

Univerzita Karlova

Pedagogická fakulta

Katedra biologie a environmentálních studií

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Možnosti léčby bakteriálních onemocnění pomocí bakteriofágů

Possibilities of Treatment of Bacterial Diseases Using Bacteriophages

Valentýna Tyllová

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Pavlasová, Ph.D.

Studijní program: Biologie, geologie a environmentalistika se zaměřením na vzdělávání  
se sdruženým studiem Chemie se zaměřením na vzdělávání

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Možnosti léčby bakteriálních onemocnění pomocí bakteriofágů potvrzuji, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Prohlašuji, že jsem při její tvorbě nepoužila nástrojů umělé inteligence jiným způsobem, než je uvedeno ve vyjádření, které je součástí textu práce. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze, 13.4. 2025

Ráda bych poděkovala mé rodině a přátelům za jejich trpělivost, podporu a pochopení během psaní nejen této práce, ale i během celého studia. Zvláštní poděkování patří mé vedoucí bakalářské práce paní RNDr. Lence Pavlosové PhD. za cenné rady, odborné vedení a vždy rychlou reakci na mé dotazy.

## **ABSTRAKT**

Práce se zabývá možnostmi léčby bakteriálních onemocnění pomocí bakteriofágů. Je zpracována jako rešerše odborné literatury. Nejprve je popsána struktura bakteriofágů, jejich životní cyklus a specifické charakteristiky, které umožňují jejich využití v terapeutické léčbě. Výhodami fágové léčby je například specifita a snižování rizika druhotných infekcí, snižování rizika vzniku rezistence bakterií na antibiotika. Nevýhodami využití bakteriofágů může být například přílišná specifita bakteriofágů ke konkrétní bakterii. V práci jsou uvedeny i způsoby, kterými jsou fágy využívány v terapiích, mezi něž patří použití enzymů, které jsou fágy kódovány (endoliziny), inhibitorů bakteriálního růstu a bakteriofágového lyzátu. Rezistence bakterií na bakteriofágy může být způsobena několika mechanismy například překrytím receptoru na bakteriální buňce, změnou tvaru bakteriální buňky nebo zničením fágové genetické informace. V práci jsou také zmíněny příklady studií, které se zabývaly bakteriofágovou léčbou infekcí způsobených bakteriemi patřících do rodu *Staphylococcus* a druhu *Pseudomonas aeruginosa*.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Bakteriofág, bakteriofágová terapie, bakteriální onemocnění, rezistence

## **ABSTRACT**

This thesis addresses possible treatments of bacterial diseases using bacteriophages. It is processed as a review of scientific literature. First, the structure of bacteriophages, their life cycle, and specific characteristics that enable their use in therapeutic treatment are described. Advantages of phage therapy include, for example, specificity and reduction of the risk of secondary infections, and reduction of the risk of bacteria developing resistance to antibiotics. Disadvantages of using bacteriophages may include, for example, the excessive specificity of bacteriophages to a particular bacterium. The thesis also presents methods by which phages are used in therapies, including the use of enzymes encoded by phages (endolysins), bacterial growth inhibitors, and bacteriophage lysate. Bacterial resistance to bacteriophages can be caused by several mechanisms, such as covering the receptor on the bacterial cell, changing the shape of the bacterial cell, or destruction of phage genetic material. The thesis also mentions examples of studies that dealt with phage therapy of infections caused by bacteria belonging to the genus *Staphylococcus* and the species *Pseudomonas aeruginosa*.

## **KEYWORDS**

Bacteriophage, bacteriophage therapy, bacterial diseases, resistance

## Obsah

Úvod.....	7
1 Metodologie.....	8
2 Bakteriofágy.....	9
2.1 Objevení bakteriofágů .....	9
2.2 Základní charakteristika bakteriofágů .....	9
2.3 Stavba bakteriofágů .....	10
2.4 Taxonomie bakteriofágů.....	12
2.5 Životní cyklus bakteriofágů .....	15
2.5.1 Interakce bakteriofágu s hostitelskou bakteriální buňkou.....	15
2.5.2 Lytický (virulentní) cyklus.....	16
2.5.3 Lyzogenní (temperovaný) cyklus .....	17
3 Bakteriofágová terapie .....	19
3.1 Princip léčby bakteriálních onemocnění pomocí bakteriofágů.....	19
3.1.1 Purifikované bakteriofágové lytické enzymy.....	19
3.1.2 Bakteriofágový lyzát.....	20
3.1.3 Bakteriofágové inhibitory bakteriálního růstu .....	21
3.2 Zvýšení stability bakteriofágů v léčivých přípravcích a jejich purifikace.....	21
3.3 Bakteriofágy vhodné k léčebnému užití .....	22
3.4 Rezistence bakterií na bakteriofágovou terapii .....	23
3.5 Výhody a nevýhody fágové terapie .....	25
3.6 Fágová terapie v kombinaci s antibiotiky .....	25
3.6.1 Porovnání bakteriofágové terapie s antibiotickou léčbou .....	26
3.7 Historický přehled výzkumu bakteriofágové terapie .....	28
3.8 Současný stav výzkumu bakteriofágové terapie .....	29

3.8.1	Bakteriofágová terapie u infekcí způsobené rodem <i>Staphylococcus</i> .....	29
3.8.2	Bakteriofágová terapie u infekcí způsobené <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	32
4	Diskuse a závěr .....	34
	Seznam použitých zdrojů .....	37

## Úvod

Antibiotika postupně ztrácí svou sílu při léčbě bakteriálních onemocnění. Bakterie jsou čím dál více rezistentní, protože se obecně používá nadměrné množství antibiotik, a to i v případech, kdy to není potřeba. Rezistence bakterií vůči antibiotikům se stává globálním problémem a je důležité hledat nová řešení léčby bakteriálních onemocnění. Nadějnou alternativou jsou viry, které napadají bakteriální buňky – bakteriofágy. Bakteriofágy stejně jako jiné viry potřebují k rozmnožení hostitelskou buňku. V případě bakteriofágů jsou to buňky bakterií. Bakteriofágy jsou nejpočetnější skupina virů. Nejhojněji je najdeme v mořské vodě. Odhadovaný počet bakteriofágů ve vodních systémech je  $10^4 - 10^8$  virionů na jeden mililitr, v půdě a částicích sedimentu se odhaduje počet bakteriofágů na  $10^9$  na jeden gram a celkový počet bakteriofágů na Zemi se odhaduje na  $10^{31}$  (Kawa et al., 2015, Esteves & Scharf, 2022).

Fágová terapie nabízí možnost cílené léčby a eliminaci patogenních bakterií bez poškození ostatní mikroflóry. Je důležité pochopit, jak bakteriofágové fungují, jaký je jejich životní cyklus, jaké jsou možné výhody a nevýhody fágové terapie. V současnosti se studiem bakteriofágové terapie intenzivně zabývají vědci např. v Hirschfeldově ústavu imunologie a experimentální terapie v Polsku, Eliavově ústavu v Tbilisi v Gruzii a ve Spojených státech amerických.

Cílem této práce je provést rešerši o provedených výzkumech fágové terapie, kterému bude předcházet shrnutí základních informací o stavbě bakteriofágu a jeho životním cyklu. Jako další cíl jsem si stanovila popsání konkrétních druhů bakteriofágů, jejich vlastností a vysvětlení mechanismů napadení a ničení bakteriálních buněk, které umožňují využití těchto fágů při léčbě bakteriálních onemocnění. Dalším cílem je potom porovnání pozitivních i negativních dopadů fágové terapie a možnosti potenciální aplikace této metody při léčbě bakteriálních onemocnění.

# 1 Metodologie

Pro účely řešení rešeršního cíle práce jsem stanovila tyto výzkumné otázky:

Výzkumná otázka č. 1: Jaké vlastnosti a charakteristiky životního cyklu bakteriofágů umožňují jejich využití v léčbě bakteriálních onemocnění a jakým způsobem jsou bakteriofágové využíváni?

Výzkumná otázka č. 2: Které druhy bakteriofágů jsou nejvhodnější pro léčebné účely vybraných onemocnění?

Výzkumná otázka č. 3: Jaké jsou hlavní výzvy a omezení spojené s používáním bakteriofágů v klinické praxi?

Odpovědi na mé výzkumné otázky jsem hledala převážně v odborných článcích. Články jsem vyhledávala v databázích Scopus, ScienceDirect, PubMed, Google scholar s využitím následujících klíčových slov: bakteriofág, bakterie, terapie, lyze, purifikace, rezistence, modifikace, antibiotika, protein, onemocnění, *Staphylococcus aureus*, rezistence (v anglickém jazyce bacteriophage, bacteria, therapy, lysis, purification, resistance, modification, antibiotics, protein, disease, *Staphylococcus aureus*). Dále jsem využívala i zdroje, které byly uváděny jako citace v článcích, ze kterých jsem čerpala. Využila jsem celkem 47 článků v anglickém jazyce a 2 články v českém jazyce a 1 monografii v českém jazyce.

## 2 Bakteriofágy

### 2.1 Objevení bakteriofágů

V roce 1896 britský vědec Ernest Hankin zkoumal vodu řek Gangy a Jumny kvůli původci onemocnění cholery, bakterii *Vibrio cholerae*. Během svého výzkumu zjistil, že v řekách se vyskytuje neznámá látka, která má antibakteriální účinky. Zjistil, že i když vodu zahřál a přefiltroval skrz porcelánové filtry, tak antibakteriální účinky nezmizely. Usoudil, že původcem antibakteriálních účinků musí být něco menšího, než jsou samotné bakterie. Podobný jev zaznamenal o 2 roky později ruský vědec Nikolaj Fjodorovič Gamaleya při práci s bakterií rodu *Bacillus subtilis*. Na práci Hankina stavěl o 20 let později britský vědec Frederick Twort. Twort, který pozoroval podobný jev jako Hankin a nevyloučil možnost, že by antibakteriální účinky mohly způsobovat viry. Z důvodu nedostatku financí ale výzkum bakteriofágů opustil. K oficiálnímu objevení bakteriofágů došlo v roce 1917 Felixem d'Herelle, což byl francouzsko – kanadský vědec. Felix d'Herelle pracoval s nemocnými vojáky a během šetření epidemie vyrobil ze vzorků stolice filtry bez bakterií, smíchal je a inkuboval je s bakteriemi kmene *Shigella*, které izoloval od pacientů. Tuto směs experimentálně naočkoval zvířatům a část směsi naočkoval na agar, aby mohl pozorovat růst bakterií. Na agarových vzorcích pozoroval oblasti, které zůstaly čisté. Tyto oblasti nazval plaky. d'Herelleho pozorování byla prezentována v roce 1917 na zasedání akademie věd a později byla publikována. d'Herelle zavedl termín „bakteriofág“, který vznikl spojením slov „bakterie“ a „fagein“ (v řečtině slovo fagein znamená jíst) v roce 1916 (Sulakvelidze et al., 2001).

### 2.2 Základní charakteristika bakteriofágů

Bakteriofágy jsou viry, které napadají bakterie, ve kterých se pak množí. To může způsobit buď lyzi (rozpad) bakteriální buňky, nebo lytický cyklus, kdy buňka není přímo ničena (Joerger, 2003).

Bakteriofágy nalezneme v každém prostředí – v oceánech, půdě, pitné vodě i v našem jídle. Jsou velice důležití pro regulaci počtu mikroorganismů na Zemi (Vaňková et al., 2018).

