

# Bakteriofagi: imunološka uloga i antimikrobni potencijal

---

Klišanin, Luka

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:513050>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-29**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno matematički fakultet  
Odjel za biologiju

# **BAKTERIOFAGI: IMUNOLOŠKA ULOGA I ANTIMIKROBNI POTENCIJAL**

Završni rad  
Luka Klišanin

Split, kolovoz 2023.

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno matematički fakultet  
Odjel za biologiju

# **BAKTERIOFAGI: IMUNOLOŠKA ULOGA I ANTIMIKROBNI POTENCIJAL**

Završni rad  
Luka Klišanin

Split, kolovoz 2023.

*Ovaj rad, izrađen u Splitu 2023. godine, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Elme Vuko i neposrednim voditeljstvom dr. sc. Tomislava Rončevića, predan je na ocjenu Odjela za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja prvostupnika biologije.*

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu

Završni rad

Prirodoslovno – matematički fakultet

Odjel za biologiju

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

### **Bakteriofagi: imunološka uloga i antimikrobni potencijal**

Luka Klišanin

#### **Sažetak:**

Bakteriofagi su bakterijski virusi te najbrojniji i najraznovrsniji biološki organizmi na zemlji. Kod čovjeka, obilno su prisutni u crijevima, gdje igraju ključnu ulogu u sastavu mikrobioma, a osim u mukoznom sloju, gdje često obitavaju, pronađeni su u krvotoku i unutarnjim organima. U crijevima, ciljano uništavanje bakterija bakteriofagima često ima kaskadne učinke na bakterijske populacije koje nisu izravno ciljane predacijom faga. Rezydentne mikrobne zajednice crijeva imaju snažan utjecaj na imunološki sustav domaćina, a promjene tih zajednica potencijalno mogu dovesti do promjene ekosustava mikrobioma i razvoja bolesti. S druge strane, uslijed rastuće bakterijske rezistencije na antibiotike, bakteriofagi se desetljećima intenzivno proučavaju kao alternativa klasičnoj antibiotskoj terapiji. Preklinička i klinička ispitivanja pokazuju da bakteriofagi ciljano djeluju na bakterije, te se lakše primjenjuju u odnosu na klasične antibiotike jer nije potrebna uzastopna primjena kroz period od nekoliko dana ili tjedana. Isto tako, mogu uništavati strukture biofilma, te povećati osjetljivost rezistentnih bakterija na neke klase antibiotika. Međutim, kliničku uporabu sprječavaju određeni nedostaci ovih lijekova, poput transmisije genetičkog materijala čime se potencijalno mogu širiti geni rezistencije ili se njihova aktivnost može smanjiti uslijed imunološkog odgovora domaćina.

**Ključne riječi:** bakteriofagi, mikrobiom, antibiotici, biofilm

**Rad sadrži:** 30 stranica, 5 slika, 1 tablica, 100 literaturnih navoda, Izvornik je na hrvatskom jeziku.

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Elma Vuko

**Neposredni voditelj:** dr. sc. Tomislav Rončević

**Ocjenjivači:** izv. prof. dr. sc. Elma Vuko  
izv. prof. dr. sc. Sanja Puljas  
dr. sc. Tomislav Rončević

**Rad prihvaćen:** 21.08.2023.

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno – matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Splitu.

<b>Basic documentation card</b>
---------------------------------

University of Split

Undergraduate thesis

Faculty of Science

Department of Biology

Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Croatia

## **Bacteriophages: immunological role and antimicrobial potential**

Luka Klišanin

### **Abstract:**

Bacteriophages are obligate parasites that require a bacterial host to reproduce and are the most numerous and diverse biological organisms on planet Earth. In humans, they are abundantly present in the gut, where they play a key role in shaping the composition of the microbiome, and in addition to the mucous layer, where they often reside, they have been found in the bloodstream and internal organs. In the gut, targeted destroying bacteria by bacteriophages often has cascading effects on bacterial populations that were not directly targeted by phage predation. Resident microbial communities of the gut have a strong influence on the host immune system, and changes in these communities can potentially lead to changes in the microbiome ecosystem and disease development. On the other hand, due to the growing bacterial resistance to antibiotics, bacteriophages have been intensively studied for decades as an alternative to classical antibiotic therapy. Preclinical trials show that bacteriophages have targeting effect on bacteria and are easier to apply compared to classical antibiotics as there is no need for consecutive application over a period of several days or weeks. Bacteriophages can also destroy biofilm structures and increase the sensitivity of resistant bacteria to some classes of antibiotics. However, clinical use is hindered by certain disadvantages of these drugs, such as the transmission of genetic material which can potentially spread resistance genes or their activity can be reduced due to the host immune response.

**Keywords:** bacteriophages, microbiome, antibiotics, biofilm

**Thesis consists of:** 30 pages, 5 figures, 1 tables, 100 references, Original language: Croatian

**Supervisors:** Assoc. Prof. Elma Vuko

**Assistant Supervisor:** Dr. Tomislav Rončević

**Reviewers:** Assoc. Prof. Elma Vuko

Assoc. Prof. Sanja Puljas

Dr. Tomislav Rončević

**Thesis accepted:** 21<sup>st</sup> August 2023

Thesis is deposited in the library of the Faculty of Science, University of Split.

## **IZJAVA**

kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom

### **BAKTERIOFAGI: IMUNOLOŠKA ULOGA I ANTIMIKROBNI POTENCIJAL**

izradio samostalno pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Elme Vuko i dr. sc. Tomislava Rončevića. U radu sam primijenio metodologiju znanstvenoistraživačkog rada i koristio literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti koje sam izravno ili parafrazirajući naveo u diplomskom radu na uobičajen, standardan način citirao sam i povezao s fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.

Student

Luka Klišanin

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. RAZRADA TEME .....	3
2.1. Bakteriofagi - povijesni osvrt.....	3
2.2. Bakteriofagi u ljudskom organizmu.....	4
2.1.1. O bakteriofagima općenito.....	4
2.1.2. Bakteriofagi crijeva, njihova (ekološka) uloga i značaj.....	5
2.2. Bakteriofagi i imunološki sustav.....	9
2.2.1. Metode pristupanja faga imunološkim stanicama urođenog imunološkog sustava .....	9
2.2.2. Interakcije bakteriofaga s imunološkim sustavom.....	11
2.3. Terapija bakteriofagima .....	14
2.3.1. Učinkovitost faga protiv kliničkih značajnih patogena.....	14
2.4. Terapija fagima naspram 'klasične' antibiotske terapije .....	16
2.4.1. Prednosti terapije fagima .....	16
2.4.2. Nedostaci terapije fagima.....	17
3. ZAKLJUČAK.....	19
4. LITERATURA .....	20

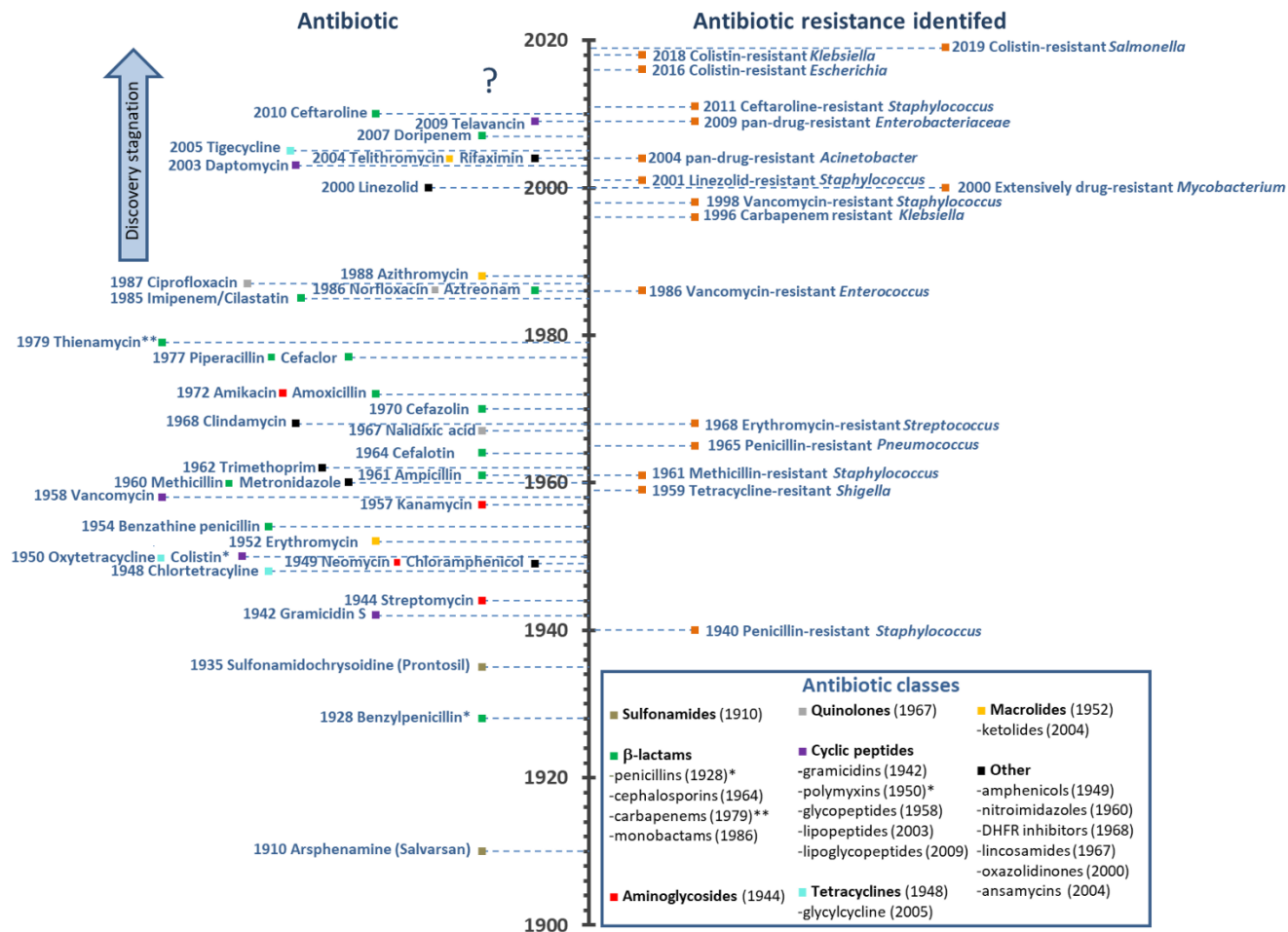


## 1. UVOD

U posljednjim desetljećima, bakterijska rezistencija na antibiotike ima za posljedicu milijune života diljem svijeta svake godine<sup>1-4</sup>. Rezultat je to pretjeranog korištenja ili zloupotrebe antibiotika kao i manjkom razvoja novih i učinkovitijih lijekova zbog smanjenih ekonomskih ulaganja i zahtjevnih sigurnosnih regulativa<sup>2-4</sup>. Početak primjene antibiotika nije usko vezan uz 20. stoljeće kada počinje moderna antibiotska era. U starim civilizacijama kao što su Egipat, Kina, Grčka i Rimsko carstvo, bakterijske zaraze su se tretirale lokalnom primjenom pljesnivog kruha na rane<sup>5</sup>. Tako su tragovi tetraciklina, današnjih antibiotika, su pronađeni u posmrtnim ostacima u Sudanskoj Nubiji (350.-550. nakon Krista) kao i u onima iz rimskog razdoblja u Egiptu<sup>6,7</sup>. U oba slučaja, pretpostavlja se da su žitarice sadržavale gljivice roda *Streptomyces*<sup>6,7</sup> te su vrlo vjerojatno imale preventivnu, a ne sistemsku ulogu u liječenju bolesti.

