

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Kristýna Glendová**

**Bakteriofágy - současné poznatky a možnosti jejich terapeutického využití**

Bacteriophages - current knowledge and possibilities for their therapeutic use

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Irena Lichá, CSc.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.05.2016

Podpis .....

**Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat RNDr. Ireně Liché, CSc. za trpělivost a čas, který mi věnovala po dobu psaní této práce. Velice si vážím jejích odborných rad a ochoty, bez kterých by tato bakalářská práce nevznikla. Také bych chtěla poděkovat svým přátelům a rodině za podporu během studia a psaní této práce.

## Abstrakt

Bakteriofágy, jako viry bakterií, jsou nejrozšířenější organismy, které osidlují všechny biotopy, v nichž se nachází i bakterie. Jednou z alternativ boje proti infekcím, způsobených rezistentními kmeny bakterií, se v současné době jeví bakteriofágová terapie, která spočívá v aplikaci lytických bakteriofágů, či pouze bakteriofágových enzymů k potlačení růstu bakterií. Práce zmiňuje historii fágové terapie, stěžejní část práce se zabývá shrnutím současných trendů v bakteriofágové terapii, která se začíná rozvíjet v posledních letech. Mnoho studií se věnuje možnostem léčby bakteriálních infekcí fágovými lyzáty, včetně geneticky modifikovaných bakteriofágů a dále možnosti použití samotných bakteriofágových enzymů - endolysinů, či kombinaci fágových lyzátů a endolysinů s antibiotiky. Hlavními zájmy ve studiích jsou účinnost, specifita a bezpečnost terapie. Účinnost bakteriofágové terapie byla prokázána mnoha studiemi, jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Bezpečnost terapie pro využití v klinické praxi se ale musí potvrdit stále málo prozkoumanými *in vivo* experimenty.

**Klíčová slova:** bakteriofágy, bakteriofágová terapie, endolysiny, enzybiotika, multirezistence,

## Abstract

Bacteriophages, as viruses of bacteria, are the most abundant entity, populate every biotope where also bacteria live. One of the alternatives to combat infections caused by resistant strains of bacteria currently appear bacteriophage therapy, consists in the application of lytic bacteriophage, or only bacteriophage enzymes to inhibit bacterial growth. Thesis mentions the history of phage therapy, a crucial part of the thesis deals with a summary of current trends in bacteriophage therapy, beginning to develop in recent years. Many studies are dedicated to the possibilities of treatment of bacterial infections by phage lysates, including genetically modified bacteriophages and also application of bacteriophage enzymes themselves - endolysins, or a combination of the phage lysates and endolysins with antibiotics. The main interests in studies are the efficiency, specificity and safety of therapy. The effectiveness of bacteriophage therapy was already proved by many studies, both *in vitro* and *in vivo*. The safety of therapy for clinical usage needs to be prove by *in vivo* experiments.

**Key words:** bacteriophage, bacteriophage therapy, endolysins, enzybiotics, multiresistence

# Obsah

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA BAKTERIOFÁGŮ</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>HISTORIE BAKTERIOFÁGOVÉ TERAPIE</b> .....	<b>4</b>
3.1	OBJEVENÍ BAKTERIOFÁGŮ .....	4
3.2	POČÁTKY TERAPIE .....	5
<b>4</b>	<b>MOŽNOSTI SOUČASNÉ BAKTERIOFÁGOVÉ TERAPIE</b> .....	<b>6</b>
4.1	VYUŽITÍ FÁGOVÉHO LYZÁTU V TERAPII .....	6
4.1.1	Využití fágového lyzátu v terapii proti <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
4.2	ENZYBIOTIKA, ENZYMY PRODUKOVANÉ BAKTERIOFÁGY .....	9
4.2.1	Virion asociované peptidoglykanové hydrolázy .....	9
4.2.2	Endolysiny a jejich použití v terapii.....	10
4.2.3	Používané databáze současně dostupných enzybiotik .....	17
4.3	FÁGOVÁ TERAPIE V KOMBINACI S ANTIBIOTIKY .....	17
4.4	APLIKACE FÁGOVÉ TERAPIE PRO KONTROLU BIOFILMU .....	18
<b>5</b>	<b>ZVÁŽENÍ VÝHOD A NEVÝHOD BAKTERIOFÁGOVÉ TERAPIE</b> .....	<b>21</b>
5.1	VÝHODY FÁGOVÉ TERAPIE.....	22
5.2	NEVÝHODY FÁGOVÉ TERAPIE .....	23
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY:</b> .....	<b>27</b>
<b>8</b>	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>34</b>

## Seznam použitých zkratek

AMK	aminokyselina	
ASM	umělé sputum	z angl. artificial sputum medium
ATB	antibiotika	
Cas	CRISPR-sdružený	z angl. CRISPR-associated
CFU	jednotky tvořící kolonie	z angl. colony forming unit
CRISPR		z angl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR RNA	
DNA	deoxyribonukleová kyselina	z angl. deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylendiamintetracetátová kyselina	z angl. ethylenediaminetetraacetic acid
EPS	extracelulární polysacharidová substance	z angl. extracellular polysaccharid substance
FyuA		z angl. ferric yersiniabactin uptake
IM	vnitřní membrána	z angl. inner membrane
MRSA	meticilin-rezistentní zlatý stafylokok	z angl. methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	meticilin senzitivní stafylokok	z angl. methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>
OD	optická densita	
OM	vnější membrána	z angl. outer membrane
PFU	částice schopné tvořit plaky	z angl. plaque-forming units
PG	peptidoglykan	
Pim	imunitní protein	z angl. immunity protein
RNA	ribonukleová kyselina	z angl. ribonucleic acid
SEM	skenovací elektronový mikroskop	
VAPGHs	virion asociované peptidoglykanové hydrolázy	z angl. virion associated peptidoglycan hydrolases
VRE	vankomycin-rezistentní Enterococci	z angl. vancomycin-resistant Enterococci

# 1 Úvod

Léčbou bakteriofágy, tedy fágovou terapií, se rozumí využití virů, jež napadají bakterie ke snížení, či odstranění infekce. Fágová terapie nachází uplatnění v léčbě infekcí u lidí, zvířat, ale i v kontrole čistoty vody i potravin. Po objevení a uvedení antibiotik do klinické praxe se aplikovaly ve velkém rozsahu a bylo zaznamenáno, že bakterie, způsobující lehká i závažná onemocnění, si začaly vůči antibiotikům budovat rezistenci. Vznik rezistentních kmenů byl rychlejší, než vývoj nových antibiotik a proto se nyní hledají nové cesty v antibakteriálních terapiích. Jednou z nich je bakteriofágová terapie. Bakteriofágy byly k potlačení bakteriálních infekcí používány před objevením antibiotik, antibiotika však zcela převládla a fágová terapie byla téměř zapomenuta.

Cílem práce je shrnout současné poznatky o bakteriofágové terapii a posoudit její vhodnost při léčbě bakteriálních infekcí. Práce zmiňuje historii fágové terapie, která položila základy pro současnou terapii. Zaměřuje se na léčbu fágovými lyzáty a jejich použití *in vitro*, na animálních modelech, ale i na využití v klinické praxi na bakterii *Pseudomonas aeruginosa*. Dále se věnuje enzymům, které bakteriofágy produkují v konkrétních fázích životního cyklu a jejich aplikaci ve směrech medicínských a biotechnologických.

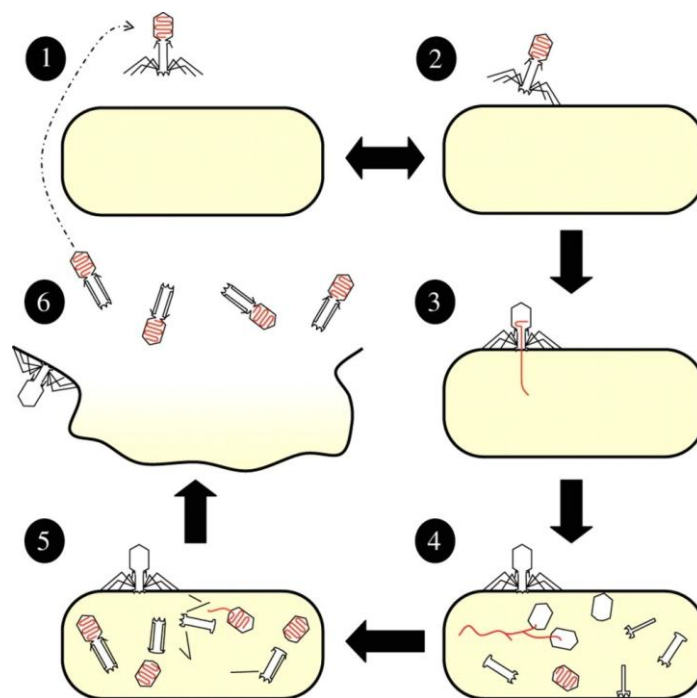


## 2 Základní charakteristika bakteriofágů

Bakteriofágy jsou viry, které infikují výhradně bakterie. Název je odvozen od řeckého slova "phagein" tzn. jíst. Vyskytují se v půdě, ve vodě, v trávicím traktu živočichů, jsou všude, kde se vyskytují i jejich přirození hostitelé, bakterie. Bakteriofágy se liší morfologicky co do tvaru a velikosti, avšak základní strukturou jsou si podobní. Tou je ikosahedrální proteinová hlavička, která obsahuje a chrání genom, krček, pochva bičíku, bazální ploténka a stažitelné bičíkové vlákno, jímž injikuje svůj genetický materiál do buňky. Geneticky jsou variabilní. Genom může být cirkulární nebo lineární a sestává z jednořetězcové nebo dvouřetězcové formy DNA, či RNA.

### Životní cyklus

Bakteriofágy mají rozdílné životní cykly. Známe cyklus lyzogenní, pseudolyzogenní, chronickou infekci a pro fágovou terapii nejdůležitější, lytický cyklus. Při lyzogenním cyklu fág integruje svůj genom do genomu hostitele a vytváří se latentní forma, tzv. profág. Z této fáze ale může kdykoliv vystoupit a zahájit cyklus lytický. V pseudolyzogenním cyklu může být fág v hostitelské buňce integrován v genomu jako profág, nebo může být udržovaný ve formě plazmidu. Chronická infekce spočívá v neustálé tvorbě nových bakteriofágů, bez lýze buňky. Při lytickém cyklu se po infekci začne bakteriofág okamžitě replikovat a vytvářet nové viriony, které jsou po lýzi buňky schopné infikovat další buňky. I přes rozdílné životní cykly zůstávají základní kroky infikování buňky stejné. Adsorbce viru na povrch buňky, separace nukleové kyseliny od proteinového pláště, exprese a replikace nukleové kyseliny, skládání a vypuštění nových virionů. Jeden z nejvíce prostudovaných bakteriofágů je virulentní bakteriofág T4, který napadá enterobakterie (Obr. 1).

