Perspektywiczne możliwości wykorzystania kombinacji działania bakteriofagów i nanomateriałów w zwalczaniu chorób bakteryjnych u zwierząt

PAWEŁ NAWROTEK, XYMENA STACHURSKA, ADRIAN AUGUSTYNIAK*

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt,
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, al. Piastów 45, 70-311 Szczecin

*Building Materials and Construction Chemistry, Technische Universität Berlin, Gustav-Meyer-Allee 25, 13355 Berlin

Otrzymano 22.08.2019

Zaakceptowano 09.12.2019

Nawrotek P., Stachurska X., Augustyniak A.

Potential of using bacteriophages and nanomaterials for eradicating bacterial diseases in animals

Summary

The appearance of new and the recurrence of old bacterial infections in animals, coupled with a simultaneous epidemic increase in the number of multidrug-resistant strains and accompanying diagnostic problems, causes a growing interest in alternative strategies for prevention and treatment of resultant diseases. Technologies based on therapeutic bacteriophages or various kinds of nanomaterials are very promising and increasingly applied in eradicating harmful enzootic and zoonotic pathogens. A new development in these endeavours may be the combined use of phages (particularly M13, MS2, λ and T-even phages) and nanoparticles for a synergistic effect. Mutual interactions between the two factors depend not only on the type and characteristics of a given nanomaterial and on the morphological type of the phage, but also on their quantity, ambient temperature, and time of exposure. Interactions between nanoparticles and bacteriophages are due to electrostatic effects used in creating hybrid phage-nanomaterial constructs that find application in eradicating bacterial pathogens, including drug-resistant and biofilming ones, as well as in directed drug delivery. One of the methods for creating useful phage-nanomaterial complexes is immobilisation by encapsulation. The entrapment of phages in a liposome structure promotes their replication and activity thanks to the small size and positive electric charge. Liposomal encapsulation protected them from the strongly acidic environment in the stomach, significantly prolonged the possibility of their storage, as well as increased their stability and durability in drinking water and feed without changing the sensory properties of water and feed. Phage-nanomaterial complexes can also be a very precise diagnostic tool for detecting bacterial pathogens in the environment, considerably increasing the sensitivity, specificity and rapidity of detection tests.

Keywords: bacterial diseases, combination therapy, nanoparticles, phage therapy

Produkcja zwierzęca może stanowić podstawowe źródło dochodu rolników i przyczyniać się do wytworzenia ok. 30-35% produktu krajowego brutto. Katastrofalne wybuchy nowych chorób, ponowne pojawianie się starych form zakażeń u zwierząt, a jednocześnie epidemiczny wzrost liczby wielolekoopornych patogenów bakteryjnych oraz towarzyszące temu problemy diagnostyczne i opóźnienia w kontrolowaniu chorób odzwierzęcych mogą jednak tę koniunkturę znacząco odwrócić (6, 46). Z tego względu zachodzi konieczność poszukiwania alternatywnych technologii zapobiegania i leczenia chorób wywoływanych przez groźne szczepy mikroorganizmów, w tym patogennych bakterii.

Odkryte ponad 100 lat temu bakteriofagi (fagi), wirusy specyficzne względem komórek bakteryjnych,

są potężnym narzędziem do budowania różnorodnych samoorganizujących się nanostruktur, które mogą znaleźć zastosowanie w diagnostyce i leczeniu wielu chorób (41). Zainteresowanie nimi gwałtownie wzrosło wobec przypadków nieskuteczności rutynowo stosowanych metod terapeutycznych, chociaż ich wykorzystanie nie zostało jeszcze powszechnie przyjęte przez współczesną medycynę, z wyjątkiem Gruzji, Rosji i Polski, gdzie fagi terapeutyczne stosowane są już od dawna (1). Ponadto, mimo że stosowanie bakteriofagów zwłaszcza podczas prób klinicznych u ludzi wciąż budzi wątpliwości, firmy farmaceutyczne mogą chętniej inwestować w terapię fagową do zastosowań weterynaryjnych (23). Z jednej strony, wykazują znaczący potencjał antybakteryjny i jako pasażowalne jednostki bakteriolityczne są wykorzy-

stywane w jedno- lub wielofagowej (koktajle fagowe) terapii chorób bakteryjnych, w tym wywoływanych przez szczepy wielolekooporne, z drugiej natomiast – można je stosować jako nośniki DNA, białek lub leków (1, 5, 11). Duże znaczenie zyskują też fagowe białka lityczne (endolizyny i hydrolazy) efektywnie degradujące peptydoglikan bakterii Gram-dodatnich, których potencjał wykazano w leczeniu chorób bakteryjnych na modelach zwierzęcych (38). Fagi reprezentują najliczniejszą (ok. 10^{31}) i prawdopodobnie najstarszą, najbardziej zróżnicowaną genetycznie oraz najszybciej powielającą się (ok. 10^{24} infekcji/sek. w skali Ziemi) „formę życia” (20, 26). Złożoność biochemiczna cząsteczek tworzących wirion fagowy oraz jego zróżnicowana wielkość wyrażana w skali nanometrycznej sprawiają, iż bakteriofagi mogą być traktowane jako naturalne nanocząstki zbudowane z makrocząsteczek różniących się ładunkiem i hydrofobowością, które mogą oddziaływać również z innymi materiałami, w tym nanomateriałami (42, 47).