Moderna era antibiotika započela je konceptom „čarobnoga metka“ od strane Paula Ehrlicha početkom 20. stoljeća. Zajedno s bakteriologom Sahachikom Hatom i kemičarem Alfredom Bertheimom, Erlich je otkrio arsensku boju arsfenamin koja je kasnije dobila naziv Salvarsan te se koristila kao lijek protiv sifilisa<sup>8</sup>. Ova terapija je bila poznata kao antimikrobna kemoterapija dok je prvi antibiotik u širokoj upotrebi bio Prontosil tj. sulfonamid kojeg je 1935. u uporabu uveo Gerhard Domagk<sup>9</sup>. Penicilin, kojeg je 1928. godine otkrio Alexandar Fleming<sup>4</sup>, je stavljen u uporabu 15-ak godina kasnije tijekom Drugog svjetskog rata, dok je Selman Waksman 1944. god. otkrio streptomycin čime počinje zlatno doba otkrića antibiotika<sup>9</sup>. Usporedno s otkrićem novih antibiotika, primijećena je rezistencija bakterija na iste, pa je prvi penicilin-rezistentni *Staphylococcus* otkriven prije nego je taj antibiotik stavljen u široku uporabu (Slika 1)<sup>9</sup>. Slično tome, meticilin,  $\beta$ -laktamski antibiotik iz klase penicilina, je otkriven 1960. god., dok je svega godinu dana kasnije izoliran meticilin-rezistentni *Staphylococcus* (Slika 1). Glikopeptidni antibiotik vankomicin je stavljen u uporabu 1958. god., te se dugo vremena smatralo kako bakterije neće biti sposobne razviti rezistenciju naspram ove klase antibiotika. Sredinom osamdesetih godina prošlog stoljeća otkriven je vankomicin-rezistentni *Enterococcus*, a 1998. i vankomicin-rezistentni *Staphylococcus* osporavajući takvo razmišljanje (Slika 1). Posljednjih trideset godina teško se otkrivaju nove klase antibiotika, dok bakterije uspješno razvijaju rezistenciju naspram

svih poznatih klasa ovih lijekova, uključujući i kolistin koji se zadnjih godina koristi kao zadnja linija obrane protiv infekcija uzrokovanih gram-negativnim bakterijama (Slika 1)<sup>9</sup>. Sve ovo sugerira da je potrebno potražiti drugačije načine liječenja bakterijskih infekcija s alternativnim mehanizmima djelovanja kako bi se efektivno suzbile bakterijske zaraze. Među ostalim, potencijalni novi lijekovi koji najviše obećavaju su: antimikrobni peptidi<sup>9</sup>, probiotici<sup>10</sup>, tvari biljnog podrijetla<sup>11</sup> i bakteriofagi<sup>1</sup>.



Slika 1 Povijesni osvrt razvoja antibiotika zajedno s vremenom pojave bakterija otpornih na antibiotike. Slika preuzeta iz Rončević i sur.<sup>9</sup>

## 2. RAZRADA TEME

### 2.1. Bakteriofagi - povijesni osvrt

Početa istraživanja vezana uz bakteriofage sežu na kraj 19. stoljeća kad je britanski mikrobiolog Ernest Hanbury Hankin otkrio da su uzorci vode indijskih rijeka Gangesa i Yamune sadržavale biološki materijal koji je uspješno uništavao kulture kolere. Ta nepoznata supstanca je mogla proći kroz višestruke miliporne filtere koji se koriste za filtriranje većih mikroorganizama poput bakterija<sup>12</sup>. 1915. godine Frederick Twort je proučavao rast Vaccinia virusa (*Poxviridae*), te je uočio da čiste kulture bakterija mogu biti uništene do sitnih granula od strane prozirne tvari koja uspješno prolazi kroz filterske membrane<sup>13</sup>. Ovaj nepoznati agens je ispitivan na kulturama roda *Micrococcus*, te nije bio sposoban rasti u odsustvu bakterija, a opisan je kao ferment koji se luči od strane mikroorganizama s ulogom koja je ostala nepoznatom u to doba<sup>14</sup>.

Dvije godine kasnije, Felix d'Herelle je u neovisnom istraživanju došao do sličnih rezultata dok je proučavao pacijente koji su bolovali od bakterijske dizenterije. Iz uzoraka stolice pacijenata koji su se oporavljali od šigeloze izolirao je „anti-Shiga mikrob“ filtrirajući uzorke stolice koje su bile prethodno inkubirane 18 h. Taj aktivni filtrat, kada se doda kulturi ili emulziji Shiga bacila, je uzrokovao propadanje spomenute kulture<sup>15</sup>. D'Herelle je opisao svoje otkriće kao mikrob koji je obligatni bakteriofag. Osim toga, provodio je eksperimente na laboratorijskim životinjama zaraženim šigelozom, potvrđujući klinički potencijal svojih istraživanja i djelomično ispunjavajući Kochove postulate. Kasnije je otišao korak dalje i uveo intravenozno liječenje bakteriofagima za invazivne infekcije<sup>16</sup>. Međutim, prvi rad koji je opisao kliničku uporabu faga objavili su Bruynoghe i Maisin, a tiče se tretiranja stafilokok-specifičnih faga koji su uzrokovali karbunkule i furunkule u inficiranih pacijenata. Kada su bakteriofagi bili primjenjivani injekcijom blizu mjesta rane, isti su uspješno reducirali bol, otok i groznicu u inficiranih pacijenata unutar 48 sati<sup>17</sup>.

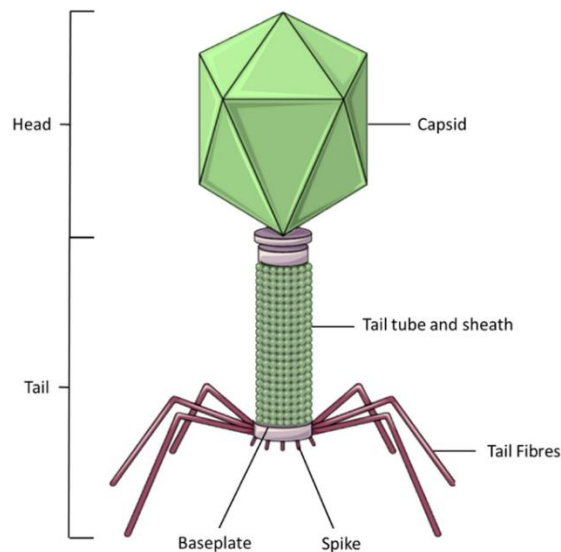
U to vrijeme, točna priroda bakteriofaga je bila predmet rasprave što nije iznenađujuće ukoliko se uzme u obzir da DNK i RNK još nisu bile otkrivene, pa samim time ni biologija faga nije mogla biti razjašnjena. Primjerice, John Northrop je smatrao da su bakteriofagi proizvedeni od strane domaćina stvaranjem inertnog proteina koji se kasnije mijenja u aktivni fag auto-katalitičkom

reakcijom<sup>18</sup>. Međutim, otkriće lizogenog ciklusa (infekcija bakterijske stanice bez indukcije lize) 1925. god. učvrstilo je ideju da sposobnost reprodukcije faga unutar bakterija zahtijeva umetanje materijala kodiranog fagom u nasljedne jedinice mikroba domaćina. U konačnici, otkriće elektronskog mikroskopa omogućilo je detaljnije razjašnjavanje prirode faga, a njemački liječnik Helmut Ruska je prvi opisao okrugle čestice kao i one „oblika sperme“ iz suspenzije faga koje su prijanjale na membrane bakterija<sup>19,20</sup>. Godinu dana kasnije Luria i Anderson su vizualizirali različite tipove faga i opisali njihovu zajedničku strukturu: nehomogenu okruglu glavu s tankim repom koja izgleda poput spermija<sup>21</sup>.

## 2.2. Bakteriofagi u ljudskom organizmu

### 2.1.1. O bakteriofagima općenito

Fagi su obligatni paraziti koji zahtijevaju bakterijskog domaćina za reprodukciju i najbrojniji su i najraznovrsniji biološki organizmi na zemlji<sup>22</sup>. Strukturno, većina faga sastoji se od genoma nukleinske kiseline pakirane unutar proteinske kapside. Kapside faga vrlo su varijabilne, kako u veličini tako i u morfologiji tj. mogu biti poliedarske, filamentozne ili pleomorfne. Neki fagi imaju vanjsku lipidnu membranu uz proteinsku kapsidu, dok drugi imaju samo lipidnu membranu (Slika 2)<sup>23</sup>.



Slika 2 Prikaz geađe bakteriofaga. Slika preuzeta iz Tabitha G. Cunliffe, Alan L. Parker i Alfonso Jaramillo<sup>24</sup>

Veličine genoma faga variraju između ~3,5 kb i ~540 kb i sastoje se od jednolančane ili dvolančane DNK (ssDNK, dsDNK) ili RNK (ssRNK, dsRNK)<sup>25</sup>. Posljedično, genomi faga koji inficiraju različite domaćine rijetko imaju slične sekvence<sup>26</sup>, te predstavljaju mozaičnu strukturu kao rezultat rekombinacije s bakterijama<sup>27</sup> i drugim fagima<sup>23</sup>. Ekstremna varijabilnost i mozaicizam genoma faga značajno kompliciraju taksonomsku klasifikaciju, koja je izvorno izvedena korištenjem zajedničkih, sekvencijskih značajki (npr. morfologija kapside i tip nukleinske kiseline koja sačinjava genom)<sup>23</sup>. Iz tog razloga, u procesu je uvođenje nove klasifikacije virusa prema tipu genomske sekvence, organizaciji genoma i rasponu potencijalnih domaćina<sup>28</sup>.

Fagi se općenito klasificiraju kao virulentni i umjereni, ovisno o njihovom životnom ciklusu. Nakon prepoznavanja i kasnijeg vezanja za specifični receptor na površini bakterijske stanice fag injektira svoj genom u bakterijsku stanicu. Genom faga se potom replicira i eksplicira unutar stanice korištenjem staničnih resursa domaćina prije nego što se nove kompletne virusne čestice (virioni) sastave i oslobode iz bakterijske stanice<sup>29</sup>. Novostvoreni virioni mogu se osloboditi lizom bakterijske stanice u litičkom ciklusu, što je uobičajeno za većinu poznatih faga<sup>29</sup>.

Nasuprot tome, određeni fagi mogu ući u lizogeni ciklus u kojem, nakon umetanja njegovog genoma u bakterijsku stanicu, fag ulazi u stanje mirovanja. Tijekom ovog stadija, genom faga (odnosno profag) se replicira zajedno s genomom domaćina, bilo kao rezultat integracije u bakterijski kromosom ili kao ekstrakromosomska molekula. Lizogeni ciklus obično završava kada određeni podražaj (npr. bakterijski SOS odgovor) inicira litički ciklus i potiče proizvodnju novih viriona i njihovo oslobađanje iz bakterijske stanice<sup>30</sup>.

### 2.1.2. Bakteriofagi crijeva, njihova (ekološka) uloga i značaj

Procjenjuje se da ljudsko tijelo sadrži trideset trilijuna mikroba, dok mikrobni ekosustav crijeva sadrži  $10^{13} - 10^{14}$  procijenjenih mikrobnih stanica po gramu fekalnih tvari<sup>30</sup>. Od tog broja, ljudska crijeva ukupno sadrže  $10^{15}$  faga, dok je broj bakterija 10 puta manji ( $10^{14}$ )<sup>31</sup>. Fagi su u izobilju prisutni u crijevima odakle translokacijom često dospijevaju u peritonealnu šupljinu,<sup>32</sup> a osim u crijevima, brojne metagenomske analize ukazale su na izraženu prisutnost bakteriofaga u

mikrobioti pluća, vagine, kože i usne šupljine<sup>32</sup>. U crijevima, pak, igraju ključnu ulogu u oblikovanju sastava mikrobioma, poticanju bakterijske raznolikosti i olakšavanju horizontalnog prijenosa gena<sup>32</sup>. Zadnji podaci sugeriraju da fagi čine veliku većinu (97,7%) genoma crijevnih virusa, dok su eukariotski i arhealni virusi prisutni u zanemarivom postotku<sup>33</sup>. Usprkos tome, genomski raznolikost crijevnih faga je najvećim dijelom nepoznata zbog *i*) nedostatka univerzalnog marker gena, kao primjerice 16S rRNA gena kod bakterija, *ii*) velike varijabilnosti genoma faga i *iii*) teškoće kultiviranja crijevnih faga<sup>34</sup>.

