

JAKUB OCHMERAK, LESZEK POTOCKI, MAŁGORZATA KUSLIŚKIEWICZUniwersytet Rzeszowski, Kolegium Nauk Przyrodniczych, Instytut Biotechnologii, e-mail: mkus@ur.edu.pl**ANTIDOTUM NA BAKTERIE CHOROBOTWÓRCZE - NOWE
SPOJRZENIE NA BAKTERIOFAGI**

Rosnąca oporność bakterii na antybiotyki stanowi coraz większe wyzwanie dla systemu opieki zdrowotnej, szczególnie w kontekście zwiększającej się liczby pacjentów z osłabioną odpornością. Z tego powodu rozwój alternatywnych metod zapobiegania infekcjom stał się jednym z najwyższych priorytetów współczesnej medycyny i biotechnologii. Obecnie rozważa się terapie nieantybiotykowe w leczeniu infekcji bakteryjnych, a jedną z możliwych opcji jest terapeutyczne zastosowanie fagów, czyli wirusów atakujących bakterie. Terapia bakteriofagowa, odkryta w epoce przedantybiotykowej, zyskuje obecnie duże zainteresowanie ze względu na jej skuteczność i możliwość pozyskiwania fagów z wielu różnych środowisk, w których bytują. Ta specyfika sprawia, że terapia fagowa jest atrakcyjną alternatywą w leczeniu infekcji, szczególnie tych wywołanych przez bakterie wielolekooporne. W publikacji omówiono problem narastającej oporności bakterii na antybiotyki i potrzebę nowych metod ich zwalczania. Przedstawiono terapię fagową, w tym jej zalety jako obiecującą alternatywę dla antybiotyków. Omówiono również wyzwania związane z terapią fagową, m.in. dostępność, standaryzację, regulację i potrzebę dalszych badań klinicznych. W artykule podkreślono potencjał terapii fagowej w leczeniu zakażeń bakteryjnych i jej znaczenie dla przyszłości medycyny.

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, bakteriofagi, bakterie chorobotwórcze

I. WSTĘP

Bakterie chorobotwórcze odgrywają istotną rolę w rozprzestrzenianiu się chorób zakaźnych. W walce z nimi przełomem stało się odkrycie penicyliny w 1929 roku przez Aleksandra Fleminga, angielskiego lekarza i bakteriologa. Odkrycie to zapoczątkowało erę antybiotyków, które uratowały miliony istnień ludzkich [Gaynes 2017]. Po odkryciu penicyliny nastąpił wzrost badań mających na celu poszukiwanie i identyfikację nowych antybiotyków. Ten przełom w medycynie znacząco poprawił jakość zdrowia i życia ludzi. Niestety, stosowanie antybiotyków w leczeniu różnych schorzeń doprowadziło do powstania szczepów opornych na najczęściej stosowane środki przeciwdrobnoustrojowe (ang. *antimicrobial resistance*, AMR). Szczególnie niebezpieczne są bakterie wykazujące oporność na więcej niż jedną klasę antybiotyków tzw. *Multi Drug Resistance Bacteria* (MDR). W odpowiedzi na to wyzwanie od wielu lat prowadzone są badania mające na celu modyfikację obecnych antybiotyków, wynalezienie nowych lub

znalezienie alternatywnych środków bakteriobójczych, które można by stosować zamiast lub w połączeniu z antybiotykami.

Celem niniejszego artykułu jest przedstawienie fagoterapii jako obiecującej alternatywy dla antybiotyków w leczeniu zakażeń bakteryjnych, ze szczególnym uwzględnieniem jej zalet w kontekście narastającej oporności na leki.

II. METODA PRACY

Dokonano tematycznego przeglądu literatury wykorzystując następujące bazy danych: PubMed, Scopus i Web of Science. Słowa kluczowe i frazy wyszukiwania obejmowały "antybiotykooporność" (antimicrobial resistance (AMR), "Pseudomonas aeruginosa", "alternatywne środki przeciwbakteryjne" (alternative antimicrobial agents), "peptydy przeciwdrobnoustrojowe" (antimicrobial peptides (AMPs)), "bakteriocyny" (bacteriocins), "fagi bakteryjne" (bacteriophages), "nanocząstki metali" (metal nanoparticles) i "rośliny lecznicze" (medicinal plants). Do przeglądu włączono jedynie publikacje naukowe w języku angielskim, opublikowane w latach 2010-2023. Wykluczono publikacje o charakterze pogładowym, doniesienia z konferencji czy też same abstrakty artykułów.

Wybór źródeł bibliograficznych oparto na następujących kryteriach: autorytet autorów tj. doświadczenie i reputacja autorów w dziedzinie mikrobiologii; metodologia badań, jakość uzyskanych danych, spójność z istniejącą wiedzą naukową. W dalszej analizie wybrano jedynie te publikacje, które spełniały wszystkie wyżej wymienione kryteria.

Przegląd literatury opiera się na źródłach dostępnych w momencie jego ukończenia.