## 2.3 Stavba bakteriofágů

Velikost bakteriofágů je v rozmezí od 24 do 200 nm. Největším známým fágem je T4, který dosahuje velikosti přibližně 200 nm. Bakteriofágy se skládají z hlavičky (kapsidy), která je symetrická. Uvnitř této hlavičky se nachází genetická informace (Ivanovska, 2007). Typy genetické informace, které bakteriofágy mohou mít, jsou následující (Abedon, 2011; Vaňková et al., 2018):

- dsDNA – dvouřetězcová (double – stranded) DNA - nejrozšířenější typ genetické informace u bakteriofágů,
- ssDNA – jednořetězcová (single – stranded) DNA,
- dsRNA – dvouřetězcová RNA (double – stranded RNA),
- ssRNA – jednořetězcová RNA (single – stranded RNA).

Přehled příkladů bakteriofágů podle typu genetické informace je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1 Příklady bakteriofágů podle typu genetické informace (zpracováno podle Ackermenn, 2003)

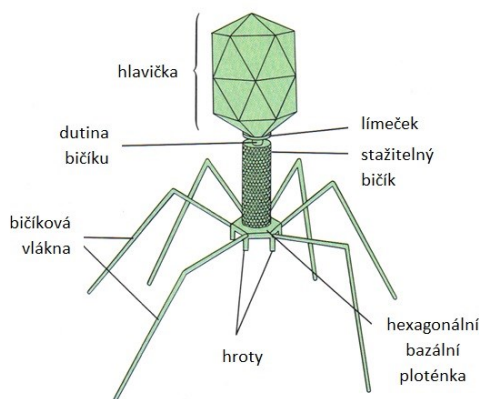
TYP GENETICKÉ INFORMACE	PŘÍKLAD BAKTERIOFÁGA
dsDNA	T4, lambda, T7
ssRNA	φX174
dsRNA	φ6
ssDNA	MS2

Velikost fágového genomu se liší a pohybuje se v rozmezí délek 3300 nukleotidů až po 500 000 nukleotidů. Infekčnost virionů je daná množstvím genetické informace v kapsidě. Příliš velké množství nebo naopak příliš malé množství genetické informace vede ke ztrátě stability bakteriofágu. Srovnání nukleotidových sekvencí bakteriofágů ukazuje širokou rozmanitost. Bakteriofágy často nemají příbuzné, kteří by měli stejnou sekvenci genomu, pokud se nejedná o profág nebo bakteriofág napadajícího stejnou hostitelskou buňku. To znamená, že bakteriofágy napadající různé hostitele se liší genomem. Bylo zjištěno,

že preference hostitele představuje překážku pro genetickou výměnu mezi fagy. Sice mají schopnost se přizpůsobit svému hostiteli, nebo jiné příbuzné buňce hostitele, kterou fág původně preferoval, ale není známo, jak rychle se bakteriofág dokáže přizpůsobit a jak často se jev vyskytuje v přírodních podmínkách proti těm laboratorním (Hatfull & Hendrix, 2012).

Kapsida bakteriofágů se skládá ze silného bílkovinného obalu, protože musí odolat tlaku, který je na ni vyvíjen velkým množstvím genetické informace (Ivanovska, 2007). Pod kapsidou se nachází krček, který ústí v bičíkovou pochvu s bičíkem, bazální destičkou s vlákny bičíku, které slouží k uchycení bakteriofága k bakterii (viz obr. 1). Co se týká tvaru kapsidy, tak bývá ikozahedrání případně helikální, můžeme se potkat i s kombinací obou symetrií (viz obr. 2). Příkladem jsou například bakteriofagy T2, T4, T6. Tyto fagy napadají bakteriální buňky *Escherichii coli*. Jejich kapsida má tvar ikozahedrání, bičík je helikální (Vaňková et al., 2018; Skurnik & Strauch, 2006).

Bičík má velmi specifickou stavbu, protože bičík má hned několik důležitých funkcí. Při injekci genetické informace do hostitelské buňky skrz něj prochází nukleová kyselina. Další funkcí bičíku je rozpoznání hostitelské buňky, za což jsou zodpovědná vlákna bičíku na bazální destičce. Bičík má dva tvary. Může být spirálovitý nebo se skládá z vrstev disků (Ackermann, 2003). K injekci nukleové kyseliny u některých fágů (T4, T2) dochází smrštěním (kontrakcí) bičíku bakteriofága. Někteří bakteriofágové nemají kontraktilní bičík například bakteriofágové T1, T3 (Nováček et al., 2016; Vaňková et al. 2018).

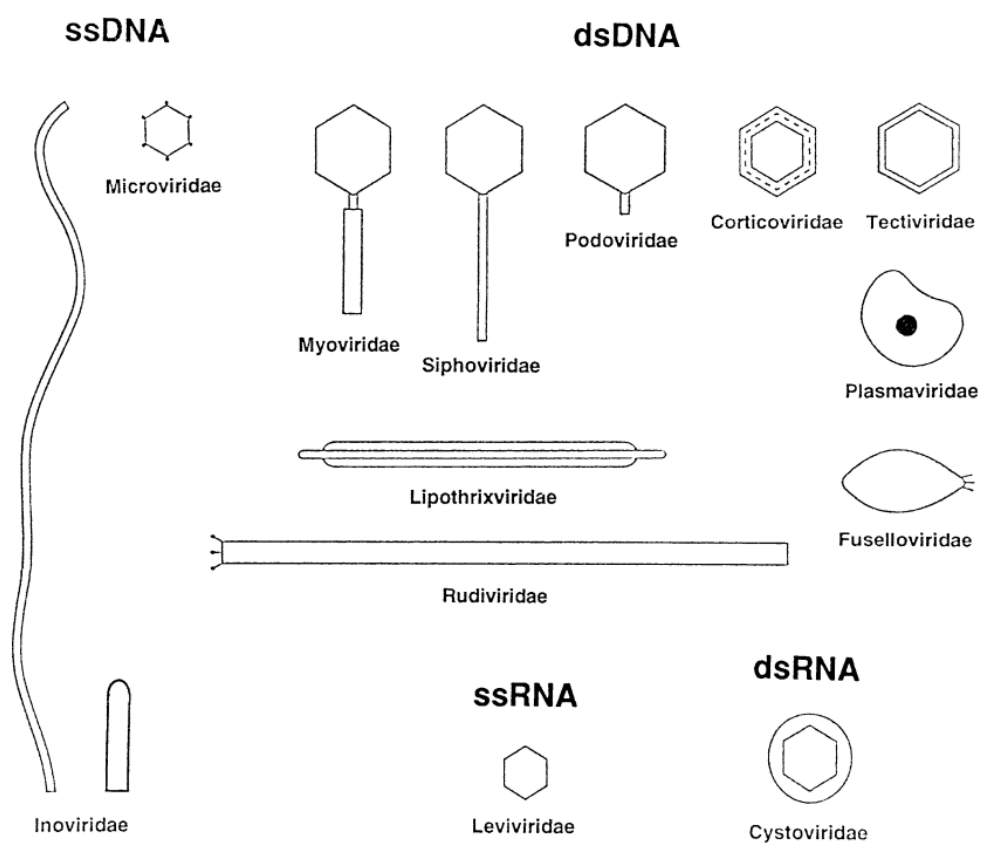


Obrázek 1 Stavba bakteriofágu

Zdroj: Kopecká, J., Rotková, G., 2017

## 2.4 Taxonomie bakteriofágů

Bakteriofágy lze rozdělit do třinácti čeledí a třiceti rodů. Velká část fágů patří do řádu *Caudovirales*, který je dále rozdělen do 4 čeledí. Pro čeleď *Myoviridae* jsou typickým znakem kontraktilní bičíky. V čeledi *Siphoviridae* bakteriofágy naopak nemají kontraktilní bičík a jejich bičík je dlouhý. *Podoviridae* mají krátký nekontraktilní bičík. Poslední čeleď tohoto řádu je *Ackermannviridae* (Ackermann, 2003; Eriksson et al., 2018).



Obrázek 2 Tvary bakteriofágů vybraných

Zdroj: (Ackermann, 2003)

V tabulce č. 2 je uvedena stručná charakteristika vybraných skupin bakteriofágů. Počet bakteriofágů v jednotlivých skupinách byl aktuální k roku 2019.

Tabulka 2 Vybrané skupiny bakteriofágů a jejich stručná charakteristika (zpracováno podle *Bacteriophage.news*, 2019).

<i>Microviridae</i>	V této skupině je 12 druhů bakteriofágů. Mají ikozahedrání tvar, jsou neobalené a jsou kulaté. Genom se skládá z jednovláknové DNA. Většinou se jedná o lytické bakteriofágy. Zaměřují se například na bakterie <i>Spiroplasma</i> .
<i>Myoviridae</i>	Mají protáhlou hlavičku, dlouhý bičík a bazální desku s hroty a vlákny. Jsou to lytické bakteriofágy.
<i>Leviviridae</i>	V této skupině jsou 4 druhy bakteriofágů. Jsou to bakteriofágy napadající kmen bakterií <i>Pseudomonas</i> . Mají ikozahedrání tvar a jsou neobalené. Na konci životního cyklu lyzují bakteriální buňku.
<i>Inoviridae</i>	Patří sem 43 druhů bakteriofágů. Jsou to bakteriofágy, které mají tyčinkovitý tvar. Jejich průměr je přibližně 7 nm a délka 2000 nm. Jsou neobalené a mají kruhový genom.
<i>Podoviridae</i>	Řadí se sem 50 druhů bakteriofágů. Nemají kontraktilní bičík a jejich bičík je krátký. Mají dvacetistěnnou kapsidu s dvouvláknovou DNA. Jejich genom kóduje 9 strukturálních proteinů.

<i>Corticoviridae</i>	Patří sem jeden druh bakteriofágu PM2. Má ikozahedrální tvar a je kulatý. V kapsidě má lipidovou membránu.
<i>Tectiviridae</i>	V této skupině jsou 4 druhy bakteriofágů. Nemají bičík. Mají ikozahedrální tvar, jsou neobalené a kapsida má dvě vrstvy s dvouvláknovou DNA.
<i>Plasmaviridae</i>	Patří sem jeden druh bakteriofágu. Tento bakteriofág se zaměřuje na bakterie <i>Acholeplasma</i> . Je obalený. Je kvazi – sférický, to znamená, že má přibližně kruhovitý tvar. Genom kóduje 15 proteinů.
<i>Fusellviridae</i>	Řadí se sem 9 bakteriofágů. Jsou to bakteriofágy napadající archea bakterie - <i>Shibatae</i> , <i>Ssolfataricus</i> a <i>Islandicus</i> . Jsou obalené a mají tvar citrónu.
<i>Cystoviridae</i>	Jeden druh fága $\phi 6$ . Bakteriofág napadající kmeny <i>Pseudomonas</i> . Má vnější lipidovou vrstvu, což je zatím známé jen u tohoto druhu bakteriofágu.
<i>Rudiviridae</i>	Napadají archea bakterie. Mají tvar tyčinky, nejsou obalené. Mají lineární genom dvouřetězcové DNA.
<i>Lipothrixiviridae</i>	V této skupině je 8 bakteriofágů. Napadají archea bakterie. Mají tvar tyčinky, nejsou obalené. Mají lineární genom dvouřetězcové DNA.

<i>Siphoviridae</i>	V této skupině je 313 druhů. Napadají archea bakterie a bakterie <i>Lactobacillus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Streptococcus</i> . Kapsida má ikozahedrální tvar. Nemají kontraktilní bičíky.
<i>Tevenvirinae</i>	Řadí se sem bakteriofág T4.