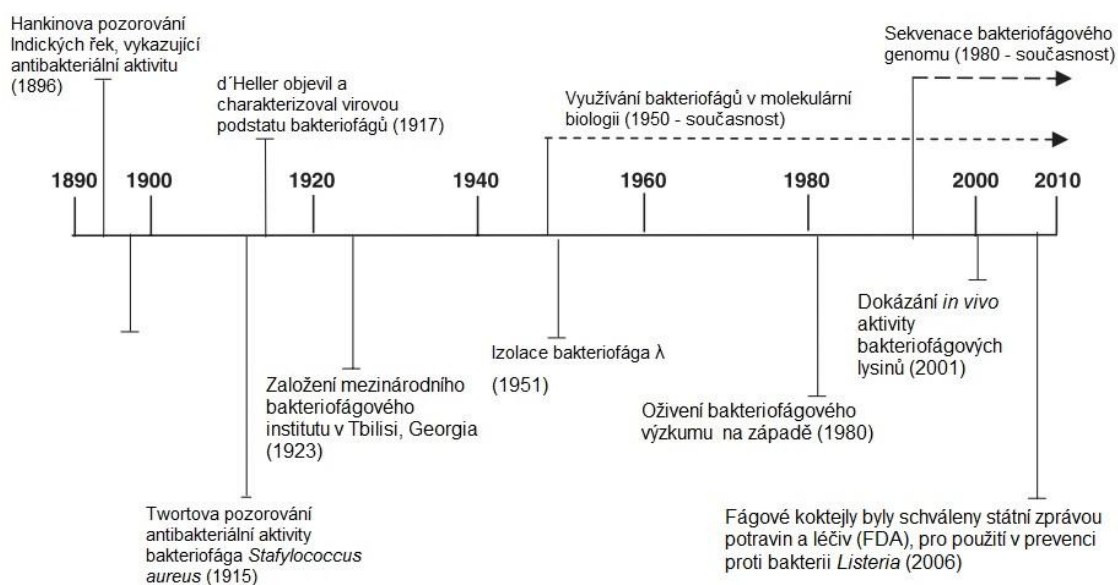


**Obr. 1:** Schéma lytického cyklu bakteriofága T4, upraveno dle (Eshelman et al., 2010): Životní cyklus začíná vyskytujícím se fágem u bakteriální buňky (1). Následuje nasednutí bakteriofága na bakteriální receptory (2). V dalším kroku injikuje bakteriofág svou genetickou informaci do bakteriální cytoplasmy (3). V cytoplasmě buňky dochází k replikaci a tvorbě strukturních složek (4) a jejich poskládání za vzniku nových virionů (5). V posledním kroku dochází k lýzi buňky a nově vzniklé fágy hledají nové hostitelské buňky, čímž znovu začínají cyklus.

## 3 Historie bakteriofágové terapie

### 3.1 Objevení bakteriofágů

V roce 1896 se britský bakteriolog Ernest Hanbury Hankin věnoval bakterii *Vibrio cholerae*, která se vyskytovala v řece Ganga (Hankin, 1896). Odebíral vzorky z míst, kde řeka ústila do města Agra a ven a zjistil, že voda vytékající z města má menší infektivitu, než voda, která do města přitéká. Posléze Hankin navrhl, že neznámý materiál, procházející jemným filtrem, by mohl být příčinou antibakteriální aktivity, avšak nadále ho již nezkoumal. V roce 1915 tento neznámý materiál studoval britský bakteriolog Frederick Twort a pouze rozšířil obecné znalosti, že se může jednat o virus. Bakteriofágy jako takové byly tedy objeveny a pojmenovány až v roce 1917 Felixem d'Hérellem, francouzsko-kanadským mikrobiologem. První pozorování bakteriofágů vznikla na základě jeho práce s hospitalizovanými vojáky, jež trpěli úplavicí (d'Herelle, 1917). Během této studie experimentálně inokuloval směs, vytvořenou z upravených vzorků stolice a bakteriálního kmene *Shigella* izolovaných od pacientů, do pokusných zvířat, ale i na agarové médium. d'Hérelle pozoroval na médiu malé, čisté oblasti, které nazval plaky. Jeho výsledky byly publikovány v září 1917 na setkání Akademie Věd (Sulakvelidze & Alavidze, 2001). d'Hélerovo znovuobjevení bakteriofágů bylo klíčové pro skoro sto let výzkumu nejen bakteriofágové terapie, ale hlavně i pro studie fágů samotných, na molekulární úrovni (Obr. 2).



**Obr 2:** Schéma hlavních milníků v historii studia bakteriofágů, upraveno dle (Flaherty et al., 2009).

## 3.2 Počátky terapie

Krátce po objevení bakteriofágů d'Hérelle rychle pochopil jejich možný potenciál v léčbě bakteriálních infekcí, který začal studovat. Studie probíhaly v Hôpital des Enfants-Malades v Paříži, kde byl léčen chlapec, trpící úplavicí. Než chlapci podali bakteriofágy, vyzkoušeli je d'Hérelle a několik zaměstnanců na sobě, kvůli ověření bezpečnosti. Stačila jedna dávka bakteriofágů a pár dní, aby se chlapec vyléčil. Po vyléčení dalších pacientů byla potvrzena účinnost terapie. Než však stihl publikovat úspěšné výsledky, svou studii o možnostech bakteriofágové léčby infekcí, způsobených *Staphylococcus* sp., zveřejnili Bruynoghe a Maisin, kteří injekčně aplikovali fágy do blízkosti kožních vředů. d'Hérellovo pokračování ve studii terapeutických fágů a výsledky Bruynoghe a Maisina podpořily vznikající studie a začala se zakládat centra pro komerční výrobu bakteriofágů a celkově se stala fágová terapie zájmem mnoha studií po celém světě (Sulakvelidze & Alavidze, 2001).

V roce 1928 sir Alexander Fleming objevil penicilin a tím nastala nová moderní éra léčby infekcí, éra antibiotik (Fleming, 1929). Protože se antibiotika jevila jako lepší alternativa, farmaceutický průmysl se tohoto objevu chopil a celý svět začal objevovat a vyvíjet nová antibiotika. Tak byla bakteriofágová terapie, kvůli produkci antibiotik ve velkém, odsunuta do pozadí a to převážně v západním světě. Oproti západu, v bývalém Sovětském svazu bakteriofágové studie přetrvávaly. I když z jejich výsledků vyplývalo, že léčba různých infekcí, včetně *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa* probíhá úspěšně, díky absenci kontrolních skupin a publikování v nevýznamných časopisech, které byly v ruském jazyce, tyto studie nepřesvědčily svět o účinnosti fágové terapie (Hraiech et al., 2015). Již před 60 lety se předvíдалa rezistence bakterií k ATB. Jedním z mnoha důvodů rezistence bakterií v současnosti, je přílišné podávání antibiotik užitkovým zvířatům. 75 % antibiotik podaných zvířeti projde jeho zažívacím traktem, kde nejsou plně vstřebány a následně jsou vyloučeny do prostředí, kde mohou vytvořit po setkání s bakterií jejich nové rezistentní kmeny. Nejčastěji jsou užitková zvířata nadbytečně léčeny penicilinovými, tetracyklinovými a makrolidovými antibiotiky (Page & Gautier, 2012).

## 4 Možnosti současné bakteriofágové terapie

V současné době, kdy se hledají alternativy k antibiotikům, se vědci vrací k možnosti použití fágové terapie. Myšlenka, že běžné infekce a nemoci budou moci zabít, již není v jednadvacátém století tak vzdálená, právě z důvodů rozšíření multirezistentních kmenů. Po celém světě se tedy zakládají centra, kde se věnují využití fágové terapie v boji proti infekcím způsobených multirezistentními kmeny bakterií, využití fágů v léčení hospodářských zvířat, ošetření potravin, v průmyslových a ekologických aplikacích apod. (Příloha 1). Fágová terapie má více forem boje proti bakteriím. Pacientům může být podán fágový lyzát, nebo pouze enzymy produkované bakteriofágy - enzybiotika. Jak fágový lyzát, tak enzybiotika mohou být podávány v kombinaci s antibiotiky.

### 4.1 Využití fágového lyzátu v terapii

Fágový lyzát je bakteriální kultura, která podlehla fágové lýzi a typicky obsahuje nově vzniklé volné bakteriofágy a lyzované kultury cílených bakterií. Způsob fágové terapie lze rozlišit podle počtu typů fágů, podávaných během léčby. V monofágové terapii se aplikuje pouze jediný typ fágů, zatímco polyfágová terapie, nazývána fágový koktejl, spočívá v současné aplikaci dvou a více typů fágů. Polyfágová terapie se zdá být účinnější než monofágová (Hall et al., 2012) a zároveň dle výsledků studie Barbosa *et al.* je při polyfágové terapii menší pravděpodobnost vzniku fág-rezistentních bakteriálních kmenů (Barbosa et al., 2013). Jeho výsledky jsou v souladu s výsledky podobných studií, které pracují s jinými bakteriemi, např. *E.coli* (Flynn et al., 2004), *Vibrio cholerae* (Kirby et al., 2011) a *Pseudomonas aeruginosa* (Hall et al., 2012). Aplikace lyzátů pacientům má mnoho forem. Mohou se aplikovat perorálně, ve formě kapek do uší, či do nosu, aplikace může být i do peritoneální dutiny, či lokálně kolem ran v případě kožních abscesů.

#### 4.1.1 Využití fágového lyzátu v terapii proti *Pseudomonas aeruginosa*

Jednou ze studovaných rezistentních bakterií je *Pseudomonas aeruginosa*. Nové rezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa* vznikají na základě její přizpůsobivosti a schopnosti prokázat svou životaschopnost v přítomnosti antibiotik.

*Pseudomonas aeruginosa* je aerobní, gram-negativní půdní bakterie z rhizobia, vyskytující se též v odpadních vodách a nemocničních prostředích. Kolonizuje sliznice imunonopresivních osob, převážně dýchacího traktu i močových cest. V nemocničních prostředích může kontaminovat medicínskou techniku a tvořit na ní biofilm, který antibiotika již nejsou schopna zničit. Zvláště nebezpečná je na jednotkách intenzivní péče, či u osob s cystickou fibrózou. Ke kolonizaci může dojít i u zdravých jedinců, u nichž se nemusí onemocnění projevit. Za závažnost infekce způsobené *Pseudomonas aeruginosa* mohou virulentní faktory, ničící hostitelské tkáně toxiny.

Obtížnost léčení infekcí způsobených *Pseudomonas aeruginosa*, vede k potřebě objevovat stále nové, vhodnější léky nebo alternativní cesty léčby, případně i v kombinaci s ATB (Hagens, Habel, & Bläsi, 2006; Hochberg et al., 2014). Na několika vědeckých pracovištích provedli úspěšné experimentální studie *in vitro* i na animálních modelech. Následně se fágová terapie aplikovala i při klinických studiích.

Ve studiích *in vitro* byly použity bakteriofágy Pf3 a Pf1, které byly věnovány pro studii univerzitou z Hohenheimu a bakteriofág JG024, izolovaný z odpadních vod z Brunšviku (Braunschweig) v Německu. Ve studii věnované Pf3 a Pf1 došli Hagens *et al.* k výsledku, že fágová terapie v kombinaci s nižšími dávkami ATB je schopná omezit růst, dokonce zabít bakteriální kmeny *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 a PAK účinněji, než za použití samostatné dávky antibiotik nebo fágů (Hagens et al., 2006). Garbe *et al.* zjišťovali hostitelské rozmezí bakteriofága JG024 *in vitro*. Použili 19 klinických izolátů z infekcí močových cest. Bakteriofág JG024 byl schopný inhibovat 84 % procent klinických izolátů. Na základě této informace ověřili, zda je tento fág schopný infikovat *Pseudomonas aeruginosa* v ASM (artificial sputum medium), které simulovalo prostředí plic cystické fibrózy a dokázali, že podmínky, které nasimulovali, nejsou pro fága překážkami, aby infikoval buňku a úspěšně se množil (Garbe et al., 2010).