III. WYNIKI

Problem antybiotykooporności

Narastająca oporność na antybiotyki wśród mikroorganizmów stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Szacuje się, że w 2050 roku zakażenia odporne na antybiotyki będą przyczyną śmierci 10 milionów ludzi rocznie, Problem ten jest szczególnie dotkliwy w krajach rozwijających się, gdzie dostęp do antybiotyków i opieki medycznej jest ograniczony, co dodatkowo zwiększa ryzyko powstawania i rozprzestrzeniania się opornych szczepów bakterii [Tang i in. 2023].

Jednymi z najbardziej problematycznych patogenów wśród bakterii Gram-dodatnich są *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, czy rodzaj *Enterococcus* [Lister i in. 2009]. Z kolei, gatunki bakterii z grupy Gram-ujemnych wykazują większą oporność na obecnie stosowane antybiotyki i są trudniejsze w zwalczaniu, głównie ze względu na ich złożoną strukturę ściany komórkowej, w której składzie występuje błona zewnętrzna bogata w lipopolisacharyd (LPS). Ta dodatkowa bariera utrudnia przenikanie antybiotyków do wnętrza komórki bakteryjnej. Do tej grupy bakterii zaliczamy *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* oraz *Pseudomonas aeruginosa* [Lister i in. 2009]. *P. aeruginosa* jest jedną z najczęściej występujących bakterii Gram-ujemnych wykazujących oporność wielolekową, MDR, co w połączeniu ze zdolnością do tworzenia biofilmów i licznymi czynnikami zjadliwości, czyni zakażenia tym gatunkiem poważnym problemem terapeutycznym [Mielko i in. 2019]. Jest ona czwartym najczęściej izolowanym drobnoustrojem szpitalnym wśród bakterii Gram-ujemnych, drugą najczęstszą przyczyną zapalenia płuc, a także trzecią najczęstszą przyczyną bakteryjnych zakażeń krwi u osób osłabionych lub w stanie krytycznym. U chorych na mukowiscydozę jest dominującym patogenem, powodującym m.in. zakażenia układu oddechowego. Zakażenia tą bakterią wiążą się z wysoką zachorowalnością i śmiertelnością wśród pacjentów [Breijyeh i in. 2020].

Ze względu na swój oportunistyczny charakter, *P. aeruginosa* stwarza zagrożenie dla pacjentów z obniżoną odpornością oraz ciężko chorych pacjentów oddziału intensywnej terapii. Dane z Systemu Nadzoru nad Zakażeniami Szpitalnymi (*National Nosocomial Infections Surveillance System*, NNIS, USA) wykazały, że w latach 1992–1997 *P. aeruginosa* była odpowiedzialna za 21% zapaleń płuc, 10% zakażeń dróg moczowych, 3% zakażeń krwi i 13% chorób oczu, uszu, nosa, zakażenia gardła na oddziałach intensywnej terapii w Stanach Zjednoczonych. Gatunek ten wykazuje również wysoką zdolność do rozwijania oporności na wiele klas antybiotyków, co utrudnia, a nawet uniemożliwia leczenie zakażeń. Dzieje się tak, ponieważ bakterie te mogą przejmować geny oporności znajdujące się na ruchomych elementach genetycznych lub w wyniku mutacji w obrębie własnego DNA, zmieniając ekspresję i/lub funkcję enzymów, białek lub całych szlaków [Lister i in. 2009].

Patogen ten jest kosmopolityczny i występuje w różnych środowiskach, w tym w wodach (rzeki, jeziora, baseny), glebie; na powierzchniach roślin (w tym owoców) i zwierząt, a także w ludzkim organizmie (w układzie pokarmowym, na skórze, w drogach oddechowych). Wykazuje zdolność do przeżywania w niekorzystnych warunkach, takich jak wysokie i niskie temperatury, susza, promieniowanie UV, działanie środków dezynfekujących [Lister i in. 2009, Mielko i in. 2019]. Te właściwości w połączeniu z licznymi czynnikami zjadliwości [Jurado-Martín i in. 2021] oraz dużą zdolnością do adaptacji i nabywania mechanizmów oporności na antybiotyki, czynią *P. aeruginosa* poważnym wyzwaniem terapeutycznym w zakażeniach szpitalnych i poza nim [Lister i in. 2009]. W związku z powyższym gatunek ten jest jednym z ważniejszych kandydatów do poszukiwania nowych, innych niż antybiotyki, środków terapeutycznych do jego zwalczania.