## 2.5 Životní cyklus bakteriofágů

Bakteriofágy mají dvě formy životního cyklu – lytický (virulentní) a lyzogenní (temperovaný). Některé fágy jsou schopné obou forem, některé jen jedné (Vaňková et al., 2018).

### 2.5.1 Interakce bakteriofágu s hostitelskou bakteriální buňkou

Bakteriofágy mají na konci svého bičíku speciální povrchové proteiny RBPs (receptor binding protein), kterými se přichytí na buněčnou stěnu bakterie, konkrétně na povrchové receptory bakteriální buňky. Specifita těchto receptorů a proteinů určuje, které bakteriální buňky je bakteriofág schopný napadnout (Hyman & Abedon, 2010). Specifita je určena i lokalizací a hustotou receptorů na buněčné stěně hostitele.

K přichycení bakteriofágu k hostitelské bakteriální buňce dochází připojením k receptoru, který je umístěn na povrchu bakterie. To je pro všechny bakteriofágy společné. Receptory jsou rozmanité, a proto se nedokáže každý bakteriofág přichytit ke každé bakterii. Tím je zařízena specifita bakteriofágů k hostitelům. Existují například flagellotropní bakteriofágy, bakteriofágy, které napadají bakteriální buňku pomocí bičíku hostitele. Bičík využijí jako receptor, na který se navážou (Esteves & Scharf, 2022).

Po přichycení bakteriofágu k hostitelské buňce dochází k injekci genetické informace bakteriofágu do cytoplazmy bakterie pomocí kontrakce bičíku. Poté je zahájený replikační proces. Replikačnímu procesu může ještě předcházet interakce fágu s různými sacharidovými skupinami, které jsou na povrchu bakteriální buňky, které brání navázání bakteriofágu na receptor. Bakteriofágy si vyvinuly mechanismy, které tyto látky rozpoznají a pak je degradují – pomocí enzymů hydrolázy nebo lyázy. Tím získají přístup k receptoru

hostitelské buňky (Stone et al., 2019). Poté se spustí buď lytický nebo lyzogenní cyklus, záleží na typu bakteriofágu.

### 2.5.2 Lytický (virulentní) cyklus

Při tomto životním cyklu bakteriofágy způsobí ve svém důsledku lyzi hostitelské buňky, a proto je důležitý pro fágovou terapii bakteriálních onemocnění. Během rozpadu buňky se uvolní nové viriony. Virulentní cyklus se spustí v moment, kdy se adsorbuje virion na povrch hostitelské buňky. Lytické enzymy naruší buněčnou stěnu a dochází pak k penetraci genetické informace fágu do cytoplazmy hostitelské buňky. Tyto enzymy jsou kódované přímo bakteriofágem. Spustí se replikace pomocí DNA polymerázy za vzniku fágové mRNA. Ta je využita k syntéze proteinů částí bakteriofága. Tímto mechanismem to probíhá u fágů s genomem DNA, nikoliv s genomem RNA. U virů s DNA dochází k replikaci v jádře hostitelské buňky. U fágů s RNA dochází replikaci v cytoplazmě bakteriální buňky. Bakteriofágy se poté zkompletují podle zákonů symetrie. Do nových kapsid se vyčleňuje nová nukleová kyselina. Během replikace vznikají i virové částice, které nejsou zkompletovány. Do prostředí se již hotové fágy dostanou prasknutím hostitelské buňky a takto uvolněné fágy mohou napadat další bakteriální buňky (Weinbauer, 2004; Vaňková et al., 2018).

K lyzi buňky dojde ve chvíli, kdy se v cytoplazmě vytvoří enzymy napadající peptidoglykan v buněčné stěně hostitelské buňky (Fischetti, 2005). Tyto enzymy nazýváme endolyziny, případně muralytické enzymy. Dále bakteriofágy potřebují k lyzi buňky ještě protein holin. Protein holin způsobuje defekt cytoplazmatické membrány a je kódován bakteriofágem (Hermoso et al., 2007).

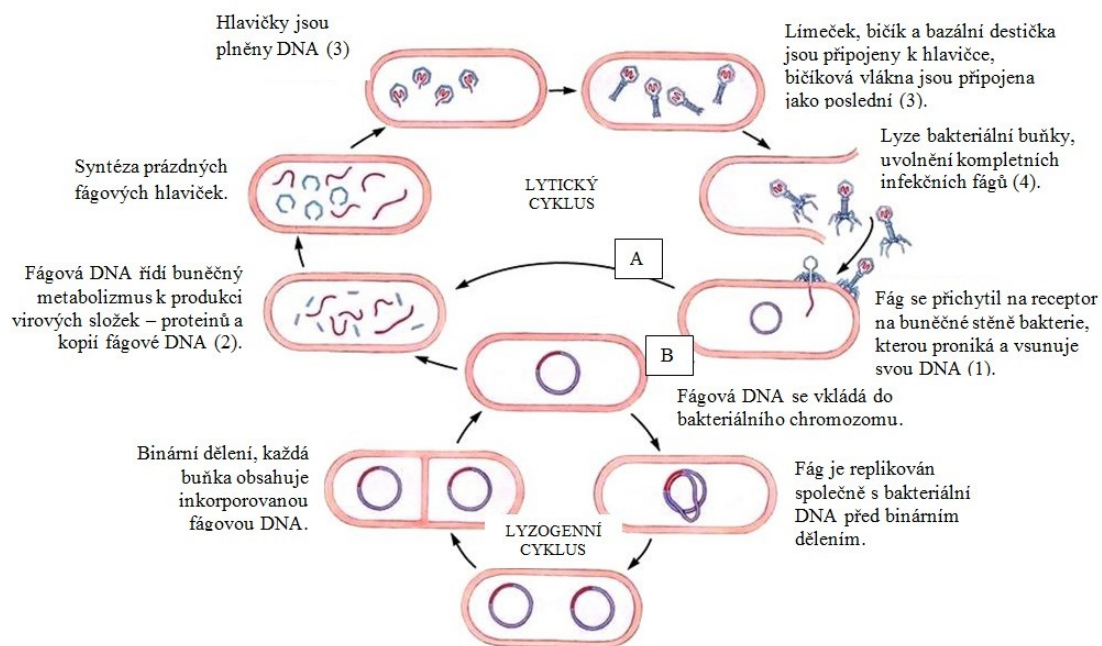
Příkladem lytického cyklu může být množení bakteriofágu T4. Lytický cyklus fágu T4 probíhá následujícím způsobem. Bakteriofág T4 je lytický fág, který infikuje *E. coli*. Má dsDNA o délce 169 000 nukleotidů, které jsou uloženy v ikozahedrál ní kapsidě. Velikost T4 fágu je na šířku 90 nm a na délku 200 nm. Životní cyklus začíná rozpoznáním receptoru na buněčném povrchu hostitele pomocí bičíkových vláken. Dojde ke kontrakci bičíku a spustí se injekce genetické informace. Ihned po injekci dojde k zastavení syntézy hostitelské DNA/RNA a proteinů. To se stane díky expresi genomu bakteriofágu. Působením RNA – polymerázy hostitelské buňky dochází k transkripci genů první fáze exprese před

samotnou replikací bakteriofágové genetické informace. Nejdříve dochází k syntetizování enzymů, které rozkládají genetickou informaci hostitele, dále enzymů k syntéze jednotlivých částí nového viru a enzymů pro replikaci fágové genetické informace. Pak dochází k druhé fázi exprese pomocí mRNA. Tvoří se viriony a pomocí lysozymu dochází k lyzi bakteriální hostitelské buňky. Bakteriofág T4 kóduje dohromady 10 proteinů, které jsou zodpovědné za replikaci fágového genomu (Mueser et al., 2010).

### **2.5.3 Lyzogenní (temperovaný) cyklus**

Lyzogenní cyklus začíná stejně jako lytický, tedy přichycením fága k hostiteli a injekcí nukleové kyseliny do cytoplazmy. Během lyzogenního cyklu se genetická informace fága začlení do genomu hostitelské buňky. Takto se vytvoří profág. V této formě je nukleová kyselina fága přenášena genomem hostitelské buňky při replikaci a následném dělení bakteriální buňky i do dalších generací hostitele. Vlivem změny podmínek (například UV záření, stresové faktory, mutageny) se temperovaný profág vyčlení z genomu hostitele a stává se z něj fág virulentní. Během vyčleňování profágu může nastat situace, že se spolu s ním uvolní i část genetické informace hostitelské buňky. Tím se stane součástí fágové nukleové kyseliny a může být přenášena dál. Tomuto procesu říkáme transdukce (Vaňková et al. 2018; Weinbauer, 2004). Lyzogenní cyklus má i několik výhod pro hostitele. Profág může mít zakódované určité vlastnosti, které navýší odolnost bakteriální buňky (Brüssow, 2004).

Oba životní cykly jsou přehledně znázorněny na obrázku 3.



Obrázek 3 Životní cyklus bakteriofágu

Zdroj: Kopecká, J., Retková, G., 2017

## **3 Bakteriofágová terapie**

### **3.1 Princip léčby bakteriálních onemocnění pomocí bakteriofágů**

Bakteriofágy jsou schopny napadnout specifické druhy bakterií. Je to dáno tím, že bakteriofág musí navázat kontakt s bakterií v konkrétním bodě povrchu bakteriální buňky a pomnožit se v ní (Sulakvelidze et al., 2001).

Terapie lze rozdělit podle toho, kolik typů bakteriofágů nasadíme na léčbu. Během monofágové terapie se využije jeden konkrétní typ bakteriofágů. Polyfágová terapie (fágový koktejl), představuje způsob terapie, kdy se využijí dva a více typů bakteriofágů. Ve studii, kterou provedl Hall spolu s dalšími vědci, se uvádí, že polyfágová terapie má vyšší úspěšnost než monofágová terapie (Hall et al., 2012).

#### **3.1.1 Purifikované bakteriofágové lytické enzymy**

Nejvhodnějšími bakteriofágy pro fágovou léčbu se jeví lytické fágy. Bakteriofágy s lytickým životním cyklem způsobují destrukci bakteriální buňky. Jsou schopny se rychle rozmnožovat, napadat a usmrcovat další bakterie. Jedním ze způsobů využití bakteriofágů v léčbě je využití purifikované části bakteriofágu s konkrétním proteinem, který ničí bakterie. Konkrétně to jsou fágové lytické enzymy, enzybiotika, které mohou být dvojího typu. Prvním typem jsou enzymy, které na začátku infekce napadají buněčnou stěnu hostitelské buňky a způsobují na ni defekty (léze), kterými se později do hostitelské buňky dostane fágový genom. Druhým typem jsou enzymy, které působí na konci životního cyklu bakteriofágu při uvolnění nových virionů. To jsou tak zvané endolyziny. Endolyziny mají velkou schopnost mureinové hydrolázy, která slouží k degradaci peptidoglykanové vrstvy, což následně vede k rozpadu bakteriální buňky (Fischetti et al., 2001). Velkou výhodou lytických enzymů je to, že bakterie jsou vystaveny malému množství enzymu a to zabraňuje tvorbě rezistence bakterie na daný fág (Eyer et al., 2005). Je důležité brát v potaz, že bakteriofágové enzymy ve většině případů fungují efektivně jen na grampozitivní bakterie (Skurnik & Strauch, 2006).

