

Терапевтический потенциал бактериофагов и эндолизиннов при лечении острых респираторных инфекций, вызванных бактериальными патогенами

For cite: Zdorov'ye Rebenka. 2017;12:702-11. doi: 10.22141/2224-0551.12.6.2017.112840

Резюме. Бактериофаги представляют собой вирусы, которые за счет рецептор/лиганд-взаимодействий способны специфически связываться с бактериальной стенкой и реплицироваться внутри конкретных бактерий. Литические ферменты бактериофагов эффективно разрушают клеточную стенку бактерий, но в отличие от антибиотиков не влияют на жизнедеятельность симбиотической флоры. Сегодня уже собран достаточный исследовательский опыт эффективности антистрептококковых, антистафилококковых, антиклебсиеллезных, антисинегнойных бактериофагов и эндолизиннов, которые способны вызывать гибель антибиотикорезистентных бактерий, в связи с чем их использование в качестве бактерицидных лекарственных средств является потенциально эффективным терапевтическим методом противомикробной терапии. Высокий уровень эффективности бактерицидного действия эндолизиннов позволяет предположить, что будущие лекарственные средства, созданные на молекулярной основе эндолизиннов, могут стать ключевыми противомикробными препаратами при лечении инвазивных инфекций.

Ключевые слова: острые респираторные инфекции; дети; бактериофаги

Введение

Бактериофаги представляют собой вирусы, которые за счет рецептор/лиганд-взаимодействий способны специфически связываться с бактериальной стенкой и реплицироваться внутри конкретных бактерий. Бактериофаги являются наиболее распространенным биологическим объектом в биосфере, представительство которых составляет 10^{31} организмов, в то время как общее число прокариотических клеток в биосфере составляет около 10^{30} [7]. Бактериофаги находятся в любой среде, в которой присутствуют бактерии. В водных системах численность популяции бактериофагов составляет 10^4 – 10^8 вирионов на 1 мл, в почве — 10^9 вирионов на 1 грамм [52]. В настоящее время идентифицировано более 5500 различных бактериофагов [1].

Из идентифицированных фагов большинство принадлежит к хвостатым фагам, которые образуют таксономический порядок: Caudovirales. Данные бактериофаги имеют икосаэдрические головки, содержащие геномы, состоящие из двухцепочечной ДНК. Порядок Caudovirales состоит из трех фаговых семейств: Myoviridae — с жесткими сократительными хвостами, Podoviridae — с короткими, не сокращающимися хвостами и Siphoviridae — с длинными гибкими хвостами. Фаги, принадлежащие к другим семействам, имеют изменчивую морфологию с геномами различного состава нуклеиновых кислот [7]. Бактериофаги, вызывающие гибель бактерий, не индуцируют развитие резистентности бактерий к противомикробным препаратам, недорогие в производстве и безопасны для людей [8]. Бактериофа-

готерапия была успешно использована для лечения инфекционных кожных заболеваний до открытия антибиотиков [45].

Бактериофаги

В центре фаготерапии Института иммунологии и экспериментальной терапии им. Хиршфельда во Вроцлаве проводят экспериментальную терапию бактериофагами против ряда бактериальных заболеваний, в том числе вызванных *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Staphylococcus* и *Stenotrophomonas*. На основании данных, опубликованных сотрудниками данного центра, положительный результат бактериофаготерапии отмечается у 35–50 % пациентов [24].

В зависимости от вида высвобождения новых вирионов из бактерий бактериофаги делят на литические и лизогенные. Литические бактериофаги способны вызывать деструкцию стенки и у антибиотикорезистентных бактерий. Большинство литических бактериофагов используют две группы протеинов для киллинга инфицированных бактерий: холины и эндолизины. Холины участвуют в процессе активации лизиса клеток-хозяев: они перфорируют цитоплазматическую мембрану бактерии, предоставляют эндолизинам доступ к бактериальному пептидогликану (peptidoglycan — PG), а эндолизины непосредственно вызывают лизис бактерии [21].

Система «холин — лизин» отвечает за терминацию цикла заражения фагом в определенный момент времени. Влияние эндолизинов на клеточную стенку бактерий высоко синхронизировано через механизм, объясненный двухстартовой моделью. Согласно данной модели время бактериального лизиса зависит от соотношения содержания холина и его антагониста антихолина. Соотношение содержания холина и антихолина строго регулируется через контроль их экспрессии на трансляционном уровне. Нарушение баланса «холин — антихолин» за счет повышения содержания холина приводит к потере целостности плазматической мембраны, что

позволяет эндолизину проникнуть к периплазме и разрушить PG бактерии [46].

Было показано, что литические ферменты бактериофагов эффективно разрушают клеточную стенку целевых грамположительных бактерий и в отличие от антибиотиков не влияют на жизнедеятельность симбиотической флоры. Таким образом, бактериофаги представляют собой высокоспецифичные средства, тогда как антибиотики, как правило, обладают широким противомикробным действием. И эта специфичность является существенным недостатком бактериофагальных препаратов. Использование в терапии большинства бактериофагов, как правило, не сопровождается развитием побочных эффектов у макроорганизмов и развитием антибиотикорезистентности у бактерий [13, 41].

Отличия лечения бактериофагальными препаратами от антибактериальной терапии представлены в табл. 1.

Эндолизины

Одновременно с фаготерапией предпринимаются попытки разработать антибактериальные агенты из бактериостатических и бактериолитических белков, кодируемых генами фагов [35]. Так, для лизирования патогенных бактерий предлагается использовать: виролизин, лизин, лизоцим, мурализин, мурамидазу, фагоассоциированные ферменты, фаголизин, фаголизозим, эндолизины, энзибиотики и другие. В настоящее время в фаготерапии сделан акцент на литические энзимы как возможные целевые противобактериальные прототипы [5, 22, 55].