Bylo také publikováno několik úspěšných studií, věnujících se léčbě infekcí způsobených bakterií *Pseudomonas aeruginosa* na animálních modelech. Bakteriofágy použité v těchto studiích, izolovány převážně z odpadních vod byly: MPK1 a MPK6, PAK-P1 (Debarbieux et al., 2010), M4 (Fu et al., 2010), LUZ7 (Ceysens et al., 2010) a PIK (Rao & Patel, 1983). Fágy MPK1 a MPK6 byly použity k léčení infekce u myši. Dávkování probíhalo intraperitoneálně nebo intramuskulárně. I když byla prokázána větší účinnost fága MPK1 než MPK6, oba fágy, takto podávané, dokázaly myši ochránit před zánětem pobřišnice a zároveň se u nich méně vyskytovaly bakteriální infekce jater, plic a sleziny, způsobené kmenem *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Autoři této studie zároveň zavedli nový možný animální model, *Drosophila melanogaster*, jimž byly fágy podávány v krmení. Oba fágy dokázaly redukovat úmrtnost *Drosophila melanogaster*, způsobenou infekcí kmenem *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Heo et al., 2009). Bakteriofág PAK-P1 byl použit k infekci bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* PAK v plicích myši. Myši byly léčeny bakteriofágy v různých poměrech bakteriofágy ku bakteriím. Při poměru 1:10 zemřely myši po pěti dnech. Myši léčeny poměrem 1:1 nebo 10:1 přežily dobu experimentu (12 dní). Myši neléčené bakteriofágy zemřely během 48 hodin. Práce autorů opět potvrdila potenciál bakteriofágové terapie (Debarbieux et al., 2010).

Wright *et al.* použili bakteriofágovou terapii v klinické studii, která se týkala pacientů, jež trpěli chronickým zánětem středního ucha, způsobeným bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. Klinické studie se zúčastnilo 24 pacientů ve věku 2 - 58 let, kteří byli rozděleni do dvou skupin. První, kontrolní skupině, ve které byly 3 ženy a 9 mužů, se indikovalo placebo. Druhé skupině, sestávající ze 4 žen a 8 mužů se aplikoval fágový koktejl, který obsahoval 6 fágů, BC-BP-01 až BC-BP-06 (Soothill et al., 2013), v koncentraci  $10^5$  PFU přímo do ucha. Pacienti byli pozorováni po 6 hodinách a po 7, 21 a 42 dnech po podání. Po ukončení léčby bylo u skupiny, která byla léčena fágy, prokázáno znatelné zlepšení zánětu oproti kontrolní skupině. Digitální fotografie zevního ucha pacienta před a po léčbě viz. Příloha 2. Vedlejší účinky nebyly pozorovány. Tato studie ukázala tedy kromě účinnosti i bezpečnost léčby lidí bakteriofágy v této infekci (Wright et al., 2009). Aplikace fágové terapie proti rezistentním kmenům bakterie *Pseudomonas aeruginosa* se zdá být nadějná.

## 4.2 Enzybiotika, enzymy produkované bakteriofágy

Název enzybiotika vznikl kombinací slov enzym a antibiotika, v myšlence využití endolysinů místo antibiotik. Tento termín byl poprvé použit Fischetti *et al.*, při jejich studii mureinových hydroláz C1 bakteriofágů (Fischetti, Nelson, & Loomis, 2001). Využití pouhých fágových enzymů, je alternativní k podávání celých fágů ve formě fágových lyzátů.

Tyto enzymy, kódované genomem bakteriofágů, jsou produkovány během fágového replikačního cyklu. Dělí se na dvě hlavní skupiny: VAPGHs (virion-associated peptidoglycan hydrolases) a endolysiny. Rozdíl v těchto enzymech je, v jaké fázi lytického cyklu působí. VAPGHs působí při degradaci peptidoglykanové vrstvy při infekci (Koch, 1996), zatímco endolysiny jsou fágem produkováné enzymy v posledním kroku lytického cyklu a zajišťují lýzi hostitelských buněk a následné uvolnění nově vzniklých fágových partikulí. Na základě porovnání sekvencí mezi VAPGHs a endolysiny se předpokládá, že oba enzymy hydrolyzují vazby v peptidoglykanové vrstvě podobným mechanismem. Vysoký stupeň podobnosti enzymů je v N-terminální katalytické doméně, v C-terminální vazebné doméně se liší (Rodríguez-Rubio *et al.*, 2013).

### 4.2.1 Virion asociované peptidoglykanové hydrolázy

Virion asociované peptidoglykanové hydrolázy (VAPGHs) mají enzymatickou aktivitu, kterou chemicky rozloží jednu ze čtyř hlavních vazeb v peptidoglykanové vrstvě bakteriální stěny, čímž vytvoří malý otvor, kudy fág injikuje svůj genetický materiál do hostitele (Koch, 1996).

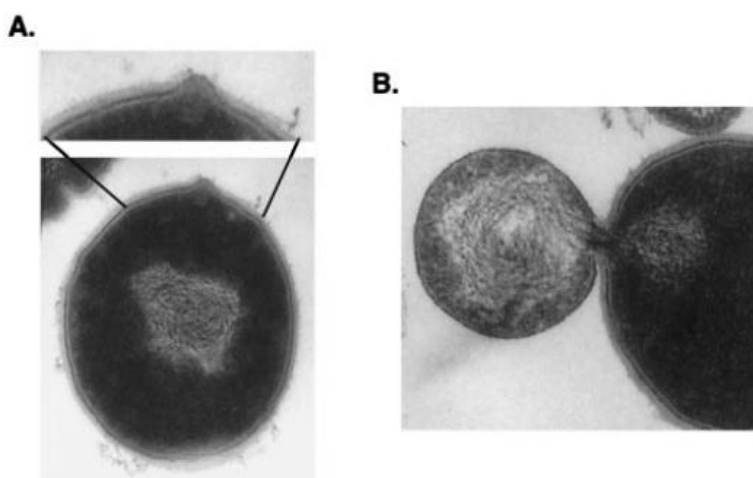
VAPGHs se dělí na základě rozdílné enzymatické aktivity na 4 skupiny: 1) lysozymy (Arisaka *et al.*, 2003); 2) lytické transglykosilázy (Rydman & Bamford, 2000); 3) glukosaminidázy a 4) endopeptidázy (Stockdale *et al.*, 2013; Caldentey & Bamford, 1992). Stále se objevují nové VAPGHs a u již objevených a popsanych byla prokázána i antibakteriální aktivita, např. protein HydH5 z fága  $\Phi$ PLA88, jež vykazuje antibakteriální aktivitu proti *Staphylococcus aureus* (Rodríguez *et al.*, 2011), protein P5 z fága  $\Phi$ 6 s antibakteriální aktivitou proti *E.coli* a dalším bakteriím, které mají nestabilní vnější membránu (Caldentey & Bamford, 1992).



Ve skutečnosti stále není funkce VAPGHs během fágového cyklu zcela objasněná. Je známo, že degradují buněčnou stěnu, aby mohl fág injikovat svou genetickou informaci. Rodríguez-rubio *et al.* ve své práci ale uvedli, že VAPGH gp49, testovaná za laboratorních podmínek, z fága  $\Phi 11$  *Staphylococcus aureus*, není pro jeho infekční cyklus nezbytná (Rodríguez-rubio *et al.*, 2013). VAPGHs, dokážou způsobit i takzvanou lýzi zvenčí. Ta je způsobena adsorbicí více fágů k bakteriální buňce, která je již infikována jiným fágem a způsobí lýzi buňky. Je to brzká lýze a vyskytuje se tedy bez nově vzniklých virionů (Delbrück, 1940). Lýzi zvenčí probírá důkladněji Abedon ve svém review (Abedon, 2011).

#### 4.2.2 Endolysiny a jejich použití v terapii

Endolysiny, nebo zkráceně také lysiny, jsou bakteriofágem kódované mureinové hydrolázy, produkované na konci jejich replikačního cyklu, sloužící k degradaci peptidoglykanové vrstvy, lýzi buňky a vypuštění nově vzniklých virionů (Obr. 3). Poprvé byly objeveny v roce 1955 a následně byla testována jejich antibakteriální aktivita (Ralston *et al.*, 1955).

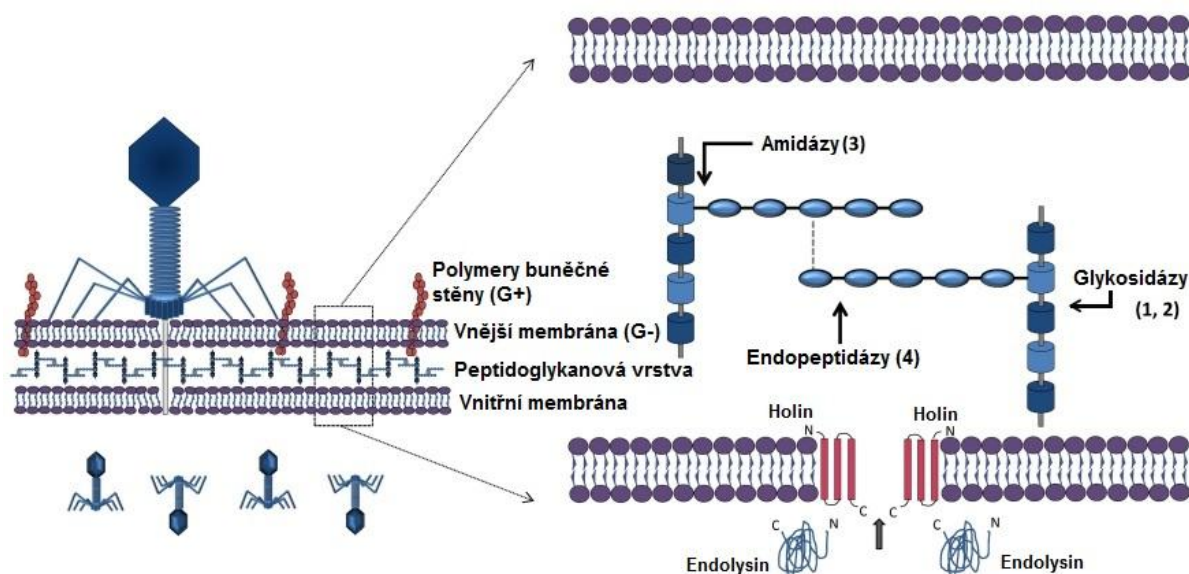


**Obr. 3:** Vliv lysinu na buněčnou stěnu po 15 s působení, upraveno dle (Fischetti *et al.*, 2001): Nejdříve dojde k oslabení buněčné stěny (A), což má za následek vytlačení membrány skrz oslabenou část (B).

Endolysiny sestávají ze dvou domén. Z C-terminální vazebné domény, která váže bakteriální stěnu a N-terminální katalytické, která štípe vazby buněčné stěny bakterie. Endolysiny se dělí na jednotlivé typy podle enzymu, kterým se k peptidoglykanu vážou. Byly identifikovány 4 typy (Obr. 4): 1) lysozymy; 2) transglykosidázy; 3) amidázy; 4) endopeptidázy.

Lysozymy a transglykosidázy působí na glykosidické vazby mezi aminocukry v buněčné stěně, zatímco amidázy a endopeptidázy působí na amidové a peptidové vazby zesilující oligopeptidy a vazby mezi nimi. V některých případech stafylokokových bakteriofágů, mají více než jednu enzymatickou aktivitu (Navarre et al., 1999).

Většina bakteriofágů využívá na konci replikačního cyklu dva enzymy, jež jsou na sobě časově závislé, holin a endolysin. Kromě několika výjimek (Loessner et al., 1997), endolysiny nemají signální sekvenci a nemohou být translokovány přes cytoplasmatickou membránu. K tomu potřebují malé membránové proteiny hydrofóbního charakteru, zvané holiny, které způsobí permeabilizaci membrán, vmezeří se do cytoplasmatické membrány, tím umožní přístup endolysinu k peptidoglykanu a dojde k lýzi buňky.