Patogeny alarmowe to szczepy bakteryjne o szczególnej wadze dla zdrowia publicznego, ze względu na ich wysoką odporność na powszechnie stosowane antybiotyki i chemioterapeutyki, zdolność do wywoływania poważnych zakażeń, w tym zakażeń inwazyjnych oraz potencjalne szerzenie się w środowisku szpitalnym i pozaszpitalnym. Wśród patogenów alarmowych wymienia się m.in.: gronkowce odporne na metycylinę (MRSA), gronkowce odporne na wankomycynę (VRSA), wankomycyno-oporne enterokoki (VRE), bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* produkujące β -laktamazy o rozszerzonym spektrum działania (ESBL), bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, a także *Pseudomonas aeruginosa* odporne na karbapenemy (KPC), czy też gatunki odporne na wiele antybiotyków, w tym karbapenemy i meropenem, z powodu obecności enzymów metalobetalaktamaz (MBL) tj. MBL-dodatnie pałeczki Gram-ujemne, *Clostridioides difficile*, a także patogeny izolowane z krwi lub płynu mózgowo-rdzeniowego [Tenderenda i in. 2023]. W obliczu narastającego globalnego zagrożenia ze strony oporności na antybiotyki, która stanowi poważne wyzwanie dla zdrowia publicznego, Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) w 2024 roku opublikowała listę priorytetowych bakterii opornych na antybiotyki (tabela 1). Celem tej listy jest ukierunkowanie badań i rozwoju nowych aktywnych leków na patogeny, które stanowią największe zagrożenie dla zdrowia ludzkiego. Lista została opracowana na podstawie kryteriów, takich jak śmiertelność pacjentów, obciążenia opieką zdrowotną i tendencja do wykazywania oporności [Reig i in. 2022].

Istnieje wiele czynników decydujących o zjadliwości szczepów bakteryjnych. Są to między innymi zdolność do tworzenia biofilmu o wysokiej odporności na leki i mechanizmy obronne gospodarza. Wykazano, że oporność komórek w biofilmie na antybiotyki jest nawet do 1000 razy większa, w porównaniu do pojedynczych komórek bakteryjnych. Obecność lipopolisacharydu (LPS) w bakteriach, białek błony zewnętrznej oraz zdolność do poruszania się, również stanowią czynniki wirulencji. Ponadto, liczne enzymy proteolityczne czy metabolity wtórne prowadzą do powstawania reaktywnych form tlenu, co działa niszcząco na organizm człowieka. Istotnym czynnikiem zjadliwości jest również komunikacja komórka-komórka (ang. *Quorum sensing* (QS)),

która umożliwi im adaptację do zmieniających się warunków środowiska [Baj i in. 2015, Chegini i in. 2020, Hall i in. 2016, Jurado-Martín i in. 2021].

Tabela 1 - Table 1

Lista WHO patogenów lekoopornych będących głównym obiektem badań na świecie / *WHO priority list of drug-resistant pathogens*

BAKTERIA <i>BACTERIA</i>	ZAGROŻENIE <i>THREATS</i>	ODPORNOŚĆ NA ANTYBIOTYKI <i>ANTIBIOTIC RESISTANCE</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Krytyczne/ <i>Critical</i>	Karbapenemo-oporne/ <i>Carbapenem-resistant</i>
<i>Enterobacterales</i>	Krytyczne/ <i>Critical</i>	oporne na cefalosporyny trzeciej generacji/ <i>third-generation cephalosporin-resistant</i>
<i>Enterobacterales</i>	Krytyczne/ <i>Critical</i>	Karbapenemo-oporne/ <i>Carbapenem-resistant</i>
<i>Salmonella typhi</i> .	Wysokie/ <i>High</i>	Fluorochinolono-oporne/ <i>Fluoroquinolone-resistant</i>
<i>Shigella spp.</i>	Wysokie/ <i>High</i>	Fluorochinolono-oporne/ <i>Fluoroquinolone-resistant</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	Wysokie/ <i>High</i>	Wankomycyno-oporne/ <i>Vancomycin-resistant</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Wysokie/ <i>High</i>	Karbapenemo-oporne / <i>Carbapenem-resistant</i>
<i>Non-typhoidal Salmonella</i>	Wysokie/ <i>High</i>	Fluorochinolono-oporne/ <i>Fluoroquinolone-resistant</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Wysokie/ <i>High</i>	oporne na cefalosporyny trzeciej generacji i/lub na fluorochinolony/ <i>third-generation cephalosporin, and/or fluoroquinolone-resistant</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Wysokie/ <i>High</i>	Metacyclino-oporne/ <i>Methicillin- and vancomycin-resistant</i>
<i>Group A Streptococci</i>	Średnie/ <i>Medium</i>	Makrolido- oporne/ <i>Macrolide-resistant</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Średnie/ <i>Medium</i>	Makrolido-oporne/ <i>Macrolide-resistant</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	Średnie/ <i>Medium</i>	Ampicylino-oporne/ <i>Ampicillin-resistant</i>
<i>Group B Streptococci</i>	Średnie/ <i>Medium</i>	Penicylino- oporne / <i>Penicillin-resistant</i>

Źródło / *Source* WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024.