На молекулярном основании специфических эндолизинов, продуцируемых бактериофагами, создаются новые рекомбинантные лекарственные средства, способные вызвать гибель исключительно причинно-значимых бактериальных агентов [48]. В частности, Vincent A. Fischetti и соавт. [34] продемонстрировали, что очищенный лизин CPL1 способен *in vivo* и *in vitro* привести к гибели бактерий большинства пневмококковых серотипов. Авторы предложили название «энзибиотик» для обозначения данных ферментов, участвующих в лизисе стенки бактерий.

Таблица 1. Особенности терапии бактериофагами и антибиотиками

Характеристика механизма действия	Терапия бактериофагами	Терапия антибиотиками
Место реализации антибактериального действия	Локальное влияние, так как бактериофаги размножаются только в инфицированном очаге	Генерализованное влияние во всем внутреннем континууме организма
Специфичность антибактериального действия	Осуществление киллинга только специфических бактерий или даже штаммов	Бактерицидное или бактериостатическое влияние на широкий спектр бактерий
Влияние на комменсальную флору	Нет	Да
Индукция развития резистентных бактериальных штаммов	Нет	Да

В настоящее время наиболее изученными энзимными продуктами бактериофагов являются пептидогликангидролазы (peptidoglycan hydrolases — PGH), или эндолизины. Эндолизины представляют собой ферменты, которые обладают эндопептидазной, амидазной, гликозидазной или трансгликозилазной активностью, вызывающей деградацию PG клеточной стенки бактерии. Действуя в конце цикла репликации фага, эндолизины способствуют высвобождению новых вирионов. Эндолизины, направленные против грамположительных и грамотрицательных бактерий, структурно отличаются друг от друга, так как стенки разных бактерий существенно отличаются молекулярной архитектурой. Стенка грамположительных бактерий состоит из цитоплазматической мембраны и толстого слоя PG (до 40 слоев), который легко доступен для экзогенных эндолизинов. Эндолизины разрушают слой PG с последующим осмотическим лизисом и гибелью клеток. Стенка грамотрицательных бактерий характеризуется наличием тонкого слоя PG (1–2 слоя), который защищен дополнительной внешней мембраной. Эндолизины, направленные против грамотрицательных бактерий, представляют собой маленькие глобулярные протеины, молекула которых состоит только из одного домена, называемого энзиматически активным доменом (enzymatically active domain — EAD), тогда как молекулы эндолизинов, направленных против грамположительных бактерий, содержат еще один домен — домен связывания клеточной стенки (cell wall binding domain — CBD). Домен CBD вносит свой вклад в литическое действие эндолизина за счет синергизма с EAD, который выполняет каталитическую функцию ферментативного белка [8].

Эндолизины частично ответственны за высвобождение новообразованных вирусных частиц за

счет деградации PG, что дестабилизирует клеточную стенку и вызывает разрушение бактерии. Некоторые фаги также кодируют второй тип PGH, а именно вирион-ассоциированную пептидогликангидролазу (virion-associated peptidoglycan hydrolase — VAPGH), которая в отличие от эндолизинов разрушает PG во время начального проникновения бактериофага через клеточную стенку в бактерию. Геном фагов также содержит гены, кодирующие полисахаридные деполимеразы, которые деградируют полисахариды оболочки бактериальных клеток [53].

Эндолизины ответственны за деградацию PG клеточной стенки бактерий на поздних стадиях репликации литического фага, вызывая высвобождение новых образовавшихся вирусных частиц (рис. 1). Так как слой PG обеспечивает структурную целостность и жесткость бактериальной стенки, его разрушение может привести к гибели бактерии. Грамположительные бактерии, у которых отсутствует внешняя мембрана, высоко чувствительны к эндолизинам, в то время как для осуществления эндолин-индуцированного лизиса грамотрицательных бактерий необходимо предшествующее влияние факторов, которые катализируют слияние внутренней и наружной мембран [42].

Сведения о генетически модифицированных энзимобиотиках представлены в базе данных GMEzy (<http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/gmenzy/>).

Антистрептококковые бактериофаги и эндолизины

В настоящее время идентифицированы два бактериофага (Cp-1 и Dp-1), специализированных на киллинге бактерий *Streptococcus pneumoniae* [31]. Эффективность применения эндолизинов данных бактериофагов продемонстрирована при лечении различных инвазивных форм *Streptococcus*

