаги стають більш відомими як засоби доставки лікарських засобів для лікування нейродегенеративних захворювань: хвороби Альцгеймера та Паркінсона [3]. Також актуальним стає біоінженерний підхід зміни певних параметрів цих біологічних агентів, що призведе до покращення стабільності фагів, підвищення бактерицидної дії і розширення діапазону їхніх господарів [4].

Метою роботи є характеристика актуальних та ефективних застосувань бактеріофагів у сфері медичної біотехнології.

Матеріали та методи. Аналітичний огляд літератури для даної роботи проводився з використанням наступних баз даних: *PubMed*, *ScienceDirect*, *MDPI*, *BioMed Central*.

Результати та обговорення. Фагова інженерія – це модифікації або маніпуляції бактеріофагів для покращення їхніх терапевтичних властивостей [2]. Використовують різні біоінженерні методи для зміни властивостей фагів, спрямовуючи їх до певних штамів бактерій, підвищуючи їхню стабільність під час зберігання та/або транспортування. Серед бактеріофагової інженерії розрізняють фаготерапію, бактеріофаговий дисплей і фагову білкову інженерію, які буде розглянуто далі.

Фаготерапія. Фаготерапія – це використання бактеріофагів для лікування бактеріальних інфекцій. На даний момент проводяться дослідження

застосування фаготерапії для боротьби з бактеріями, які вражають рослин і тварин і, в рідкісних випадках, людей (наразі даний вид терапії офіційно не застосовується для лікування бактеріальних інфекцій людей). Фаготерапія, як і будь-яка лікувальна методика, має свої переваги та недоліки. Перевагами фаготерапії є: висока специфічність (більшість фагів може інфікувати лише дуже обмежене коло штамів бактерій в межах одного виду; це зменшує шкоду корисній мікробіоті організму); самообмеження (у разі смерті бактерії-господаря фаги перестають функціонувати); низька токсичність; експоненціальне розмноження (реплікація фагів в місцях інфекції дозволяє використовувати менше дозування); адаптивність (велика природна різноманітність фагів дозволяє замінити їх у разі виникнення резистентності); антибіоплівкова активність (руйнуючи структури біоплівки, фаги поліпшують проникнення антибіотиків) та універсальність [1, 2, 5]. Прикладом ефективності застосування фаготерапії є дослідження в клінічних випробуваннях за участю собак. У цьому дослідженні десять собак, які страждали на хронічний отит, спричинений *P. aeruginosa*, отримали одноразову дозу 0,2 мл шести бактеріофагів (від BC-BP-01 до BC-BP-06). Через 48 годин спостерігалось зниження кількості *P. aeruginosa* на 67 % [2]. Незважаючи на переваги фагів над традиційними антибіотиками, вони мають і певні недоліки. Першим з основних недоліків є вузький спектр дії, оскільки кожен окремий фаг має свій власний специфічний діапазон господарів, вимагається точна ідентифікація бактеріального штаму, що ускладнює лікування полімікробних інфекцій. Вирішенням цієї проблеми є використання так званих «фагових коктейлів». Вони включають комбінацію декількох фагів, спрямованих на різні штами або види бактерій, що забезпечує ширший спектр дії. Також деякі стратегії передбачають інтеграцію антибіотиків з фаговими коктейлями для оптимізації потенціалу фагів [2]. Наприклад науковцями за допомогою генної інженерії було створено фаг M13mp23, який посилює ефективність антибіотиків, таких як офлоксацин та гентаміцин, *in vitro* та при інфекціях у мишей. M13mp23 продемонстрував підвищену ефективність проти антибіотикорезистентних клітин, персистентів і клітин всередині структурованих біоплівок. Механізм дії M13mp23 складає надмірну експресію LexA3, стійкого до розщеплення варіанту репресора LexA, гіперекспресія якого пригнічує ДНК репарацію і виникнення антибіотикорезистентності [1]. На даний момент завдяки нещодавнім досягненням у галузі редагування геному, а саме створенню системи CRISPR-Cas, перспектива використання фагів у терапії значно зросла. Іншим недоліком є обмеження через можливу імунну відповідь при потраплянні фагів в кров, що зменшує їх активність [1]. Одним з варіантів вирішення цієї проблеми стало застосування ліпосомальної інкапсуляції для захисту фагів від нейтралізації фагоспецифічними антитілами [2]. Варто зазначити ще один важливий недолік – потенційне горизонтальне перенесення генів. Фаги здатні трансдукувати генетичний матеріал між бактеріями-господарями, що сприяє еволюції бактеріальної популяції і покращенню пристосованості бактерій [1].