Alternatywne środki przeciwbakteryjne

W 2022 roku przeprowadzono kompleksową ocenę globalnego wpływu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe na zdrowie pacjentów. Oszacowano, że w 2019 r. 4,95 mln zgonów związanych było z AMR, z czego większość spowodowana była przez sześć gatunków bakterii, wcześniej zidentyfikowanych przez WHO jako stanowiących duże zagrożenie [Strathdee i in. 2023]. Pomimo, że w raporcie tym skalę tego problemu porównuje się do liczby przypadków śmiertelności i zachorowalności dla malarii czy wirusa HIV, częstość występowania AMR podczas pandemii COVID-19 znacząco wzrosła. Szacuje się, że do roku 2050 co najmniej 10 milionów ludzi umrze z powodu oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe [O'Neill 2014]. Stąd, ze względu na stale rosnącą liczbę szczepów bakteryjnych opornych na antybiotyki, poszukuje się nowych i alternatywnych środków przeciwbakteryjnych. Oprócz opracowywania nowych antybiotyków, coraz więcej uwagi poświęca się badaniu związków, które można by zastosować w leczeniu w połączeniu z antybiotykami lub w ich zastępstwie.

Wśród środków obecnie badanych wymienia się przykładowo: adiuwanty antybiotykowe, bakteriofagi, DCAP, inhibitory systemów QS czy czynniki przeciwbakteryjne oparte na metalach

[Breijyeh i in. 2020]. Adiuwanty antybiotykowe to związki, które same w sobie nie wykazują aktywności antybiotykowej lub ta jest u nich słaba. Są one stosowane w terapiach skojarzonych z konwencjonalnymi antybiotykami w celu zwiększenia skuteczności lub zablokowania mechanizmów oporności antybiotykowej. Zastosowanie adiuwantów antybiotykowych pozwoliło na ponowne, skuteczne zastosowanie starych antybiotyków, co przyczynia się do oszczędności kosztów na poszukiwaniu nowych leków. Zaletą opracowywania adiuwantów jest fakt, że nie ma potrzeby znajdowania im istotnego celu, a znalezienie takiego, który po zahamowaniu, zwiększy aktywność stosowanego antybiotyku. Wyróżnia się trzy główne typy wspomagaczy antybiotykowych: inhibitory β -laktamaz, inhibitory pomp efluksowych oraz środki zwiększające przepuszczalność błony zewnętrznej bakterii [Breijyeh i in. 2020, Gill i in. 2015]. W odmienny sposób działa związek DCAP (2-((3-(3,6-dichloro-9H-karbazol-9-ilo)-2hydroksypropylo)amino)-2(hydroksymetylo)propan-1,2-diol), który wykazuje szerokie spektrum wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Jest to specyficzny związek, który zakłóca prawidłowe funkcjonowanie błony komórkowej bakterii, co prowadzi w konsekwencji do ich śmierci. Jego mechanizm działania polega na destabilizacji aktywności biologicznej błony komórkowej poprzez zmniejszenie potencjału transbłonowego i zwiększenie jej przepuszczalności, a także w zaburzeniu lokalizacji kluczowych dla podziału komórki bakteryjnej białek błonowych takich jak MinD i FtsA [Breijyeh i in. 2020, Eun i in. 2012]. Chociaż DCAP wykazuje obiecującą skuteczność przeciwdrobnoustrojową, jego ograniczenia, takie jak rozwój oporności wśród mikroorganizmów, toksyczność i wysokie koszty produkcji, ograniczają jego powszechne stosowanie. Z kolei modulacja i hamowanie QS poprzez odpowiednie inhibitory jest potencjalnym środkiem terapeutycznym, pozwalającym na kontrolowanie wielu czynników zjadliwości naraz, w tym tworzenie biofilmu [Qin i in. 2022]. W ostatnich latach sporym zainteresowaniem cieszą się badania nad środkami przeciwdrobnoustrojowymi na bazie metali. Związki metali wykazują unikatowe sposoby działania i dzięki swojej strukturze dają większą szansę powodzenia klinicznego w porównaniu do cząsteczek organicznych. Jednak należy mieć na uwadze, że istnieją doniesienia o nabieraniu oporności również na związki metali [Breijyeh i in. 2020].

Bakteriofagi jako środki przeciwbakteryjne

Bakteriofagi to wirusy atakujące wyłącznie komórki bakteryjne. Są one naturalnymi „drapieżnikami” bakterii, nie są zdolne do zakażenia komórek eukariotycznych. Fagi, podobnie jak i inne wirusy, są niezdolne do samodzielnej replikacji. Do namnażania wymagają gospodarza, czyli komórek bakterii, w których mogą „rozmnażać się” wykorzystując białka gospodarza. Bakteriofagi zostały odkryte w 1917 roku przez mikrobiologa Feliza d’Herelle’a. Już od początku ich odkrycia, naukowcy zainteresowali się fagami, a one same były uważane za potencjalnie skuteczny środek przeciwbakteryjny. Idea ich wykorzystania do leczenia zakażeń bakteryjnych została jednak porzucona podczas II Wojny Światowej, kiedy to wprowadzono antybiotyki [Breijyeh i in. 2020]. Dodatkowym problemem były ograniczenia ówczesnej technologii, które uniemożliwiły odpowiednie badania nad fagoterapią [Chegini i in. 2020, Strathdee i in. 2023]. Fagi zakłócają procesy życiowe w zakażonej komórce bakteryjnej. Charakteryzują się często także wysoką specyficznością wobec gospodarza – specyficzność gatunkowa, a niekiedy nawet szczepową. Cecha ta może być rozpatrywana zarówno jako zaleta, jak i wada. Z jednej strony pozwala ona uniknąć dysbakteriozy i infekcji wtórnych, z drugiej strony bakterie mogą na drodze ewolucji nabyć nowe systemy obrony lub zmienić strukturę receptorów rozpoznawanych przez fagi. Aby temu przeciwdziałać w fagoterapii raczej nie stosuje się pojedynczych fagów, a zamiast tego mieszaniny (koktajle) bakteriofagowe. Koktajle fagowe skuteczniej zwalczają bakterie, łatwiej też przenikają i niszczą strukturę biofilmu. Bakteriofagi ulegają także samoamplifikacji