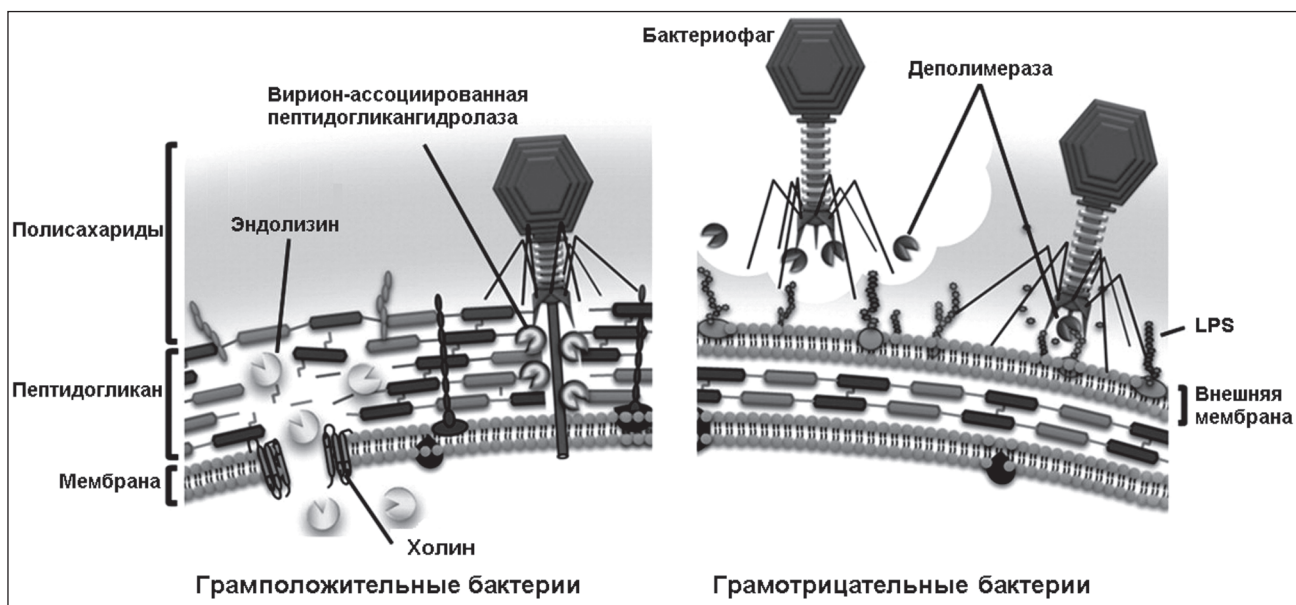


Рисунок 1. Механизм действия эндолизинов на грамположительные и грамотрицательные бактерии [42]

pneumoniae-инфекций, в том числе и при пневмониях (табл. 2).

Результаты исследования лечебного эффекта Cpl-1 показали, что внутривенное введение препарата не является оптимальным методом доставки антистрептококкового эндолизина. Внутривенное введение в дозе 10 мг/кг с последующей непрерывной инфузией 5 мг/кг/ч Cpl-1 в течение 6 ч крысам со стрептококковой инвазивной инфекцией не приводило к благоприятному исходу заболевания. И только после болюсного введения 250 мг/кг с последующей непрерывной инфузией 250 мг/кг/ч Cpl-1 в течение 6 часов наблюдалось снижение уровня бактериемии [14]. Ограниченный терапевтический эффект внутривенного введения эндолизина, вероятно, обусловлен коротким периодом полувыведения препарата. Согласно данным исследований эффективности лечения пневмококковых инфекций у животных, эндолизин устраняют бактериальную нагрузку при назначении сразу после заражения, до клинической манифестации болезни. Назначение в первые сутки после заражения одной внутрибрюшинной инъекции Cpl-1 мышам, страдающим тяжелой пневмококковой пневмонией, сопровождается 100% выживаемостью. По сравнению с эффективностью терапии амоксициллином (86 % выживаемости) Cpl-1 обеспечивал достоверно более высокий уровень выживаемости. Однако начало лечения со вторых суток после инфицирования сопровождается снижением вероятности выживания до 42 % [54]. Ингаляционное однократное введение эндолизина Cpl-1 в дозе 0,4 мг (в 25 мл физиологического раствора) при помощи MicroSprayer мышам, больным тяжелой стрептококковой пневмонией, способствовало предупреждению летального исхода заболева-

ния в 80 % случаев. Через 10 суток после введения Cpl-1 у мышей отмечается значимое снижение бактериальной нагрузки в легочной ткани, в то время как у выживших мышей, не леченных Cpl-1, наблюдается увеличение числа КОЕ бактерий *Streptococcus pneumoniae* в легких. Однако применение только ингаляционного введения эндолизина недостаточно для полной элиминации бактерий *Streptococcus pneumoniae* [12].

Антистафилококковые бактериофаги и ЭНДОЛИЗИНЫ

В настоящее время проводятся испытания (фаза I) двух препаратов, основанных на антистафилококковых фагах, P128 GangaGen и CF-301 Contrafect, которые предлагают использовать для деколонизации носоглотки от бактерий *Staphylococcus aureus* [50].

Результаты исследований муреин/пептидогликановых гидролаз, продуцируемых бактериофагами, позволяют считать, что данные энзимы могут быть использованы в качестве новых антибактериальных средств для борьбы с грамположительными патогенами. Ruth Keary и соавт. [26] установили, что бактериофагальная муреиновая пептидаза SHAP_K вызывает быстрый лизис нескольких штаммов MRSA и предотвращает образование стафилококковой биопленки, не сопровождаясь проявлением побочных эффектов у экспериментальных животных. Различные штаммы обладают разной чувствительностью к эндолизинам специфических бактериофагов (табл. 3).

Эффективность применения эндолизинов данных стафилококковых бактериофагов продемонстрирована при лечении различных заболеваний, индуцированных *Staphylococcus aureus* и MRSA (табл. 4).

Таблица 2. Эффективное применение антистрептококковых эндолизинов при стрептококковых инфекциях

Против <i>Streptococcus pneumoniae</i>		
Холинсвязывающий протеин CPL1 стрептококкового бактериофага Cp-1		
Экспериментальная модель	Путь введения, доза	Автор
Колонизация носовой полости у мышей	Инстилляцией носовой полости	[32]
	Внутрь	[34]
Тяжелая пневмония у мышей	Интраперитонеально	[54]
	Ингаляционно, по 0,4 мг	[12]
Бактериемия у мышей	Внутривенно, по 2000 мкг	[28]
	Интраперитонеально, по 0,4 мг/кг совместно с даптомицином	[49]
Эндокардит у крыс	Внутривенно, однократно по 10 мг/кг	[14]
Менингит у крыс	Интраперитонеально, однократно по 200 мг/кг	[17]
Холинсвязывающий химерный протеин Cpl-711		
Бактериемия у мышей	Интраперитонеально, однократно по 25–500 мкг	[11]
Холинсвязывающий протеин Pal стрептококкового бактериофага Dp-1		
Колонизация носовой полости у мышей	Инстилляцией носовой полости	[29]
Сочетание холинсвязывающих протеинов CPL1 и Pal стрептококковых бактериофагов		
Сепсис у мышей	Интраперитонеально, однократно по 200 мкг; 1100 U	[25]

Таблица 3. Активность пептидогликангидролаз против различных штаммов стафилококка [44]