Modulární endolyziny jsou často charakterizovány přítomností jedné nebo dvou N – terminálních (začátek molekuly) enzymaticky aktivních domén, které jsou spojené krátkou flexibilní částí k C – terminální (koncová část molekuly) části molekuly, která se váže

na buněčnou stěnu. Toto uspořádání je typické pro bakteriofágy grampozitivních bakterií a pro mykobakteriofágy. N – terminální enzymaticky aktivní doména modulárních enzymů funguje tak, že štěpí specifické peptidoglykanové vazby v mureinové vrstvě, zatímco doména C – terminální rozpozná buněčnou stěnu a váže se na specifické části pro správnou fixaci a fungování enzymu. Endolyziny infikující gramnegativní bakterie mají většinou jednoduchou globulární strukturu (Abdelrahman et al., 2021).

### 3.1.2 Bakteriofágový lyzát

V terapii se také často využívá fágový lyzát, který vznikne z kultury bakterií, která byla vystavena bakteriofágům a obsahuje tím pádem nové vzniklé bakteriofágy, které jsou schopny napadat další buňky. Z kultury se poté vytvoří lyzát, který může být podán pacientovi, a to hned několika způsoby, například perorálně, injekčně nebo přímo na pokožku v případě povrchové infekce. Zároveň jsou lyzáty využívány jako zásobní médium s bakteriofágy pro laboratorní účely. Aby lyzáty obsahovaly co nejméně endotoxinů a exotoxinů, je potřeba je purifikovat (Bonilla al., 2016).

V J. Craig Venterově institutu prováděli experiment, který měl za cíl izolovat bakteriofágy pro detekci a léčbu multirezistentní tuberkulózy a vypracování efektivní metody, kterou si mohou vyzkoušet studenti středních škol na nepatogenních bakteriích. Během toho experimentu si vědci vytvářeli vlastní bakteriofágový lyzát. Nejdříve si izolovali bakteriofágy z enviromentálních vzorků půdy, které byly sesbírány za různého počasí. Poté takto izolované fágy přidali k hostitelské kultuře bakterií a nechali je 20 minut adsorbovat. Po inkubaci byla směs přidána do kultury bakterií *M. smegmatis* na agarové misky. Dále byla směs inkubována při 37°C. Když se na misce po 18 hodinách objevily plaky (místa, kde bakteriofágy infikovaly a ničily bakterie), byl fágový vzorek považován za využitelný a byl uskladněn. Pokud se plaky po 18 hodinách nevytvořily, nechali misky inkubovat dalších 24 hodin. Pokud ani po dalších 24 hodinách nedošlo k vytvoření plaků, bylo usouzeno, že lyzát neobsahuje žádné bakteriofágy rodu *M. smegmatis*. Takto vytvořený lyzát byl následně purifikován metodou streak plating (streakovací metoda), kterou opakovali třikrát. Na agarovou misku bylo nanášeno 10 µl fágového lyzátu, který byl rozetřen. Po přidání kultury *M. smegmatis* byly vytvořeny plaky a z nich byly izolovány čisté kmeny bakteriofágů. Bakteriofágy poté z misek získali pomocí fágového pufru tím, že byly

odebrány pomocí Pasteurovy pipety. Po získání dostatečného množství fágů byla provedena kvantifikace supernatantu. Fágový pufr byl centrifugován, aby byly odstraněny zbytky agaru a bakteriálních buněk a v titru zůstaly jen bakteriofágové částice. Poté provedli extrakci nukleových kyselin bakteriofágů. Před extrakcí nukleových kyselin ještě použili DNázu/RNázu, což jsou enzymy, které degradují DNA a RNA a vyčistí genetickou informaci od jakékoliv kontaminace. Tím získali čistý fágový lyzát (Singh et al., 2006).

### **3.1.3 Bakteriofágové inhibitory bakteriálního růstu**

Další formou využití fágů v terapii jsou fágové inhibitory bakteriálního růstu. To jsou proteiny, které mají schopnost potlačovat a ovlivňovat růst bakterií. Tyto proteiny působí přímo na metabolismus bakterie. Některé proteiny, například protein gp2 fága T7 inhibuje transkripci tak, že se váže k RNA – polymeráze *E. coli*. Protein AsiA fága T4 inhibuje transkripční faktor  $\sigma 70$  a tím dojde k uvolnění bakteriální RNA – polymerázy. Ta pak snadněji integruje s T4 specifickými  $\sigma$ -faktory (sigma faktory jsou regulační proteiny, které ovlivňují fungování RNA – polymerázy). Další proteiny P fága  $\lambda$  a protein B fága P2 jsou schopné se vázat na helikázu u *E. coli* (Eyer et al., 2005).

## **3.2 Zvýšení stability bakteriofágů v léčivých přípravcích a jejich purifikace**

Některé bakteriofágy nepotřebují pro účely použití k léčbě nijak modifikovat, protože jsou samy o sobě stabilní, ale některé typy fágů potřebují specifické podmínky jako je například pH a teplota, aby z nich vytvořený přípravek byl během skladování stabilní (Ackermann et al. 2004; Hurst et al., 1980).

Původní lyzáty bakteriálních kultur s bakteriofágy obsahovaly velké množství bakteriálních zbytků, které produkovaly během svého rozpadu endotoxiny a exotoxiny, které mohou způsobit nežádoucí účinky léčby, například záněty nebo horečku. Mezi nejčastěji používané metody purifikace patří srážení polyethylenglykogenem (PEG) a gradientová centrifugace s chloridem cesným (CsCl). Jsou to levné a jednoduché metody, ale bylo vyzorováno, že tyto dvě metody negativně ovlivňují bakteriofágy. Docházelo k velkému úbytku bakteriofágů ve vzorku, ale stále část bakteriofágů dokázala tuto metodu přežít (Carroll – Portillo et al., 2021).

Další způsob odstranění nežádoucích látek z rozpadu buněk bakterií v lyzátu, je pomocí ultrafiltrace a dvoustupňovou chromatografií lyzátu. Tuto metodu testoval tým biochemiků v Polsku. Bohužel během této metody sice výrazně snížili množství endotoxinů, ale také to inaktivovalo velkou část bakteriofágů. Z tohoto důvodu není tato metoda purifikace vhodná (Boratyński et al., 2004).

Efektivní metodou purifikace je využití metakrylátových monolitů. Monolity mají velkou dynamickou vaznost na velké molekuly (například na plazmidy a viry). Slovinští vědci provedli experiment, při kterém použili tři různé bakteriofágy – T7, M13, lambda. Tyto tři typy fágů se liší velikostí a tvarem. Každý fág měl odlišnou dynamickou vaznost při různých koncentracích NaCl, chloridu sodného. Jedním z výsledků této studie je to, že je důležité přesně zjistit optimální podmínky pro purifikaci daného bakteriofágu (Smrekar et al., 2011).

### **3.3 Bakteriofágy vhodné k léčebnému užití**

Než se nasadí bakteriofágy k úspěšné léčbě, je potřeba splnit několik podmínek. Konkrétní typ bakteriofágu by měl být nasazen až ve chvíli, kdy je podrobně popsán a charakterizován. Je důležité znát jaké jsou jeho ideální podmínky pro napadení bakteriální buňky. Napadení bakteriální buňky bakteriofágem je složitý proces. Měl by být přesně znám fágový receptor, který rozpozná buňku bakterie, aby bylo dosaženo efektivní léčby bez nežádoucích vedlejších účinků. Fágové přípravky by měly být bezpečné a neměly by obsahovat zbytky bakterií ani jejich části kvůli vzniku nežádoucích účinků. Fágové přípravky by měly obsahovat infekční fágové částice, proto by mělo být validováno skladování přípravků. Účinnost fágové terapie by měla být testována zvířatech. Každý fág se může in vivo (v těle živého organismu) chovat odlišně (Skurnik & Strauch, 2006). Další důležité podmínky jsou:

- daný bakteriofág je dostatečně virulentní k bakteriální buňce,
- je stabilní při skladování,
- není zničen makrofágy,
- neměl by vytvářet velkou bakteriální rezistenci na daný typ bakteriofágů,
- neměl by podléhat transdukcii.

Transdukce je jev, kdy se při množení nových bakteriofágových částic dostane do jejich genomu část bakteriálního genomu a přenáší se spolu s ním na další bakterie (Round Table, 2016).

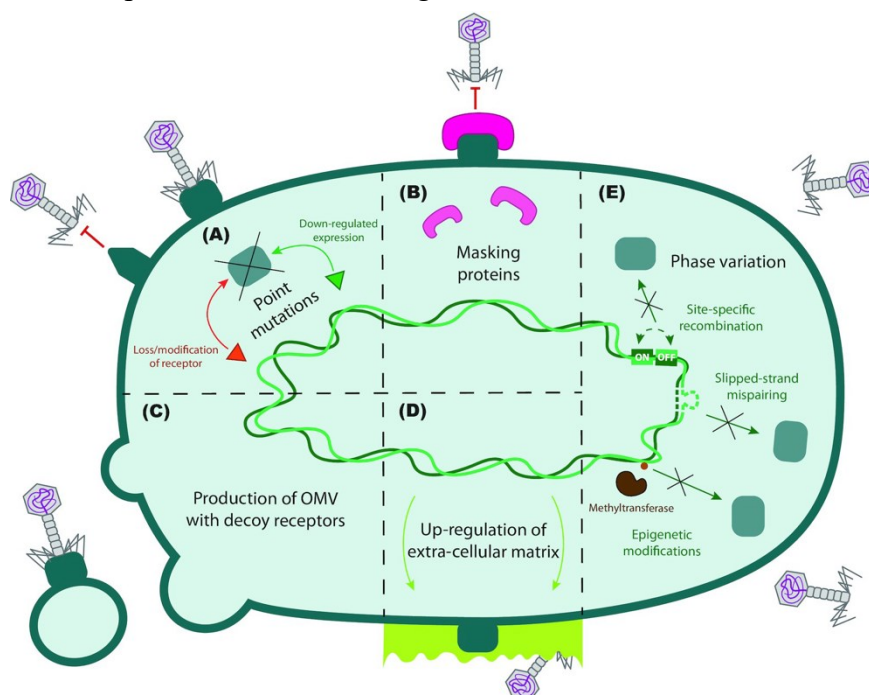
### **3.4 Rezistence bakterií na bakteriofágovou terapii**

Některé bakterie si vyvíjí obranné mechanismy, které zabraňují přichycení fágu k buněčné stěně. Jedním ze způsobů je produkce kompetitivních inhibitorů. Kompetitivní inhibice je proces, kdy se inhibitor naváže na aktivní místo receptoru místo skutečného ligandu. Inhibitor má podobnou strukturu jako ligand a může ho tedy nahradit. V tu chvíli receptor nemůže fungovat tak, jak má. Bakterie vyprodukuje proteiny, které jsou podobné sloučeninám, kterými se bakteriofágy vážou na buněčnou stěnu hostitele. Tyto proteiny se přichytí na místa, kam by se vázal bakteriofág a tím se znemožní navázání bakteriofágu na bakterii – toto místo je pro bakteriofágy nevyužitelné. Byly objeveny mechanismy, které bakteriofágy využívají k tomu, aby se dokázaly přichytit na hostitelskou buňku a tento způsob obrany hostitelské buňky obejdou (Labrie et al., 2010). Zároveň může nastat situace, kdy je bakterie přirozeně rezistentní na daného bakteriofágu, protože přirozeně nevytváří žádné receptory, na které by se bakteriofág navázal.