w obecności bakterii, co wzmacnia ich działanie lokalne. Ponadto fagi pod koniec cyklu litycznego wytwarzają enzymy zwane endolizynami, które rozkładając peptydoglikan od wewnątrz pomagając w uwalnianiu nowych wirionów potomnych. Dodatkowo enzymy te działają niezależnie od oporności bakterii na antybiotyki. Zaletą fagoterapii jest dostępność bakteriofagów. Są one obecne w dużych ilościach wszędzie tam, gdzie występują ich gospodarze, co oznacza, że fagi można pozyskać bardzo łatwo ze środowiska naturalnego czy szpitalnego, w zależności od bakterii jaką chcemy zwalczyć. Redukuje to czas i koszty pozyskania środków przeciwbakteryjnych. Z próbek trzeba jedynie wyizolować czyste kultury bakteriofagów, np.: za pomocą odpowiednich filtrów, po czym takimi fagami zaraża się bakterie, w celu namnożenia wirusa [Breijyeh i in. 2020, Chegini i in. 2020].

Terapeutyczne wykorzystanie bakteriofagów

Po tym, jak w 1919 r. d'Herelle z powodzeniem zastosował preparaty fagowe w leczeniu dzieci cierpiących na czerwonkę bakteryjną, terapię fagową zaczęto szeroko stosować w leczeniu infekcji bakteryjnych u ludzi i zwierząt. W latach trzydziestych XX wieku metoda ta była szeroko stosowana w Europie i Azji w leczeniu różnych zakażeń bakteryjnych u ludzi i zwierząt, na długo przed wprowadzeniem na rynek penicyliny. Pierwszy program terapii fagowej został uruchomiony na terenie dzisiejszego Tbilisi w Gruzji, a kolejny we Wrocławiu w Polsce. Oba programy początkowo odnosiły duże sukcesy w leczeniu różnych zakażeń bakteryjnych, m.in. czerwonki, duru brzuszego i zapalenia płuc [Abedon i in. 2017, Lin i in. 2017, Summers 2012]. Jednak po tym, jak II wojna światowa wprowadziła na rynek penicylinę uznano, że szerokie spektrum działania antybiotyków przeciwko infekcjom bakteryjnym ma przewagę nad fagami. Co więcej, antagonizm między Stanami Zjednoczonymi a Związkiem Radzieckim w okresie powojennym podsycał zarówno nieufność do nauki pochodzącej z byłego bloku sowieckiego, jak i wszechobecne podejrzenia co do terapeutycznego zastosowania fagów w nadchodzących dziesięcioleciach [Strathdee i in. 2023].

Naturalnie występujące (lub tzw. „środowiskowe”) fagi można znaleźć praktycznie w każdej niszy na planecie, w której występują bakterie, w tym w oceanach, jeziorach, glebie, roślinach i zwierzętach [Clokie i in. 2011]. Zatem izolację fagów środowiskowych można prowadzić w miejscach, w których występuje mnóstwo bakterii danego gatunku, np. w oczyszczalniach ścieków i odpadach komunalnych typu szpitalne. Aczkolwiek, istnieje wiele naturalnie występujących fagów, których nie udaje się wyizolować, ponieważ gospodarz jest niezidentyfikowany lub nie można go łatwo wyhodować w laboratorium. Fagi do zastosowań klinicznych wymagają obszernej charakterystyki, w tym sekwencjonowanie genomu pod kątem specjacji fagów oraz poszukiwanie elementów genetycznych kodujących oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe, genów kodujących toksyny lub elementów genetycznych sugerujących zdolność do lizogenezy [Philipson i in. 2018]. Przed zastosowaniem klinicznym fagi należy namnażać w odpowiednim, dobrze scharakteryzowanym gospodarzu i oczyścić w celu usunięcia/zmniejszenia poziomu endotoksyn lub innych potencjalnie szkodliwych materiałów. Fagi stosowane klinicznie, w okolicznościach innych niż awaryjne, należy przygotować zgodnie z warunkami dobrej praktyki klinicznej (ang. *good clinical practice*, GCP) lub warunkami zbliżonymi do tego poziomu rygorystyczności. Pomimo, że liczba stosowanych skutecznych terapii fagowych rośnie, proces identyfikacji fagów litycznych pozostaje ograniczony. A tylko dobrze scharakteryzowane banki fagów mogą służyć jako biblioteki, z których w konsekwencji można pozyskać fagi terapeutyczne do zastosowań klinicznych.