Danas je potvrđeno da prva kolonizacija i inicijacija crijevne mikrobiote počinje tijekom poroda<sup>35</sup>. Objavljene studije upućuju da je stupanj raznolikosti crijevnih bakterija relativno nizak na početku života novorođenčeta, zatim se brzo mijenjaju u prvih nekoliko dana nakon rođenja, a naposljetku postaju sve raznolikije i stabilnije tijekom vremena<sup>36</sup>. Prva studija koja opisuje zajednicu crijevnih faga dojenčadi provedena je na svježim fekalnim uzorcima (prikupljeno u dojenčadi starosti od jednog tjedna do tri mjeseca)<sup>37</sup>. Brojenje faga pomoću direktne epifluorescencijske mikroskopije (EFM) pokazalo je da mekonij (prva fekalna izlučevina novorođenčeta) nije sadržavao virione ili virusu slične čestice (engl. VLP, *virus like particles*). S druge strane, oko 10<sup>8</sup> VLP-ova po gramu je otkriveno već krajem prvog tjedna života. Nadalje, metagenomske analize sekvenci su pokazale da su sekvence bile pretežito dsDNA grupe faga kao što su *Sipho-*, *Podo-*, i *Myovirusi*. Ova otkrića su u skladu s prethodnim istraživanjima koja sugeriraju da je mikrobna raznolikost niska u crijevima novorođenčadi<sup>37,38</sup>. S druge strane, novije istraživanje od strane Lim i sur.<sup>39</sup> pokazalo je da je najveća bioraznolikost bakteriofaga crijeva bila u novorođenčadi u prva 4 dana života, te se zatim smanjivala sukladno s godinama. Baš kao i crijevne bakterije, zajednica crijevnih faga relativno je stabilna kod odraslih u usporedbi s dojenčadi<sup>40</sup>. Studije su pokazale da zajednicom crijevnih faga dominiraju umjereni fagi (engl. *temperate*) i da su jedinstveni za pojedince bez obzira na potencijalnu genetsku povezanost<sup>41</sup>.

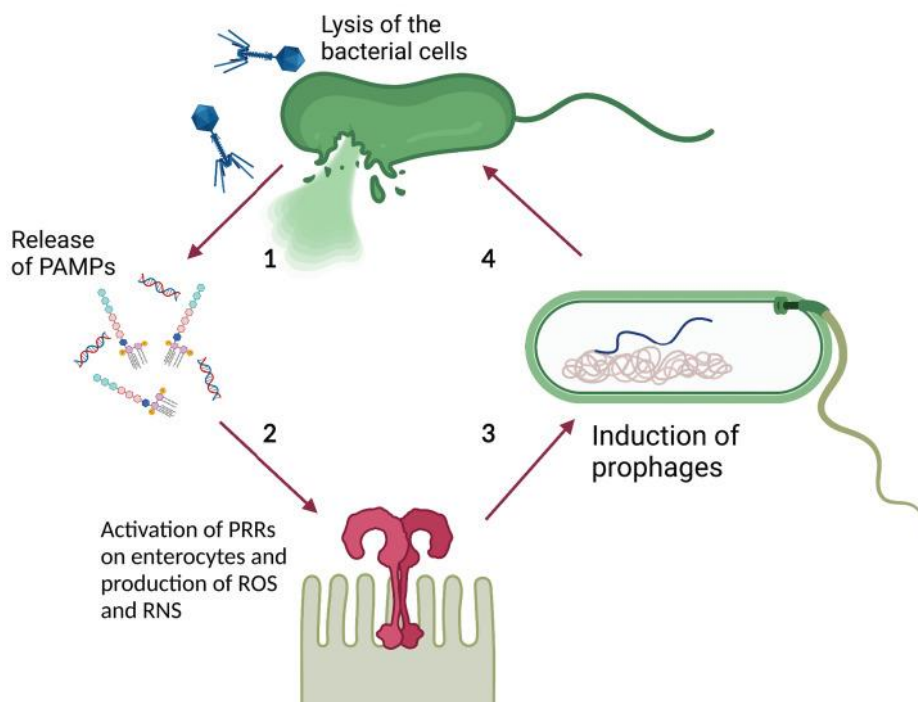
U crijevima, slično kao u makroskopskim ekosustavima<sup>42</sup>, postoji veza između različitih organizama, pa je tako primjerice kod gnotobiotskih miševa (odgajanih u sterilnim uvjetima), fagom posredovana liza bakterijskih populacija imala kaskadne učinke na bakterijske populacije koje nisu bile izravno ciljane predacijom faga<sup>43</sup>. U ljudskom probavnom sustavu, rezidentne mikrobne zajednice imaju snažan utjecaj na imunološki sustav domaćina, a promjene tih zajednica posredovane fagom mogu potaknuti kaskadne učinke koji potencijalno mogu dovesti do promjene

ekosustava mikrobioma i razvoja bolesti<sup>44</sup>. Isto tako, smanjenje komenzalnih bakterijskih populacija posredovano fagom može utjecati na proizvodnju imunomodulatornih spojeva. Pokazalo se da pacijenti s bolestima probavnoga sustava imaju smanjenu razinu *Faecalibacterium prausnitzii*<sup>45</sup> i povećanu razinu faga te bakterije<sup>46</sup>. *F. prausnitzii* igra važnu ulogu pri sintezi butirata u debelom crijevu<sup>47</sup> koji je protuupalna kratkolančana masna kiselina<sup>48</sup>, pa povećana predacija faga može neizravno pridonijeti upali crijeva smanjenjem količine butirata koji proizvodi *F. prausnitzii*.

Slično tome, uočeno je da pacijenti s Parkinsonovom bolešću imaju povećane razine litičkih faga bakterija iz roda *Lactococcus* i smanjene razine tih bakterija u crijevima koje reguliraju propusnost crijeva i proizvode dopamin, pa se može zaključiti da bi predacija faga mogla pridonijeti razvoju ove bolesti<sup>49</sup>. Gledajući širu sliku, smanjenje populacije komenzalnih bakterija crijeva posredovano fagom može dovesti do smanjene proizvodnje imunomodulatornih spojeva od strane bakterija čime se modulira proces upale crijeva. Također, predacija faga može neizravno utjecati na zdravlje probavnog sustava održavajući populaciju komenzalnih bakterija „pod kontrolom“. Fagi osiguravaju imunitet od strane ne-domaćina tako što se vežu na sloj mucina koji okružuje crijevni epitel preko proteina sličnog imunoglobulinu (Ig) koji se nalazi u njihovoj kapsidi. Svojom litičkom aktivnošću i predatorstvom u sloju mucina, fagi sprječavaju kolonizaciju od strane bakterijskih stanica<sup>50</sup> i aktivaciju imunološkog sustava<sup>51</sup>.

Umjereni fagi sposobni su snažno doprinijeti virulenciji bakterijskog domaćina tako što osiguravaju gene za virulentnost što omogućuje izbjegavanje imunološkog sustava ili sintezu toksina<sup>52</sup>. Na taj način, umjereni fagi mogu neizravno izvršiti proupalni učinak u gastrointestinalnom traktu (GIT) i uzrokovati promjene u crijevnom ekosustavu. Fagi mogu utjecati na ekološki sustav crijeva i prelazeći iz lizogenog u litički ciklus što u konačnici dovodi do smrti bakterijskog domaćina<sup>53</sup>. Lin i sur.<sup>53</sup> prepostavili su da indukcija profaga potiče upalu crijeva širenjem integriranih faktora virulencije. Upala crijeva povećava propusnost crijeva na taj način povećavajući razinu kisika u lumenu, a to zauzvrat potiče indukciju profaga kroz mehanizam koji uključuje oksidativni stres putem mehanizma pozitivne povratne sprege. Liza bakterijskih stanica posredovana fagom doprinosi upalnoj bolesti crijeva potičući oslobađanje molekularnih uzoraka povezanih s patogenima (PAMP, engl. *Pathogen Associated Molecular Patterns*) kao što su bakterijska DNK, lipopolisaharid i peptidoglikan<sup>44</sup> i njihovoj izloženosti receptorima za

prepoznavanje uzoraka (PRR, engl. *Pattern Recognition Receptors*) na gastrointestinalnim epitelnim stanicama (npr. TLR, engl. *Toll-like receptors*)<sup>54</sup>. Ovo pokreće proizvodnju reaktivnih kisikovih i reaktivnih dušikovih vrsta (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species* odnosno RNS, engl. *Reactive Nitrogen Species*) koji potiču upalni odgovor domaćina<sup>55</sup> koji može neizravno povećati indukciju profaga. S druge strane, ROS i RNS mogu izravno potaknuti indukciju profaga<sup>56,57</sup> što ukazuje na još jedan mehanizam putem kojeg fagi mogu potaknuti pozitivnu upalnu povratnu petlju (Slika 3).



Slika 2 Teorijski model PAMP-PRR pozitivne povratne sprege za upalu GIT-a posredovane bakteriofagom. 1) Bakterijska liza posredovana fagom uzrokuje oslobađanje PAMP-ova, kao što su bakterijskaDNK i LPS. 2) PAMP-ove prepoznaju PRR-ovi, kao što je TLR, smješteni na površini epitelnih stanica crijeva, što dovodi do proizvodnje ROS-a i RNS-a. 3) ROS i RNS stimuliraju indukciju profaga izravno, oštećujući bakterijskuDNK i aktivirajući SOS odgovor, ili neizravno, stimulirajući upalni odgovor. Upalni odgovor povećava luminalni oksidativni stres uzrokujući oštećenjeDNK čime se aktivira SOS odgovor. 4) Indukcija dormantnog profaga uzrokuje pokretanje litičkog ciklusa faga što rezultira lizom bakterijske stanice. Slika preuzeta iz Zuppi i sur.<sup>34</sup>



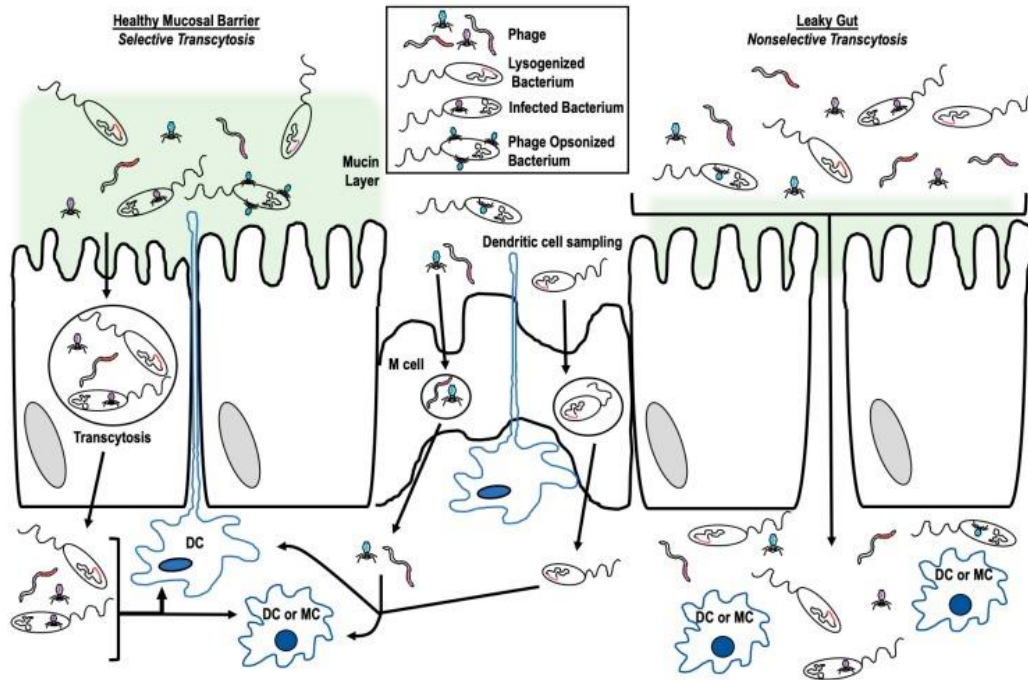
## 2.3. Bakteriofagi i imunološki sustav