Штамм стафилококка	Пептидогликангидролаза									
	80 α	Phi11	LysK	P68	Лизо-стафин	2638A ^c		Twort	PhiSH2	WMY
						Сутки 1	Сутки 3+			
Newman	++	++	++	+	+++	-	-	++	-	(+)
305 (Newbould)	++	++	++	++	+++	-	-	++	+	++
Newman sm ^r	++	++	++	++	+++	-	-	++	(+)	+
Newman $\Delta tagO$	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	+	+++
Newman Δica	++	++	++	+	+++	-	-	++	-	(+)
Newman $\Delta dltA$	++	++	++	+	+++	-	-	++	-	+
Newman $\Delta srtA$	++	++	++	+	+++	-	-	+	-	+
MN8	++	++	++	+	++	-	++	+	(+)	+
MN8 Δica	++	++	++	+	++	-	++	++	-	+
MN8 $\Delta sarA$	++	++	++	+	++	(+)	+++	++	-	+
ALC 1342	++	+	++	+	++	-	-	++	(+)	(+)
ANG 133	++	++	+	+	+++	-	-	+	-	(+)
ANG 144	(+)	(+)	+	(+)	+++	-	-	+	-	-
SA113	++	++	++	+	+++	+	++	++	-	++
SA113 $\Delta tagO$	++	+++	++	++	+++	+++	+++	++	-	+++
SA113 $\Delta dltA$	++	++	++	++	+++	+	++	++	+	++
Reynolds (CP-)	++	++	++	+	+++	-	-	++	(+)	+
Reynolds (CP5)	++	++	++	++	+++	-	-	++	(+)	++
Reynolds (CP8)	++	++	++	++	+++	-	-	++	(+)	+
NRS 382 (MRSA)	++	+	++	+	++	-	-	+	(+)	(+)
NRS 383 (MRSA)	++	++	++	+	+++	(+)	++	++	+	+
NRS 384 (MRSA)	++	++	++	+	+++	-	(+)	+	(+)	+
NRS 385 (MRSA)	++	++	++	+	+++	-	-	++	(+)	+
SA001	++	++	++	++	+++	-	-	++	(+)	++
SA002	++	++	++	++	+++	-	+	++	(+)	+
SA003	++	++	++	++	+++	-	-	++	(+)	+
SA009	++	++	++	++	+++	-	-	++	+	++
SA019	++	++	++	++	+++	-	+	++	(+)	(+)
SA020	++	++	++	++	+++	-	+	++	+	+
SA021	++	+	++	+	++	-	(+)	+	(+)	(+)
SA026	++	++	++	++	++	-	+	++	(+)	+
SA028	++	+	++	+	++	-	-	+	(+)	(+)
SA029	++	++	++	++	++	(+)	+	++	(+)	++
SA031	++	++	++	+	++	-	-	++	(+)	+
SA033	++	++	++	+	++	-	+	++	(+)	++
SA047	++	++	++	+	++	-	(+)	++	(+)	+
SA048	++	++	++	+	++	-	+	++	(+)	+
SA049	++	++	++	+	++	-	+	++	(+)	++
<i>S. chromogenes</i>	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	++	+	++
<i>S. epidermidis</i>	++	(+)	++	+	++	-	+	++	+	-
<i>S. hyicus</i>	++	+	+++	+	+++	-	-	++	+	+
<i>S. simulans</i>	++	+	++	+	++	-	(+)	++	+	+
<i>S. warneri</i>	++	-	++	+	++	-	-	++	+	-
<i>S. xyloso</i>	+++	+++	+++	++	+++	-	-	++	+	++

Введение эндолизинов приводит к уменьшению уровня бактериемии *Staphylococcus aureus* и предотвращает летальный исход септического процесса у грызунов. Так, внутривентральное введение эндолизина MV-L в дозе 0,05 мг (2 мг/кг) через 30 минут после системного заражения бактериями MRSA сопровождается выживанием 100% инфицированных мышей. Однако введение MV-L через 1 час после инфицирования сопровождается выживаемостью только 60 % инфицированных мышей [40]. Применение в терапии более мощного антистафилококкового эндолизина LysGH15 с исключительной антистафилолитической активностью, высокоспецифичной для штаммов MRSA, в той же дозе (2 мг/кг) способствует предотвращению летального исхода заболевания и при его введении через один час после инфицирования. Однако назначение LysGH15 не способствует полной санации крови. Терапия эндолизином LysGH15 приводит и к снижению уровня активности воспалительного процесса, в частности, к уменьшению концентрации IL-6, IFN- γ [18]. Назначение LysGH15 сопровождается специфическим антительным ответом на данный эндолизин, но антитела не влияют на терапевтическую эффективность LysGH15 [56]. Mathias Schmelcher и соавт. [44] продемонстрировали, что применение эндолизинов LysK, phi11, 80 α , 2638A или WMY при стафилококковой бактериемии предотвращает летальность у 100 % экспериментальных животных, что практически сравнимо с эффективностью сочетанной терапии лизостафином и ванкомицином. В то же время необходимо отметить, что

терапия эндолизинами Twort и phiSH2 сопровождалась развитием летального исхода в 40 % случаев, а P68 — не предотвращала летального исхода.

Антиклебсиеллезные бактериофаги и ЭНДОЛИЗИНЫ

Основываясь на результатах исследований антибактериальной активности бактериофагов, Eun-Ah Park и соавт. [37] показали, что бактериофаги PKO111 и PKP126 могут быть хорошими кандидатами для разработки терапевтических средств с выраженной бактерицидной активностью по отношению к бактериям *Klebsiella*. Также миовирусы KP15 и KP27 субсемейства *Tevenvirinae* продуцируют холин, антихолин, спапин и эндолизин, который, собственно, таргетно разрушает PG бактерий *Klebsiella*. Установлено, что эндолизин KP27 характеризуется энзиматической специфичностью, стабильностью и отсутствием токсичности по отношению к эпителиальным клеткам человека [30].