Fagoterapia wykorzystuje specyficzne cechy bakteriofagów, takie jak m.in.: ich specyficzność wobec selektywnego i bezpiecznego zwalczania bakterii charakteryzujących się niewrażliwością na obecnie dostępne antybiotyki. Bakteriofagi są również wykorzystywane w terapiach skojarzonych wraz z antybiotykami, co dodatkowo zwiększa skuteczność terapii [Breijyeh i in. 2020]. Istnieją pewne przeszkody w prowadzeniu fagoterapii z wykorzystaniem fagów naturalnych. Fagi infekujące bakterie nie zabijają ich wystarczająco skutecznie. Ponadto, fagi mogą kodować białka toksyczne dla człowieka. Z tego powodu w ostatnich czasach wzrasta zainteresowanie konstruowaniem nowych bakteriofagów bezpieczniejszych, o lepszych właściwościach terapeutycznych i większym zakresie gospodarzy [Strathdee i in. 2023].

Pomimo, że w ciągu ostatnich 10 lat zainteresowanie wykorzystaniem bakteriofagów do leczenia chorób bakteryjnych szczególnie wzrosło, ciągle niewiele jest doniesień dotyczących badań klinicznych. Internetowa baza danych PubMed, podaje, że w ciągu ostatnich 10 lat opublikowano 3 206 manuskryptów dotyczące bakteriofagów (słowo kluczowe „bakteriofagi” wskazane w tytule publikacji, dzień wyszukiwania 5 lipca 2024). Natomiast zarejestrowane próby kliniczne na stronie ClinicalTrials.gov dotyczą 55 przypadków (z ostatnich 10 lat). Większość z nich ma na celu wykorzystanie bakteriobójczego działania fagów litycznych, jednak część koncentruje się na zdolności fagów do niszczenia biofilmów, które utrudniają sterylizację zakażonych wszczepionych urządzeń biomedycznych. Pomimo faktu, że zakres wiedzy o optymalnym wykorzystaniu fagów jako środków terapeutycznych jest znaczny, wciąż należy być ostrożnym w dalszym rozwoju terapii fagowych. Ważnym aspektem jest zdefiniowanie farmakokinetyki i farmakodynamiki fagów, aby potwierdzić ich aktywność [Strathdee i in. 2023].

Aby przeciwdziałać globalnemu zagrożeniu jakim jest oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe, WHO i Grupa Robocza ONZ przygotowały raport, w którym proponuje się i podejmuje działania dotyczące koncepcji „Jednego zdrowia: interakcji między ludźmi, zwierzętami i środowiskiem” (*No time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections*, 2019). Pomimo, że ustalenia dotyczą stosowania antybiotyków, zostały one rozszerzone w kontekście stosowania również terapii fagowej.

Badania *in vitro* wskazują, że bakteriofagi mogą się okazać jedną z najbardziej obiecujących broni przeciwko oportunistycznym szczepom *P. aeruginosa*, oraz tych tworzących biofilmy. Dla przykładu, fag M-1 izolowany ze ścieków zmniejszył tempo wzrostu bakterii i samego biofilmu *P. aeruginosa*, już po 6 godzinach leczenia. Fag ten rozkładał enzymatycznie polimery alginianowe, a także pośrednio niszczył biofilmy poprzez zabijanie wolnych bakterii [Adnan i in. 2020]. Również w terapiach *in vivo* wykazano skuteczność terapii fagowych. Wyizolowane bakteriofagi, BΦ-R656 i -R1836, eliminowały szczepy bakterii *P. aeruginosa* (wywołujące ostre zapalenie płuc) w modelach myszy, a także były w stanie usuwać biofilmy. Również terapie skojarzone, wykorzystujące antybiotyki wraz z fagami, są skuteczne przeciwko bakteriom MDR [Breijyeh i in. 2020, Chegini i in. 2020].

IV. PODSUMOWANIE

Terapia fagowa, choć odkryta na początku XX wieku, przez wiele lat była marginalizowana na rzecz rozwijającej się antybiotykoterapii, z powodu łatwiejszej dostępności antybiotyków, ich wysokiej skuteczności, czy też niskich kosztów produkcji. Jednakże, narastający problem oporności bakterii na powszechnie stosowane w leczeniu antybiotyki skłania do ponownego rozważenia roli terapii fagowej w ich zwalczaniu. Okazuje się, że fagi mogą stanowić wartościową alternatywę lub uzupełnienie

konwencjonalnych metod leczenia w przypadku zakażeń wywołanych przez lekooporne szczepy bakterii. Ciekawe jest również to, że terapia fagowa nigdy nie została całkowicie porzucona w Gruzji, gdzie w Instytucie im. Georgiego Eliava od roku 1923 prowadzi się badania i terapie lecznicze z wykorzystaniem bakteriofagów. W Polsce, choć badania nad fagami były prowadzone od początku XX wieku, terapia fagowa nigdy nie została w pełni zinstytucjonalizowana. Z kolei w Rosji, po okresie intensywnych badań, zainteresowanie terapią fagową nieco osłabło, choć nadal istnieją ośrodki badawcze zajmujące się tą tematyką. W wymienionych powyżej krajach, terapia fagowa była i nadal jest integralną częścią systemu opieki zdrowotnej, jednak jej zastosowanie często zależy od indywidualnych decyzji lekarzy i dostępności odpowiednich preparatów fagowych.