Některé bakterie vytváří restriční endonukleázy, což jsou látky, které jsou schopné zničit fágovou genetickou informaci. Bakteriofágový genom je cizí a restriční enzymy genom fágu rozpoznají a rozštěpí na menší části. Genom bakterie je ochráněn a zachován. Některé bakteriofágy jsou schopny i tento obranný mechanismus bakterie obejít. Lze to pozorovat u bakteriofágu T7, který vytváří inhibiční protein, který se váže přímo na restriční enzymy *E. coli* a tím je blokuje. Funguje to tak, že na začátku infekce bakteriofágem je nejdříve injikováno malé množství genomu fágu. Tento genom obsahuje gen kódující inhibitorový protein. Když je inhibitor bakterií nasyntetizován, tak dojde k přenosu zbylého genomu bakteriofágu. Dalšími známými bakteriofágy, které jsou schopny tohoto mechanismu jsou bakteriofágy *E. coli* T4 a rodu *Bacillus* P1 (Hyman & Abedon, 2010).

Další možností, jak se bakterie chrání před bakteriofágy, je produkce extracelulárního matrixu. Extracelulární matrix je vrstva, kterou bakterie vytvoří a tím vzniká další překážka, kterou musí bakteriofágy překonat, aby byla jejich absorpce úspěšná (Labrie et al., 2010).

Na následujícím obrázku č. 4 je popsáno několik adaptací hostitelské buňky, které vedou k rezistenci bakterie před infekcí bakteriofágem.



Obrázek 4 Adaptace hostitele vedoucí k fágové rezistenci

Zdroj: Egido et al., 2022

V části (A) je znázorněná mutace receptoru na povrchu hostitelské buňky, která může vést ke ztrátě nebo modifikaci fágových receptorů (zelený obdélník). Případně může dojít i ke snížení jejich exprese, tj. ke snížení počtu receptorů na povrchu buňky. V části (B) je růžově znázorněný protein, který maskuje receptor na povrchu buňky. Protein se naváže na povrchový receptor a tím se receptor stává pro bakteriofágy nedostupný. V části (C) jsou vnější membránové vezikuly (OMV – outer – membrane vesicle), které fungují jako návnady. Na tyto návnady se bakteriofág naváže a tím se zabrání kontaktu hostitelské buňky s bakteriofágem. V části (D) je světle zeleně znázorněná vyšší produkce extracelulárního matrixu. To vede k fyzickému překrytí receptorů na povrchu bakteriální buňky. V části (E) je popsána fázová variace (ovlivnění povrchových struktur) prostřednictvím tří mechanismů. První mechanismus je regulace bakteriálního fenotypu, včetně exprese povrchových proteinů jako jsou fágové receptory. To znamená, že bakterie dokáže pozměnit svůj tvar, dokáže ovlivnit, jaké proteiny a kolik proteinů zrovna bude syntetizovat. Druhým mechanismem je rekombinace genetické informace (inverzní přestavba úseku genu), která

způsobí změnu genu pro konkrétní protein, který tvoří receptor na povrchu buňky, například se zneaktivní a tím nedochází k jeho expresi. Posledními mechanismy jsou chybné párování skluzu a epigenetické modifikace. Epigenetická modifikace znamená, že bakterie část genu překryje a tím nedochází k produkci receptoru, kterým by se bakteriofág dostal do bakteriální buňky. Chybné párování skluzu znamená, že určitá část genu se opakuje několikrát za sebou (například gen pro produkci proteinu, ze kterého je receptor). Při buněčném dělení může nastat situace, kdy se při kopírování tohoto genu část vynechá nebo se naopak část zkopíruje víckrát. Tím dojde k tomu, že se receptor později nevytvoří vůbec (Egido et al., 2022).

### **3.5 Výhody a nevýhody fágové terapie**

Výhodou bakteriofágové léčby je určitě to, že bakteriofágy napadají jen určitý typ bakteriálních buněk. Není tím ohrožena ostatní mikroflóra. Aby léčba byla úspěšná, je důležité přesně určit, o jaký patogen se jedná, jakou má rezistenci vůči bakteriofágu, kterého chceme nasadit (Eyer et al., 2005; Drulis-Kawa et al., 2015). Další výhodou je schopnost bakteriofágů mutovat společně s bakteriemi (Drulis-Kawa et al., 2015). Bakteriofágy se umí množit rychle a efektivně. K léčbě tedy stačí i malé množství přípravku, třeba jen jedna dávka (Eyer et al., 2005). Bakteriofágy, ani jejich části, neškodí eukaryotním buňkám. Navíc je tu výhoda v podobě menšího poškození mikroflóry pacienta a obecně menší počet nežádoucích účinků oproti léčbě antibiotiky (Matsuzaki et al., 2005).

Z hlediska náročnosti hledání nových fágů i z hlediska nákladů, je fágová léčba levnější oproti vývoji antibiotik (Skurnik et al., 2007; Golkar et al. 2014).

Nevýhodou fágové léčby je ta, že i bakterie mají schopnost se bránit a vyvíjet si obranné mechanismy, které bakterii chrání proti vniknutí a přijmutí cizí nukleové kyseliny (Jansen et al. 2002). Zároveň, aby byla fágová terapie úspěšná, je důležité nastavit správné podmínky a prostředí pro aktivitu bakteriofágu. Jednou z důležitých podmínek je například teplota a pH (Hurst et al. 1980).

### **3.6 Fágová terapie v kombinaci s antibiotiky**

V několika studiích bylo uvedeno, že při nasazení bakteriofágů a antibiotik současně, je pravděpodobnost vyléčení pacienta vyšší než při nasazení fágů bez antibiotik. Tým

německých biochemiků v roce 2014 provedl experiment, kde porovnávali účinky kombinované léčby antibiotik s bakteriofágy a léčbu jen fágy (Torres-Barceló et al., 2014). Použili antibiotikum streptomycin a bakteriofágy typu LUZ7 proti bakteriálnímu kmeni *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Experiment byl vyhodnocován tak, že po dobu 72 hodin sledovali optickou hustotu (absorbanci) bakteriální populace. Už po 24 hodinách došlo k snížení absorbance při nasazení antibiotik a bakteriofágů současně. Redukce bakterií streptomycinem v kombinaci s bakteriofágy byla výrazně vyšší než u kultury, kde byly nasazeny pouze fágy.

Tuto myšlenku kombinované léčby dále rozvíjeli a testovali účinky kombinované léčby následovně: antibiotika přidali do kultury 12 hodin po nasazení bakteriofágů a 24 hodin po nasazení bakteriofágů. Výsledkem bylo, že populace bakterií, která byla léčena jen antibiotiky, si vyvinula rezistenci. Nejmenší optická hustota bakterií byla naměřena u kombinace bakteriofágů a antibiotik nasazených 24 hodin po bakteriofágech. Co se týká rezistence bakterií na kombinovanou léčbu, tak ta vznikla pomaleji než u kultury jen s antibiotiky (Torres-Barceló et al., 2014).

### **3.6.1 Porovnání bakteriofágové terapie s antibiotickou léčbou**

Bakteriofágy jsou specifické, napadají jen konkrétní druh bakteriální buňky. Antibiotika ničí jak patogenní bakterie, tak i ostatní bakteriální buňky a tím poškozují ostatní mikroflóru. Tím, že fágy napadají konkrétní bakteriální buňky, snižuje se tím riziko sekundárních infekcí, protože antibiotika poškozují ostatní mikroflóru, což může vést k podráždění, zánětům, horečkám apod. Bakteriofágy se množí v konkrétním bodě infekce, zatímco antibiotika prochází celým tělem a jsou zátěží pro ostatní části těla pacienta.

Bakterie sice může získat rezistenci vůči konkrétnímu bakteriofágu, ale bakteriofág na rozdíl od antibiotik, umí mutovat a tím se přizpůsobit bakterii (Golkar et al., 2014).

V ruské studii, kterou vedl Meladze se svým týmem (Meladze et al., 1982), se uvádí, že u pacientů, kteří byli léčeni pomocí fágů došlo k zotavení v 82 % případech, oproti skupině, která byla léčena antibiotiky, kde došlo k zotavení u 64 % pacientů. Studie byla provedena u pacientů s hnisavým onemocněním plic. Pacienti byli rozděleni do 2 skupin. První skupina o 223 lidech byla léčena pomocí fágů, druhá skupina o 117 lidech byla léčena pomocí antibiotik. Úspěšnost léčby byla vyhodnocována na základě rentgenového vyšetření,

krevního rozboru a celkového zlepšení zdravotního stavu. U žádného z pacientů léčeného bakteriofágy nebyly pozorovány vedlejší účinky (Sulakvelidze et al., 2001).

Porovnání bakteriofágové léčby s antibiotickou léčbou je uvedeno v tabulce číslo 3.

Tabulka 3 Porovnání bakteriofágové terapie s antibiotickou léčbou (zpracováno podle Sulakvelidze et al., 2001).

<b>BAKTERIOFÁGY</b>	<b>ANTIBIOTIKA</b>	<b>KOMENTÁŘE</b>
Jsou specifické, napadají konkrétní buňky a snižuje se tím riziko sekundární infekce.	Antibiotika ničí jak patogenní bakterie, tak i ostatní mikroflóru pacienta. To může vést k sekundárním infekcím.	Vysoká specifita bakteriofágů může být považována za nevýhodu, protože nejdříve musí být identifikována bakterie, která onemocnění způsobuje. Antibiotika mají vyšší pravděpodobnost úspěšnosti u onemocnění, kde nebylo přesně určeno, o jakou bakterii se jedná.
Množí se přímo v místě infekce.	Antibiotika prochází celým tělem pacienta.	Bakteriofágy jsou schopny se množit v konkrétním místě velmi rychle. Není proto potřeba tak často podávat přípravky s fágy, aby se dosáhlo zlepšení stavu pacienta.
Nebyly popsány závažnější vedlejší účinky.	Byly nahlášeny vedlejší účinky jako například střevní poruchy, alergické reakce, sekundární infekce.	Vedlejší účinky i fágové terapie mohly být způsobeny endotoxiny z lyzovaných bakterií.

Bakterie, které byly rezistentní vůči konkrétnímu fágu, reagovaly na jiné fágy s podobným cílovým rozsahem (jaké bakterie napadají).	Rezistence na antibiotika byla zaznamenána i u bakterií, na které nebyla léčba antibiotiky cílená.	Kvůli širokému spektru působení antibiotik se staly rezistentní bakterie, na které nebyla léčba cílená.
Selekce konkrétních bakteriofágů, například proti kterým jsou bakterie odolné, je relativně rychlá, zabere maximálně pár týdnů.	Vývoj nového antibiotika je časově náročný proces.	Bakteriofágy jsou schopny se přizpůsobovat bakteriím, které jsou rezistentní vůči fágům i antibiotikům. To podporuje evoluční myšlenku přirozeného výběru.

### 3.7 Historický přehled výzkumu bakteriofágové terapie

Poprvé byly fágy použity k léčbě v Paříži v roce 1919 F. d'Herellem. Bakteriofágy nasadil u pacientů s dyzentérií. Během této léčby docházelo k zmírnění příznaků onemocnění a po několika dnech došlo k zotavení. Výsledky této léčby, ale nebyly publikovány, takže oficiální aplikace fágové terapie proběhla v roce 1921 Richardem Bruynoghem a Josephem Maisinou. Ti využili fágy k léčbě stafylokokové infekce (Sulakvelidze et al., 2001).

V roce 1923 byl založen výzkumný ústav v Gruzii. Založil ho G. Eliav. V tomto institutu se zabývali vývojem terapeutických fágů, které šlo aplikovat proti bakteriím rodu *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus* a dalším. V 60. letech 20. století se z institutu postupně stávalo centrum fágové terapie. Docházelo zde k testování přípravků a výzkumu účinnosti přípravků s bakteriofágy proti bakteriím. Výzkum fágové terapie probíhal také v Polsku. Ve Wroclawi v roce 1952 nasazovali fágy po operacích, aby předcházeli pooperačním infekcím (Eyer et al., 2005).