**Obr. 4:** Schéma holin-lysinového systému, upraveno dle (Oliveira et al., 2013): Schéma ukazuje všechny rozštěpitelné vazby, s příklady hydroláz, které na ně působí: 1) N-acetyl- $\beta$ -D-muramidázy, 2) N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidázy, 3) N-acetylmuramoyl-L-alanin amidázy 4) L-alanoyl-D-glutamát endopeptidázy

#### 4.2.2.1 Medikální a biotechnologické aplikace endolysinů

Schopnost purifikovaných fágových endolysinů zabíjet bakterie byla poprvé popsána v roce 1959 (Freimer et al., 1959), avšak až Fischetti *et al.* v roce 2001 prokázali při *in vitro* i *in vivo* studiích na *Streptococcus* sp, že endolysiny jsou unikátní mureinové hydrolázy. Myšlenka, že by mohly být využity jako antimikrobiální látky v prevenci, či ničení infekce v mukosálních površích u myši (Fischetti et al., 2001), podpořila rozvoj výzkumu endolysinů ve fágové terapii, převážně ke kontrolám infekcí gram-pozitivních bakterií, např. *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* a *Clostridium perfringens*.

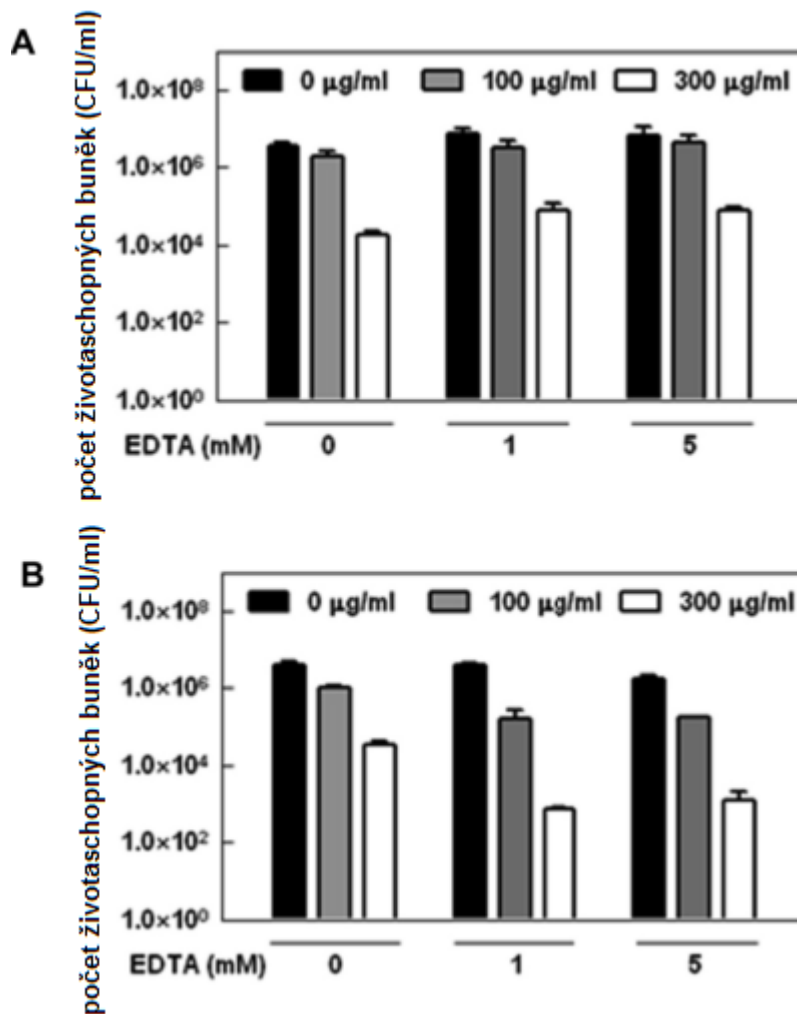
Nový přístup ke kontrolám infekce *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*, pomocí bakteriofágových purifikovaných lytických enzymů zaujali Fischetti *et al.* Použili lysin PlyV12, izolovaný z bakteriofága  $\Phi 1$ , jehož hostitelem je kmen *Enterococcus faecalis* V12. Výsledkem jejich studie bylo zjištění, že za 15 minut po aplikaci lysinu PlyV12 na suspenzi *Enterococcus faecalis* došlo k poklesu optické density suspenze o 50 % (Fischetti et al., 2004).

Loessner *et al.* pracovali s endolysinem ply3626 a holinem hol3626 z fága  $\Phi 3626$ . Ve své studii popsali pozici genů pro holin a endolysin a demonstrovali funkci holinových a endolysinových genových produktů. Prokázali, že fág  $\Phi 3626$  je schopný zlyzovat bakteriální stěnu 48 kmenů *Clostridium perfringens*, zatímco jiné druhy bakterií, či klostridií nebyly postihnuty. Vzhledem k vysoké specifitě Ply3626 k bakterii *Clostridium perfringens* předpokládali, že právě C-terminální vazebná doména směřuje enzymy na specifické receptory na buňkách *Clostridium perfringens*. Tuto myšlenku prokázali pomocí mutanta HPL3626 $\Delta$ C, který měl zkrácenou C-terminální doménu a ztratil schopnost lyzovat buňky. (Loessner, Zimmer, et al., 2002). Tuto hypotézu zároveň potvrzují Loessner *et al.* jinou studií, kde se věnují endolysinům Ply118 a Ply500, z fága *Listeria monocytogenes*. Tyto endolysiny specificky hydrolyzují stěnu *Listeria* a mají podobnou strukturu a funkci (Loessner, Kramer, et al., 2002). Tyto poznatky mohou být podle Loessner *et al.* velmi přínosné do budoucnosti, pro prevenci růstu *Listeria monocytogene* ve střevech drůbeže, nebo k prevenci kolonizace potravin bakteriemi (Loessner, Zimmer, et al., 2002).

#### 4.2.2.2 Využití endolysinů proti gram-negativním bakteriím

Při experimentálních studiích lytické aktivity endolysinů se zjistilo, že endolysiny nepůsobí lyticky na gram-negativní bakterie. Oproti gram-pozitivním bakteriím, které mají peptidoglykan zpřístupněn zvenčí buňky, mají gram-negativní bakterie navíc vnější membránu, která zabraňuje vstupu lytickým enzymům. Využívá se tedy různých detergentů, nebo chelatačních činidel, například EDTA (MacGregor & Elliker, 1958), pro rozrušení vnější membrány gram-negativních bakterií. Buňka se až poté stává náchylnou k mureinovým hydrolázám.

Při výzkumu lytické aktivity endolysinu SPN9CC zjistili Lim *et al.*, že tento endolysin má lytické účinky na gram-negativní bakterie i bez přidání EDTA činidla. Antimikrobiální aktivitu endolysinu SPN9CC testovali na 8 gram-pozitivních a 23 gram-negativních kmenech bakterií. Endolysin dokázal zlyzovat všechny přítomné gram-negativní kmeny bakterií, avšak žádné gram-pozitivní. Dále tedy studovali působení endolysinu SPN9CC na *E.coli*, s postupným zvyšováním doby působení endolysinu samotného, či endolysinu v kombinaci s EDTA v různých koncentracích. I když je endolysin schopný zredukovat gram-negativní bakterie sám, k největší redukci životaschopných buněk došlo v kombinaci 1mM EDTA a endolysinu v koncentraci 300 µg/ml, po dvou hodinách působení (Obr. 5). Pokud reakce probíhala pouze s EDTA činidlem, životaschopnost bakterií nebyla významně ovlivněna, z čehož usoudili, že EDTA pomáhá zvýšit lytickou aktivitu SPN9CC pomocí permeabilizace vnější membrány. Zároveň určili, že endolysin SPN9CC je aktivní v široké škále teploty (24°C až 65°C) a pH (7,0 až 9,5), avšak nejvyšší aktivitu vykazoval při teplotě 50°C a pH 7,5 až 8,5 (Lim, Shin, Heu, & Ryu, 2014).



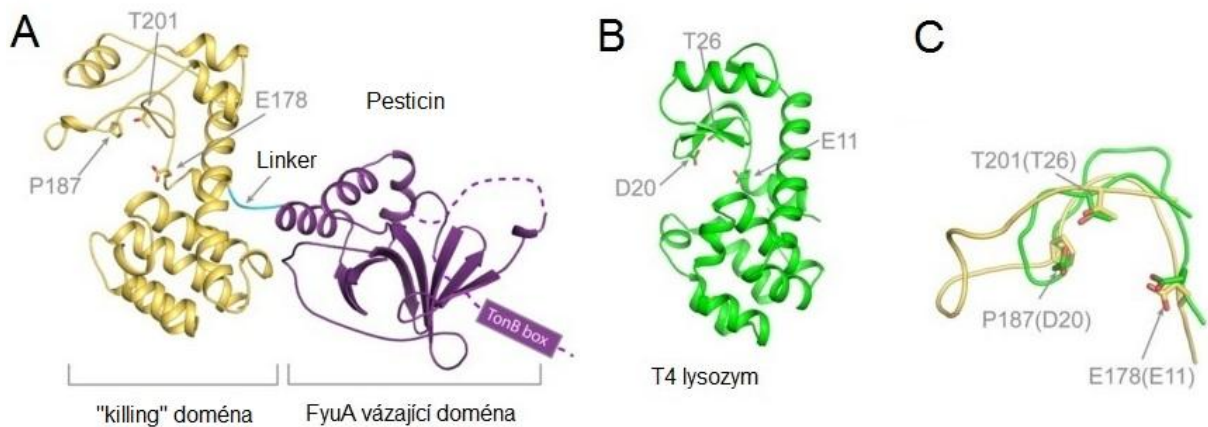
**Obr. 5:** Lytická aktivita purifikovaného endolysinu SPN9CC, upraveno dle (Lim et al., 2014): Na obrázku jsou znázorněny počty životaschopných bakterií *E.coli*, po přidání endolysinu SPN9CC. Zároveň s endolysinem byly k buňkám přidány různé koncentrace EDTA. Doba působení byla 1 hodina (A) a 2 hodiny (B).

Lai *et al.* pracovali na exogenní aplikaci endolysinu LysAB2 z fága  $\Phi$ AB2. Prokázali schopnost endolysinu LysAB2 lyzovat gram-negativní i gram-pozitivní bakterie (Lai et al., 2011). Antibakteriální aktivitu endolysinu fága *Bacillus amyloliquefaciens* proti gram-negativnímu bakteriálnímu kmenu *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 analyzovali Morita *et al.* Vytvořili deleční mutanty endolysinu, D1-D10 a ověřovali jejich enzymatickou aktivitu. Na základě pokusů Appelmelk *et al.* s laktoferrinem se předpokládá podobná reakce u endolysinů (During et al., 1999), kterou je interakce peptidů tvořící amfipatické helixové domény s negativně nabitými membránovými elementy, např. lipopolysacharidy, gram-negativních bakterií (Appelmelk et al., 1994). U mutantů, s delecí 116 aminokyslinových oblastí C-terminální domény byla ztracena antibakteriální aktivita.