Nanomateriały, to z kolei struktury wytwarzane w skali nano, których co najmniej jeden wymiar wynosi od 1 do 100 nm, a dzięki korzystnemu stosunkowi powierzchni do ich masy mogą być bardziej aktywne biologicznie niż makrocząstki o tym samym składzie chemicznym (6, 7, 16). Rozmiary nanomateriałów zbliżone do elementów subkomórkowych umożliwiają im penetrowanie naturalnych barier, takich jak błony biologiczne, przez co po wprowadzeniu do organizmu mogą dotrzeć do najdrobniejszych naczyń oraz dowolnych typów komórek (31). Projektowaniem, otrzymywaniem i nadawaniem pożądanych właściwości nanocząstkom i nanomateriałom zajmuje się nanotechnologia, rozwijana od lat 50. XX w., która, obok biotechnologii, stała się jedną z najpopularniejszych interdyscyplinarnych dziedzin nauki (7). Obecnie ze względu na dużą różnorodność nanomateriałów proponowane są do zastosowania w diagnozowaniu i leczeniu chorób, podawaniu leków, żywieniu, hodowli i reprodukcji zwierząt oraz produkcji żywności (6, 16). Przede wszystkim podkreśla się jednak ich dużą aktywność przeciwdrobnoustrojową, stanowiącą alternatywę dla obecnie stosowanych metod unieszkodliwiania patogenów, m.in. w środowisku zwierząt gospodarskich (36, 45). Istotnym przykładem zastosowania nanotechnologii jest ukierunkowane dostarczanie leków warunkujące możliwość opracowania krótko- i długoterminowych strategii leczenia groźnych infekcji. Połączenie terapeutycznego z nanocząsteczką pozwala na znaczne poprawienie jego rozpuszczalności i biodostępności, co ułatwia transport leków hydrofobowych do krwiobiegu. Jest to bardzo istotne, ponieważ szacuje się, że aż 40% nowych leków jest słabo rozpuszczalnych w płynach ustrojowych. Ponadto, bezpośrednia interakcja leku z nanomateriałem umożliwia jego kontrolowane uwalnianie lub też dostarczenie dwóch różnych leków jednocześnie w terapii skojarzonej (6).

Przykładem takich nanomateriałów mogą być struktury krzemionkowe, które są uznawane za biokompatybilne, a dzięki możliwości wytworzenia na ich powierzchni mezoporów, mogą być zastosowane jako nośniki leków, substancji przeciwdrobnoustrojowych i fotokatalizatorów (9, 34).

Obie alternatywne technologie wykorzystujące wirusy bakteryjne lub nanomateriały mają swoje zalety, ale mają również wady. Chan i wsp. (11) zaznaczają, że potencjał terapii fagowej wciąż nie może być w pełni wykorzystany z powodu braku pełnego dopasowania do większości zachodnich modeli opracowywania leków, regulacji prawnych i wdrożeń klinicznych. Poza tym, istnieją zastrzeżenia odnośnie bezpieczeństwa stosowania fagoterapii ze względu na obecność lizogennych fagów kodujących cechy antybiotykooporności czy toksynogenezy. Pewne wątpliwości może budzić również zbyt wąskie spektrum aktywności fagów litycznych, alternatywnie rekompensowane mieszkankami (koktajlami) fagowymi, a także pełna efektywność lizy w stosunku do wszystkich komórek wrażliwego szczepu, zbyt szybkie usuwanie fagów z organizmu oraz możliwa obecność komponentów bakterii w preparacie fagowym (20). Zwraca się też uwagę na fakt, iż bakteriofagi mogą wykazywać ograniczoną stabilność w roztworze, a ich miano może ulegać znacznemu spadkowi podczas przetwarzania i przechowywania (30). Natomiast nanocząstki (NPs, nanoparticles), ze względu na właściwości chemiczne, mogą niekorzystnie oddziaływać na organizmy żywe. Podkreśla się, że niektóre nanomateriały (np. nanosrebro) poprzez możliwość penetrowania błon biologicznych, przedstawiania się do wnętrza komórki i uwalniania wysoce reaktywnych jonów w pobliżu wrażliwych organelli oraz potencjalne działanie genotoksyczne, mogą powodować niekorzystne, długofalowe skutki (31). Bogdan i wsp. (7) obawiają się, że ditlenek tytanu może okazać się toksyczny właśnie w postaci nanocząstek, chociaż jednocześnie doceniają jego potencjał i możliwości wykorzystania w terapii antynowotworowej. Wskazują również, że główną przyczyną ograniczającą taką terapię jest trudność w przygotowaniu formuły farmaceutycznej umożliwiającej precyzyjne dostarczenie nanometrycznych fotosensybilizatorów do komórek rakowych (7).