Bakteriofagi, czyli wirusy atakujące bakterie, dzięki swojej specyficzności do określonych szczepów bakteryjnych i zdolności do samoreplikacji, są skutecznym narzędziem w walce z zakażeniami opornymi na antybiotyki... Dodatkowo, terapia fagowa oferuje kilka istotnych zalet: niskie ryzyko wystąpienia skutków ubocznych oraz minimalne ryzyko zaburzenia naturalnej flory bakteryjnej. To czyni ją atrakcyjną alternatywą lub uzupełnieniem konwencjonalnych metod leczenia zakażeń bakteryjnych.

Możliwości wykorzystania bakteriofagów w medycynie poszerzają się dzięki połączeniu tradycyjnych metod ich pozyskiwania z nowoczesnymi technikami inżynierii genetycznej, które umożliwiają tworzenie fagów o pożądanych biologicznych właściwościach. Nawet w przypadku braku danych dotyczących skuteczności w badaniach klinicznych, coraz większa liczba krajów (np. USA, Belgia, Francja, Szwecja, Australia, a ostatnio Wielka Brytania) wprowadziła specjalne procedury, które umożliwiają stosowanie terapii fagowej jako leczenia alternatywnego, gdyby zawiodła konwencjonalna antybiotykoterapia. Jedynymi przeszkodami na drodze zmierzającej do zwiększenia skali stosowania terapii fagowej są wyzwania logistyczne, jak i regulacyjne, ale są one do pokonania.

Informacja o finansowaniu badań: *Dofinansowano ze środków Ministra Nauki w ramach Programu „Regionalna inicjatywa doskonałości”. Umowa nr RID/SP/0010/2024/1.*

BIBLIOGRAFIA

1. Adnan M., Ali Shah M. R., Jamal M., Jalil F., Andleeb S., Nawaz M. A., Pervez S., Hussain T., Shah I., Imran M., Kamil A. 2020. Isolation and characterization of bacteriophage to control multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* planktonic cells and biofilm. *Biologicals*. 63. 89-96.
2. WHO Bacterial Priority Pathogens List. 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. ISBN 978-92-4-009346-1 (electronic version). ISBN 978-92-4-009347-8 (print version).
3. Baj J., Bartosik D., Dziewit Ł., Jagusztyn-Krynicka E.K., Markiewicz Z., Piekarowicz A., Włodarczyk M., Wolska K.I. 2015. *Biologia molekularna bakterii*. Wyd. 2. zm. Warszawa. Wydawnictwo Naukowe PWN.
4. Abedon ST., García P., Mullany P., Aminov R. 2017. Editorial: Phage Therapy: Past, Present and Future. *Front. Microbiol.* 8. 981. doi: 10.3389/fmicb.2017.0098.
5. Bello-López JM., Cabrero-Martínez OA., Ibáñez-Cervantes G., Hernández-Cortez C., Pelcastre-Rodríguez LI., Gonzalez-Avila LU., Castro-Escarpulli G. 2019. Horizontal Gene Transfer and Its Association with Antibiotic Resistance in the Genus *Aeromonas*