Бактеріофаговий дисплей. Фаговий дисплей – це біоінженерний метод, який передбачає генетичне злиття чужорідних пептидів з поверхневими білками

фага, що призводить до створення нових частинок бактеріофагів із широким спектром використання [2]. У результаті цього фаг експресує на своїй поверхні нові білки або пептиди, завдяки яким бактеріофаг специфічно націлюється на поверхневі компоненти бактерій. Цей підхід дозволяє визначити і виокремити, які фаги прикріпилися до визначених мішеней, а які ні. Також фаговий дисплей сприяє виявленню захворювань і дослідження біомаркерів [3]. Таким чином, цей підхід полегшує пошук лігандів або білків із підвищеною спорідненістю і специфічністю до бажаних клітин-мішеней (наприклад, клітини-господарі, антитіла, штами бактерій, біомаркери), що є важливим для діагностики і цільової доставки ліків, біовізуалізації і розробки вакцин [2]. Однак, проблеми цього методу полягають у складній природі створених білкових бібліотек і обмеження у виявленні більших за розміром мішеней через відповідно малий розмір пептидів або білкових доменів, експресованих на поверхні фага. Цей метод використовують часто для виявлення ранніх ознак захворювань. Так, наприклад, було використано платформу фагового дисплея M13 для візуалізації клітин колоректального раку за допомогою специфічного зв'язування з маркером МСТ1 [6]. Мотивацією цього дослідження було виявити маркери раннього колоректального раку, оскільки наразі наявні деякі обмеження поточних методів скринінгу цього виду раку. Було обрано пептидні ліганди, як джерело зв'язування з біомаркером, які розпізнають рецептори на клітинній поверхні і специфічно зв'язуються з ними. За допомогою біоінформатичних підходів було визначено, що мембранний білок МСТ1, який синтезується на клітинній лінії колоректального раку, є чудовим маркером. Пептид РКОпер, що експресується на поверхні бактеріофага, вибірково зв'язується з клітинами колоректального раку. Після експериментів було визначено, що РКОпер специфічно взаємодіє та утворює зв'язок з МСТ1, де його надмірна експресія вказує на розвиток цього виду раку. Таким чином, фаговий дисплей допоміг визначити клітини-мішені, які були раковими, для діагностичних цілей.

Фагова білкова інженерія. В еукаріотичних вірусах фагові білки можуть бути структурними і неструктурними. До останніх належать полімерази і спеціалізовані ферменти, які також називають фаговими лізинами або ензибіотиками і використовують для створення ендолізинів – фагових неструктурних ферментів (усі літичні фаги мають власні ендолізینی) [1]. Ендолізینی – це фагові пептидогліканові гідролази, ферменти, що здатні розкладати клітинну стінку бактерій, маючи значну антибактеріальну активність. Вони також є найбільш відомими ферментами для розробки лізину. Таким чином, було виділено ендолізін LysABP-01 з бактеріофага *Acinetobacter baumannii*, де фермент має здатність лізувати клітинну стінку штамів *A. baumannii*, *E. coli* і *P. aeruginosa*, але не *S. aureus* [7]. Антибактеріальна активність значно посилювалась у результаті синергічної дії цього ендолізину разом з колістином – антибіотиком групи поліміксинів, який діє на мембрану бактерій. Дана комбінація мала синергічний ефект проти різних лікарсько-стійких штамів *A. baumannii*. Іншими білковими молекулами є піоцини R, або R-піоцини, – це бактеріоцини, які зустрічаються майже в усіх ізолятах *P. aeruginosa*. Вони