Pomimo tych argumentów potencjał aplikacyjny bakteriofagów lub nanomateriałów jest aktualnie intensywnie rozwijany, podejmowane są jednocześnie próby zwiększenia ich działania i znaczenia, poprzez uzyskanie efektu synergistycznego (47). Tworzenie biohybrydowych materiałów nanostrukturalnych, złożonych zarówno z nieorganicznych nanocząstek, jak i biomolekuł fagowych znajduje wiele nowych możliwości zastosowań w bardzo różnych dziedzinach, w tym takich, jak np. medycyna czy nanobiotechnologia (25, 39).

Mechanizmy interakcji fag–nanomateriał

Sporo wiadomo już na temat interakcji bakterii z nanomateriałami, zwłaszcza w kontekście antybakteryjnego mechanizmu działania nanocząstek metali (srebra, złota, miedzi, palladu lub platyny) i tlenków metali (tzw. nanotlenków), w tym ditlenku tytanu (TiO_2) i tlenku cynku (ZnO). Przyjmuje się, że działanie to zwiększa się wraz ze zmniejszaniem wielkości cząstek i generalnie polega na agregacji na powierzchni komórki bakteryjnej, zmianie właściwości i przepuszczalności błony cytoplazmatycznej, penetracji nanocząstek do wnętrza komórki, uwolnieniu jonów metali i uszkodzeniu materiału genetycznego. Dodatkowo, wzbudzone promieniowaniem UV nanotlenki mogą stanowić źródło powstających na ich powierzchni reaktywnych form tlenu (ROS), które dzięki dużemu potencjałowi oksydacyjnemu powodują niszczenie błon komórkowych (7, 36, 47). Co ciekawe, odmienny charakter oddziaływań bakterii z nanomateriałem odnotowano w przypadku promieniowców z rodzaju *Streptomyces* (4). Pomimo kontaktu z nanosferami tytano-krzemowymi aktywowanymi światłem UV nie stwierdzono tu bowiem rozpadu komórek na skutek dezintegracji ściany komórkowej i błony cytoplazmatycznej, ale wystąpienie wszystkich typowych stadiów rozwojowych promieniowców (tzn. obecność pseudo-grzybni substratowej, powietrznej oraz spor). Ditlenek tytanu, którym funkcjonalizowane były nanosfery krzemowe, przeniknął do komórek *Streptomyces* sp., uległ akumulacji w ziarnach polifosforanów i najprawdopodobniej doprowadził do (wykrytej dodatkowo) zwiększonej sekrecji barwnika, wskazując na potencjalną możliwość stymulowania aktywności bakterii pod wpływem nanomateriału (4). W świetle nieopublikowanych jeszcze wyników badań własnych tego rodzaju przykładów interakcji jest więcej, co perspektywicznie może mieć ogromne znaczenie dla funkcjonowania m.in. mikrobiomu glebowego.

W przypadku wirusów, w tym bakteriofagów, mechanizm interakcji z nanomateriałem może być związany z rodzajem i charakterystyką danego nanomateriału, a także typem morfologicznym faga (17, 47). Wykazano, że nanocząstki ZnO stymulują rozwój lityczny colifaga ssRNA MS2, specyficznego dla pałeczek Gram-ujemnych z gatunku *Escherichia coli*, w następstwie multimeryzacji receptora i zwiększenia aktywności enzymatycznej wirusowej integrazy. Jednocześnie cynk, redukując ujemny ładunek na powierzchni komórki lub wirusa, zmniejsza barierę elektrostatyczną pomiędzy nimi, zwiększając tym samym adsorpcję faga na powierzchni komórki i promując w ten sposób infekcję fagową (47). Przeciwny efekt odnotowali jednak Gokulan i wsp. (17), którzy analizując bakteriofagi infekujące bakterie jelitowe (w tym *Enterobacter* spp. i *Yersinia* spp.), a także ziarniaki z rodzaju *Staphylococcus* wykazali, że nanocząstki