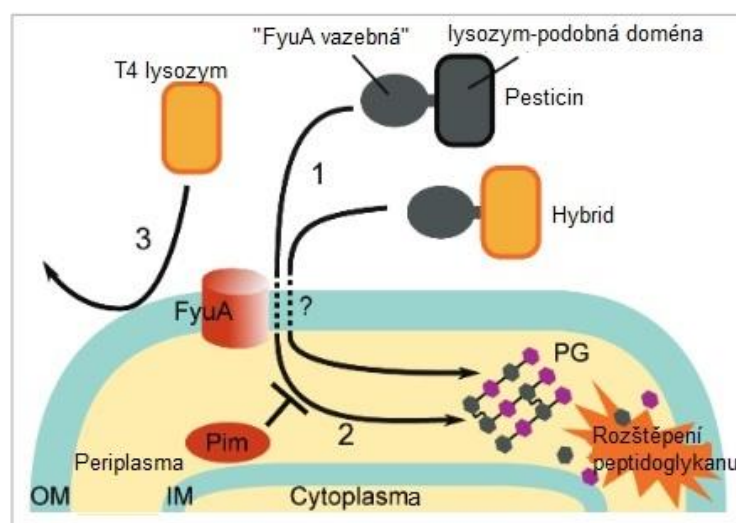
Morita *et al.* na základě těchto znalostí usuzují, že navázání na lipopolysacharid bakteriálního kmene *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by mohly způsobovat dva helikální peptidy, které jsou na základě sekundární struktury pravděpodobně ve vazebné C-terminální doméně endolysinu, která poskytuje katalytické N-terminální doméně přístup k bakteriální stěně. Dle experimentů s delečními mutanty předpokládají, že mechanismus lytické aktivity endolysinu vůči gram-negativním bakteriím vyžaduje aktivitu obou domén (Morita *et al.*, 2001). Endolysin SPN9CC prokázal lytickou aktivitu, stejnou jako u těchto dvou endolysinů, bez nutného prvotního rozrušení peptidoglykanové vrstvy (Lim *et al.*, 2014).

Novou alternativu k doposud používané EDTA našli Oliveira *et al.* Ve své studii použili bakteriofágový endolysin Lys68 proti gram-negativním bakteriím společně s organickými kyselinami. Kyselina citrónová a jablečná lépe permeabilizovaly vnější buněčnou stěnu v kombinaci s Lys68, než kombinace Lys68 a EDTA (Oliveira *et al.*, 2014).

Další novou alternativou je vytváření hybridních lysinů. Lukacik *et al.* vytvořili hybridní endolysin, který je schopný zahubit gram-negativní bakterie. K jeho vytvoření použili strukturu pesticinu (Obr. 6, A) a T4 lysozymu (Obr. 6, B), na základě jejich strukturní a funkční podobnosti C-terminální domény (Obr. 6, C). Pesticin je toxin z bakterie *Yersenia Pestis*, který inhibuje růst blízkých příbuzných kmenů bakterií a sestává ze dvou domén, spojených krátkým linkerem. Z domény, která se váže na FyuA receptor a z domény, která degraduje peptidoglykan. FyuA je receptor pro siderofor yerseniabactin ve vnější membráně, kterým může být do periplasmy bakterie přenášen i pesticin, který zhydrolyzuje peptidoglykan (Vollmer *et al.*, 1997). Na podobném principu je založená inhibice gram-negativních bakterií pomocí hybridního lysinu (Obr. 7). Touto studií ukázali Lukacik *et al.*, že hybridní lysin je schopný zabít bakteriální patogeny, bez rozrušení vnější membrány použitím chelatačních činidel, či detergentů, ale jen ty kmeny, které obsahují FyuA receptor (Lukacik *et al.*, 2012).



**Obr. 6:** Modelová struktura pesticinu, T4 lysozymu a hybridního lysinu, upraveno dle (Lukacik et al., 2012): (A) zobrazuje domény pesticinu, spojené krátkým linkerem, "killing" doména odpovídá N-terminální doméně a FyuA vazebná doména odpovídá C-terminální doméně. (B) T4 lysozym je archetypální lysin, sestávající z katalytických triád, odpovídající E11, D20 a T26 na obrázku. (C) Dva zbytky jsou konzervovány v pesticinu jako E178 a T201. Po překrytí AMK zbytků jsou vidět rozdílné sekundární struktury pesticinu (zlatý) a T4 lysozymu (zelený) kde jsou vidět funkční zbytky pesticinu, podobné T4 lysozymu.



**Obr. 7:** Schéma mechanismu translokace pesticinu a hybridního lysinu do periplasmy, upraveno dle (Lukacik et al., 2013): 1) molekula pesticinu projde pomocí své FyuA vazebné domény do periplasmatického prostoru přes FyuA receptor, kde rozštěpí peptidoglykanovou vrstvu a usmrtí buňku. 2) Hybridní lysin projde stejným způsobem jako pesticin do periplasmatického prostoru, ale na rozdíl od pesticinu, hybrid nebude inhibován periplasmatickým Pim proteinem. 3) Samotný T4 lysozym není schopný se dostat skrz vnější membránu buňky.

### 4.2.3 Používané databáze současně dostupných enzybiotik

Enzybiotika lze dohledat v mnoha databázích, například phiBIOTICS. Tento portál obsahuje obecné shrnutí, chemické i biologické složení a výsledky ze studií, kde byla enzybiotika použita (Hojckova et al., 2013). Dalším portálem je GMEnzy, který se zaměřuje na geneticky modifikovaná enzybiotika (GME). Zde se mohou dohledat strategie, produkční a purifikační metody a údaje o biologické aktivitě (Wu et al., 2014). Dalším portálem je EnzyBase, který obsahuje řadu aplikací, například počítačové míchání fágových koktejlů, apod. (Wu et al., 2012). Každá tato databáze je volně přístupná na internetu (Tab. 1).

**Tabulka 1:** Přehled internetových stránek enzybiotických databází.

Databáze	Internetové stránky
phiBIOTICS	<a href="http://www.phibiotics.org/">http://www.phibiotics.org/</a>
GMEnzy	<a href="http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/gmenzy/">http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/gmenzy/</a>
EnzyBase	<a href="http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/EnzyBase/home.php">http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/EnzyBase/home.php</a>

### 4.3 Fágová terapie v kombinaci s antibiotiky

Již v několika studiích se došlo k závěru, že kombinace antibiotik s bakteriofágy, či endolysiny, vykazuje výsledky slibnější, než použití fágových produktů samostatně.

Tato myšlenka, odhalit účinky samostatné nebo kombinované léčby, byla cílem studie Hochberg *et al.* Použili lytický bakteriofág LUZ7 a bakteriální kmen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, který byl infikován samostatně bakteriofágem LUZ7 i kombinovaně se streptomycinem. Optická hustota populace bakterií byla zaznamenávána po dobu 70 hodin a už po prvních 24 hodinách dokázala samostatná dávka antibiotik i bakteriofágů silně zredukovat hustotu bakterií. Kombinace fágů se streptomycinem způsobila radikálně větší redukci oproti samostatným dávkám a dokázala potlačit obnovení bakterií v populaci. Snažili se tedy rozvinout kombinovanou léčbu a zvažovali, zda má dávkování streptomycinu k fágům vliv na účinnost léčby. ATB přidali současně s bakteriofágy, dále 12 a 24 hodin po podání bakteriofágů. Optická hustota byla na konci experimentu nejmenší v případě, kdy se podal streptomycin po 12 hodinách od podání bakteriofágů. Bakterie, kterým byla aplikována pouze samostatná dávka streptomycinu si vyvinuly rezistenci.



Rezistence na bakteriofágy v kombinaci s antibiotiky vznikala výrazně pomaleji. (Hochberg et al., 2014).

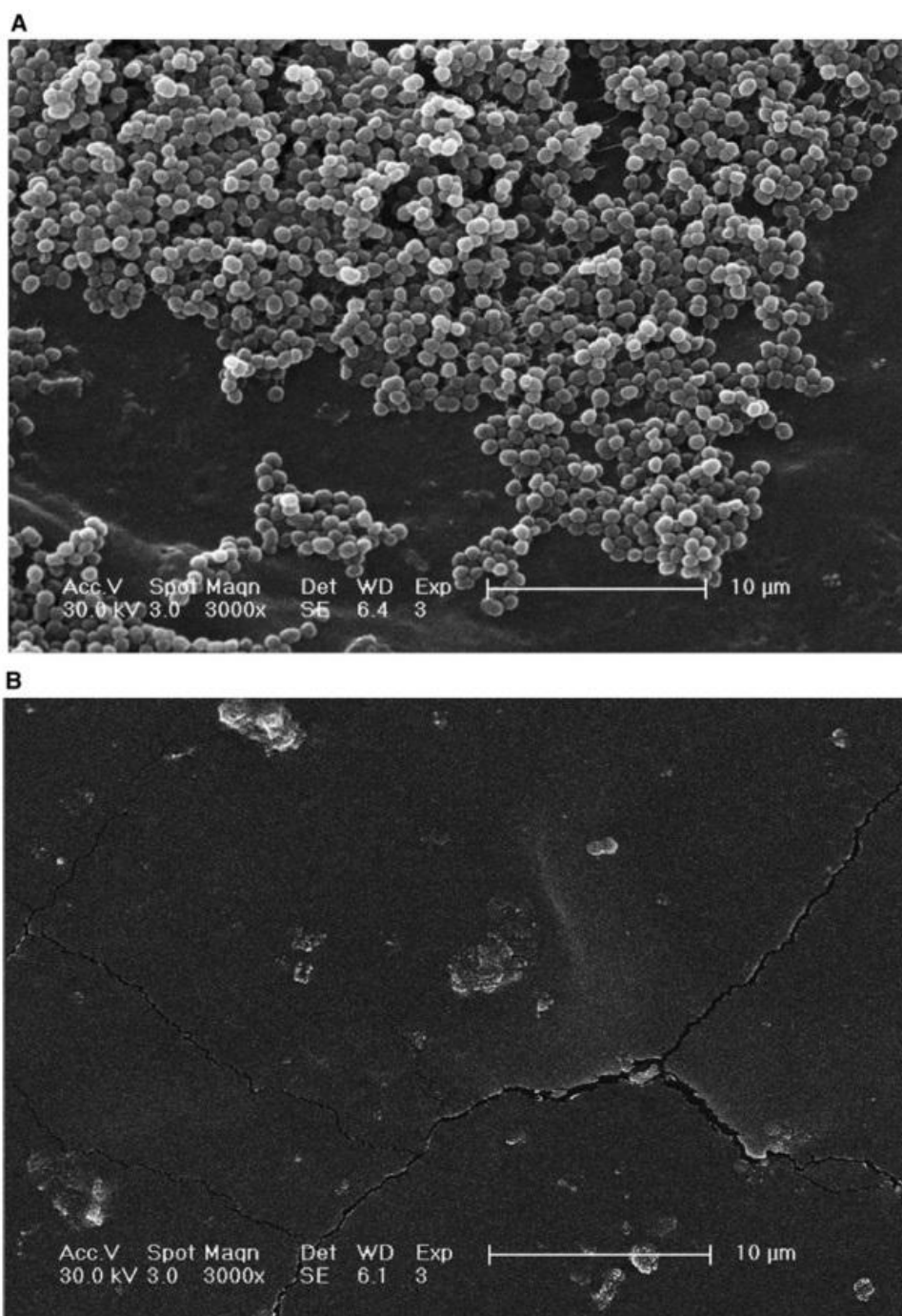
Studiu působení kombinace antibiotik s endolysin se věnovali Schuch *et al.* Studovali vliv lysinu CF-301, který je vyvíjen k léčbě bakteriální infekce *Staphylococcus aureus*. Lysin CF-301 byl testován na 250 kmenech *Staphylococcus aureus*, z nichž 103 bylo MSSA (methicillin-sensitives *Staphylococcus aureus*) a 120 MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). Lysin CF-301 dokázal tyto kmeny plně inhibovat. Na základě těchto výsledků se mohli věnovat účinku kombinaci endolysinu CF-301 s antibiotiky. Lysin s antibiotiky testovali *in vitro*. Antibiotika a CF-301 byly v jejich nejmenší koncentraci, kdy redukuje bakterie, testovány na 20 MSSA a 42 MRSA laboratorních kmenech. Kombinace CF-301 a antibiotik se potvrdila jako účinnější léčba než pouhým endolysinem, či antibiotiky proti bakterii *Staphylococcus aureus* (Schuch et al., 2014).