безпосередньо не синтезуються фагами, але еволюційно походять від них. R-піюцини складаються з довгих трубок у серцевині, покритих оболонками, які з'єднані з базовою пластиною, до якої прикріплені білки, що зв'язуються з рецепторами RBP [1]. Таким чином, R-піюцини зв'язуються з ядерним полісахаридом у *P. aeruginosa* через RBP рецептори. Це сприяє скороченню оболонки, проникненню стрижневої трубки всередину клітини, що призводить до утворення пор, які порушують потенціал мембрани, що відповідно призводить до апоптозу. В одному дослідженні було об'єднано частини волокон хвоста піюцину R2 з частинами волокон хвоста фагів для зміни спектру знищення піюцинів від *P. aeruginosa* до *E. coli* [8]. Таким чином, даний химерний піюцин знищив *E. coli*, водночас втратив свою літичну здатність щодо *P. aeruginosa*.

Висновки. У даній роботі було розглянуто три актуальні напрямки використання бактеріофагів у сфері біотехнологій: фаготерапія – використання бактеріофагів для цільового лікування бактеріальних інфекцій, зокрема спричинених резистентними до антибіотиків штамми; фаговий дисплей – метод генної інженерії, що дозволяє експресувати пептиди на поверхні бактеріофага для створення специфічних лігандів та фагова білкова інженерія – використання фагових ферментів, таких як ендолізени та піюцини, для створення антибактеріальних засобів. Згідно з проведенням аналізом, можна сказати, що використання фагів є достатньо перспективним напрямком досліджень, особливо в умовах зростання антибіотикорезистентності. До того ж, стрімкий розвиток генної інженерії та нанотехнологій додатково сприяє відкриттю нових можливостей застосування фагів у медицині, ветеринарії, агробіотехнології, фармацевтиці та діагностиці.

Список використаної літератури:

1. Phage-derived antibacterials: harnessing the simplicity, plasticity, and diversity of phages / B.-o. Kim et al. *Viruses*. 2019. Vol. 11, no. 3. P. 268. URL: <https://doi.org/10.3390/v11030268>.
2. The biotechnological application of bacteriophages: what to do and where to go in the middle of the post-antibiotic era / S. J. Jo et al. *Microorganisms*. 2023. Vol. 11, no. 9. P. 2311. URL: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092311>.
3. Santos S. B., Azeredo J. Bacteriophage-based biotechnological applications. *Viruses*. 2019. Vol. 11, no. 8. P. 737. URL: <https://doi.org/10.3390/v11080737>.
4. Bacteriophage bioengineering: a transformative approach for targeted drug discovery and beyond / L. Cui et al. *Pathogens*. 2023. Vol. 12, no. 9. P. 1179. URL: <https://doi.org/10.3390/pathogens12091179>.
5. Gordillo Altamirano F. L., Barr J. J. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019. Vol. 32, no. 2. URL: <https://doi.org/10.1128/cmr.00066-18>.
6. Rational identification of a colorectal cancer targeting peptide through phage display / D. Ferreira et al. *Scientific Reports*. 2019. Vol. 9, no. 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40562-1>.
7. Enhanced antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* bacteriophage ØABP-01 endolysin (LysABP-01) in combination with colistin / R. Thummeepak et al. *Frontiers in Microbiology*. 2016. Vol. 7. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01402>.
8. Retargeting R-type pyocins to generate novel bactericidal protein complexes / S. R. Williams et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008. Vol. 74, no. 12. P. 3868–3876. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.00141-08>.