### 2.3.1. Metode pristupanja faga imunološkim stanicama urođenog imunološkog sustava

Bakteriofagi se često mogu nalaziti izvan mukoznog sloja u kojem često obitavaju, pa su, među ostalim, pronađeni u krvotoku, slezeni, bubrezima, jetri i mozgu<sup>58</sup>. Ovi virusi posjeduju brojne epitope koje prepoznaje PRR urođenog imunološkog sustava, te koji stimuliraju proizvodnju antifagnih protutijela<sup>59</sup>. Kako bi se inicirao imunološki odgovor vođen prirođenim imunološkim stanicama, bakteriofagi im prvo moraju pristupiti. Ove stanice, uključujući makrofage, dendritične stanice i mastocite lokalizirani su na gastrointestinalnoj sluznici. Oni predstavljaju prve imunološke stanice s kojima se bakteriofagi susreću. Fagi su, u pravilu, obilnije prisutni na površinama sluznice, a neki od njih ekspimiraju proteinske domene specifične za glikoprotein mucin koji se nalazi na epitelu crijeva<sup>60</sup>. Kolifagični T4 (fag crijeva) veže oligosaharidne bočne lance mucinskih proteina pomoću malih domena koje su dio kapsidnih proteina<sup>50</sup>, a ostali *Caudovirales* fagi također imaju slične vezne domene unutar svojih kapsidnih proteina. Ovakav oblik sidrenja povećava priliku za kontakt faga i bakterije, te zauzvrat priliku za zarazu ili lizogenizaciju svog domaćina.

Postoji niz načina na koje fagi mogu prijeći gastrointestinalni epitel (transcitoza) (Slika4):

1. Slobodni unos, gdje se sam fag endocitozira i transportira<sup>61</sup>
2. Trojanski konj, gdje fag sa svojim inficiranim bakterijskim domaćinom ulazi ili se endocitozira zajedno s domaćinom<sup>62,63</sup>
3. Prelazak kroz propusno crijevo, gdje je upala ili ozljeda rezultirala oslabljenom funkcijom barijere što omogućuje pasivni tranzit faga kroz epitel<sup>58</sup>



Slika 3 Mehanizmi transcitoze bakteriofaga za pristup urođenim imunološkim stanicama. Grafički prikaz različitih načina na koje bakteriofag može prijeći epitelnu barijeru sluznice. Dendritičke stanice (DC) i makrofagi (MC) su označeni. Slika preuzeta iz Carroll Portillo i Lin<sup>64</sup>

O mehanizmu slobodnog unosa provedeno je najopsežnije istraživanje od strane Nguyena i sur.<sup>65</sup>. Ispitali su sposobnost faga *Caudovirales* (iz obitelji *Myoviridae*, *Siphoviridae* i *Podoviridae*) specifičnih za različite bakterijske domaćine za translociranje preko epitelnih ili endotelnih staničnih linija. Otkrili su da se transport faga prvenstveno odvija od apikalnog prema bazolateralnom smjeru, te da se najviše 0,1% faga kreće kroz bilo koji monosloj. Tijekom transcitoze, fagi se mogu naći unutar endosomskih odjeljaka, a zanimljivo, isključivo poremećaj Golgijevog aparata uspješno je sprječavao translociranje. Međutim, inhibicija endocitoze posredovane receptorima s primjenom Wortmannina ili inhibicija endocitoze ovisne o klatrinu primjenom klorokina nije inhibirala tranzit faga što ukazuje da bi endocitoza slobodnog T4 kroz epitelnu barijeru mogla biti pasivna. U ovoj studiji nije uočena paracelularna transcitoza T4. Unutar skupine faga postojala je značajna varijacija u postotku svake vrste faga koja je uspješno transcitozirala kroz monosloj MDCK (epitela psećeg bubrega). Transcitoza faga T4 varirala je ovisno o vrsti testiranog staničnog monosloja. Ovi podaci pokazuju da je transcitoza vjerojatno specifična i za fag i za tkivo, tako da se neki fagi mogu lakše kretati kroz određena tkiva, dok drugi uopće ne.

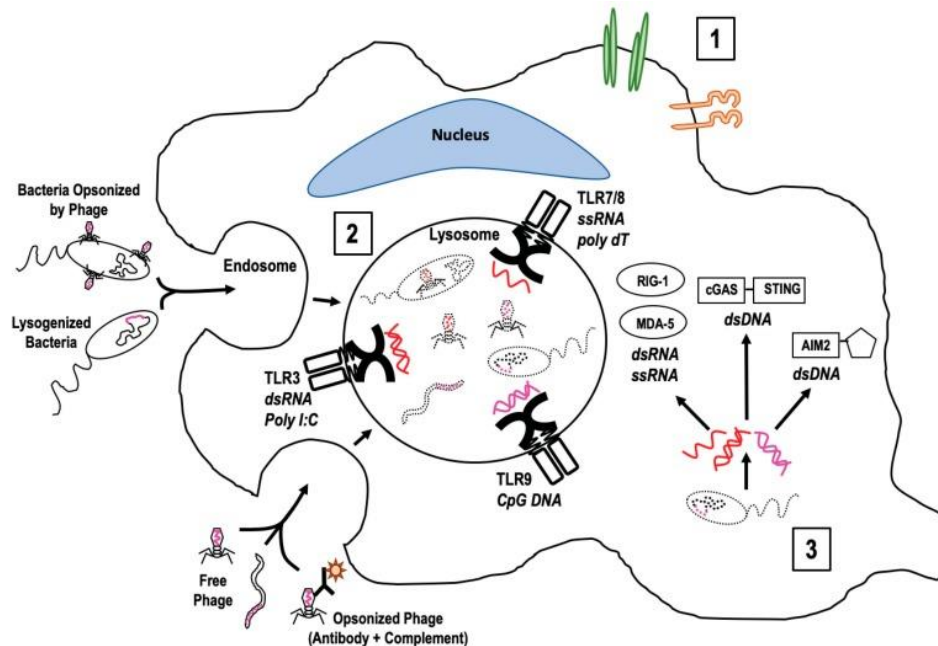
Drugi mehanizam transcitoze faga uključuje transport faga preko barijere dok se nalazi unutar bakterije (trojanski konj). Fagi se mogu „prebaciti“ preko mukozne barijere unutar bakterije koristeći uobičajene putove bakterijske transcitoze<sup>63</sup>. Neki fagi povećavaju vjerojatnost transcitoze povećanjem agregacije bakterija na epitelnim površinama. Primjerice, prisutnost filamentoznog faga rezultira povećanom agregacijom *Neisseria meningitidis* na epitelnim površinama stvaranjem poveznice između stanica i bakterija<sup>66</sup>.

Treći mehanizam translokacije faga javlja se u okruženju propusnih crijeva. U ovom mehanizmu, pojavljuju se otvori između stanica gdje su čvrsti spojevi (engl. *tight junctions*) prije sprječavali paracelularno kretanje (bakterijskih ili virusnih) organizama preko mukozne barijere. U zdravoj mukoznoj barijeri, paracelularni transport ograničen je na molekule koje prolaze kroz pore ili puteve curenja<sup>67</sup>. Ti su putovi ograničeni na 5-10 Å odnosno ispod ~62,5 Å; oba znatno ispod veličine bakteriofaga. Upala, ozljeda ili mikrobnih signali mogu uzrokovati povećanu propusnost epitelne barijere utječući na čvrste spojeve. U ovom slučaju, fagima koji ne bi transcotizirali u zdravim uvjetima, omogućen je pristup stanicama prirodnog imunološkog sustava što omogućuje potencijalno povećanje štetnih proupalnih odgovora i pridonosi daljnjem razvoju bolesnih stanja.

### 2.3.2. Interakcije bakteriofaga s imunološkim sustavom

Budući da nije poznato da bakteriofagi inficiraju stanice sisavaca postavlja se pitanje koja je uloga eukariotskog staničnog mehanizma za otkrivanje bakteriofaga. Pretpostavlja se da te interakcije počivaju na istim signalnim putevima koji se koriste za otkrivanje životinjskih virusa, a u većini slučajeva signaliziranje utječe na prigušivanje upalnog odgovora koji je stimuliran prisutnošću bakterija<sup>68</sup>. Imunološka signalizacija započinje vezanjem liganda s izvanstaničnim ili unutarstaničnim receptorima. Nakon što bakteriofagi dobiju pristup stanicama urođenog imunološkog sustava sluznice, postoji niz mehanizama putem kojih ih te stanice mogu prepoznati (Slika 4), a dijele se u tri skupine:

1. Izvanstanično prepoznavanje
2. Endocitozno prepoznavanje
3. Citoplazmatsko prepoznavanje



Slika 4 Slikovni prikaz tri načina na koje stanice urođenog imunološkog sustava mogu prepoznati bakteriofag kako bi pokrenule imunološku signalizaciju. 1. Izvanstanično prepoznavanje integrinima, membranskim dijelovima ili fag-specifičnim receptorima, 2. Endosomalno prepoznavanje endosomalnim PRR-ovima nakon što se fag u bilo kojem obliku endocitozira i razgradi unutar lizosomskog odjeljka, i 3. Citoplazmatsko prepoznavanje nukleotida bakteriofaga putem različitih receptora kao što su AIM3 čija je glavna uloga nakon prepoznavanja fagne DNK stimulirati lučenje interleukina. Slika preuzeta iz Carroll Portilo i Lin<sup>64</sup>

Izvanstanično prepoznavanje slobodnog faga odvija se pomoću vezanja dijelova stanične površine stanice, integrina ili trenutno nepoznatih fagnih receptora<sup>64</sup>. Fag *Clostridium difficile* adherira na epitelne stanice na fag-specifičan način<sup>70</sup>, pomoću domene Lys-Gly-Asp<sup>69</sup> ili tzv. KGD domene prisutne u T4 kapsidnim proteinima čiji se homolozi vežu na integrin<sup>71,72</sup> što ukazuje na moguće interakcije fag-integrin. Osim KGD domena, T4 i ostalih članova *Caudovirales* također posjeduju kapsidne proteine s domenama sličnom Ig<sup>73</sup>. Hoc protein T4 kapside sadrži tri ovakve domene,<sup>74</sup> za koje je dokazano da utječu na vezanje faga za sloj mucina.<sup>50</sup>

Endocitozno prepoznavanje počinje endocitozom slobodnog faga, opsoniziranog faga (s vezanim antitijelima i komplementom) ili zaražene bakterije nakon čega slijedi kretanje duž lizosomskog puta<sup>75</sup>. Degradacija lizosomskog sadržaja znači da su epitopi faga izloženi PRR-u unutar endosomskog odjeljka. U slučaju lizogeniziranih bakterija, to zahtijeva razgradnju bakterijskih membrana. Integrirana fagna DNK se tada oslobađa zajedno s bakterijskom DNK. U slučaju bakterija zaraženih fagom i bakteriofaga, razgradnja virusne (proteinske) kapside oslobađa fagne nukleotide koji omogućuju detekciju pomoću PRR. PRR uključuje niz endosomski

povezanih TLR-ova koji detektiraju nukleinske kiseline, uključujući TLR3 (veže dsRNA i poli I:C), TLR7 i 8 (veže ssRNA i poli dT) i TLR9 (veže CpGDNK)<sup>76</sup>.