#### **4.4 Aplikace fágové terapie pro kontrolu biofilmu**

Proti biofilmu ATB nepůsobí a mohou vznikat závažné infekce končící smrtí. Ve svém review popisují Holban et al., že následkem vznikajících fenotypových změn, kterými se odlišují oproti volně žijícím bakteriím stejného druhu, je v biofilmu rostoucí bakterie více odolná vůči vnějším vlivům, stresu i imunitní odpovědi hostitele. Biofilm je populace buněk, přilnutá k povrchu, který kolonizují a vytváří EPS (extracelulární polysacharidová substance). Tímto povrchem může být lidská kůže, gastrointestinální trakt, infikovaná tkáň, ústní dutina, ale i medikální přístroje apod. Věda teprve nyní začíná chápat celé procesy biofilmu (Holban et al., 2016).

EPS sestává z mnoha variací chemických, ale i fyzikálních vlastností. Primárně je tvořena z polysacharidů, z menší části jsou to neutrální makromolekuly, majoritní část tvoří polyanionové molekuly. Anionový charakter zajišťují uronové kyseliny, například D-glukuronová, D-galakturonová kyselina apod. nebo ketal-vázané pyruváty. Na základě těchto vlastností vznikají dvojmocné vazby anionů vápníku a magnesia, které zesilují vazby s polymerovými vlákny a zvětšují vazebnou sílu vznikajícího biofilmu.

Rozrušení biofilmu je zásadní krok v lékařství i v průmyslových aplikacích ke kontrole biofilmu. Studie a jejich pokusy jsou založeny na fyzických, chemických a biologických metodách, které slouží jako prevence jeho vzniku, nebo mají zničit biofilm již utvořený. Slibné jsou biologické studie, ve kterých se věnují fágové kontrole biofilmu, kde se za adekvátní cíl k determinaci považuje právě EPS. Bakteriofágy produkují polysacharidové depolymerázy, které mají potenciál mezibuněčnou hmotu degradovat, ale nemusí se vždy dostat do spodních vrstev, až k hostitelské buňce (May et al., 2010). Jednou z prvních studií prevence biofilmu *Listeria monocytogenes* na površích z nerezové oceli byla publikována Hibma *et al.* v roce 1997 a přispěla k tendencím budoucího výzkumu (Hibma et al., 1997). Na Hibma *et al.* navázali Curtin a Donlan, kteří inhibovali biofilm *Staphylococcus epidermidis* na lékařských zařízeních (Obr. 8). Použili fág 456, který byl testován proti *Staphylococcus epidermidis* již Dean *et al.* v roce 1973 (Dean et al., 1973; Curtin & Donlan, 2006). Na tuto studii navázali Fu *et al.*, kteří zkoumali aplikaci fágů proti *Pseudomonas aeruginosa*. K inhibici použili bakteriofág M4, který úspěšně zredukoval více než 99 % biofilmu během 24 hodin (Fu et al., 2010).



**Obr. 8:** Snímky biofilmu *Staphylococcus epidermidis* na katetru ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), upraveno dle (Curtin & Donlan, 2006): A) Povrch neošetřeného katetru po 24 hodinové tvorbě biofilmu bakterií *Staphylococcus epidermidis*. B) Povrch stejného katetru, přeláčeného bakteriofágem 456.

## 5 Zvážení výhod a nevýhod bakteriofágové terapie

Pro aplikaci bakteriofágové terapie je potřeba znát všechny okolnosti, vyplývající z jejího použití, biologie bakteriofágů, či jejich enzymů, které se používají v terapii, jejich účinků na bakterie, případně interakce s infikovaným hostitelem. Nejvýznamnější vlastnosti fágových produktů a antibiotik jsou pro přehlednost shrnuty v Tab. 2.

**Tab. 2:** Porovnání bakteriofágů, endolysinů a antibiotik jako antimikrobiální látky, upraveno dle (Knoll & Mylonakis, 2013). Vlastnosti jsou porovnávány, bez ohledu na jejich výhodnost, či nevýhodnost.

Vlastnost	Bakteriofágy	Endolysiny	Antibiotika
<b>Účinky</b>	Baktericidní	Baktericidní	Baktericidní nebo bakteriostatické
<b>Inhibice biofilmu</b>	ANO	ANO	NE
<b>Antibakteriální spektrum, následky</b>	Specifické rozhraní	Specifické rozhraní	Nespecifické rozhraní
	Žádné vedlejší škody na tkáni hostitele infekce	Žádné vedlejší škody na tkáni hostitele infekce	Může způsobit vedlejší škody na tkáni hostitele infekce
<b>Možnost rezistence bakterií</b>	Nižší při polyfágové terapii	Neregistrována	Faktory vyvolávající rezistenci jsou známe
	Rezistentní mutanty lze potlačit aplikací nových fágů		Vývoj nových antibiotik, vůči vzniku rezistentních kmenů bakterií je časově náročný
	Rezistentní mutace může negativně ovlivnit virulenci bakterií		Rezistentní mutace může zvýšit nebo snížit virulenci bakterií
<b>Vedlejší efekty</b>	Nepozorovány	Nepozorovány	Známy
<b>Účinnost</b>	Neprokázána	Neprokázána	Prokázána

## 5.1 Výhody fágové terapie

Oproti antibiotikům, jakmile se fág dostane do buňky, je schopen se aktivně replikovat. Každý bakteriofág průměrně vyprodukuje během lytického cyklu až 200 dceřiných fágů, v závislosti na podmínkách (Delbrück, 1945). Lze tedy aplikovat fágy pouze v jedné dávce a díky potenciálu fágů pro aktivní replikaci, lze dosáhnout "aktivní" terapie (Payne & Jansen, 2001). Avšak nelze předpokládat, že jediná dávka fágů bude dostatečná k dosažení žádaných výsledků. Rozhodnutí, zda stačí jediná dávka, či je nezbytných dávek více, záleží na léčené infekci a rychlosti růstu bakteriální populace. K tomu svou studií přispěli Capparelli *et al.* Pokud populace bakterií roste rychle, stačí jedna dávka. U pomalu rostoucích bakterií, je nezbytná potřeba více dávek (Capparelli *et al.*, 2010). Důkazů, že by aplikace vícenásobné dávky vyvolávala vedlejší účinky, existuje v literatuře málo anebo vedlejší účinky pozorovány vůbec nebyly. (Fischetti *et al.*, 2003).

Díky schopnosti fágů se replikovat, tedy zvýšit svou hustotu při infekci *in vivo*, by se mohla snížit potřebná dávka na minimum a tím snížit i náklady na léčbu. Náklady na výrobu a léčbu jsou zvláště důležité pro rozvojové země. Snížením dávky by se také mohla zlepšit kontrola léčby, protože fág zvýší svou hustotu pouze tehdy, když aktivně zabíjí bakterie.

Další výhodou fágové terapie je jejich vysoká specifita vůči hostiteli. (Hall *et al.*, 2013; Poullain *et al.*, 2007). S fágovou terapií nastává možnost vyhnout se sekundárním infekcím, vznikajících užíváním antibiotik, která se zaměří jak na patogen, tak i na mikroflóru pacienta. Fág má jen minimální dopad na zdraví prospěšnou floru v těle hostitele. Antibiotika se širšími oblastmi působení mají tendenci navozovat superinfekce (*Clostridium difficile*, *Candida albicans* apod.) (Ramos *et al.*, 2005). Specifita bakteriofágů spočívá v komplementaritě receptorů na povrchu bakteriální buňky, kde jsou i rozeznávané složky, například lipopolysacharidy, peptidoglykan, kyselina teichoová, olichosacharidy apod.

V současnosti, kdy vznikají geneticky modifikované endolysiny a bakteriofágy se těmito kroky získávají bezpečnější a výhodnější produkty. Modifikované bakteriofágy mají výhodu oproti antibiotikům v degradaci biofilmů. Lze vytvořit bakteriofág, který bude exprimovat nejúčinnější EPS specifický degradující enzym. Tyto enzymy současně napadají jak buňky v biofilmu, tak EPS (Lu & Collins, 2007).

Velkou výhodou bakteriofágů je, že mají nízkou toxicitu, protože se skládají především z nukleových kyselin a proteinů. V podstatě jsou netoxické. Jejich složení má nízký dopad na životní prostředí. Na rozdíl od širokospektrých antibiotik, vyloučené, plně nevstřebažené fágy budou mít maximálně vliv pouze na malou část bakteriálních populací. Fágy mimo hostitele mohou být velmi rychle inaktivovány slunečním světlem, vysušením, teplotními extrémy a dalšími vlivy, na které nejsou adaptované (viz. kapitola 5.2 Nevýhody fágové terapie).

## 5.2 Nevýhody fágové terapie

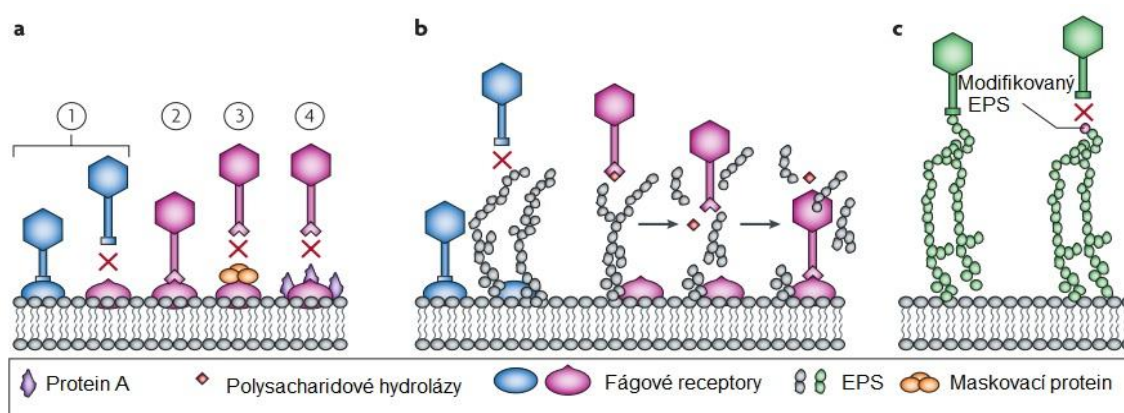
Mezi možné nevýhody patří fakt, že přibližně 50 % bakterií má vlastní primitivní imunitní systém, nazýván CRISPRs (clustered regularly interspaced short palindromic repeats), který zasahuje proti cizorodé DNA, plazmidům a virům (Jansen et al., 2002; Mojica et al., 2005). Jsou známé tři typy (I-III), ale jejich struktury se stále vyvíjí. Mechanismus působení na fágy lze rozdělit do tří fází: fáze adaptace, fáze exprese a zpracování a fáze umlčení. Nejprve Cas bílkoviny rozpoznají cizorodou nukleovou kyselinu, kterou začlení do repetitivní oblasti. Tyto oblasti jsou dále přepisovány do dlouhého transkriptu primární RNA, který je zpracován do malých úseků CRISPR RNA (crRNA). Tyto crRNA obsahují sekvence, komplementární k cizorodé nukleové kyselině a jsou párovány s Cas bílkovinami na efektorovém komplexu, který rozeznává cílové sekvence v cizorodé nukleové kyselině na základě komplementarity bází. Zahájí se specifické štěpení řetězců a tím dojde k zábraně šíření cizorodé nukleové kyseliny. Podrobněji popisuje molekulární mechanismy CRISPR ve svém shrnutí Gasiunas a Sinkunas (Gasiunas & Sinkunas, 2014).