Velkou stopkou výzkumu fágové terapie bylo objevení penicilinu Alexandrem Flemigem v roce 1928. Antibiotika šlo snadněji vyrábět a celosvětově se rozšířila produkce a výzkum různých druhů antibiotik. To způsobilo upozadění výzkumu bakteriofágové léčby, a to převážně v západním světě. V bývalém Sovětském svazu stále docházelo k výzkumu, ale tyto studie byly publikovány v ruštině, v časopisech s malým dosahem a bez kontrolních skupin. To způsobilo to, že ostatní státy neuvěřily výsledkům, ke kterým v SSSR dospěli (Hraiech et al., 2015).

### **3.8 Současný stav výzkumu bakteriofágové terapie**

V dnešní době se na světě nachází několik institutů, které se zabývají výzkumem fágové terapie. Řadí se mezi ně například EIMBV (Institut Elieva), který byl založen v roce 1923 v Gruzii. Dále je to Hirszfeldův institut, který byl založen v roce 1952 v Polsku. Institut pro výzkum chorob zvířat v Houghtonu, Cambridgeshire ve Velké Británii (Sulakvelidze et al., 2001). Mnoho výzkumných ústavů sídlí v Kanadě a Spojených státech amerických.

#### **3.8.1 Bakteriofágová terapie u infekcí způsobené rodem *Staphylococcus***

Mezi bakteriofágy, které úspěšně lyzují bakteriální buňky stafylokoků patří fágy rodu Twort z čeledi *Myoviridae* (Lavigne et al., 2009).

*Staphylococcus aureus* je virulentní patogen, který způsobuje několik závažných onemocnění. Mezi tato onemocnění se řadí kožní abscesy, infekce ran, endokarditida (zánět endokardu srdce), zápal plic, osteomyelitida (zánět kostní tkáně) a syndrom toxického šoku (zánětlivá reakce těla vyvolaná toxiny bakteriemi stafylokoků). Bakteriofágová léčba proti bakteriím *Staphylococcus aureus* byla testována na zvířatech. Cílem těchto studií bylo zjištění, zda je léčba bezpečná a na kolik je účinná. První klinickou zkouškou léčení *Staphylococcus aureus* bylo léčení 42 pacientů s žilnatými vředy na nohou s tím, že u některých byly již projevené příznaky. Výzkum provedl tým biochemika Rhoadse (Rhoads et al., 2009). K léčení byl využitý fágový koktejl, který se zaměřoval na bakterie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Cílem bylo zlepšení hojení ran. Z 42 pacientů dokončilo terapii úspěšně 39, 3 pacienti studii opustili. Léčba probíhala po dobu 12 týdnů s tím, že pacienti byli rozděleni do skupin. Jedna skupina byla léčená fyziologickým roztokem, druhá fágovým přípravkem s následným pozorováním

po dobu 24 týdnů. Během této terapie nedošlo k závažným vedlejším účinkům, což bylo cílem první části výzkumu. Aby byla otestována bezpečnost bakteriofágového přípravku, je zapotřebí ho otestovat na větším vzorku pacientů v druhé fázi studie (Plumet et al., 2022; Rhoads et al., 2009).

Studie Langa a kol. uvádí, že použili bakteriofágy u sedmi pacientů s chronickými ortopedickými infekcemi. Dvě infekce po zavedení kyčelní protézy, dvě septické artritidy kolena, jedna osteomyelitida holenní kosti, jedna septické srůstání stehenní kosti a jedna septická komplikace po Harringtonově zákroku. Harringtonův zákrok je operace páteře, kdy se do páteře dávají kovové části, které buď napravují deformaci páteře, nebo stabilizují páteř po úrazech. Ve spojení s několika typy chirurgických zákroků byly použity pouze specifické fágy. Ve všech případech byla infekce způsobena gramnegativními rezistentními bakteriemi, včetně rodu *Staphylococcus aureus*. Podařilo se jim vyléčit dva záněty kyčelních protéz (protézy musely být pro účely léčby odstraněny). V jednom případě byla léčba neúspěšná, protože došlo k opětovné infekci způsobené stafylokokem. V jednom případě došlo k vyléčení stafylokokové infekce, ale přetrvávala infekce pseudomonální (Lang et al., 1979).

Tým biochemiků Tristana Ferryho si dal za cíl otestovat léčbu u tří pacientů, kterým se vracela infekce do protetického kolene (umělého kloubu kolene). Tato infekce byla způsobena bakterií *Staphylococcus aureus*, který je rezistentní vůči antibiotikům. Léčba proběhla v kombinaci s operací, která proběhla metodou DAIR (Debridement Antibiotics and Implant Retention – chirurgické antibiotické vyčištění implantátu). Metoda DAIR se využívá při léčbě zánětu kloubní náhrady, kdy náhradu nelze vyjmout. U všech tří pacientů byla dříve provedena operace metodou DAIR, ale nebyla úspěšná. Proto navrhli novou metodu PhagoDAIR. Tato metoda kombinuje metodu DAIR s bakteriofágovou léčbou. Pacientům podali koktejl ze tří bakteriofágů – PP1493, PP1815, PP1957), během operace DAIR. Před operací byl proveden test k posouzení lytické aktivity bakteriofágů na klinických kmenech bakterií odebraných z kloubní punkce. Léčebný postup PhagoDAIR u těchto tří pacientů byl úspěšný. Byla prokázána náchylnost bakterie *Staphylococcus aureus* na dva ze tří bakteriofágů. Jeden z pacientů byl infikován dvěma geneticky odlišnými kmeny, které měly odlišnou citlivost na bakteriofágy v koktejl. Po proceduře PhagoDAIR

byli pacienti léčeni antibiotiky dalších 6 – 12 týdnů. Dále byli na kontrole po sedmi, jedenácti a třiceti měsících po zákroku. Výsledky byly příznivé, u všech pacientů došlo k zlepšení stavu. U dvou pacientů byla provedena další operace metodou DAIR bez podání bakteriofágů. Na konci pozorování bylo zaznamenáno úplné vymizení známek infekce u dvou ze tří pacientů. Pacient, který měl infekci způsobenou dvěma různými kmeny bakterií, stále trpěl infekcí, ale došlo k výraznému zlepšení stavu. Metoda PhagoDAIR má potenciál na využití u pacientů, kteří nemohou podstoupit výměnu implantátu a zároveň, aby nedocházelo ke ztrátě funkce implantátu (Ferry et al., 2020).

Tým biochemiků v USA úspěšně léčil 61 let starou pacientku, která trpěla osteoartrózou. Pacientka podstoupila endoprotézu pravého kolenního kloubu, a to v roce 1999 s následnou revizí v roce 2016. Zanedlouho po revizi kloubu se u pacientky projeví příznaky infekčního onemocnění – horečka, zimnice. Testy potvrdily, že pacientka měla v kloubu bakterii rodu *Staphylococcus aureus*. Podstoupila několik výplachů a chirurgických zákroků, které skončily výměnou kloubu v roce 2018. Pacientce byla navržena amputace nad kolenem, ale zažádala o bakteriofágovou léčbu. Léčba byla zahájena v březnu 2019. Před podáním první dávky byl proveden test citlivosti bakterií na antistafylokokové bakteriofágy. Test byl proveden metodou dvojitého agarového překrytí. Tato metoda spočívá v tom, že bakteriální kultura je smíchána s měkkým agarem (agar s nižší koncentrací) a poté je tato směs nalita na pevnou agarovou plotnu. Na tuto plochu se pak nalije roztok s bakteriofágy a nechá se inkubovat. Léčba probíhala formou injekčního podání bakteriofágového koktejlu tří bakteriofágů (J-Sa36, Sa83, Sa87) do kolene doplněné o infuze každých dvanáct hodin po dobu dvou týdnů, doplněné ještě o infuze cefazolinu (antibiotikum) každých osm hodin po dobu šesti týdnů. Během této doby nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky. Léčba byla ukončena po dvou týdnech z důvodu nedostatku fágového koktejlu. To mělo za následek recidivu a návrat bolestí. K léčbě se vrátili v září. Pacientka dostala injekci bakteriofágového přípravku do kolene a byla doplněna o pravidelné infuze každých dvanáct hodin po dobu šesti týdnů i s infuzí cefazolinu, který byl podáván každých osm hodin po dobu šesti týdnů. V druhém kole léčby byl použit jiný lytický fág, konkrétně bakteriofág SaGR5101. Po dokončení obou cyklů bakteriofágové léčby došlo k zotavení pacientky (Remirez – Sanchez et al., 2021).

### 3.8.2 Bakteriofágová terapie u infekcí způsobené *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* je patogen, který způsobuje nozokomiální infekce (infekce, které pacient získá v průběhu pobytu ve zdravotnickém zařízení). Je také příčinou plicních infekcí u pacientů trpících cystickou fibrózou (Furfaro et al., 2018).

Výzkumný italský tým odebral 40 kmenů *Pseudomonas aeruginosa* od pacientů s cystickou fibrózou, kteří se léčili v několika italských lékařských centrech. Dále přidali 2 izoláty od pacientů s chronickou obstrukční plicní nemocí, které byly též odebrány v Itálii a ještě 9 kmenů, které nebyly izolovány v Itálii, 5 enviromentálních izolátů a 2 laboratorní kmeny (PAO1 a PAO1 *pilA*). Tímto získali širokou genetickou rozmanitost bakteriálních hostitelů. Poté izolovali 23 nových bakteriofágů, u kterých testovali jejich účinnost na panelu, kde bylo naneseno 58 kmenů *Pseudomonas aeruginosa*. Tím si potvrdili jejich předpoklad, že žádný z bakteriofágů nebyl schopný lyzovat všechny kmeny *Pseudomonas aeruginosa*. Polovina bakteriofágů vykazovala široký rozsah hostitelů, které byly schopné lyzovat. Vybrali šest bakteriofágů se širokým rozsahem (PYO2, E215, E220, S218, E217 a DEV). U těchto fágů se předpokládalo, že budou infikovat 97 % kmenů. Co se týká taxonomického zařazení vybraných bakteriofágů, tak všechny patří do řádu *Caudovirales*; PYO2, DEV a E220 jsou z čeledi *Podoviridae*; E215 a E217 patří do čeledi *Myoviridae*; S218 je z čeledi *Siphoviridae*. Koktejl z bakteriofágů byl použit při léčení respirační infekce u laboratorní myši. Bylo zjištěno, že všechny myši přežily infekci způsobenou *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteriální koncentrace se snížila už šest hodin po zahájení léčby (Forti et al., 2018).

Skupina belgických chirurgů a vědců rozvinula spolupráci s biology, kteří se zabývají bakteriofágy v Moskvě a Tbilisi. Cílem této spolupráce byla snaha zjistit, jak by bylo možno bakteriofágy použít při léčbě popálenin. Terapie probíhala ve vojenské nemocnici Queen Astrid v Bruselu. Provedli menší studii na devíti pacientech, která byla schválena lékařskou etickou komisí. U těchto pacientů byla část rány léčena sprejem, který obsahoval bakteriofágy a druhá část byla léčena bez bakteriofágů a fungovala jako kontrolní část. Obě byly monitorovány tkáňovou biopsií, která byla provedena před aplikací, po dvou hodinách po aplikaci a po pěti hodinách po aplikaci. Pacienti byli pečlivě pozorováni další tři týdny. Během této terapie nebyly pozorovány žádné velké nežádoucí účinky a účinnost

bakteriofágového přípravku byla následně ještě testována v další fázi studie (Abedon et al., 2011).