Citoplazmatsko prepoznavanje DNK faga unutar eukariotskog domaćina još nije u potpunosti opisano ali najvjerojatnije se odvija s fagom koji inficira unutarstanične bakterije kao što su *Chlamydia*, *Mycobacterium* i *Listeria*<sup>64</sup>. Najsloženiji dio ovog aktivacijskog puta je pristup nukleinske kiseline faga citoplazmatskom prostoru. Epitopi intracelularnog bakteriofaga vjerojatno bi postali izloženi u citoplazmi nakon bakterijske smrti ili fagom inducirane bakterijske lize<sup>64</sup>.

## 2.3. Terapija bakteriofagima

### 2.3.1. Učinkovitost faga protiv kliničkih značajnih patogena

Nedavna istraživanja na životinjskim modelima demonstrirala su mogućnosti terapije bakteriofagima protiv niza klinički značajnih patogena. Primjerice, preživljavanje miševa oboljelih od crijevne sepse uzrokovane *Pseudomonas aeruginosa* bilo je 66,7% nakon oralne primjena faga, u usporedbi s 0% u kontrolnoj skupini (Tablica 1)<sup>77</sup>. U hrčkovom modelu ileocecitisa izazvanog *Clostridium difficile* jedna doza faga pokazala se kao dovoljna profilaksa protiv infekcije, dok su tretmani fagom nakon infekcije spasili 11 od 12 inficiranih miševa, a kontrolne životinje koje su primale *C. difficile* i klindamicin uginule su unutar 96 h (Tablica 1)<sup>78</sup>. Kombinacije faga također značajno smanjuju rast *C. difficile in vitro* i ograničavaju proliferaciju *in vivo* u modelu hrčka<sup>79</sup>. Intraperitonealna primjena jednog soja faga bila je dovoljna za preživljavanje cijele populacije miševa u modelima bakterijemije uzrokovane aplicirajući *Enterococcus faecium* otpornu na vankomicin, *Escherichia coli* koja proizvodi  $\beta$ -laktamazu proširenog spektra i *P. aeruginosa* otpornu na imipenem (Tablica 1). Isto tako, postoji indikacija da su fagi sposobni obnoviti osjetljivost na antibiotike kod bakterija otpornih na antibiotike, kao u slučaju *P. aeruginosa* otporne na više lijekova<sup>80</sup>.

Ispitivanja terapije fagom na ljudima odvijala su se gotovo kroz cijelo stoljeće na nekoliko instituta u istočnoj Europi, od kojih su najpoznatiji Eliava institut za bakteriofage (Tbilisi, Gruzija) i Institut za imunologiju i eksperimentalnu terapiju (Wroclaw, Poljska). Institut Eliava opsežno je koristio fage u prekliničkom i kliničkom liječenju uobičajenih bakterijskih infekcija uzrokovanih patogenima kao što su *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella spp.* i *Enterococcus spp.*<sup>81</sup>. U kliničkom ispitivanju iz 1938. godine, 219 pacijenata s bakterijskom dizenterijom (138 djece i 81 odrasla osoba) liječeno je isključivo koktelom faga koji se sastojao od različitih faga koji ciljaju *Shigella flexneri*, *Shigella shiga*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* i *B*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* i *Enterococcus spp.* Kokteli su primjenjivani oralno i rektalno. U roku od 24 sata, 28% pacijenata s krvlju u stolici oslobodilo se ovog simptoma, dok je daljnjih 27% pokazalo poboljšanje unutar 2-3 dana. Sveukupno, 74% od 219 pacijenata pokazalo je poboljšanje ili su simptomi potpuno nestali<sup>81</sup>.

Trenutačno ne postoje proizvodi za fagnu terapiju odobreni za ljudsku upotrebu u EU ili SAD-u. Međutim, u prehrambenoj industriji postoji nekoliko komercijalnih pripravaka faga koji se koriste za kontrolu bakterijskih patogena, a koje je odobrila FDA (engl. *Food and Drug Administration*) pod klasifikacijom "općenito se smatraju sigurnima". Ovi pripravci se između ostalih koriste protiv *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *MRSA*, *E. coli O157:H7*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter spp.* i *Pseudomonas syringae*.<sup>82</sup> Brojna istraživanja potencijalne učinkovitosti terapije fagima su sažeta u Tablici 1.

Tablica 1 Objavljeni otkrića o terapiji fagima kod ljudi i na životinjskim modelima. Preuzeto i obrađeno iz Lin i sur.<sup>83</sup>

Uzročnik	Model	Stanje	Način primjene	Sažetak rezultata
<i>Shigella dysenteriae</i>	Čovjek	Dizenterija	Oralno	Sve četiri liječene osobe oporavile su se nakon 24 sata.
<i>Vibrio cholerae</i>	Čovjek	Kolera	Oralno	68 od 73 ispitanika preživjelo je u liječenoj skupini, a samo 44 od 118 u kontrolnoj skupini.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Miš	Sepsa	Oralno	66,7% smanjena smrtnost.
<i>Clostridium difficile</i>	Hrčak	Illeoecitis	Oralno	Istodobna primjena s <i>C. difficile</i> spriječila je infekciju.
<i>Enterococcus faecium</i> otporan na vankomicin	Miš	Bakterijemija	Intraperitonealna injekcija	100% smanjena smrtnost.
<i>E. coli</i> koja proizvodi $\beta$ -laktamazu	Miš	Bakterijemija	Intraperitonealna injekcija	100% smanjena smrtnost.
<i>P. aeruginosa</i> otporna na imipenem	Miš	Bakterijemija	Intraperitonealna injekcija	100% smanjena smrtnost.
<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> i <i>Staphylococcus aureus</i>	Miš	Sepsa	Intraperitonealna injekcija	Životinje zaštićene od smrtonosne doze <i>A. baumannii</i> i <i>P. aeruginosa</i> , ali ne i <i>S. aureus</i> .
<i>E. coli</i>	Miš	Meningitis i sepsa	Intraperitonealna injekcija ili subkutanozna	100% odnosno 50% smanjena smrtnost za meningitis i sepsu.



Višestruko rezistentni <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Miš	Sepsa	Intraperitonealna injekcija i oralna primjena	92% i 84% smanjena smrtnost intraperitonealnim, odnosno oralnim putem
---	-----	-------	---	---

## 2.4. Terapija fagima naspram 'klasične' antibiotske terapije

### 2.4.1. Prednosti terapije fagima

Bakteriofagi imaju vrlo uzak spektar djelovanja čime je izbjegnuta najvažniji problem vezan isključivo uz primjenu antibiotika, a to je utjecaj na cjelokupni mikrobiom uz eliminaciju potencijalno korisnih bakterija, prekomjerni rast sekundarnih uzročnika i pojavu rezistentnih bakterija.<sup>84</sup> Kod ljudi su podaci koji potvrđuju specifičnost djelovanja bakteriofaga prikazani u istraživanju kojeg su proveli Sarker i sur.<sup>85</sup> Zdrave odrasle osobe su tijekom 2 dana uzimale oralni koktel od devet bakteriofaga *E. coli* sličnih T4 . Nakon 5 dana, iako su se bakteriofagi mogli detektirati u fecesu gotovo svih liječenih subjekata, nije uočena promjena sastava crijevne mikrobiote. Druge prednosti terapije bakteriofaga uključuju bolju podnošljivost jer se repliciraju samo u ciljnoj bakteriji, ali ne mogu zaraziti stanice sisavaca<sup>86</sup>. Štoviše, primjena je lakša, budući da bakteriofagi ne trebaju ponovljene primjene ubrzo jednu nakon druge tijekom nekoliko dana, kao što je obično slučaj s antibioticima, jer oni mogu ostati u ljudskom tijelu relativno dulje vrijeme, tj. do nekoliko dana<sup>86</sup>. Općenito, potrebno je vrlo malo doza zbog porasta koncentracije bakteriofaga na mjestu infekcije nakon početne primjene.

Pomoću novih isplativih tehnologija sekvenciranja DNK i sinteze DNK u velikim razmjerima, bakteriofagi se mogu sintetizirati tako da mogu prevladati neka ograničenja liječenja antibioticima. Dobar primjer su bakteriofagi koji mogu raspršiti biofilmove<sup>87</sup>. U *in vitro* studiji, Lu i Collins sintetizirali su bakteriofage koji ekspimiraju enzim koji uspješno razgrađuje biofilm sintetiziran od strane *E. coli*<sup>87</sup>. Na ovaj način, bio je moguć simultani napad na strukturu biofilma, ali i na bakterijske stanice čime se uspješno smanjio broj stanica bakterijskog biofilma za 99,9%. Isto tako, genetske modifikacije faga mogu pomoći pri liječenju infekcija uzrokovanih bakterijama koje su rezistentne na određene antibiotike. Uvođenje gena *rpsL* i *gyrA* pozitivno je utjecalo na osjetljivost bakterija na dva antibiotika: streptomycin i nalidiksičnu kiselinu. Utvrđeno je da su



nakon genetskog inženjeringa faga, bakterijske populacije ponovno postale osjetljivije na spomenute antibiotike iako su prethodno populacije bakterija bile otporne<sup>88</sup>. Konačno, uporaba bakteriofaga mogla bi biti jeftinija od upotrebe antibiotika čije su mete patogeni rezistentni na više lijekova. U maloj skupini pacijenata koji su patili od meticilin-rezistentne infekcije *Staphylococcus aureus*, Miedzybrodzki i sur.<sup>89</sup> otkrili su da uporaba faga značajno smanjuje troškove zdravstvene skrbi.

#### 2.4.2. Nedostaci terapije fagima

Nekoliko je nedostataka terapije fagima, ali spomenut ćemo samo one značajnije. Jedan od nedostataka je izbor učinkovitog bakteriofaga za bakterijske infekcije pri čemu se mora dokazati da je specifičan za dati bakterijski soj. Genom bakteriofaga mora biti sekvenciran i ne smije sadržavati gene integracije, kao u lizogenom tipu, gene otporne na antibiotike, gene za toksine kodirane fagom ili gene za druge čimbenike virulencije bakterija<sup>90</sup>.

Drugi nedostatak terapije fagima je mogućnost pojave bakterija otpornih na bakteriofage. Bakterije mogu razviti niz obrambenih mehanizama protiv bakteriofaga kao što su promjena ili gubitak receptora, lučenje tvari koje sprječavaju adheziju faga na membranu bakterija i sl.<sup>91</sup>. Razvoj bakterijske rezistencije na bakteriofage može se smanjiti upotrebom bakteriofagnog koktela (kombinacija više faga specifičnih za više sojeva bakterija) ili kombinacijom s antibioticima<sup>92</sup>.