Ve výhodách bylo již řečeno, že bakteriofágy jsou v podstatě netoxické. To ale neznamená, že fágy nekomunikují s imunitním systémem hostitele infekce. Merrill *et al.* pozorovali, že po injekci vysokého titru fágů myšim, jsou bakteriofágy jako cizí struktura v těle hostitele infekce velmi rychle odstraňovány filtračními orgány retikulo-endoteliálního systému (Merrill et al., 1973).

Další nevýhodou je stabilita fágových partikulí a faktory omezující jejich aktivitu. Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují přežití fága v jeho přirozeném prostředí. Muniesa *et al.* navrhli, že mezi strukturou fágů a jejich přežitím může být spojitost (Muniesa et al., 1999). Jedním z faktorů, které určují jejich aktivitu je teplota (Hurst et al., 1980; Olson et al., 2004). Některé bakteriofágy dokážou přežít ve vysokých teplotách

(40-90°C), bakteriofágy *Lactococcus* dokonce i pasterizaci (Madera et al., 2004). Další důležitý faktor ovlivňující stabilitu fágů je pH. V případě podání fágových produktů perorálně může dojít k deaktivaci produktů, díky kyselému prostředí v žaludku, protože ne všechny bakteriofágy snášejí kyselé prostředí (Davis et al., 1985; Sharp et al., 1946). Avšak vliv na stabilitu a aktivitu fágu může mít i zásadité pH. Fischetti *et al.* pracovali s lysinem PlyV12 a došli k závěru, že PlyV12 vykazuje při pH 6,0 maximální aktivitu, která ale klesá se zvyšováním pH a při pH 8,5 dochází až k inaktivaci (Fischetti et al., 2004).

Skutečnost, že bakterie mohou být rezistentní nejen na antibiotika, ale i na bakteriofágy je další nevýhodou, avšak díky specifitě bakteriofágů se riziko fágové rezistence jeví jako nižší oproti ATB, což můžeme pokládat za výhodu oproti ATB. Pro adsorpci fágů na bakteriální buňku je potřeba rozeznání bakteriálních receptorů (Obr. 9, a1). Bakterie se mohou stát fág-rezistentní tak, že změní strukturu povrchových receptorů, ale bakteriofág se dokáže novým receptorům přizpůsobit (Obr. 9, a2). Proto bakterie následně maskuje fágové receptory, produkcí maskovacích proteinů (Obr. 9, a3). Např. *Staphylococcus aureus* produkuje imunoglobulin G, na jehož Fc fragment se váže protein A. Tím maskuje bakterie své receptory a redukuje fágovou adrosbci (Obr. 9, a4). Bylo prokázáno že produkce fágu se zlepšuje, když bakterie produkuje méně proteinu A (Nordstrom & Forsgren, 1974). Bakterie se může bránit fágové adsorpci i tvorbou vrstvy EPS. Tento krok může fág ale obejít a zhydrolyzovat EPS produkcí polysacharidových hydroláz (Obr. 9, b) (Stirm & Rieger-Hug, 1981). Bakteriofágy získaly také schopnost specificky rozpoznávat polysacharidy, jako jsou O antigeny, či K antigeny (Obr. 9, c) (Steinbacher et al., 1997).



**Obr. 9:** Fág-resistentní mechanismy, upraveno dle (Labrie et al., 2010). Popis viz text.

## 6 Závěr

Cílem práce bylo shrnout dosavadní poznatky o bakteriofágové terapii a možnosti využití při léčbě infekcí, zvláště způsobených bakteriemi, rezistentními na ATB. Terapeutického potenciálu bakteriofágů si byli vědomi již jejich objevitelé před téměř sto lety a možnosti se stále rozvíjí s moderní dobou.

Fágový lyzát, podávaný ve formě fágových koktejlů, používali již d'Hérelle v roce 1919 k léčbě úplavice, či Bruynoghe a Maisin v roce 1921 k léčbě kožního stafylokokového onemocnění. V současnosti se používá při klinických studiích infekcí *Pseudomonas aeruginosa*. Může se dávkovat jako monofágový lyzát nebo polyfágový, ve formě fágového koktejlu. Zdá se, že polyfágová terapie je vhodnější, protože je menší pravděpodobnost vzniku fág-rezistentních kmenů bakterií. Pokud ale rezistentní mutant vznikne, bakteriofág je schopný se na něj adaptovat. Další možností terapie jsou enzybiotika, VAPGHs a endolysiny. VAPGHs asistují při vstupu fágové genetické informace do buňky, jejich uplatnění v terapii, ale zatím není jasné neboť jejich přesná funkce není objasněna. Endolysiny způsobují lýzi buňky a uvolnění nově sestavených virionů. Aby se dostali k peptidoglykanové vrstvě, využívají holinového systému. Holiny permeabilizují membránu a umožní endolysinům přístup k peptidoglykanu. Oproti fágovým lyzátům, vznik rezistentních mutantů na endolysiny nebyl doposud pozorován. V současnosti se vytváří geneticky modifikované endolysiny i bakteriofágy. Geneticky modifikované endolysiny jsou schopné zničit i gram-negativní bakterie a modifikované bakteriofágy lépe inhibují biofilm. Velmi slibné výsledky se dostávají při kombinaci antibiotik s fágovými produkty. Není zcela jasné, zda bakteriofágová terapie plně nahradí léčbu antibiotiky, ale z výsledků kombinace antibiotik a fágových produktů lze usoudit, že nejméně mohou být účinné doplňky při léčbě antibiotiky.

Autoři mnoha studií si pokládají otázku, zda je bakteriofágová terapie bezpečná. Od narození přichází lidé do kontaktu s bakteriofágy, avšak nelze usuzovat, že nejsou nebezpečné. Nelze ani předpokládat, že v terapii se budou bakteriofágy chovat stejně, jako v jejich přirozeném prostředí. Na základě těchto obav stále není bakteriofágová terapie dostupnou a schválenou klinickou metodou. Aby se mohla bakteriofágová terapie zavést v budoucnosti jako konvenční metoda, bude potřeba získat ještě mnoho znalostí o chování fágových produktů vůči bakteriím i vůči imunitnímu systému hostitele infekce.



K získání těchto znalostí bude zapotřebí mnoho experimentálních studií *in vitro* a hlavně *in vivo*.

Avšak na základě studií popsaných v této práci, má bakteriofágová terapie skutečný potenciál léčit infekce způsobené multirezistentními kmeny bakterií samostatně, či ve spolupráci s antibiotiky. Využití bakteriofágů, či jejich enzymů má budoucnost i v oblastech týkající se zemědělství, bezpečnosti potravin i vody.

## 7 Seznam použité literatury:

- \*Abedon, S.T., 2011. Lysis from without. *Bacteriophage*, 1, pp.46–49.
- Appelmek, B.J. et al., 1994. Lactoferrin Is Lipid A-Binding Protein. *Infection and immunity*, 62, pp.2628–2632.
- Arisaka, F. et al., 2003. The tail lysozyme complex of bacteriophage T4. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35, pp.16–21.
- Barbosa, C., Venail, P. & Holguin, A. V., 2013. Co-Evolutionary Dynamics of the Bacteria Implications for Phage Therapy Co-Evolutionary Dynamics of the Bacteria *Vibrio* sp. CV1 and Phages V1G , V1P1 and V1P2: Implications for Phage Therapy. *Microbial Ecology*, 66, pp.897–905.
- Caldentey, J. & Bamford, D.H., 1992. The lytic enzyme of the *Pseudomonas* phage b6 . Purification and biochemical characterization. *Biochemica et Biophysica Acta*, 1159, pp.44–50.
- Capparelli, R. et al., 2010. Bacteriophage Therapy of *Salmonella enterica*: A Fresh Appraisal of Bacteriophage Therapy. *The Journal of Infectious Disease*, 201, pp.52–61.
- Ceysens, P. et al., 2010. Molecular and physiological analysis of three *Pseudomonas aeruginosa* phages belonging to the “ N4-like viruses .” *Virology*, 405, pp.26–30.
- Curtin, J.J. & Donlan, R.M., 2006. Using Bacteriophages To Reduce Formation of Catheter-Associated Biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, pp.1268–1275.
- d’Herelle, F., 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *CR Acad. Sci. Paris*, 165, pp.373–375.
- Davis, C., Silveira, N.F.A. & Fleet, G.H., 1985. Occurrence and Properties of Bacteriophages of *Leuconostoc* in Australian Wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 50, pp.872–876.
- Dean, B.A. et al., 1973. Phage typing of coagulase-negative staphylococci and micrococci. *The Journal of Hygiene (Cambridge)*, 71, pp.261–270.
- Debarbieux, L. et al., 2010. Bacteriophages Can Treat and Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections. *The Journal of Infectious Disease*, 201, pp.1096–1104.
- Delbrück, M., 1945. The burst size distribution in the growth of bacterial. *Journal of Bacteriology*, 50, p.131.
- Delbrück, M., 1940. The growth of bacteriophage and lysis of the host. *The Journal of General Physiology*, 23, pp.643–660.

- During, K. et al., 1999. The non-enzymatic microbicidal activity of lysozymes. *FEBS Letters*, 449, pp.93–100.
- Eshelman, C.M. et al., 2010. Unrestricted migration favours virulent pathogens in experimental metapopulations: evolutionary genetics of a rapacious life history. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 365, pp.2503–2513.
- Fischetti, V.A. et al., 2004. Identification of a Broadly Active Phage Lytic Enzyme with Lethal Activity against Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Journal of bacteriology*, 186, pp.4808–4812.
- Fischetti, V.A., Loeffler, J.M. & Djurkovic, S., 2003. Phage Lytic Enzyme Cpl-1 as a Novel Antimicrobial for Pneumococcal Bacteremia. *Infection and immunity*, 71, pp.6199–6204.
- Fischetti, V.A., Nelson, D. & Loomis, L., 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 Science of the United States of America*, 98, pp.4107–4112.
- Flaherty, S.O., Ross, R.P. & Coffey, A., 2009. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria. *Federation of European Microbiological Societies*, 33, pp.801–819.
- Fleming, A., 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology*, 10, p.226.
- Flynn, G.O. et al., 2004. Evaluation of a Cocktail of Three Bacteriophages for Biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, pp.3417–3424.
- Freimer, E.H., Krause, R.M. & McCarty, M.D., 1959. Studies of L forms and protoplasts of group A Streptococci. *The Journal of Experimental Medicine*, 110, pp.853–874.
- Fu, W. et al., 2010. Bacteriophage Cocktail for the Prevention of Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* on Catheters in an In Vitro Model System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, pp.397–404.
- Garbe, J. et al., 2010. Characterization of JG024 a *pseudomonas aeruginosa* PB1-like broad host range phage under simulated infection conditions. *BMC Microbiology*, 10, pp.1–10.
- Gasiunas, G. & Sinkunas, T., 2014. Molecular mechanisms of CRISPR - mediated microbial immunity. *Cellular and Molecular Life Science*, 71, pp.449–465.
- Hagens, S., Habel, A. & Bläsi, U.D.O., 2006. Augmentation of the Antimicrobial Efficacy of Antibiotics by Filamentous Phage. *Microbial Drug Resistance*, 12, pp.164–168.