srebra (AgNPs, silver nanoparticles) mają zdolność do inaktywacji tych fagów w zależności od stężenia, temperatury i czasu. Odkryto również, że jedynie nanomateriał o najmniejszych rozmiarach (10 nm) efektywnie inaktywował fagi, podczas gdy nanocząstki większe (75 i 100 nm) nie wykazywały właściwości przeciwwirusowych (17). Znaczna redukcja populacji fagów następowała dopiero po długotrwałej (7 dni) ekspozycji na 10 nm AgNP w temperaturze 37°C i przy zastosowaniu stosunkowo dużej dawki nanomateriału. Generalne efekt był tym większy, im wyższą stosowano dawkę (17). Inaktywujące działanie srebra wobec faga MS2 potwierdzono także, stosując nanocząstki ditlenku tytanu domieszkowanego srebrem (nAg/TiO_2). W tym przypadku wydajność fagowej inaktywacji wzrastała wraz ze wzrostem zawartości srebra w układzie, co może następować w efekcie interakcji wirusowych aminokwasów powierzchniowych ze srebrem (wykazującym wysokie powinowactwo do grup siarczkowych), przy czym na powierzchni kapsydu wirusa MS2 znajduje się 183 odsłoniętych reszt cysteinowych (24, 27).

Inny przykład interakcji z udziałem nanocząstek srebra i bakteriofagów wskazuje na pozytywny efekt oddziaływań elektrostatycznych między głównymi białkami kapsydu faga a nanomateriałem (39). Wykorzystując faga filamentarnego M13 P9b, specyficznego dla pałeczek *Pseudomonas aeruginosa* i zmodyfikowanego (z użyciem metody phage display) w celu prezentacji na jego powierzchni białek zapewniających bezpośrednie połączenie z AgNP, stwierdzono, że stabilność takiego zestawu jest znacząco wyższa przy wartościach pH powyżej punktu izoelektrycznego (pI) wyznaczonego dla cząsteczki faga oraz dodatkowej obecności jonów Na^+ i Cl^- . Pozwala to na konstruowanie hybrydowych sieci nanostrukturalnych składających się z klonu fagowego bezpośrednio połączonego z określonym nanomateriałem (39). Otrzymane w ten sposób aktywne kompleksy fag–nanomateriał mogą być wykorzystywane do ukierunkowanego dostarczania genów i leków (25, 39). Działanie takich biohybrydowych nanomateriałów może odbywać się na podobnej zasadzie jak koniugaty nano- TiO_2 z przeciwciałami monoklonalnymi precyzyjnie nakierowujące lek na receptor docelowy (7).

Interakcja fagów i nanomateriałów może się jednak także odbywać na poziomie genetycznym. Pośrednio odbywać się to może w momencie, gdy fag nie wchodzi w cykl lityczny (w postaci kompletnego wirionu o aktywności infekcyjnej), ale funkcjonuje w komórce jako wbudowany w genom bakteryjny, lizogen. Guo i wsp. (21) wykazali, że nanocząstki tlenku miedzi (CuONPs, copper oxide nanoparticles) bezpośrednio oddziałują na profaga obecnego w gospodarzu bakteryjnym *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, ponieważ w odpowiedzi na ekspozycję wysokich stężeń CuONP (50 mg/L) jedynie geny bakteriofaga Pfl (PA0717-

PA0728) ulegały największej ekspresji. Co więcej, podczas ekspozycji bakterii na nanocząstki CuO nie zaobserwowano, aby fag lizogenny ulegał indukcji, wchodząc w cykl lityczny (21).