Treći nedostatak je smanjena aktivnost zbog odgovora imunološkog sustava što nije začuđujuća činjenica jer ih imunološki sustav može prepoznati i potaknuti promjene koje smanjuju učinkovitost terapije bakteriofagima. Imunološki odgovor naspram bakteriofaga dokazan je kod ljudi i kod životinja. Kod životinja bakteriofage su ingestirale fagocitne stanice nekoliko minuta nakon primjene i te su ih stanice bile sposobne uništiti unutar 2 sata<sup>93</sup>. Dodatna istraživanja preživljavanja T7 bakteriofaga u krvi zdravih i imunokompromitiranih miševa, pokazala su da su kod životinja s teškom kombiniranom imunodeficijencijom titri bakteriofaga bili stabilni dugo vremena dok je u zdravih miševa 99% bakteriofaga eliminirano unutar sat vremena. Budući da su titri faga ostali stabilni u miševa s nedostatkom B-stanica, čini se da je najveći dio eliminacije faga

iz krvi posljedica specifične proizvodnje protutijela<sup>94</sup>. Kod ljudi specifična protutijela na bakteriofage se mogu otkriti u 80% pojedinaca iako nitko nije prethodno primio bakteriofagnu terapiju<sup>95</sup>. Međutim, čak i ako nije u potpunosti dokazano, čini se vjerojatnim da imunološki odgovor izazvan fagom ima malen ili nikakav utjecaj na bakteriofagnu terapiju jer se liza bakterijskih stanica događa prije sinteze specifičnih protutijela. Isto tako, primjena faga općenito nije bila povezana s oštećenjem tkiva, povećanjem proupalnih citokina ili povećanom proizvodnjom reaktivnih kisikovih vrsta (ROS)<sup>96</sup>.

Četvrti nedostatak terapije fagima je potencijalno pogodovanje razvoju bakterijske otpornosti na antibiotike. Lizogeni fagi ugrađuju vlastitu DNK u bakterijski genom. Kao rezultat toga mogu igrati ulogu u širenju gena otpornosti na antibiotike, dok se zbog transdukcije, teoretski, mogu razviti nove bakterije otpornije na antibiotike u odnosu na prethodnike<sup>97</sup>. Veliki broj faga koji nose gene povezane s rezistencijom na antibiotike otkriven je u sekretima i tkivima pacijenata koji pate od ponavljajućih infekcija uzrokovanih patogenima otpornim na antibiotike i koji su prethodno opetovano liječeni antimikrobnim lijekovima<sup>98</sup>. Jedan od primjera su pacijenti koji boluju od cistične fibroze. Analizom >1000 kratkih sekvenci virusa kod takvih osoba identificirano je 66 gena za efluksnu pumpu, 15 gena za otpornost na fluorokinolone i 9 gena za  $\beta$ -laktamazu. Ova i slična otkrića dovela su do pretpostavke da bi fagi mogli biti sredstva prilagodbe bakterijama na specifičan okoliš (pluća kod osoba oboljelih od cistične fibroze) i za pojavu i selekciju patogena rezistentnih na više lijekova<sup>99</sup>. Međutim, nedavna ponovna procjena prethodno prikupljenih podataka sugerira da je brojnost gena otpornosti na antibiotike u fagima uvelike precijenjena i da je rizik od transdukcije, iako moguć, manji nego što se prije mislilo. U nekoliko studija zaključci su bili pogrešni zbog prekomjernog sadržaja bakterijske DNK u proučavanim uzorcima dok su istovremeno korišteni neadekvatni pristupi za otkrivanje gena otpornosti na antibiotike u genomima faga<sup>100</sup>.

### 3. ZAKLJUČAK

Upotreba bakteriofaga kao novih klasa lijekova u borbi protiv multirezistentnih bakterija za sada pokazuje obećavajuće rezultate. Međutim, desetljeća istraživanja, koja uključuju prekliničke i kliničke faze još uvijek ne daju jednoznačne rezultate koji bi mogli garantirati skorašnju uporabu u kliničkoj praksi. Takvih istraživanja je do sada provedeno svega nekoliko, a rezultati su djelomično zabrinjavajući zbog potencijalnih problema poput transmisije genetičkog materijala, rizika od povećanja bakterijske rezistencije na antibiotike i sl. Osim toga možemo se zapitati da li je jedino ispravno promatrati bakteriofage isključivo u kontekstu njihove antimikrobne aktivnosti. Bi li imalo smisla da ovi virusi reagiraju s eukariotskim domaćinom kad bi njihova uloga bila jedino i isključivo inficiranje bakterija? Iz dosadašnjih istraživanja je vidljivo da bakteriofagi utječu na eukariotskog domaćina tako što aktiviraju imunološki sustav. Međutim, poznavanje ovih procesa je još uvijek ograničeno, vrlo vjerojatno i zbog još uvijek ograničenih eksperimentalnih mogućnosti gdje često promatramo jednu izoliranu vrstu bakteriofaga dok su oni u prirodnom okolišu okruženi s mnoštvom drugih vrsta bakteriofaga i bakterija. Sasvim sigurno, daljnje proučavanje bakteriofaga i njihova tripartitnog odnosa s bakterijskim i eukariotskim domaćinom može u budućnosti dati odgovore koji će pomoći razumijevanju njihove cjelokupne uloge u mikrobiomu i njihove primjene kao novih potencijalnih antimikrobnih lijekova.

## 4. LITERATURA

- (1) Golkar, Z.; Bagasra, O.; Pace, D. G. Bacteriophage Therapy: A Potential Solution for the Antibiotic Resistance Crisis. *J Infect Dev Ctries* **2014**, *8* (2), 129–136. <https://doi.org/10.3855/jidc.3573>.
- (2) Gould, I. M.; Bal, A. M. New Antibiotic Agents in the Pipeline and How They Can Help Overcome Microbial Resistance. *Virulence* **2013**, *4* (2), 185–191. <https://doi.org/10.4161/viru.22507>.
- (3) Wright, G. D. Something Old, Something New: Revisiting Natural Products in Antibiotic Drug Discovery. *Can J Microbiol* **2014**, *60* (3), 147–154. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0063>.
- (4) Sengupta, S.; Chattopadhyay, M. K.; Grossart, H.-P. The Multifaceted Roles of Antibiotics and Antibiotic Resistance in Nature. *Front Microbiol* **2013**, *4*, 47. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00047>.
- (5) K, G. Antibiotics: From Prehistory to the Present Day. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2016**, *71* (3). <https://doi.org/10.1093/jac/dkv484>.
- (6) Ej, B.; Ms, K.; Gj, A.; Dl, M.; Ar, V. Tetracycline-Labeled Human Bone from Ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science (New York, N.Y.)* **1980**, *209* (4464). <https://doi.org/10.1126/science.7001623>.
- (7) Cook, M.; Molto, E.; Anderson, C. Fluorochrome Labelling in Roman Period Skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt. *Am J Phys Anthropol* **1989**, *80* (2), 137–143. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330800202>.
- (8) Zaffiri, L.; Gardner, J.; Toledo-Pereyra, L. H. History of Antibiotics. From Salvarsan to Cephalosporins. *J Invest Surg* **2012**, *25* (2), 67–77. <https://doi.org/10.3109/08941939.2012.664099>.
- (9) Rončević, T.; Puizina, J.; Tossi, A. Antimicrobial Peptides as Anti-Infective Agents in Pre-Post-Antibiotic Era? *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (22), 5713. <https://doi.org/10.3390/ijms20225713>.

- (10) Shi, L. H.; Balakrishnan, K.; Thiagarajah, K.; Mohd Ismail, N. I.; Yin, O. S. Beneficial Properties of Probiotics. *Trop Life Sci Res* **2016**, *27* (2), 73–90. <https://doi.org/10.21315/tlsr2016.27.2.6>.
- (11) Cowan, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* **1999**, *12* (4), 564–582.
- (12) *Hankin: L'action bactericide des eaux de la Jumna...* - Google znalac. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?journal=Ann+Inst+Pasteur+\(Paris\)&title=L%E2%80%99action+bactericide+des+eaux+de+la+Jumna+et+du+Gange+sur+le+vibrion+du+c+holera&author=EH+Hankin&volume=10&publication\\_year=1896&pages=511-23&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Ann+Inst+Pasteur+(Paris)&title=L%E2%80%99action+bactericide+des+eaux+de+la+Jumna+et+du+Gange+sur+le+vibrion+du+c+holera&author=EH+Hankin&volume=10&publication_year=1896&pages=511-23&) (accessed 2022-12-02).
- (13) Twort, F. W. An Investigation on The Nature of Ultra-Microscopic Viruses. *The Lancet* **1915**, *186* (4814), 1241–1243. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)20383-3).
- (14) Wittebole, X.; De Roock, S.; Opal, S. M. A Historical Overview of Bacteriophage Therapy as an Alternative to Antibiotics for the Treatment of Bacterial Pathogens. *Virulence* **2014**, *5* (1), 226–235. <https://doi.org/10.4161/viru.25991>.
- (15) Savage, D. C. Microbial Biota of the Human Intestine: 17.
- (16) d'Herelle, F. Bacteriophage as a Treatment in Acute Medical and Surgical Infections. *Bull N Y Acad Med* **1931**, *7* (5), 329–348.
- (17) *Bruynoghe: Essais de thérapeutique au moyen du bacteriop...* - Google znalac. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?journal=Compt+Rend+Soc+Biol.&title=Essais+de+th%C3%A9rapeutique+au+moyen+du+bacteriophage+du+Staphylocoque&author=R+Bruynoghe&author=J+Maisin&volume=85&publication\\_year=1921&pages=1120-1&](https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Compt+Rend+Soc+Biol.&title=Essais+de+th%C3%A9rapeutique+au+moyen+du+bacteriophage+du+Staphylocoque&author=R+Bruynoghe&author=J+Maisin&volume=85&publication_year=1921&pages=1120-1&) (accessed 2022-12-03).
- (18) Northrop, J. H. Concentration And Purification of Bacteriophage. *Journal of General Physiology* **1938**, *21* (3), 335–366. <https://doi.org/10.1085/jgp.21.3.335>.
- (19) Ruska, H. Die Sichtbarmachung der bakterio-phagen Lyse im ubermikroskop. *Naturwissenschaften* **1940**, *28* (3), 45–46. <https://doi.org/10.1007/BF01486931>.
- (20) Kruger, D.; Schneck, P.; Gelderblom, H. Helmut Ruska and the Visualisation of Viruses. *The Lancet* **2000**, *355* (9216), 1713–1717. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02250-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02250-9).
- (21) Luria, S. E.; Anderson, T. F. The Identification and Characterization of Bacteriophages with the Electron Microscope. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1942**, *28* (4), 127-130.1.

- (22) Suttle, C. A. Viruses in the Sea. *Nature* **2005**, *437* (7057), 356–361. <https://doi.org/10.1038/nature04160>.
- (23) Dion, M. B.; Oechslin, F.; Moineau, S. Phage Diversity, Genomics and Phylogeny. *Nat Rev Microbiol* **2020**, *18* (3), 125–138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>.
- (24) Cunliffe, T. G.; Parker, A. L.; Jaramillo, A. Pseudotyping Bacteriophage P2 Tail Fibers to Extend the Host Range for Biomedical Applications. *ACS Synth. Biol.* **2022**, *11* (10), 3207–3215. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00629>.
- (25) Sausset, R.; Petit, M. A.; Gaboriau-Routhiau, V.; De Paepe, M. New Insights into Intestinal Phages. *Mucosal Immunol* **2020**, *13* (2), 205–215. <https://doi.org/10.1038/s41385-019-0250-5>.
- (26) Grose, J. H.; Casjens, S. R. Understanding the Enormous Diversity of Bacteriophages: The Tailed Phages That Infect the Bacterial Family Enterobacteriaceae. *Virology* **2014**, *0*, 421–443. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.08.024>.
- (27) Harrison, E.; Brockhurst, M. A. Ecological and Evolutionary Benefits of Temperate Phage: What Does or Doesn't Kill You Makes You Stronger. *BioEssays* **2017**, *39* (12), 1700112. <https://doi.org/10.1002/bies.201700112>.
- (28) Simmonds, P.; Adams, M. J.; Benkő, M.; Breitbart, M.; Brister, J. R.; Carstens, E. B.; Davison, A. J.; Delwart, E.; Gorbalenya, A. E.; Harrach, B.; Hull, R.; King, A. M. Q.; Koonin, E. V.; Krupovic, M.; Kuhn, J. H.; Lefkowitz, E. J.; Nibert, M. L.; Orton, R.; Roossinck, M. J.; Sabanadzovic, S.; Sullivan, M. B.; Suttle, C. A.; Tesh, R. B.; van der Vlugt, R. A.; Varsani, A.; Zerbini, F. M. Virus Taxonomy in the Age of Metagenomics. *Nat Rev Microbiol* **2017**, *15* (3), 161–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.177>.
- (29) Hobbs, Z.; Abedon, S. T. Diversity of Phage Infection Types and Associated Terminology: The Problem with 'Lytic or Lysogenic.' *FEMS Microbiology Letters* **2016**, *363* (7), fnw047. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw047>.
- (30) Oppenheim, A. B.; Kobilier, O.; Stavans, J.; Court, D. L.; Adhya, S. Switches in Bacteriophage Lambda Development. *Annu. Rev. Genet.* **2005**, *39* (1), 409–429. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.113656>.
- (31) Qv, L.; Mao, S.; Li, Y.; Zhang, J.; Li, L. Roles of Gut Bacteriophages in the Pathogenesis and Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Front Cell Infect Microbiol* **2021**, *11*, 755650. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.755650>.