- Hall, A.R. et al., 2013. Bacteria-Phage Coevolution and the Emergence of Generalist Pathogens. *The American naturalist*, 177, pp.44–53.
- Hall, A.R. et al., 2012. Effects of Sequential and Simultaneous Applications of Bacteriophages on Populations of *Pseudomonas aeruginosa* In Vitro and in Wax Moth. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, pp.5646–5652.
- Hankin, E.H., 1896. L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Ann. Inst. Pasteur*, 10, p.511.
- Heo, Y. et al., 2009. Antibacterial Efficacy of Phages against *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Mice and *Drosophila melanogaster*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, pp.2469–2474.
- Hibma, A.M., Jassim, S.A.A. & Griffiths, M.W., 1997. Infection and removal of L-forms of *Listeria monocytogenes* with bred bacteriophage. *International Journal of Food Microbiology*, 34, pp.197–207.
- Hochberg, M.E. et al., 2014. A Window of Opportunity to Control the Bacterial Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* Combining Antibiotics and Phages. *PLOS ONE*, 9, pp.1–7.
- Hojckova, K., Stano, M. & Klucar, L., 2013. phiBIOTICS: catalogue of therapeutic enzybiotics , relevant research studies and practical applications. *BMC Microbiology*, 13, p.1.
- Holban, A.M., Cartelle, M. & Mihai, A., 2016. Control of biofilm-associated infections by signaling molecules and nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*.
- 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, pp.3653–63.
- 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, pp.1067–1079.
- Jansen, R. et al., 2002. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43, pp.1565–1575.
- Kirby, A.E. et al., 2011. The Population and Evolutionary Dynamics of *Vibrio cholerae* and Its Bacteriophage: Conditions for Maintaining Phage-Limited Communities. *The American Naturalist*, 178, pp.715–728.
- Knoll, B.M. & Mylonakis, E., 2013. Antibacterial Bioagents Based on Principles of Bacteriophage Biology: An Overview. *Clinical Infectious Disease*, 58, pp.528–534.
- Koch, A.L., 1996. The Permeability of the Wall Fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 178, pp.768–773.

- Labrie, S.J., Samson, J.E. & Moineau, S., 2010. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nature Publishing Group*, 8, pp.317–327.
- Lai, M. et al., 2011. Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii* phage  $\phi$  AB2 endolysin ( LysAB2 ) against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Antibacterial activity of *Acinetobacter baumannii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, pp.529–539.
- Lim, J.-A. et al., 2014. Exogenous Lytic Activity of SPN9CC Endolysin Against Gram-Negative Bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, pp.803–811.
- Loessner, M.J., Kramer, K., et al., 2002. C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Molecular Microbiology*, 44, pp.335–349.
- Loessner, M.J. et al., 1997. Three *Bacillus cereus* Bacteriophage Endolysins Are Unrelated but Reveal High Homology to Cell Wall Hydrolases from Different Bacilli. *Journal of Bacteriology*, 179, pp.2845–2851.
- Loessner, M.J., Zimmer, M. & Scherer, S., 2002. The Murein Hydrolase of the Bacteriophage  $\phi$ 3626 Dual Lysis System Is Active against All Tested *Clostridium perfringens* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, pp.5311–5317.
- Lu, T.K. & Collins, J.J., 2007. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *PNAS*, 104, pp.11197–11202.
- Lukacik, P. et al., 2013. Specific targeting and killing of Gram-negative pathogens with an engineered phage lytic enzyme. *Virulence*, 4, pp.90–96.
- Lukacik, P. et al., 2012. Structural engineering of a phage lysin that targets Gram-negative pathogens. *PNAS*, 109, pp.9857–9862.
- MacGregor, D.R. & Elliker, P.R., 1958. A comparison of some properties of strains of *Pseudomonas aeruginosa* sensitive and resistant to quaternary ammonium compounds. *Canadian journal of microbiology*, 4, pp.499–503.
- Madera, C., Monjardí, C. & Sua, J.E., 2004. Milk Contamination and Resistance to Processing Conditions Determine the Fate of *Lactococcus lactis* Bacteriophages in Dairies. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, pp.7365–7371.
- May, T., Tsuruta, K. & Okabe, S., 2010. Exposure of conjugative plasmid carrying *Escherichia coli* biofilms to male-specific bacteriophages. *The ISME Journal*, 5, pp.771–775.
- Merril, C.R., Trigg, M.E. & Geier, M.R., 1973. Fate of Bacteriophage Lambda in non-immune germ-free mice. *Nature*, 246, pp.221–223.

- Mojica, F.J.M. et al., 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60, pp.174–182.
- Morita, M. et al., 2001. Functional analysis of antibacterial activity of *Bacillus amyloliquefaciens* phage endolysin against Gram-negative bacteria. *FEBS Letters*, 500, pp.56–59.
- Muniesa, M., Lucena, F. & Jofre, J., 1999. Study of the potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment. *Journal of Applied Microbiology*, 87, pp.402–409.
- Navarre, W.W. et al., 1999. Multiple Enzymatic Activities of the Murein Hydrolase from Staphylococcal Phage  $\phi$ 11. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, pp.15847–15856.
- Nordstrom, K. & Forsgren, A., 1974. Effect of Protein A on Adsorption of Bacteriophages to *Staphylococcus aureus*. *Journal of Virology*, 14, pp.198–202.
- Oliveira, H. et al., 2014. A Thermostable Salmonella Phage Endolysin, Lys68, with Broad Bactericidal Properties against Gram-Negative Pathogens in Presence of Weak Acids. *PLOS ONE*, 9, pp.1–11.
- Oliveira, H. et al., 2013. Molecular Aspects and Comparative Genomics of Bacteriophage. *Journal of Virology*, 87, pp.4558–4570.
- Olson, M.R., Axler, R.P. & Hicks, R.E., 2004. Effects of freezing and storage temperature on MS2 viability. *Journal of Virological Methods*, 122, pp.147–152.
- Page, S.W. & Gautier, P., 2012. Use of antimicrobial agents in livestock. *Revue Scientifique et Technique de l'office International des epizooties*, 31, pp.145–188.
- Payne, R.J.H. & Jansen, V.A.A., 2001. Understanding Bacteriophage Therapy as a Density-dependent Kinetic Process. *Journal of Theoretical Biology*, 208, pp.37–48.
- Poullain, V. et al., 2007. The evolution of specificity in evolving and coevolving antagonistic interactions between a bacteria and its phage. *Evolution*, 62, pp.1–11.
- Ralston, D.J. et al., 1955. Virolysin: a virus-induced lysin from staphylococcal phage lysates. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 89, pp.502–507.
- Ramos, J.M., Juan, R.S. & Lumbreras, C., 2005. Risk of superinfection related to antibiotic use. Are all antibiotics the same? *Revista Española de Quimioterapia*, 18, pp.39–44.
- Rao, K.K. & Patel, I.R., 1983. Studies on the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bacteriophage receptors. *Archives of Microbiology*, 135, pp.155–157.

- Rodríguez, L. et al., 2011. Lytic activity of the virion-associated peptidoglycan hydrolase HydH5 of *Staphylococcus aureus* bacteriophage vB\_SauS-phiIPLA88. *BMC Microbiology*, 11, pp.1–11.
- Rodríguez-Rubio, L. et al., 2013. Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzybiotics. *Critical Reviews in Microbiology*, 39, pp.427–434.
- Rodríguez-rubio, L. et al., 2013. The Peptidoglycan Hydrolase of *Staphylococcus aureus* Bacteriophage  $\phi$ 11 Plays a Structural Role in the Viral Particle. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, pp.6187–6190.
- Rydman, P.S. & Bamford, D.H., 2000. Bacteriophage PRD1 DNA entry uses a viral membrane-associated transglycosylase activity. *Molecular Microbiology*, 37, pp.356–363.
- Sharp, D.G. et al., 1946. Sedimentation characters and pH stability of the T2 bacteriophage of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 165, pp.259–270.
- Schuch, R. et al., 2014. Combination Therapy With Lysin CF-301 and Antibiotic Is Superior to Antibiotic Alone for Treating Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* – Induced Murine Bacteremia. *The Journal of Infectious Disease*, 209, pp.1469–1478.
- Soothill, J., Hawkins, C. & Harper, D., 2013. Bacteriophage-containing therapeutic agents. *U.S. Patent No. 8,388,946*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Steinbacher, S. et al., 1997. Interaction of *Salmonella* phage 22 with its O-antigen receptor studied by X-Ray crystallography. *The Journal of Biological Chemistry*, 378, pp.337–343.
- Stirm, S. & Rieger-Hug, D., 1981. Comparative Study of Host Capsule Depolymerases Associated with *Klebsiella* Bacteriophages. *Virology*, 378, pp.363–378.
- Stockdale, S.R. et al., 2013. The Lactococcal Phages Tuc2009 and TP901-1 Incorporate Two Alternate Forms of Their Tail Fiber into Their Virions for Infection Specialization. *The Journal of Biological Chemistry*, 288, pp.5581–5590.
- Sulakvelidze, A. & Alavidze, Z., 2001. Minireview: Bacteriophage Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, pp.649–659.
- Thiel, K., 2004. Old dogma , new tricks - 21st Century phage therapy. *Nature Biotechnology*, 22, pp.31–36.
- Veesenmeyer, J.L., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and Therapy: Evolving Translational Strategies. *Critical Care Medicine*, 37, pp.1777–1786.
- Vollmer, W., Pils, H. & Hantke, K., 1997. Pesticin Displays Muramidase Activity. *Journal of Bacteriology*, 179, pp.1580–1583.

- Wright, A. et al., 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*, 34, pp.349–357.
- Wu, H. et al., 2012. EnzyBase: a novel database for enzybiotic studies. *BMC Microbiology*, 12, p.54.
- Wu, H. et al., 2014. GMEnzy: A Genetically Modified Enzybiotic Database. *PLOS ONE*, 9, pp.1–7.



## 8 Přílohy

**Příloha 1:** Světové společnosti, zabývající se bakteriofágy a jejich enzymy, upraveno dle (Thiel, 2004).

Společnost (Umístění)	Zaměření	Založení
<b>Biophage Pharma</b> (Montreal, Kanada)	Použití <i>E.coli</i> , <i>Salmonella typhumurium</i> u hospodářských zvířat	1995
<b>Enzybiotics / New Horizons Diagnostic</b> (Kolumbie, MD, USA)	Lytické enzymy jako diagnostické agens	2003
<b>Exponential Biotherapies</b> (Port Washington, NY, USA)	Klinické experimenty proti bakterii VRE (Vancomycin-resistant Enterococci) a MRSA, biochrana	1994
<b>GangaGen</b> (Bangalore, Indie, San Francisco, CA, USA, Ottawa, Canada)	Nelytické fágy, pro použití v medicíně, hospodářství a ekologii	2000
<b>Intralytix</b> USA, Baltimore	Využití fágů ve zpracování potravin, v lékařství a v životním prostředí	1998
<b>Hexal Gentech</b> (Německo, Holzkirschen)	Fágy jako prostředky pro doručení letálních plazmidů do bakterie	1998
<b>Intralytix</b> (Baltimore, MD, USA)	Fágy pro aplikaci v ekologii, ošetření potravin a v medicíně	1998
<b>MicroStealth Technologies</b> (USA, Cambridge)	Fágy jako prostředky pro doručení antimikrobiálních peptidů	2002
<b>Phage biotech</b> (Israel, Tel Aviv)	Technologie lytických bakteriofágů pro klinické, veterinární, zemědělské, průmyslové a ekologické aplikace	2001
<b>Phage Therapeutic</b> (Bothell, WA, USA)	Fágy v užití proti bakteriálním infekcím	1997
<b>PhaGen</b> (Las Vegas, NV, USA, dříve Regma Bio Technologies v Londýně)	Využití bakteriofágů v terapii a jako přenašeč proteinů	2000
<b>PhageTech</b> (Montreal, Canada)	Fágová genomika	1997
<b>Phage-Therapy</b> (Gruzie, Tbilisi)	Logistická podpora pro pacienty, hledající léčbu fágy v Gruzii	2000
<b>Phico Therapeutics</b> (Cambridge, UK)	Fágy jako transportéry letálních proteinů	2000

**Příloha 2:** Digitální fotografie zevního ucha pacienta A0012, upraveno dle (Wright et al., 2009): Digitální fotografie před (a) a po (b) léčbě pacienta A0012. Pacient trpěl dlouhodobě záněty zevního ucha.