Антисинегнойные бактериофаги и ЭНДОЛИЗИНЫ

В настоящее время идентифицировано несколько бактериофагов (E79, JG024, PaP1, MPK1, MPK6, PAK-P1, M4, LUZ7 и PIK), которые показали эффективность при лечении экспериментальных инфекций, вызванных бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, у животных [10, 20, 23, 27, 38, 47].

Краткая характеристика исследований, посвященных изучению эффективности терапии бактериофагами экспериментальных пневмоний,

Таблица 4. Экспериментальное применение антистафилококковых эндолизинов при MRSA-ассоциированных инфекционных процессах

Эндолизин	Экспериментальная модель	Путь введения, доза	Автор
LysK/CHAP _K	Колонизация носовой полости у мышей	Инстилляциии носовой полости	[15]
	Бактериемия у мышей	Интраперитонеально	[15]
MV-L	Колонизация носовой полости у мышей	Инстилляциии носовой полости	[40]
	Бактериемия у мышей	Интраперитонеально, по 2 мг/кг	[40]
λ Sa2-E-lyso-SH3b	Мастит у мышей	По 12,5 мкг на каждую железу	[43]
Химерный лизин ClyS	Сепсис у мышей	Интраперитонеально	[9]
LysGH15	Бактериемия у мышей	Внутривенно, по 2 мг/кг	[18]
PhiSH2	Бактериемия у мышей	Интраперитонеально	[44]
Phi11	Бактериемия у мышей	Интраперитонеально	[44]
Twort	Бактериемия у мышей	Интраперитонеально	[44]
WMY	Бактериемия у мышей	Интраперитонеально	[44]
80 α	Бактериемия у мышей	Интраперитонеально	[44]
2638A	Бактериемия у мышей	Интраперитонеально	[44]
PlySs2	Бактериемия у мышей	Внутривенно, по 1 мг	[16]
SAL-1	Бактериемия у мышей	Внутривенно, по 12,5 мг/кг	[39]

вызванных бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, представлена в табл. 5.

Продемонстрировано, что интраназальное введение в респираторный тракт бактериофага РАК-Р1 эффективно предотвращает поражение легких и предупреждает развитие неблагоприятного исхода летальной инфекции, вызванной бактериями *Pseudomonas aeruginosa* у мышей. Эффективность снижения бактериальной нагрузки в ткани легкого при применении бактериофага РАК-Р1 у мышей с синегнойной пневмонией сочетается с уменьшением уровня провоспалительных цитокинов. Через 48 часов после введения РАК-Р1 уровни концентрации IL-6 и TNF-α возвращаются к исходным значениям [10]. Laurent Debarbieux и соавт. [10] подчеркивают, что достижение 100% выживаемости у инфицированных животных отмечается только тогда, когда лечение бактериофагом РАК-Р1 про-

водится не позже, чем через 2 часа после инфицирования бактериями *Pseudomonas aeruginosa*. Eric Morello и соавт. [33] показали, что интраназальное введение бактериофагов РАК-Р или РЗ-СНА мышам с летальной пневмонией, вызванной бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, сопровождается выживаемостью экспериментальных животных в 90–100 % случаев. Также установлено, что бактериофаг РЗ-СНА оказывает профилактическое влияние: назначение РЗ-СНА за 4 дня до инфицирования в 100 % случаев предупреждает развитие инфекционного процесса.

Возможность применения эндолизинов бактериофагов была продемонстрирована несколькими группами исследователей (табл. 6).

Catherine Paradis-Bleau и соавт. [36] продемонстрировали, что gp144 фага phiKZ представляет собой литическую трансгликозилазу, способную

Таблица 5. Опыт применения бактериофагов при лечении экспериментальных пневмоний, вызванных бактериями *Pseudomonas aeruginosa*

Экспериментальная модель	Штамм <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Бактериофаг	Путь введения, доза	Продолжительность лечения	Эффект	Время манифестации эффекта	Автор
Летальная пневмония у мышей	РАК биолюминесцентный штамм <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	РАК-Р1	Интраназально, по 108 PFU	Однократно в первые два часа после инфицирования	Снижение уровня летальности и поражения ткани легкого	Через 6–24 часа после введения препарата	[10]
				Однократно за 24 часа до инфицирования	Выживаемость в 100 % случаев	Через 24 часа после введения препарата	
	MDR штамм <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , выделенный у больных муковисцидозом	РАК-Р или РЗ-СНА	Интраназально, по 3×10^7 или 3×10^8 PFU	Однократно в первые два часа после инфицирования	Снижение уровня летальности и поражения ткани легкого	Через 18 часов после введения препарата	[33]
				Интраназально, по 3×10^8 PFU	Выживаемость в 100 % случаев	Через 4 суток после введения препарата	
Пневмония у мышей	Штамм <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , выделенный у больных муковисцидозом	Коктейль из двух фагов φMR299-2 и φNH-4	Интраназально, по 50 мкл раствора 2×10^9 – 5×10^9 PFU/мл	Однократно в первые два часа после инфицирования	Ускорение бактериального клиренса ткани легкого	Через 4–8 часов после введения препарата	[2]

Таблица 6. Эндолизины с бактерицидной активностью против бактерий *Pseudomonas aeruginosa*

Эндолизин	Уровень исследования	Автор
Art-175	<i>In vitro</i>	[5]
EL188	<i>In vitro</i>	[6]
KZ144	<i>In vitro</i>	[36]
LysPA26	<i>In vitro</i>	[19]
OBPgp279	<i>In vitro</i>	[51]

взаимодействовать с дезорганизованными бактериальными мембранами и приводить к гибели бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Также показано, что эндолизин Art-175, EL188, OBPgp279, LysPA26 обладают бактерицидной активностью против бактерии *Pseudomonas aeruginosa* [3, 4, 6, 19, 51]. Представляет интерес, что эндолизин LysPA26 может эффективно приводить к гибели не только бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, но и бактерии *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli*. Однако эндолизин LysPA26 неэффективен против таких грамположительных бактерий, как *Staphylococcus aureus* [19].