Bakteriofagi mogą wchodzić w interakcje z nanomateriałami również poprzez immobilizowanie metodą kapsułkowania. Przykładowo, zamknięcie fagów w strukturze liposomu promuje ich replikację i aktywność, dzięki niewielkim rozmiarom ($\varnothing$ ok. 300 nm) oraz dodatniemu ładunkowi elektrycznemu między +31,6 i +35,1 mV (pH 6,1) (13). Liposomy, obok np. polimerycznych mikrosfer, dendrymerów, hybryd lipid-polimer itp., stanowią obecnie biokompatybilne nanoskalowe nośniki leków (6, 32, 40, 48). Nanocząstki te są pęcherzykami zbudowanymi z jednej, kilku lub kilkunastu przestrzeni wodnych oddzielonych od siebie zamkniętymi koncentrycznie dwuwarstwami lipidów naturalnych i/lub syntetycznych (32). Zakresy ich rozmiarów są zależne od rodzaju powstałych pęcherzyków i różnicują je na pęcherzyki wielowarstwowe (> 200 nm), duże pęcherzyki jednowarstwowe (100-400 nm) oraz małe jednowarstwowe pęcherzyki (< 100 nm) (18). W celu wyeliminowania możliwości wylapywania liposomów przez komórki fagocytarne, dotarcia w większej ilości do komórek docelowych oraz zwiększenia efektywności działania, strukturę liposomów modyfikuje się poprzez dołączanie do ich powierzchni hydrofilowych grup karboksylowych lub polimerów (48). Dzięki tym właściwościom różne cząsteczki, w tym takie jak białka i kwasy nukleinowe, mogą być zamykane w ich wnętrzu (cząstki hydrofilowe), wbudowywane do dwuwarstwy (cząstki hydrofobowe) lub przyłączane do powierzchni dwuwarstwy lipidowej (32). Colom i wsp. (13) wykazali, że kapsułkowanie liposomowe fagów wykazujących aktywność bakteriolityczną względem pałeczek z rodzaju *Salmonella* zabezpieczało je przed silnie kwaśnym (pH 2,8) środowiskiem żołądka, a jednocześnie znacznie zwiększało efektywność eradykacji tych patogenów u brojlerów otrzymujących je drogą *per os*. W ten sposób wydłużono też możliwość przechowywania preparatu przez co najmniej 3 miesiące (w temperaturze 4°C) oraz zapewniono jego stabilność i trwałość po dodaniu do wody pitnej i paszy. Badacze ci (13) założyli, że liposomy zapewniały optymalny transfer fagów do organizmu, ze względu na dwie podstawowe funkcje, tzn. pełniąc rolę bariery dla protonów, chroniącej fagi przed kwasem żołądkowym oraz promując właściwości mukoadhezyjne, ze względu na dodatni ładunek na ich powierzchni, co może zapewnić dłuższe utrzymywanie się fagów w jelitach. Dla porównania, inni badacze (33) w celu ochrony fagów podczas ich przechodzenia z żołądka do dystalnych części przewodu pokarmowego u szczurów musieli podawać równocześnie różne leki unieczyniające sok żołądkowy, takie jak ranitydyna czy omeprazol.

Potencjalne możliwości wykorzystania kombinacji fag–nanomateriał

Niebezpieczne zakażenia bakteryjne są nierozwalnie związane z procesem chowu i hodowli zwierząt. Fakt ten nabrał tym większego znaczenia, im powszechniej stosowano antybiotyki jako np. tzw. antybiotykowe stymulatory wzrostu (ASW), w celu przyspieszenia tempa wzrostu, poprawy wykorzystania paszy i zmniejszenia śmiertelności zwierząt gospodarskich. Działania te w dużej mierze przyczyniły się do obniżenia wartości konsumpcyjnej produktów mięsnych, jak również do wyselekcjonowania wielolekoopornych patogenów bakteryjnych, które dodatkowo szybko rozprzestrzeniły to zjawisko w środowisku rolniczym (43). Dlatego też wzrasta ilość badań koncentrujących się na opracowaniu alternatywnych metod terapii i profilaktyki chorób zakaźnych, które zapewniłyby odpowiednio skuteczny i trwały efekt. Obok dobrze poznanych probiotyków, prebiotyków, zakwaszaczy, ekstraktów roślinnych, neutraceutyków (miedź i cynk), stanowiących dodatki do pasz oraz nowszych rozwiązań wykorzystujących potencjał prozdrowotny i ekologiczny, m.in. peptydów przeciwdrobnoustrojowych, przeciwciał żółtkowych, olejków eterycznych, siary bydłowej i wielu innych związków, coraz większe zainteresowanie mogą budzić innowacyjne systemy bazujące na efekcie synergizmu wykorzystywanego w celowanych działaniach kombinowanych (12, 25, 43). Stosowanie takich strategii wydaje się konieczne, zwłaszcza na różnych etapach procesu produkcji zwierzęcej, podczas którego istotnym elementem prewencji jest ukierunkowana, miejscowa eliminacja patogenów bakteryjnych, np. występujących w świniskiej gnojowicy (19).

Perspektywicznie możliwe jest opracowanie specyficznych preparatów opartych na kombinacji działania fagów i nanomateriałów wykorzystywanych nie tylko do eradykacji, ale przypuszczalnie także do sanizacji, biokontroli czy biokonserwacji, w przypadku większości patogenów bakteryjnych, w tym lekoopornych i biofilmujących, których obecność stwarza zagrożenie sanitarno-epidemiologiczne i jednocześnie przynosi straty ekonomiczne w chowie i hodowli zwierząt (2, 28). Poza wielokrotnionym i swoistym efektem bakteriobójczym, preparaty takie mogą równocześnie charakteryzować się dużą stabilnością i aktywnością podczas przechowywania oraz aplikowania na różne sposoby, m.in. jako dodatek do paszy i wody (2, 13). Kompleksy fagów z nanomateriałami mogą być również bardzo precyzyjnym narzędziem diagnostycznym znajdującym zastosowanie w wykrywaniu patogenów bakteryjnych w środowisku. Sprzężone z fagiem T7 nanocząstki o właściwościach magnetycznych zostały wykorzystane do szybkiej detekcji pałeczek *E. coli* w wodzie pitnej (41). W tym przypadku cząsteczki magnetytu służyły do wychwytywania komórek bak-