- spp. *Microorganisms*. 7(9).363. doi: 10.3390/microorganisms7090363. PMID: 31540466; PMCID: PMC6780555.
6. Breijyeh Z., Jubeh B., Karaman R. 2020. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*. 25(6).1340. doi: 10.3390/molecules25061340. PMID: 32187986; PMCID: PMC7144564.
 7. Chegini Z., Khoshbayan A., Taati Moghadam M., Farahani I., Jazireian P., Shariati A. 2020. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*.19(1). 45. doi: 10.1186/s12941-020-00389-5. PMID: 32998720; PMCID: PMC7528332.
 8. Clokie MR., Millard AD., Letarov AV., Heaphy S. 2011. Phages in nature. *Bacteriophage*.1(1). 31-45. doi: 10.4161/bact.1.1.14942. PMID: 21687533; PMCID: PMC3109452.
 9. Eun YJ., Foss MH., Kiekebusch D., Pauw DA., Westler WM., Thanbichler M., Weibel DB. 2012. DCAP: a broad-spectrum antibiotic that targets the cytoplasmic membrane of bacteria. *J Am Chem Soc*.134 (28). 11322-5. doi: 10.1021/ja302542j. Epub 2012 Jul 5. PMID: 22741745; PMCID: PMC3516701.
 10. Gaynes R. 2017. The Discovery of Penicillin-New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases* 23 (5). 849-53. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>.
 11. Gill EE., Franco OL., Hancock RE. 2015. Antibiotic adjuvants: diverse strategies for controlling drug-resistant pathogens. *Chem Biol Drug Des*. 85(1). 56-78. doi: 10.1111/cbdd.12478. PMID: 25393203; PMCID: PMC4279029.
 12. Hall S., McDermott C., Anoopkumar-Dukie S., McFarland AJ., Forbes A., Perkins AV., Davey AK., Chess-Williams R., Kiefel MJ., Arora D., Grant GD. 2016. Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins (Basel)*. 8(8). 236. doi: 10.3390/toxins8080236. PMID: 27517959; PMCID: PMC4999852.
 13. Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance. 2019. No time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections. <https://www.who.int/publications/i/item/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections>.
 14. Jurado-Martín I., Sainz-Mejías M., McClean S. 2021. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci*. 22(6). 3128. doi: 10.3390/ijms22063128. PMID: 33803907; PMCID: PMC8003266.
 15. Lin DM., Koskella B., Lin HC. 2017. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 8(3). 162-173. doi: 10.4292/wjgpt.v8.i3.162. PMID: 28828194; PMCID: PMC5547374.
 16. Lister PD., Wolter DJ., Hanson ND. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 22(4). 582-610. doi: 10.1128/CMR.00040-09. PMID: 19822890; PMCID: PMC2772362.
 17. Mielko KA., Jabłoński SJ., Milczewska J., Sands D., Łukaszewicz M., Młynarz P. 2019. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol*. 35(11). 178. doi: 10.1007/s11274-019-2739-1. PMID: 31701321; PMCID: PMC6838043.
 18. O'Neill J., 2014. Review on Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations*. <https://amr-review.org/>.
 19. Pang Z., Raudonis R., Glick BR., Lin TJ., Cheng Z. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 37(1). 177-192. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013. Epub 2018 Nov 27. PMID: 30500353.

20. Philipson CW., Voegtly LJ., Lueder MR., Long KA., Rice GK., Frey KG., Biswas B., Cer RZ., Hamilton T., Bishop-Lilly KA. 2018. Characterizing Phage Genomes for Therapeutic Applications. *Viruses*.10(4). 188. doi: 10.3390/v10040188. PMID: 29642590; PMCID: PMC5923482.
21. Qin S., Xiao W., Zhou C., Pu Q., Deng X., Lan L., Liang H., Song X., Wu M. 2022. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther*. 7(1). 199. doi: 10.1038/s41392-022-01056-1. PMID: 35752612; PMCID: PMC9233671.
22. Reig S., Le Gouellec A., Bleves S. 2022. What Is New in the Anti-*Pseudomonas aeruginosa* Clinical Development Pipeline Since the 2017 WHO Alert? *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 12. 909731. doi: 10.3389/fcimb.2022.909731.
23. Strathdee SA., Hatfull GF., Mutalik VK., Schooley RT. 2023. Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. *Cell*. 186(1). 17-31. doi: 10.1016/j.cell.2022.11.017. PMID: 36608652; PMCID: PMC9827498.
24. Summers W.C. 2012. The Strange History of Phage Therapy. *Bacteriophage*. 2 (2). 130-33. <https://doi.org/10.4161/bact.20757>.
25. Tang KWK., Millar BC., Moore JE. 2023. Antimicrobial Resistance (AMR). *Br J Biomed Sci*. 80. 11387. doi: 10.3389/bjbs.2023.11387. PMID: 37448857; PMCID: PMC10336207.
26. Tenderenda A., Łysakowska ME., Gawron-Skarbek A. 2023. The Prevalence of Alert Pathogens and Microbial Resistance Mechanisms: A Three-Year Retrospective Study in a General Hospital in Poland. *Pathogens*. 12(12). 1401. doi: 10.3390/pathogens12121401. PMID: 38133286; PMCID: PMC10746124.

PHAGE THERAPY – AN ALTERNATIVE FOR ANTIBIOTICS-RESISTANCE BACTERIA INFECTIONS

Summary

The emergence of pathogenic bacteria resistant to many currently available antimicrobial agents has become a critical problem in modern medicine, particularly due to the concomitant increase in immunosuppressed patients. Non-antibiotic therapies to treat bacterial infections are now under serious consideration and one possible option is the therapeutic use of specific phage particles. Bacteriophage therapy, discovered in the pre-antibiotic era, is currently gaining great interest due to its effectiveness and the ability to obtain phages from many different environments in which they live. This specificity makes phage therapy an attractive alternative in the treatment of infections, especially those caused by multidrug-resistant bacteria. The publication examines the problem of growing bacterial resistance to antibiotics and the need for novel methods of combating them. Phage therapy is presented as a promising alternative to traditional antibiotics, and its benefits are highlighted. The article also examines the challenges associated with phage therapy, such as accessibility, standardisation, regulatory concerns and the need for additional clinical trials. It highlights the significant potential of phage therapy to combat bacterial infections and its central role in shaping the future of medicine.

Keywords: antibiotic resistance, bacteriophages, pathogenic bacteria