Необходимо отметить, что эффективность бактериофаговой терапии пневмоний зависит от времени введения препарата относительно момента инфицирования и дозы введенного бактериофага. Практически все исследователи продемонстрировали, что максимальный антибактериальный эффект фаговых препаратов проявляется при их введении в первые два часа после инфицирования причинно-значимым патогеном.

Выводы

Таким образом, литические бактериофаги и эндолизин способны вызывать гибель антибиотикорезистентных бактерий, в связи с чем их использование в качестве бактерицидных лекарственных средств является потенциально эффективным терапевтическим методом противомикробной терапии. Высокий уровень эффективности бактерицидного действия эндолизинов позволяет предположить, что будущие лекарственные средства, созданные на молекулярной основе эндолизинов, могут стать ключевыми противомикробными препаратами при лечении инвазивных инфекций.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии какого-либо конфликта интересов при подготовке данной статьи.

References

- Ackermann H.W. 5500 Phages examined in the electron microscope // *Arch. Virol.* 2007 Feb; 152(2): 227-43. doi: 10.1007/s00705-006-0849-1.
- Alemayehu D. Bacteriophages ϕ MR299-2 and ϕ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells / D. Alemayehu, P.G. Casey, O. McAuliffe et al. // *MBio.* 2012 Mar 6; 3(2): e00029-12. doi: 10.1128/mBio.00029-12.
- Briers Y. Analysis of outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa* and bactericidal activity of endolysins KZ144 and EL188 under high hydrostatic pressure / Y. Briers, A. Cornelissen, A. Aertsen et al. // *FEMS Microbiol Lett.* 2008 Mar; 280(1): 113-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.01051.x.
- Briers Y. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persists of *Pseudomonas aeruginosa* / Y. Briers, M. Walmagh, B. Grymonprez et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014 Jul; 58(7): 3774-84. doi: 10.1128/AAC.02668-14.
- Briers Y. Engineered endolysin-based "Artilyns" to combat multidrug-resistant gram-negative pathogens / Y. Briers, M. Walmagh, V. Van Puyenbroeck et al. // *MBio.* 2014 Jul 1; 5(4): e01379-14. doi: 10.1128/mBio.01379-14.
- Briers Y., Walmagh M., Lavigne R. Use of bacteriophage endolysin EL188 and outer membrane permeabilizers against *Pseudomonas aeruginosa* // *J. Appl. Microbiol.* 2011 Mar; 110(3): 778-85. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04931.x.
- Buttimer C. Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases / C. Buttimer, O. McAuliffe, R.P. Ross et al. // *Front Microbiol.* 2017 Jan 20; 8: 34. doi: 10.3389/fmicb.2017.00034.
- Cisek A.A. Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages / A.A. Cisek, I. Dąbrowska, K.P. Gregorczyk, Z. Wyżewski // *Curr Microbiol.* 2017 Feb; 74(2): 277-283. doi: 10.1007/s00284-016-1166-x.
- Daniel A. Synergism between a novel chimeric lysin and oxacillin protects against infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / A. Daniel, C. Euler, M. Collin et al. // *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Apr; 54(4): 1603-12. doi: 10.1128/AAC.01625-09.
- Debarbieux L. Bacteriophages can treat and prevent *Pseudomonas aeruginosa* lung infections / L. Debarbieux, D. Leduc, D. Maura et al. // *J. Infect. Dis.* 2010 Apr 1; 201(7): 1096-104. doi: 10.1086/651135.
- Diez-Martinez R. A novel chimeric phage lysin with high in vitro and in vivo bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae* / R. Diez-Martinez, H.D. De Paz, E. Garcia-Fernández et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2015; 70(6): 1763-73. doi: 10.1093/jac/dkv038.
- Doehn J.M. Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia / J.M. Doehn, K. Fischer, K. Reppe et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2013 Sep; 68(9): 2111-7. doi: 10.1093/jac/dkt131.
- Doss J. A Review of Phage Therapy against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms / J. Doss, K. Culbertson, D. Hahn et al. // *Viruses.* 2017 Mar 18; 9(3). pii: E50. doi: 10.3390/v9030050.
- Entenza J.M. Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats / J.M. Entenza, J.M. Loeffler, D. Grandgirard et al. // *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Nov; 49(11): 4789-92. doi: 10.1128/AAC.49.11.4789-4792.2005.
- Fenton M. Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials / M. Fenton, P. Ross, O. McAuliffe et al. // *Bioeng Bugs.* 2010 Jan-Feb; 1(1): 9-16. doi: 10.4161/bbug.1.1.9818.]
- Gilmer D.B. Novel bacteriophage lysin with broad lytic activity protects against mixed infection by *Streptococcus pyogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / D.B. Gilmer, J.E. Schmitz, C.W. Euler, V.A. Fischetti // *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jun; 57(6): 2743-50. doi: 10.1128/AAC.02526-12.
- Grandgirard D. Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis / D. Grandgirard, J.M. Loeffler, V.A. Fischetti, S.L. Leib // *J. Infect. Dis.* 2008 Jun 1; 197(11): 1519-22. doi: 10.1086/587942.
- Gu J. LysGH15 reduces the inflammation caused by lethal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice / J. Gu, J. Zuo, L. Lei et al. // *Bioeng Bugs.* 2011 Mar-Apr; 2(2): 96-9. doi: 10.4161/bbug.2.2.14883.
- Guo M. A Novel Antimicrobial Endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa* / M. Guo, C. Feng, J. Ren et al. // *Front Microbiol.* 2017 Feb 27; 8: 293. doi: 10.3389/fmicb.2017.00293.
- Harper D.R., Enright M.C. Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections // *J. Appl. Microbiol.* 2011 Jul; 111(1): 1-7. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05003.x.
- Hobbs Z., Abedon S.T. Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with "Lytic or lysogenic" // *FEMS Microbiol Lett.* 2016 Apr; 363(7). pii: fnw047. doi: 10.1093/femsle/fnw047.
- Hojckova K., Stano M., Klucar L. phiBIOTICS: catalogue of therapeutic enzymatics, relevant research studies and practical applications // *BMC Microbiol.* 2013 Mar 6; 13: 53. doi: 10.1186/1471-2180-13-53.
- Hraiech S. Bacteriophage-based therapy in cystic fibrosis-associated *Pseudomonas aeruginosa* infections: rationale and current status / S. Hraiech, F. Brégeon, J.M. Rolain et al. // *Drug Des Devel Ther.* 2015 Jul 16; 9: 3653-63. doi: 10.2147/DDDT.S53123.
- Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN (2015) Najczęstsze pytania. www.iitd.pan.wroc.pl/pl/OTF/Pytania.html. Accessed 10 June 2015.
- Jado I. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model / I. Jado,