teryjnych, a związany z nimi bakteriofag doprowadzał do zliżowania komórek, uwalniając endogenną β -galaktozydazę, która następnie wykrywana była z użyciem odpowiedniego substratu kolorymetrycznego. Czułość tej metody pozwoliła na wykrycie obecności pałeczek okrężnicy w ilości 1×10^4 jednostek tworzących kolonię w 1 mL wody już w niespełna 2,5 godziny. Dodatkowo,

strategia ta okazała się wysoce specyficzna względem konkurencyjnych bakterii (41). Jeszcze czulszy i szybszy test diagnostyczny, oparty na nanoprętach funkcjonalizowanych cząsteczkami złota (GNRs, gold nanorods) i bakteriofagach T4 specyficznych dla *E. coli* wykrywanych za pomocą spektroskopii Ramana, opracowano w celu skuteczniejszej identyfikacji bakterii chorobotwórczych już na poziomie jednej komórki (35). Możliwości wykorzystania kombinacji działania fagów i nanomateriałów w zwalczaniu chorób bakteryjnych u zwierząt przedstawiono na rycinie 1.

Wielce obiecująca wydaje się ponadto możliwość zastosowania fagów jako bezpośrednich nośników dla nanomateriałów (3, 22, 39). W tym kontekście dużą rolę mogą odgrywać zwłaszcza nanocząstki wirusopodobne (VLPs, virus-like particles) dzięki możliwości wprowadzania specyficznych modyfikacji kapsydu fagowego. Przykładem może być zastosowanie VLPs bakteriofaga MS2 do selektywnego dostarczania zarówno nanocząstek, jak i leków chemioterapeutycznych, koktajli siRNA czy toksyn białkowych, bezpośrednio do komórek rakowych (3).

Kompleksy fag–nanomateriał w terapii antybakteryjnej

Dzięki możliwości wiązania fagów z nanomateriałami dostępna może stać się nowa metoda zapobiegania i leczenia ciężkich infekcji bakteryjnych, oparta na wykorzystaniu potencjału obu (dobrze już poznanych) czynników antybakteryjnych (39). Bakteriofagi są doskonałym kandydatem do dostarczania leków, dzięki naturalnej zdolności wprowadzania swojego materiału genetycznego do komórki wrażliwej bakterii oraz łatwości ich modyfikowania i sprzęgania z różnymi substancjami i materiałami. Co więcej, można je wykorzystać do samodzielnego składania nanomateriałów z udziałem cząsteczek nieorganicznych, takich jak: złoto, srebro, ditlenek tytanu, miedź, aluminium i wiele

Ryc. 1. Potencjalne możliwości wykorzystania kombinacji działania bakteriofagów i nanomateriałów w zwalczaniu chorób bakteryjnych u zwierząt; linią przerywaną zaznaczono perspektywiczne obszary zastosowania

innych (41). Spośród licznych grup bakteriofagów, jako zaprojektowane precyzyjne nośniki środków terapeutycznych i markerów diagnostycznych, obecnie można stosować fagi filamentarne (szczególnie M13), a także fagi MS2, λ i fagi T-parzyste. Po opracowaniu mogą one stanowić idealny konstrukt nanomateriałowo-fagowy dostarczający odpowiednie biomolekuły do określonego celu, jednocześnie unikając neutralizacji przez układ odpornościowy (22). Cernei i wsp. (10) zastosowali w tym celu bakteriofaga λ immobilizowanego na powierzchni superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPIONs, superparamagnetic iron oxide nanoparticles) sugerując, że działanie to może znacznie zwiększyć jego potencjał aplikacyjny, w tym związany z leczeniem ciężkich zakażeń bakteryjnych. Z kolei dzięki immobilizacji kowalencyjnej polegającej na utworzeniu silnego wiązania kowalencyjnego między grupami funkcyjnymi główki fagowej i nośnika, opracowano materiał opatrunkowy zawierający bakteriofagi aktywne wobec *P. aeruginosa* osadzone na nanowłóknach polikaprolaktonu (PCL), które wykazywały natychmiastową, prawie 100-procentową skuteczność, nawet po 25 cyklach prania tego materiału. Uzyskano w ten sposób odporny i nietoksyczny opatrunek pomocny w leczeniu bakteryjnych infekcji skórnych (37).