Tým biochemika Wrihta si dal za cíl otestovat bezpečnost a účinnost bakteriofágového přípravku Biophage – PA, který cílí na *Pseudomonas aeruginosa* u chronického onemocnění zánětu středního ucha. Této studii se účastnilo 24 pacientů, kteří nastupovali na terapii se zánětem středního ucha, způsobeným bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Pacienti byli rozděleni náhodně do dvou skupin. Jedna skupina, kontrolní, byla léčena placebem, druhá skupina dostala jednu dávku přípravku Biophage – PA. Po podání léků, byli pozorováni šest hodin a poté byli vyšetřeni sedmý, dvacátý první a čtyřicátý druhý den po první dávce stejným lékařem. Lékař se pacientů ptal na nežádoucí účinky. Pacienti byli podrobeni vstupním vyšetřením, které zahrnovalo testování citlivosti bakterií v uchu na alespoň jeden ze šesti bakteriofágů, ze kterých se přípravek skládá. Tato citlivost byla stanovena plakovým testem na izolátech z výtěrů. U každého pacienta bylo léčeno pouze jedno ucho, protože u všech bylo onemocnění jednostranné. Chronické záněty u pacientů souvisely s předchozím onemocněním zánětu středního ucha, nebo s onemocněním mastoidey a následnou operací. Průměrný věk pacientů, kteří se studii účastnili byl 56,7 let a účastnilo se jí 17 mužů a 7 žen. Ve skupině, která byla léčena bakteriofágy, došlo ke zlepšení stavu u všech pacientů kromě jednoho. U tří pacientů došlo téměř k zotavení se zlepšením stavu o více než 80 %. U druhé skupiny, která byla léčena placebem, došlo u tří lidí ke zlepšení stavu, u devíti ke zhoršení. Žádný z pacientů léčený placebem se nezlepšil nad 80 % proti původnímu stavu. Během studie nebyly nahlášeny žádné závažné nežádoucí účinky (Wright et al. 2009).

## 4 Diskuse a závěr

Cílem této práce bylo provedení rešerše o možnostech léčby bakteriálních onemocnění pomocí bakteriofágů a o dosud provedených výzkumech fágové terapie. V práci jsem zabývala stavbou bakteriofágů, jejich vlastnostmi a životními cykly. Jako další úkol jsem si nastavila nalezení konkrétních druhů bakteriofágů, jejich vlastností a pochopení mechanismů napadení bakteriálních buněk, které umožňují využití těchto fágů při léčbě bakteriálních onemocnění. Dalším cílem bylo porovnání pozitivních i negativních dopadů fágové terapie a možnosti potenciální aplikace této metody při léčbě bakteriálních onemocnění. V práci jsem se zabývala i rezistencí bakterií vůči bakteriofágům. Cíle práce jsem plnila na základě tří výzkumných otázek:

Výzkumná otázka č. 1: Jaké vlastnosti a charakteristiky životního cyklu bakteriofágů umožňují jejich využití v léčbě bakteriálních onemocnění a jakým způsobem jsou bakteriofágy využívány?

Výzkumná otázka č. 2: Které druhy bakteriofágů jsou nejvhodnější pro léčebné účely vybraných onemocnění?

Výzkumná otázka č. 3: Jaké jsou hlavní výzvy a omezení spojené s používáním bakteriofágů v klinické praxi?

První výzkumná otázka směřovala ke zjištění, jaké vlastnosti a charakteristiky životního cyklu bakteriofágů umožňují jejich využití v léčbě bakteriálních onemocnění a jakým způsobem jsou bakteriofágy využívány. Nejvhodnějšími bakteriofágy, které se využívají v bakteriofágových terapiích jsou lytické fágy. Tyto fágy jsou schopny lyzovat bakteriální buňku. Bakteriofágy vhodné k léčebnému jsou charakteristické následujícím: jsou dostatečně virulentní, jsou stabilní při skladování, nepodléhají makrofágům, nevytváří velkou bakteriální rezistenci na daný bakteriofág, nepodléhá transdukci. V terapiích se využívají i bakteriofágové enzymy, které jsou dvojího typu. Enzymy, které fungují na začátku infekce bakteriofágem a napadají buněčnou stěnu bakterie, na které vytvoří léze, kterými se bakteriofág dostane do hostitelské buňky. Druhým typem tak zvané endolysin, které se aktivují na konci životního cyklu bakteriofága. Dále se v terapiích používá bakteriofágový lyzát. To je přípravek, který je vytvořen tím, že kultura bakterií, která

podlehla bakteriofágům, je izolována a dále využívána v terapiích, nebo je využívána jako zásobní látka obsahující bakteriofágy pro další účely výzkumu. Lyzáty často obsahují toxiny, které produkují mrtvé buňky bakterií, a proto se purifikují, aby byly stabilnější, a aby obsahovaly co nejmenší množství toxinů. V terapiích se dále využívají bakteriofágové koktejly, což je smíchání více bakteriofágů, aby bylo dosaženo větší pravděpodobnosti, že alespoň jeden bakteriofág bude schopný lyzovat bakteriální hostitelskou buňku. K léčbě se dále využívají bakteriofágové inhibitory bakteriálního růstu. V terapiích se využívá kombinace bakteriofágů a antibiotik. Je to efektivní cesta, jak vyléčit pacienta a zároveň snížit riziko druhotných infekcí a vzniku rezistence bakterie na samotné antibiotikum nebo bakteriofág.

Druhá výzkumná otázka se ptala na příklady lytických bakteriofágů, které byly využity v terapii. Ve své práci zmiňuji například bakteriofágy PP1493, PP1815, PP1957, SaGR5101.

Třetí výzkumná otázka se ptala na to, jaké jsou hlavní výzvy a omezení spojené s používáním bakteriofágů v klinické praxi. Bakterie jsou schopné se bránit absorpcí bakteriofága hned několika způsoby například překrytím receptoru na buněčné stěně extracelulárním matrixem nebo proteinem. Dalšími příklady metod, kterými se bakterie brání jsou kompetitivní inhibice a rozklad cizorodé bakteriofágové genetické informace pomocí restrikčních endonukleáz.

U srovnání bakteriofágové léčby a antibiotické léčby jsem došla k následujícím poznatkům a dalším výzvám, které jsou s fágovou léčbou spojené. Bakteriofágy jsou specifické. Aby byla fágová léčba úspěšná, tak je potřeba nejdříve otestovat citlivost bakterie na daného fágu. Dále je potřeba přesně znát bakterii, která dané onemocnění způsobuje. Specifita bakteriofágů má výhodu v tom, že lyzuje pouze určitou bakterii a tím se předchází druhotným infekcím nebo nežádoucím účinkům. Oproti tomu antibiotika poškozují okolní mikroflóru a způsobují vznik rezistence všech bakterií v mikroflóře na dané antibiotikum. Bylo potvrzeno, že bakterie dokážou budovat obranné mechanismy proti bakteriofágům, ale rozdíl mezi antibiotiky a bakteriofágy je ten, že některé fágy dokážou tyto obranné mechanismy obcházet a přizpůsobovat se jim. Vývoj nových bakteriofágů je ekonomicky i časově výhodnější proti nákladům na vývoj nových antibiotik.

S bakteriofágovou léčbou jsou spojeny výzvy a překážky, které je potřeba překonat. Stále je potřeba provádět výzkumy bezpečnosti a efektivity jednotlivých bakteriofágů, aby postupně tyto metody byly schváleny a standardizovány. Zároveň je potřeba mít dostatek financí a pacientů, kteří by byli ochotni procházet klinickými testy. Výzvou je také specifita bakteriofágů a nutnost hledat ideální fág na daný patogen. V neposlední řadě je potřeba zkoumat cesty, jak snižovat riziko vzniku rezistence na daný bakteriofág, případně, jak bakteriofág následně modifikovat. Také je potřeba vymyslet efektivní způsob výroby a uskladňování bakteriofágů, aby nedocházelo k velkým ztrátám virů v přípravku.

Ve své práci zmiňuji příklady sedmi studií, z toho šest se zabývalo léčbou u lidí a jedna testováním léčby u laboratorních myší. Čtyři studie byly zaměřeny na infekci bakteriemi rodu *Staphylococcus* a tři studie byly zaměřeny na infekce způsobeny bakteriemi rodu *Pseudomonas aeruginosa*. Tyto práce měly za cíl otestování funkčnosti fágové terapie a její bezpečnost. Tyto studie byly provedeny v rozmezí let 1979 – 2022. U zkoumaných jedinců (lidských i zvířecích), kteří se účastnili těchto studií došlo buď k vyléčení infekce, nebo k výraznému zlepšení stavu. Při popisu léčby konkrétních infekcí jsem se soustředila především na to, jak byla daná léčba úspěšná. Zda došlo ke zlepšení stavu pacientů nebo k úplnému vyléčení případně naopak k zhoršení stavu pacientů. Dále jsem se soustředila na to, jakou formou terapie probíhala, jestli byla rozdělena do více fází, nebo se jednalo o jednorázovou dávku fágového přípravku. Ve studiích jsem se zaměřila i na to, jaké fágy využili pro léčbu. Vybírala jsem studie zabývající se léčbou infekcí způsobené bakterií rodu *Staphylococcus* a infekcí způsobené bakterií *Pseudomonas aeruginosa*.

Léčba bakteriofágy má velký potenciál vyřešit problém zvyšující se rezistence bakterií na antibiotika. Postupně vznikají takzvané superbakterie, které nereagují na žádnou antibiotickou léčbu. Je důležité hledat další způsoby a metody nahrazení antibiotik, abychom byli i v budoucnosti schopni léčit pacienty s bakteriálními onemocněními.

## Seznam použitých zdrojů

- Abdelrahman, F., Easwaran, M., Daramola, O. I., Ragab, S., Lynch, S., Odusele, T. J., Khan, F. M., Ayobami, A., Adnan, F., Torrents, E., Sanmukh, S., & El-Shibiny, A. (2021). *Phage-encoded endolysins*. *Antibiotics*, *10*(2), 124. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020124>
- Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). *Phage treatment of human infections*. *Bacteriophage*, *1*(2), 66. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>
- Ackermann, H. W. (2003). *Bacteriophage observations and evolution*. *Research in Microbiology*, *154*(4), 245–251. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00067-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00067-6)
- Ackermann, H.-W., Tremblay, D., & Moineau, S. (2004). *Long-term bacteriophage preservation*. [https://www.researchgate.net/publication/285783875\\_Long-term\\_bacteriophage\\_preservation](https://www.researchgate.net/publication/285783875_Long-term_bacteriophage_preservation)
- Alavidze, Z., Aminov, R., Betts, A., Bardiau, M., Bretaudeau, L., Caplin, J., Chanishvili, N., Coffey, A., Cooper, I., De Vos, D., Doskar, J., Friman, V., Hoyle, N., Karanadze, N., Kurtboke, I., Kutateladze, M., McCallin, S., Merabishvili, M., Mgaloblishvili, G., ... Pirnay, J. P. (2016). *Silk route to the acceptance and re-implementation of bacteriophage therapy*. *Biotechnology Journal*, *11*(5), 595–600. <https://doi.org/10.1002/biot.201600023>
- Bonilla, N., Rojas, M. I., Cruz, G. N. F., Hung, S. H., Rohwer, F., & Barr, J. J. (2016). *Phage on tap—a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks*. *PeerJ*, *2016*(7), e2261. <https://doi.org/10.7717/peerj.2261/supp-1>
- Brüssow, H., Canchaya, C., & Hardt, W.-D. (2004). *Phages and the evolution of bacterial pathogens: From genomic rearrangements to lysogenic conversion*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *68*(3), 560–602. <https://doi.org/10.1128/mubr.68.3.560-602.2004>
- Carroll-Portillo, A., Coffman, C. N., Varga, M. G., Alcock, J., Singh, S. B., & Lin, H. C. (2021). *Standard bacteriophage purification procedures cause loss in numbers and activity*. *Viruses*, *13*(2), Article 328. <https://doi.org/10.3390/v13020328>

- Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., & Maciejewska, B. (2015). *Bacteriophages and phage-derived proteins – application approaches*. *Current Medicinal Chemistry*, 22(14), 1757. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150209152851>
- Egido, J. E., Costa, A. R., Aparicio-Maldonado, C., Haas, P. J., & Brouns, S. J. J. (2022). *Mechanisms and clinical importance of bacteriophage resistance*. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(1), Article fuab048. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab048>
- Eriksson, H., Maciejewska, B., Latka, A., Majkowska-Skrobek, G., Hellstrand, M., Melefors, Ö., Wang, J. T., Kropinski, A. M., Drulis-Kawa, Z., & Nilsson, A. S. (2015). *A suggested new bacteriophage genus, “Kp34likevirus”, within the Autographivirinae subfamily of Podoviridae*. *Viruses*, 7(4), 1804–1822. <https://doi.org/10.3390/v7041804>
- Esteves, N. C., & Scharf, B. E. (2022). *Flagellotropic bacteriophages: Opportunities and challenges for antimicrobial applications*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7084. <https://doi.org/10.3390/ijms23137084>
- Ferry, T., Kolenda, C., Batailler, C., Gustave, C. A., Lustig, S., Malatray, M., Fevre, C., Josse, J., Petitjean, C., Chidiac, C., Leboucher, G., & Laurent, F. (2020). *Phage therapy as adjuvant to conservative surgery and antibiotics to salvage patients with relapsing *S. aureus* prosthetic knee infection*. *Frontiers in Medicine*, 7, 570572. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.570572>
- Fischetti, V. A. (2005). *Bacteriophage lytic enzymes: Novel anti-infectives*. *Trends in Microbiology*, 13(10), 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.08.007>
- Forti, F., Roach, D. R., Cafora, M., Pasini, M. E., Horner, D. S., Fiscarelli, E. V., Rossitto, M., Cariani, L., Briani, F., Debarbieux, L., & Ghisotti, D. (2018). *Design of a broad-range bacteriophage cocktail that reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and treats acute infections in two animal models*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), e02573-17. <https://doi.org/10.1128/aac.02573-17>
- Furfaro, L. L., Payne, M. S., & Chang, B. J. (2018). *Bacteriophage therapy: Clinical trials and regulatory hurdles*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, Article 376. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00376>

- Golkar, Z., Bagasra, O., & Pace, D. G. (2014). *Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis*. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(2), 129–136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>
- Hall, A. R., De Vos, D., Friman, V. P., Pirnay, J. P., & Buckling, A. (2012). *Effects of sequential and simultaneous applications of bacteriophages on populations of Pseudomonas aeruginosa in vitro and in wax moth larvae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5646–5652. <https://doi.org/10.1128/aem.00757-12>
- Hatfull, G. F., & Hendrix, R. W. (2011). *Bacteriophages and their genomes*. *Current Opinion in Virology*, 1(4), 298–303. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.009>
- Hermoso, J. A., García, J. L., & García, P. (2007). *Taking aim on bacterial pathogens: From phage therapy to enzybiotics*. *Current Opinion in Microbiology*, 10(5), 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.08.002>
- Hraiech, S., Brégeon, F., & Rolain, J. M. (2015). *Bacteriophage-based therapy in cystic fibrosis-associated Pseudomonas aeruginosa infections: Rationale and current status*. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 3653–3663. <https://doi.org/10.2147/dddt.s53123>
- Hurst, C. J., Gerba, C. P., & Cech, I. (1980). *Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil*. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(6), 1067–1079. <https://doi.org/10.1128/aem.40.6.1067-1079.1980>
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). *Bacteriophage host range and bacterial resistance*. *Advances in Applied Microbiology*, 70, 217–248. [https://doi.org/10.1016/s0065-2164\(10\)70007-1](https://doi.org/10.1016/s0065-2164(10)70007-1)
- Ivanovska, I., Wuite, G., Jönsson, B., & Evilevitch, A. (2007). *Internal DNA pressure modifies stability of WT phage*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), 9603–9608. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703166104>
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W., & Schouls, L. M. (2002). *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes*. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>

- Joerger, R. D. (2003). *Alternatives to antibiotics: Bacteriocins, antimicrobial peptides, and bacteriophages*. *Poultry Science*, 82(4), 640–647. <https://doi.org/10.1093/ps/82.4.640>
- Labrie, S. J., Samson, J. E., & Moineau, S. (2010). *Bacteriophage resistance mechanisms*. *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317–327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Lang, G., Kehr, P., Mathevon, H., Clavert, J. M., Séjourne, P., & Pointu, J. (2001). *Bacteriophage therapy of septic complications of orthopaedic surgery*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659. <https://doi.org/10.1128/aac.45.3.649-659.2001>
- Lavigne, R., Darius, P., Summer, E. J., Seto, D., Mahadevan, P., Nilsson, A. S., Ackermann, H. W., & Kropinski, A. M. (2009). *Classification of Myoviridae bacteriophages using protein sequence similarity*. *BMC Microbiology*, 9, Article 224. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-224>
- Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., Ikeuchi, M., Tani, T., Fujieda, M., Wakiguchi, H., & Imai, S. (2005). *Bacteriophage therapy: A revitalized therapy against bacterial infectious diseases*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 11(5), 211–219. <https://doi.org/10.1007/s10156-005-0408-9>
- Meladze, G. D., Mebuke, M. G., Chkhetia, N. S., Kiknadze, N. I., Koguashvili, G. G., Timoshuk, I. I., Larionova, N. G., & Vasadze, G. K. (1982). The efficacy of staphylococcal bacteriophage in treatment of purulent diseases of lungs and pleura. *Grudnaya Khirurgiya*, (1), 53–56.
- Mueser, T. C., Hinerman, J. M., Devos, J. M., Boyer, R. A., & Williams, K. J. (2010). *Structural analysis of bacteriophage T4 DNA replication: A review in the Virology Journal series on bacteriophage T4 and its relatives*. *Virology Journal*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-359>
- Nelson, D., Loomis, L., & Fischetti, V. A. (2001). *Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(7), 4107. <https://doi.org/10.1073/pnas.061038398>
- Nováček, J., Šiborová, M., Benešik, M., Pantůček, R., Doškař, J., & Plevka, P. (2016). *Structure and genome release of Twort-like Myoviridae phage with a double-layered*

baseplate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(33), 9351–9356. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605883113>

Plumet, L., Ahmad-Mansour, N., Dunyach-Remy, C., Kissa, K., Sotto, A., Lavigne, J. P., Costechareyre, D., & Molle, V. (2022). *Bacteriophage therapy for Staphylococcus aureus infections: A review of animal models, treatments, and clinical trials*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.907314>

Ramirez-Sanchez, C., Gonzales, F., Buckley, M., Biswas, B., Henry, M., Deschenes, M. V., Horne, B., Fackler, J., Brownstein, M. J., Schooley, R. T., & Aslam, S. (2021). *Successful treatment of Staphylococcus aureus prosthetic joint infection with bacteriophage therapy*. *Viruses*, 13(6), 1182. <https://doi.org/10.3390/v13061182>

Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Kuskowski, M. A., Wolcott, B. M., Ward, L. S., & Sulakvelidze, A. (2009). *Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: Results of a phase I safety trial*. *Journal of Wound Care*, 18(6), 237–243. <https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.6.42801>

Singh, S., Assad-Garcia, E., Assad-Garcia, N., Oldfield, L., Vashee, S., Fouts, D. E., & Craig, J. (n.d.). *Optimizing phagehunting methods to isolate and amplify bacteriophages*. J. Craig Venter Institute, Rockville, MD.

Skurnik, M., Pajunen, M., & Kiljunen, S. (2007). *Biotechnological challenges of phage therapy*. *Biotechnology Letters*, 29(7), 995–1003. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9346-1>

Skurnik, M., & Strauch, E. (2006). *Phage therapy: Facts and fiction*. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(1), 5–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.09.002>

Smrekar, F., Ciringer, M., Štrancar, A., & Podgornik, A. (2011). *Characterisation of methacrylate monoliths for bacteriophage purification*. *Journal of Chromatography A*, 1218(17), 2438–2444. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.083>

Stone, E., Campbell, K., Grant, I., & McAuliffe, O. (2019). *Understanding and exploiting phage–host interactions*. *Viruses*, 11(6), 567. <https://doi.org/10.3390/v11060567>

Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G. (2001). *Bacteriophage therapy. Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 649–659. <https://doi.org/10.1128/aac.45.3.649-659.2001>

Torres-Barceló, C., Arias-Sánchez, F. I., Vasse, M., Ramsayer, J., Kaltz, O., & Hochberg, M. E. (2014). *A window of opportunity to control the bacterial pathogen Pseudomonas aeruginosa combining antibiotics and phages. PLOS ONE*, 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106628>

Van Belleghem, J. D., Merabishvili, M., Vergauwen, B., Lavigne, R., & Vaneechoutte, M. (2017). *A comparative study of different strategies for removal of endotoxins from bacteriophage preparations. Journal of Microbiological Methods*, 132, 153–159. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.11.020>

Vaňková, I., Čurečková, V., & Šárka Bursová, M. (2018). *Viry a bakteriofágy v potravinách*. [https://www.vfu.cz/files/2340\\_53\\_Viry\\_a\\_bakteriofagy\\_v\\_potravinach.pdf](https://www.vfu.cz/files/2340_53_Viry_a_bakteriofagy_v_potravinach.pdf)

Weinbauer, M. G. (2004). *Ecology of prokaryotic viruses. FEMS Microbiology Reviews*, 28(2), 127–181. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>

Wright, A., Hawkins, C. H., Änggård, E. E., & Harper, D. R. (2009). *A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa: A preliminary report of efficacy. Clinical Otolaryngology: Official Journal of ENT-UK; Official Journal of Netherlands Society for Oto-Rhino-Laryngology & Cervico-Facial Surgery*, 34(4), 349–357. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x>

## **Vyjádření k využití nástrojů umělé inteligence**

Při psaní této bakalářské práce byly využity nástroje umělé inteligence. Umělou inteligenci jsem využívala k překladu odborných článků a vysvětlení pojmů, kterým jsem nerozuměla. Na začátku jsem si nechala od umělé inteligence orientačně vygenerovat nápady, o jakých všech tématech by se dalo psát, ale finální podobu a strukturu práce jsem vytvořila já. Zpracování tématu, zdroje a články jsem vyhledávala bez pomoci umělé inteligence. Výzkumné otázky nejsou vygenerované umělou inteligencí.

## **Seznam obrázků**

Obrázek 1 Stavba bakteriofága.....	11
Obrázek 2 Tvary bakteriofágů vybraných skupin .....	12
Obrázek 3 Životní cyklus bakteriofága.....	18
Obrázek 4 Adaptace hostitele vedoucí k fágové rezistenci.....	24

## **Seznam tabulek**

Tabulka 1 Příklady bakteriofágů podle typu genetické informace.....	10
Tabulka 2 Vybrané skupiny bakteriofágů a jejich stručná charakteristika .....	13
Tabulka 3 Porovnání bakteriofágové terapie s antibiotickou léčbou.....	27