- R. López, E. García et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2003 Dec; 52(6): 967-73. doi: 10.1093/jac/dkg485.
26. Keary R. Characterization of a Bacteriophage-Derived Mu-rein Peptidase for Elimination of Antibiotic-Resistant *Staphylococcus aureus* / R. Keary, M. Sanz-Gaitero, M.J. van Raaij et al. // *Curr Protein Pept Sci.* 2016; 17(2): 183-90. doi: 10.2174/1389203716666151102105515.
27. Krylov V.N. Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: long-term prospects for use in phage therapy // *Adv. Virus Res.* 2014; 88: 227-78. doi: 10.1016/B978-0-12-800098-4.00005-2.
28. Loeffler J.M., Djurkovic S., Fischetti V.A. Phage lytic enzyme Cpl-1 as a novel antimicrobial for pneumococcal bacteremia // *Infect Immun.* 2003 Nov; 71(11): 6199-204. doi: 10.1128/IAI.71.11.6199-6204.2003.
29. Loeffler J.M., Nelson D., Fischetti V.A. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase // *Science.* 2001 Dec 7; 294(5549): 2170-2. doi: 10.1126/science.1066869.
30. Maciejewska B. Klebsiella phages representing a novel clade of viruses with an unknown DNA modification and biotechnologically interesting enzymes / B. Maciejewska, B. Roszniowski, A. Espallat et al. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017 Jan; 101(2): 673-684. doi: 10.1007/s00253-016-7928-3.
31. Mariano R. The interactome of *Streptococcus pneumoniae* and its bacteriophages show highly specific patterns of interactions among bacteria and their phages / R. Mariano, S. Wuchty, M.G. Vizoso-Pinto et al. // *Sci Rep.* 2016 Apr 22; 6: 24597. doi: 10.1038/srep24597.
32. McCullers J.A. Novel strategy to prevent otitis media caused by colonizing *Streptococcus pneumoniae* / J.A. McCullers, A. Karlström, A.R. Iverson et al. // *PLoS Pathog.* 2007 Mar; 3(3): e28. doi: 10.1371/journal.ppat.0030028.
33. Morello E. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention / E. Morello, E. Saussereau, D. Maura et al. // *PLoS One.* 2011 Feb 15; 6(2): e16963. doi: 10.1371/journal.pone.0016963.
34. Nelson D., Loomis L., Fischetti V.A. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* 2001 Mar 27; 98(7): 4107-12. doi: 10.1073/pnas.061038398.
35. Oliveira H. Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins / H. Oliveira, L.D. Melo, S.B. Santos et al. // *J. Virol.* 2013 Apr; 87(8): 4558-70. doi: 10.1128/JVI.03277-12.
36. Paradis-Bleau C. Peptidoglycan lytic activity of the *Pseudomonas aeruginosa* phage phiKZ gp144 lytic transglycosylase / C. Paradis-Bleau, I. Cloutier, L. Lemieux et al. // *FEMS Microbiol Lett.* 2007 Jan; 266(2): 201-9. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00523.x.
37. Park E.A. Characterization and genome analysis of novel bacteriophages infecting the opportunistic human pathogens *Klebsiella oxytoca* and *K. pneumoniae* / E.A. Park, Y.T. Kim, J.H. Cho et al. // *Arch Virol.* 2017 Apr; 162(4): 1129-1139. doi: 10.1007/s00705-016-3202-3.
38. Pires D.P. Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections / D.P. Pires, D. Vilas Boas, S. Sillankorva, J. Azeredo // *J. Virol.* 2015 Aug; 89(15): 7449-56. doi: 10.1128/JVI.00385-15.
39. Preclinical safety evaluation of intravenously administered SAL200 containing the recombinant phage endolysin SAL-1 as a pharmaceutical ingredient / S.Y. Jun, G.M. Jung, S.J. Yoon et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(4): 2084-8. doi: 10.1128/AAC.02232-13.
40. Rashel M. Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11 / M. Rashel, J. Uchiyama, T. Ujihara et al. // *J. Infect Dis.* 2007 Oct 15; 196(8): 1237-47. doi: 10.1086/521305.
41. Reindel R., Fiore C.R. Phage Therapy: Considerations and Challenges for Development // *Clin. Infect. Dis.* 2017 Mar 1. doi: 10.1093/cid/cix188.
42. Roach D.R., Donovan D.M. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications // *Bacteriophage.* 2015 Jun 23; 5(3): e1062590. doi: 10.1080/21597081.2015.1062590.
43. Schmelcher M. Chimeric phage lysins act synergistically with lyso-staphin to kill mastitis-causing *Staphylococcus aureus* in murine mammary glands / M. Schmelcher, A.M. Powell, S.C. Becker et al. // *Appl Environ Microbiol.* 2012 Apr; 78(7): 2297-305. doi: 10.1128/AEM.07050-11.
44. Schmelcher M. Evolutionarily distinct bacteriophage endolysins featuring conserved peptidoglycan cleavage sites protect mice from MRSA infection / M. Schmelcher, Y. Shen, D.C. Nelson et al. // *J. Antimicrob Chemother.* 2015 May; 70(5): 1453-65. doi: 10.1093/jac/dku552.
45. Sharma S. Bacteriophages and its applications: an overview / S. Sharma, S. Chatterjee, S. Datta et al. // *Folia Microbiol (Praha).* 2017 Jan; 62(1): 17-55. doi: 10.1007/s12223-016-0471-x.
46. To K.H., Young R. Probing the structure of the S105 hole // *J. Bacteriol.* 2014 Nov; 196(21): 3683-9. doi: 10.1128/JB.01673-14.
47. Torres-Barceló C. A window of opportunity to control the bacterial pathogen *Pseudomonas aeruginosa* combining antibiotics and phages / C. Torres-Barceló, F.I. Arias-Sánchez, M. Vasse et al. // *PLoS One.* 2014 Sep 26; 9(9): e106628. doi: 10.1371/journal.pone.0106628.
48. Trudil D. Phage lytic enzymes: a history // *Virol Sin.* 2015 Feb; 30(1): 26-32. doi: 10.1007/s12250-014-3549-0.
49. Vouillamoz J. Bactericidal synergism between daptomycin and the phage lysin Cpl-1 in a mouse model of pneumococcal bacteraemia / J. Vouillamoz, J.M. Entenza, M. Giddey et al. // *Int. J. Antimicrob Agents.* 2013 Nov; 42(5): 416-21. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.06.020.
50. Vuong C. Investigational drugs to treat methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / C. Vuong, A.J. Yeh, G.Y. Cheung, M. Otto // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2016; 25(1): 73-93. doi: 10.1517/13543784.2016.1109077.
51. Walmagh M. Characterization of modular bacteriophage endolysins from Myoviridae phages OBP, 201φ2-1 and PVP-SE1 / M. Walmagh, Y. Briers, S.B. dos Santos et al. // *PLoS One.* 2012; 7(5): e36991. doi: 10.1371/journal.pone.0036991.
52. Weinbauer M.G. Ecology of prokaryotic viruses // *FEMS Microbiol Rev.* 2004 May; 28(2): 127-81. doi: 10.1016/j.femsre.2003.08.001.
53. Wittekind M., Schuch R. Cell wall hydrolases and antibiotics: exploiting synergy to create efficacious new antimicrobial treatments // *Curr. Opin. Microbiol.* 2016 Oct; 33: 18-24. doi: 10.1016/j.mib.2016.05.006.
54. Witzgenrath M. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia / M. Witzgenrath, B. Schmeck, J.M. Doehn et al. // *Crit. Care Med.* 2009 Feb; 37(2): 642-9. doi: 10.1097/CCM.0b013e31819586a6.
55. Wu H. GMEnzy: a genetically modified enzymatic database / H. Wu, J. Huang, H. Lu et al. // *PLoS One.* 2014 Aug 1; 9(8): e103687. doi: 10.1371/journal.pone.0103687.
56. Zhang L. LysGH15 kills *Staphylococcus aureus* without being affected by the humoral immune response or inducing inflammation / L. Zhang, D. Li, X. Li et al. // *Sci Rep.* 2016 Jul 7; 6: 29344. doi: 10.1038/srep29344.