Dodatkowy proces kapsułkowania bakteriofagów (np. w liposomach) pozwala skutecznie dostarczyć lub przedłużyć ich uwalnianie w docelowym miejscu zakażenia, a także zwiększyć czas utrzymywania się w organizmie. Może to znaleźć zastosowanie w leczeniu zakażeń układowych, wewnątrzkomórkowych lub w leczeniu zapobiegawczym (30). Co więcej, kapsułkowanie fagów może wspomóc efektywność fagów również w przypadku eradykacji bakteryjnych patogenów żywności. Ustalono, że proces ten przeprowadzony z użyciem trzech rodzajów pęcherzykowych nośników, takich jak: liposomy oraz (podobne do

nich, ale zawierające środki powierzchniowo czynne) niosomy i transfersomy, pozwalały utrzymać stabilność i zakaźność faga phiPLA-RODI, infekującego Gram-dodatnie ziarniaki *Staphylococcus aureus*, już w warunkach niskiej temperatury (4°C) i przez okres 6 miesięcy (18).

Ling-Li i wsp. (28) wykazali, że fagi poliwalentne (o zwiększonym zakresie gospodarzy) immobilizowane na nanocząstkach magnetytu dodatkowo pokryte chitozanem łatwiej wiązały się z nośnikiem oraz efektywnej eliminowały biofilm bakteryjny. Wytwarzanie biofilmu jest ważnym markerem zjadliwości wielu mikroorganizmów, które jako wielokomórkowe, zorganizowane skupiska otoczone wydzielanymi przez siebie zewnątrzkomórkowymi polimerami EPS (extracellular polymeric substances), stają się odporne na czynniki przeciwbakteryjne oraz wykazują zwiększoną zdolność do unikania odpowiedzi immunologicznej (29). Z użyciem odpowiednio zmodyfikowanych paramagnetycznych kompleksów fag-nanomateriał pokrytych chitozanem udało się zaburzyć integralność macierzy biofilmu i wspomóc jego infiltrację przez bakteriofagi, przy stosunkowo niskim polu magnetycznym (660 Gs), uzyskując prawie 89-procentową redukcję biomasy biofilmu już w przeciągu 6 godzin (28). Inni badacze (2) zastosowali nanocząsteczki chitozanu (CS-NP, chitosan nanoparticles) jako system nośnikowy dla faga ΦKAZ14, w celu uzyskania skutecznej ochrony przed kwasem żołądkowym i enzymami trawiennymi w przewodzie pokarmowym kurcząt. Kombinacja nietoksycznego, biokompatybilnego i biodegradowalnego chitozanu z bakteriofagiem atakującym chorobotwórczy dla ptaków szczep *E. coli* pozwoliła na opracowanie cząsteczek nano-faga (C-ΦKAZ14 NP), które poprawiły skuteczność doustnej terapii przeciwko kolibakteriozie u drobiu (2).

Nie tylko modyfikowane fagi mogą wykazywać efektywną aktywność bakteriolityczną. Bonnain i wsp. (8) wskazują, że różne fagi, w tym np. swoiste dla *E. coli*, w naturalny sposób wiążą jony żelaza, gromadząc je wokół włókienek ogonka. Strategia ta jest przez nie wykorzystywana do efektywnego zakażenia bakterii poprzez receptory obecne na powierzchni komórki bakteryjnej związane z sideroforami (organicznymi ligandami wiążącymi żelazo). Skompleksowane w obrębie faga żelazo jest rozpoznawane przez receptor związany z sideroforem gospodarza, umożliwiając przyłączenie się faga do komórki, a następnie wstrzyknięcie jego materiału genetycznego i zainicjowanie zakażenia. Komórkowe zapasy żelaza są włączane do ogonków nowych potomnych fagów, które po lizie komórki bakteryjnej są uwalniane do środowiska, gdzie infekują nowych gospodarzy (8). Zaobserwowanie tej naturalnej zależności może w perspektywie być wykorzystane do znacznie łatwiejszego wiązania bakteriofagów z określonymi nanomateriałami. Przykładem mogą być, np. kropki kwantowe (QDs,

quantum dots) – nanocząstki o wielkości od jednego do kilku nanometrów (15). Ze względu na swoją wielkość ten rodzaj nanomateriału wykazuje charakterystyczne właściwości, w tym luminescencję, co znajduje zastosowanie (m.in. w nanodetektorach) do wykrywania amoniaku w środowisku (44). Kropki kwantowe są też proponowane jako czynnik działający synergistycznie z antybiotykami, zwiększający ich aktywność względem wielolekoopornych szczepów *E. coli*, *Salmonella enterica* i *Klebsiella pneumoniae* (14).