- (32) *Frontiers* | *Phages in the Human Body*.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.00566/full> (accessed 2023-07-15).
- (33) Gregory, A. C.; Zablocki, O.; Zayed, A. A.; Howell, A.; Bolduc, B.; Sullivan, M. B. The Gut Virome Database Reveals Age-Dependent Patterns of Virome Diversity in the Human Gut. *Cell Host Microbe* **2020**, *28* (5), 724-740.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.08.003>.
- (34) Zuppi, M.; Hendrickson, H. L.; O'Sullivan, J. M.; Vatanen, T. Phages in the Gut Ecosystem. *Front Cell Infect Microbiol* **2022**, *11*, 822562. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.822562>.
- (35) Salazar, N.; Arboleya, S.; Valdés, L.; Stanton, C.; Ross, P.; Ruiz, L.; Gueimonde, M.; de los Reyes-Gavilán, C. G. The Human Intestinal Microbiome at Extreme Ages of Life. Dietary Intervention as a Way to Counteract Alterations. *Front Genet* **2014**, *5*, 406. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00406>.
- (36) Manrique, P.; Bolduc, B.; Walk, S. T.; van der Oost, J.; de Vos, W. M.; Young, M. J. Healthy Human Gut Phageome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113* (37), 10400–10405. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601060113>.
- (37) Breitbart, M.; Haynes, M.; Kelley, S.; Angly, F.; Edwards, R. A.; Felts, B.; Mahaffy, J. M.; Mueller, J.; Nulton, J.; Rayhawk, S.; Rodriguez-Brito, B.; Salamon, P.; Rohwer, F. Viral Diversity and Dynamics in an Infant Gut. *Research in Microbiology* **2008**, *159* (5), 367–373. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.04.006>.
- (38) Magne, F.; AbÃ©ly, M.; Boyer, F.; Morville, P.; Pochart, P.; Suau, A. Low Species Diversity and High Interindividual Variability in Faeces of Preterm Infants as Revealed by Sequences of 16S rRNA Genes and PCR-Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis Profiles: Diversity and Variability in Faeces of Preterm Infants. *FEMS Microbiology Ecology* **2006**, *57* (1), 128–138. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00097.x>.
- (39) Lim, E. S.; Zhou, Y.; Zhao, G.; Bauer, I. K.; Droit, L.; Ndao, I. M.; Warner, B. B.; Tarr, P. I.; Wang, D.; Holtz, L. R. Early Life Dynamics of the Human Gut Virome and Bacterial Microbiome in Infants. *Nat Med* **2015**, *21* (10), 1228–1234. <https://doi.org/10.1038/nm.3950>.
- (40) Lawrence, D.; Baldridge, M. T.; Handley, S. A. Phages and Human Health: More Than Idle Hitchhikers. *Viruses* **2019**, *11* (7), 587. <https://doi.org/10.3390/v11070587>.
- (41) Reyes, A.; Haynes, M.; Hanson, N.; Angly, F. E.; Heath, A. C.; Rohwer, F.; Gordon, J. I. Viruses in the Fecal Microbiota of Monozygotic Twins and Their Mothers. *Nature* **2010**, *466* (7304), 334–338. <https://doi.org/10.1038/nature09199>.

- (42) Chapin, F. S.; Matson, P. A.; Vitousek, P. M. *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology*; Springer New York: New York, NY, 2011. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9504-9>.
- (43) Hsu, B. B.; Gibson, T. E.; Yeliseyev, V.; Liu, Q.; Lyon, L.; Bry, L.; Silver, P. A.; Gerber, G. K. Dynamic Modulation of the Gut Microbiota and Metabolome by Bacteriophages in a Mouse Model. *Cell Host Microbe* **2019**, *25* (6), 803-814.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.05.001>.
- (44) Tetz, G.; Tetz, V. Bacteriophages as New Human Viral Pathogens. *Microorganisms* **2018**, *6* (2), 54. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020054>.
- (45) Sokol, H.; Seksik, P.; Furet, J. P.; Firmesse, O.; Nion-Larmurier, I.; Beaugerie, L.; Cosnes, J.; Corthier, G.; Marteau, P.; Doré, J. Low Counts of Faecalibacterium Prausnitzii in Colitis Microbiota. *Inflamm Bowel Dis* **2009**, *15* (8), 1183–1189. <https://doi.org/10.1002/ibd.20903>.
- (46) Cornuault, J. K.; Petit, M.-A.; Mariadassou, M.; Benevides, L.; Moncaut, E.; Langella, P.; Sokol, H.; De Paepe, M. Phages Infecting Faecalibacterium Prausnitzii Belong to Novel Viral Genera That Help to Decipher Intestinal Viromes. *Microbiome* **2018**, *6*, 65. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0452-1>.
- (47) Segain, J.; de la Bletiere, D. R.; Bourreille, A.; Leray, V.; Gervois, N.; Rosales, C.; Ferrier, L.; Bonnet, C.; Blottiere, H.; Galmiche, J. Butyrate Inhibits Inflammatory Responses through NFκB Inhibition: Implications for Crohn's Disease. *Gut* **2000**, *47* (3), 397–403. <https://doi.org/10.1136/gut.47.3.397>.
- (48) Liu, H.; Wang, J.; He, T.; Becker, S.; Zhang, G.; Li, D.; Ma, X. Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? *Adv Nutr* **2018**, *9* (1), 21–29. <https://doi.org/10.1093/advances/nmx009>.
- (49) Tetz, G.; Brown, S. M.; Hao, Y.; Tetz, V. Parkinson's Disease and Bacteriophages as Its Overlooked Contributors. *Sci Rep* **2018**, *8*, 10812. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29173-4>.
- (50) Barr, J. J.; Auro, R.; Furlan, M.; Whiteson, K. L.; Erb, M. L.; Pogliano, J.; Stotland, A.; Wolkowicz, R.; Cutting, A. S.; Doran, K. S.; Salamon, P.; Youle, M.; Rohwer, F. Bacteriophage Adhering to Mucus Provide a Non-Host-Derived Immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (26), 10771–10776. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305923110>.
- (51) Wells, J. M.; Brummer, R. J.; Derrien, M.; MacDonald, T. T.; Troost, F.; Cani, P. D.; Theodorou, V.; Dekker, J.; Méheust, A.; de Vos, W. M.; Mercenier, A.; Nauta, A.; Garcia-Rodenas, C. L. Homeostasis of the Gut Barrier and Potential Biomarkers. *Am J Physiol*



- Gastrointest Liver Physiol* **2017**, *312* (3), G171–G193.  
<https://doi.org/10.1152/ajpgi.00048.2015>.
- (52) Penadés, J. R.; Chen, J.; Quiles-Puchalt, N.; Carpena, N.; Novick, R. P. Bacteriophage-Mediated Spread of Bacterial Virulence Genes. *Current Opinion in Microbiology* **2015**, *23*, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.019>.
- (53) Lin, D. M.; Lin, H. C. A Theoretical Model of Temperate Phages as Mediators of Gut Microbiome Dysbiosis. *F1000Res* **2019**, *8*, F1000 Faculty Rev-997. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18480.1>.
- (54) Takeuchi, O.; Akira, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* **2010**, *140* (6), 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>.
- (55) Rokutan, K.; Kawahara, T.; Kuwano, Y.; Tominaga, K.; Nishida, K.; Teshima-Kondo, S. Nox Enzymes and Oxidative Stress in the Immunopathology of the Gastrointestinal Tract. *Semin Immunopathol* **2008**, *30* (3), 315–327. <https://doi.org/10.1007/s00281-008-0124-5>.
- (56) Diard, M.; Bakkeren, E.; Cornuault, J. K.; Moor, K.; Hausmann, A.; Sellin, M. E.; Loverdo, C.; Aertsen, A.; Ackermann, M.; De Paepe, M.; Slack, E.; Hardt, W.-D. Inflammation Boosts Bacteriophage Transfer between *Salmonella* Spp. *Science* **2017**, *355* (6330), 1211–1215. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8451>.
- (57) Łoś, J. M.; Łoś, M.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, G. Hydrogen Peroxide-Mediated Induction of the Shiga Toxinconverting Lambdoid Prophage ST2-8624 in *Escherichia Coli* O157:H7. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2010**, *58* (3), 322–329. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2009.00644.x>.
- (58) Górski, A.; Wazna, E.; Dabrowska, B.-W.; Dabrowska, K.; Switała-Jeleń, K.; Miedzybrodzki, R. Bacteriophage Translocation. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2006**, *46* (3), 313–319. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00044.x>.
- (59) Dąbrowska, K.; Miernikiewicz, P.; Piotrowicz, A.; Hodyra, K.; Owczarek, B.; Lecion, D.; Kaźmierczak, Z.; Letarov, A.; Górski, A. Immunogenicity Studies of Proteins Forming the T4 Phage Head Surface. *J Virol* **2014**, *88* (21), 12551–12557. <https://doi.org/10.1128/JVI.02043-14>.
- (60) Grondin, J. A.; Kwon, Y. H.; Far, P. M.; Haq, S.; Khan, W. I. Mucins in Intestinal Mucosal Defense and Inflammation: Learning From Clinical and Experimental Studies. *Front Immunol* **2020**, *11*, 2054. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02054>.