Получено 14.09.2017 ■

Абатуров О.Є.¹, Крючко Т.О.²¹ДЗ «Дніпропетровська медична академія МОЗ України», м. Дніпро, Україна²ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава, Україна

Терапевтичний потенціал бактеріофагів та ендолізинів при лікуванні гострих респіраторних інфекцій, викликаних бактеріальними патогенами

Резюме. Бактеріофаги являють собою віруси, які за рахунок рецептор/ліганд-взаємодії здатні специфічно зв'язуватися з бактеріальною стінкою і відновлювати-

ся всередині певних мікроорганізмів. Літичні ферменти бактеріофагів ефективно руйнують клітинну стінку бактерій, але на відміну від антибіотиків не впливають

на життєдіяльність симбіотичної флори. На сьогодні існує велика кількість наукових матеріалів, що стосуються ефективності антистрептококових, антистафілококових, антиклебсієльозних, антисинегнійних бактеріофагів і ендолізинів, які здатні викликати загибель антибіотикорезистентних бактерій, у зв'язку з чим їх використовують як бактерицидні лікарські засоби, що є потенційно ефективним терапевтичним методом про-

тимікробної терапії. Високий рівень ефективності бактерицидної дії ендолізинів дозволяє висловити припущення, що майбутні лікарські засоби, створені на молекулярній основі ендолізинів, можуть стати ключовими протимікробними препаратами при лікуванні інфекційних захворювань.

Ключові слова: гострі респіраторно-вірусні інфекції; діти; бактеріофаги

A.E. Abaturov¹, T.A. Kryuchko²

¹SI "Dnipropetrovsk Medical Academy of Ministry of Health of Ukraine", Dnipro, Ukraine

²HSEIU "Ukrainian Medical Stomatological Academy", Poltava, Ukraine

The therapeutic potential of bacteriophages and endolysins in the treatment of acute respiratory infections caused by bacterial pathogens

Abstract. Bacteriophages are viruses that, due to the receptor/ligand interactions, are able to specifically bind to the bacterial wall and replicate within specific bacteria. The lytic enzymes of bacteriophages efficiently destroy the bacterial cell wall, but unlike antibiotics, they do not affect the vital activity of the symbiotic flora. Today, there is sufficient research experience on the efficacy of antistreptococcal, antistaphylococcal, anti-klebsiella, antipseudomonal bacteriophages and endolysins that

can kill antibiotic-resistant bacteria, and therefore, their use as bactericidal drugs is a potentially effective therapeutic method of antimicrobial therapy. The high level of effectiveness of the bactericidal action of endolysins suggests that future drugs, created on the molecular basis of endolysins, can become key antimicrobial agents in the treatment of invasive infections.

Keywords: acute respiratory infections; children; bacteriophages