- (61) Tian, Y.; Wu, M.; Liu, X.; Liu, Z.; Zhou, Q.; Niu, Z.; Huang, Y. Probing the Endocytic Pathways of the Filamentous Bacteriophage in Live Cells Using Ratiometric PH Fluorescent Indicator. *Adv. Healthcare Mater.* **2015**, *4* (3), 413–419. <https://doi.org/10.1002/adhm.201400508>.
- (62) Duerkop, B. A.; Hooper, L. V. Resident Viruses and Their Interactions with the Immune System. *Nat Immunol* **2013**, *14* (7), 654–659. <https://doi.org/10.1038/ni.2614>.
- (63) Hsia, R.; Ohayon, H.; Gounon, P.; Dautry-Varsat, A.; Bavoil, P. M. Phage Infection of the Obligate Intracellular Bacterium, Chlamydia Psittaci Strain Guinea Pig Inclusion Conjunctivitis. *Microbes and Infection* **2000**, *2* (7), 761–772. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)90356-3](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)90356-3).
- (64) Carroll-Portillo, A.; Lin, H. C. Bacteriophage and the Innate Immune System: Access and Signaling. *Microorganisms* **2019**, *7* (12), 625. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7120625>.
- (65) Nguyen, S.; Baker, K.; Padman, B. S.; Patwa, R.; Dunstan, R. A.; Weston, T. A.; Schlosser, K.; Bailey, B.; Lithgow, T.; Lazarou, M.; Luque, A.; Rohwer, F.; Blumberg, R. S.; Barr, J. J. Bacteriophage Transcytosis Provides a Mechanism To Cross Epithelial Cell Layers. *mBio* **2017**, *8* (6), e01874-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01874-17>.
- (66) Bille, E.; Meyer, J.; Jamet, A.; Euphrasie, D.; Barnier, J.-P.; Brissac, T.; Larsen, A.; Pelissier, P.; Nassif, X. A Virulence-Associated Filamentous Bacteriophage of Neisseria Meningitidis Increases Host-Cell Colonisation. *PLoS Pathog* **2017**, *13* (7), e1006495. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006495>.
- (67) Roxas, J. L.; Viswanathan, V. K. Modulation of Intestinal Paracellular Transport by Bacterial Pathogens. In *Comprehensive Physiology*; Terjung, R., Ed.; Wiley, 2018; pp 823–842. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170034>.
- (68) Miernikiewicz, P.; Kłopot, A.; Soluch, R.; Szkuta, P.; Kęska, W.; Hodyra-Stefaniak, K.; Konopka, A.; Nowak, M.; Lecion, D.; Kaźmierczak, Z.; Majewska, J.; Harhala, M.; Górski, A.; Dąbrowska, K. T4 Phage Tail Adhesin Gp12 Counteracts LPS-Induced Inflammation In Vivo. *Front Microbiol* **2016**, *7*, 1112. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01112>.
- (69) Gorski, A.; Dabrowska, K.; Switala-Jeleń, K.; Nowaczyk, M.; Weber-Dabrowska, B.; Boratynski, J.; Wietrzyk, J.; Opolski, A. New Insights into the Possible Role of

- Bacteriophages in Host Defense and Disease. *Med Immunol* **2003**, 2, 2. <https://doi.org/10.1186/1476-9433-2-2>.
- (70) Shan, J.; Ramachandran, A.; Thanki, A. M.; Vukusic, F. B. I.; Barylski, J.; Clokie, M. R. J. Bacteriophages Are More Virulent to Bacteria with Human Cells than They Are in Bacterial Culture; Insights from HT-29 Cells. *Sci Rep* **2018**, 8, 5091. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23418-y>.
- (71) Nykvist, P.; Tasanen, K.; Viitasalo, T.; Käpylä, J.; Jokinen, J.; Bruckner-Tuderman, L.; Heino, J. The Cell Adhesion Domain of Type XVII Collagen Promotes Integrin-Mediated Cell Spreading by a Novel Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276 (42), 38673–38679. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102589200>.
- (72) Prasad, K. S. S.; Andre, P.; He, M.; Bao, M.; Manganello, J.; Phillips, D. R. Soluble CD40 Ligand Induces B3 Integrin Tyrosine Phosphorylation and Triggers Platelet Activation by Outside-in Signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, 100 (21), 12367–12371. <https://doi.org/10.1073/pnas.2032886100>.
- (73) Fraser, J. S.; Yu, Z.; Maxwell, K. L.; Davidson, A. R. Ig-Like Domains on Bacteriophages: A Tale of Promiscuity and Deceit. *Journal of Molecular Biology* **2006**, 359 (2), 496–507. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.03.043>.
- (74) Sathaliyawala, T.; Islam, M. Z.; Li, Q.; Fokine, A.; Rossmann, M. G.; Rao, V. B. Functional Analysis of the Highly Antigenic Outer Capsid Protein, Hoc, a Virus Decoration Protein from T4-like Bacteriophages. *Mol Microbiol* **2010**, 77 (2), 444–455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07219.x>.
- (75) Aronow, R.; Danon, D.; Shahar, A.; Aronson, M. Electron Microscopy of In Vitro Endocytosis of T2 Phage By Cells From Rabbit Peritoneal Exudate. *J Exp Med* **1964**, 120 (5), 943–954.
- (76) Noppert, S. J.; Fitzgerald, K. A.; Hertzog, P. J. The Role of Type I Interferons in TLR Responses. *Immunol Cell Biol* **2007**, 85 (6), 446–457. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100099>.
- (77) Watanabe, R.; Matsumoto, T.; Sano, G.; Ishii, Y.; Tateda, K.; Sumiyama, Y.; Uchiyama, J.; Sakurai, S.; Matsuzaki, S.; Imai, S.; Yamaguchi, K. Efficacy of Bacteriophage Therapy against Gut-Derived Sepsis Caused by *Pseudomonas Aeruginosa* in Mice. *Antimicrob Agents Chemother* **2007**, 51 (2), 446–452. <https://doi.org/10.1128/AAC.00635-06>.

- (78) Ramesh, V.; Fralick, J. A.; Rolfe, R. D. Prevention of Clostridium Difficile -Induced Ileocectitis with Bacteriophage. *Anaerobe* **1999**, *5* (2), 69–78. <https://doi.org/10.1006/anae.1999.0192>.
- (79) Nale, J. Y.; Spencer, J.; Hargreaves, K. R.; Buckley, A. M.; Trzepiński, P.; Douce, G. R.; Clokie, M. R. J. Bacteriophage Combinations Significantly Reduce Clostridium Difficile Growth In Vitro and Proliferation In Vivo. *Antimicrob Agents Chemother* **2016**, *60* (2), 968–981. <https://doi.org/10.1128/AAC.01774-15>.
- (80) Chan, B. K.; Sstrom, M.; Wertz, J. E.; Kortright, K. E.; Narayan, D.; Turner, P. E. Phage Selection Restores Antibiotic Sensitivity in MDR Pseudomonas Aeruginosa. *Sci Rep* **2016**, *6*, 26717. <https://doi.org/10.1038/srep26717>.
- (81) Kutateladze, M.; Adamia, R. Phage Therapy Experience at the Eliava Institute. *Médecine et Maladies Infectieuses* **2008**, *38* (8), 426–430. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.06.023>.
- (82) Schofield, D. A.; Sharp, N. J.; Vandamm, J.; Molineux, I. J.; Spreng, K. A.; Rajanna, C.; Westwater, C.; Stewart, G. C. Bacillus Anthracis Diagnostic Detection and Rapid Antibiotic Susceptibility Determination Using ‘Bioluminescent’ Reporter Phage. *Journal of Microbiological Methods* **2013**, *95* (2), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.013>.
- (83) Lin, D. M.; Koskella, B.; Lin, H. C. Phage Therapy: An Alternative to Antibiotics in the Age of Multi-Drug Resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* **2017**, *8* (3), 162–173. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>.
- (84) Domingo-Calap, P.; Delgado-Martínez, J. Bacteriophages: Protagonists of a Post-Antibiotic Era. *Antibiotics (Basel)* **2018**, *7* (3), 66. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030066>.
- (85) Sarker, S. A.; McCallin, S.; Barretto, C.; Berger, B.; Pittet, A.-C.; Sultana, S.; Krause, L.; Huq, S.; Bibiloni, R.; Bruttin, A.; Reuteler, G.; Brüssow, H. Oral T4-like Phage Cocktail Application to Healthy Adult Volunteers from Bangladesh. *Virology* **2012**, *434* (2), 222–232. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.002>.
- (86) Kakasis, A.; Panitsa, G. Bacteriophage Therapy as an Alternative Treatment for Human Infections. A Comprehensive Review. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2019**, *53* (1), 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.004>.

- (87) Lu, T. K.; Collins, J. J. Dispersing Biofilms with Engineered Enzymatic Bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104* (27), 11197–11202. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704624104>.
- (88) Edgar, R.; Friedman, N.; Molshanski-Mor, S.; Qimron, U. Reversing Bacterial Resistance to Antibiotics by Phage-Mediated Delivery of Dominant Sensitive Genes. *Applied and Environmental Microbiology* **2012**, *78* (3), 744. <https://doi.org/10.1128/AEM.05741-11>.
- (89) Miedzybrodzki, R.; Fortuna, W.; Weber-Dabrowska, B.; Górski, A. Phage Therapy of Staphylococcal Infections (Including MRSA) May Be Less Expensive than Antibiotic Treatment. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **2007**, *61*, 461–465.
- (90) Principi, N.; Silvestri, E.; Esposito, S. Advantages and Limitations of Bacteriophages for the Treatment of Bacterial Infections. *Front Pharmacol* **2019**, *10*, 513. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00513>.
- (91) Seed, K. D.; Faruque, S. M.; Mekalanos, J. J.; Calderwood, S. B.; Qadri, F.; Camilli, A. Phase Variable O Antigen Biosynthetic Genes Control Expression of the Major Protective Antigen and Bacteriophage Receptor in *Vibrio Cholerae* O1. *PLoS Pathog* **2012**, *8* (9), e1002917. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002917>.
- (92) Torres-Barceló, C. Phage Therapy Faces Evolutionary Challenges. *Viruses* **2018**, *10* (6), 323. <https://doi.org/10.3390/v10060323>.
- (93) Kaźmierczak, Z.; Piotrowicz, A.; Owczarek, B.; Hodyra, K.; Miernikiewicz, P.; Lecion, D.; Harhala, M.; Górski, A.; Dąbrowska, K. Molecular Imaging of T4 Phage in Mammalian Tissues and Cells. *Bacteriophage* **2014**, *4*, e28364. <https://doi.org/10.4161/bact.28364>.
- (94) Srivastava, A. S.; Kaido, T.; Carrier, E. Immunological Factors That Affect the in Vivo Fate of T7 Phage in the Mouse. *Journal of Virological Methods* **2004**, *115* (1), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.09.009>.
- (95) Dąbrowska, K.; Miernikiewicz, P.; Piotrowicz, A.; Hodyra, K.; Owczarek, B.; Lecion, D.; Kaźmierczak, Z.; Letarov, A.; Górski, A. Immunogenicity Studies of Proteins Forming the T4 Phage Head Surface. *J Virol* **2014**, *88* (21), 12551–12557. <https://doi.org/10.1128/JVI.02043-14>.
- (96) Miernikiewicz, P.; Dąbrowska, K.; Piotrowicz, A.; Owczarek, B.; Wojas-Turek, J.; Kicielińska, J.; Rossowska, J.; Pajtasz-Piasecka, E.; Hodyra, K.; Macegoniuk, K.; Rzewucka, K.; Kopciuch, A.; Majka, T.; Letarov, A.; Kulikov, E.; Maciejewski, H.; Górski, A. T4 Phage

- and Its Head Surface Proteins Do Not Stimulate Inflammatory Mediator Production. *PLoS One* **2013**, *8* (8), e71036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071036>.
- (97) Maiques, E.; Úbeda, C.; Tormo, M. Á.; Ferrer, M. D.; Lasa, Í.; Novick, R. P.; Penadés, J. R. Role of Staphylococcal Phage and SaPI Integrase in Intra- and Interspecies SaPI Transfer. *J Bacteriol* **2007**, *189* (15), 5608–5616. <https://doi.org/10.1128/JB.00619-07>.
- (98) Fancello, L.; Desnues, C.; Raoult, D.; Rolain, J. M. Bacteriophages and Diffusion of Genes Encoding Antimicrobial Resistance in Cystic Fibrosis Sputum Microbiota. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2011**, *66* (11), 2448–2454. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr315>.
- (99) Jm, R.; L, F.; C, D.; D, R. Bacteriophages as Vehicles of the Resistome in Cystic Fibrosis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2011**, *66* (11). <https://doi.org/10.1093/jac/dkr318>.
- (100) Enault, F.; Briet, A.; Bouteille, L.; Roux, S.; Sullivan, M. B.; Petit, M.-A. Phages Rarely Encode Antibiotic Resistance Genes: A Cautionary Tale for Virome Analyses. *ISME J* **2017**, *11* (1), 237–247. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.90>.