Pomimo dużego zainteresowania metodami opartymi na działaniu zarówno bakteriofagów, jak i nanomateriałów niewiele jest doniesień na temat systemów wykorzystujących ich wzajemną kombinację, które mogłyby znaleźć szersze zastosowanie w procesach sanizacji, biokontroli czy biokonserwacji mających zastosowanie, m.in. w chowie i hodowli zwierząt. Wydaje się też, że na chwilę obecną nie ma potrzeby, aby zastępowały i wypierały one inne metody wykorzystywane w walce z chorobami bakteryjnymi ludzi i zwierząt. Perspektywicznie jednak wszechstronność i duży potencjał aplikacyjny kompleksów fag-nanomateriał przemawia za rozwijaniem i eksplorowaniem technologii opartej na ich interakcjach.

Piśmiennictwo

1. Abedon S. T., García P., Mullany P., Aminov R.: Editorial: phage therapy: past, present and future. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 981.
2. Adamu A. K., Sabo M. A., Abas F.: Chitosan nanoparticles as carriers for the delivery of ΦKAZ14 bacteriophage for oral biological control of colibacillosis in chickens. *Molecules* 2016, 21, 256.
3. Ashley C. E., Carnes E. C., Phillips G. K., Durfee P. N., Buley M. D., Lino C. A., Padilla D. P., Phillips B., Carter M. B., Willman C. L., Brinker C. J., Caldeira J., Chackerian B., Wharton W., Peabody D. S.: Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles. *ACS Nano*. 2011, 5, 5729-5745.
4. Augustyniak A., Cendrowski K., Nawrotek P., Barylak M., Mijowska E.: Investigating the interaction between *Streptomyces* sp. and titania/silica nanospheres. *Water Air Soil Pollut.* 2016, 227, 230.
5. Augustyniak A., Grygorcewicz B., Nawrotek P.: Isolation of multidrug resistant coliforms and their bacteriophages from swine slurry. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2018, 42, 319-325.
6. Bai D.-P., Lin X.-Y., Huang Y.-F., Zhang X.-F.: Theranostics aspects of various nanoparticles in veterinary medicine. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3299.
7. Bogdan J., Pławińska-Czarnak J., Zarzyńska J.: Nanomateriały w medycynie – właściwości ditlenku tytanu i perspektywy jego wykorzystania w terapii przeciwnowotworowej. *Med. Weter.* 2015, 71, 18-23.
8. Bonnain C., Breitbart M., Buck K. N.: The ferrojan horse hypothesis: iron-virus interactions in the ocean. *Front. Mar. Sci.* 2016, 3, 82.
9. Cendrowski K.: Titania/mesoporous silica nanotubes with efficient photocatalytic properties. *Pol. J. Chem. Technol.* 2018, 20, 103-108.
10. Cernei N., Dostalova S., Heger Z., Kopel P., Zitka O., Adam V., Kizek R.: Paramagnetic particles for immobilization of bacteriophage λ. *J. Metallomics Nanotechnol.* 2015, 1, 57-61.
11. Chan B. K., Abedon S. T., Loc-Carrillo C.: Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol.* 2013, 8, 769-783.
12. Chen B. A., Dai Y. Y., Wang X. M., Zhang R. Y., Xu W. L., Shen H. L., Gao F., Sun Q., Deng X. J., Ding J. H., Gao C., Sun Y. Y., Cheng J., Wang J., Zhao G., Chen N. N.: Synergistic effect of the combination of nanoparticulate Fe₃O₄ and Au with daunomycin on K562/A02 cells. *Int. J. Nanomedicine* 2008, 3, 343-350.
13. Colom J., Cano-Sarabia M., Otero J., Cortés P., MasPOCH D., Llagostera M.: Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81, 4841-4849.
14. Courtney C. M., Goodman S. M., Nagy T. A., Levy M., Bhusal P., Madinger N. E., Detweiler C. S., Nagpal P., Chatterjee A.: Potentiating antibiotics in drug-resistant clinical isolates via stimuli-activated superoxide generation. *Sci. Adv.* 2017, 3:e1701776.

15. Evans C. M., Cass L. C., Knowles K. E., Tice D. B., Chang R. P. H., Weiss E. A.: Review of the synthesis and properties of colloidal quantum dots: the evolving role of coordinating surface ligands. *J. Coord. Chem.* 2012, 65, 2391-2414.
16. Glód D., Adamczak M., Bednarski W.: Wybrane aspekty zastosowania nanotechnologii w produkcji żywności. *Zywn. Nauk. Technol. Ja.* 2014, 5, 36-52.
17. Gokulan K., Bekele A. Z., Drake K. L., Khare S.: Responses of intestinal virome to silver nanoparticles: safety assessment by classical virology, whole-genome sequencing and bioinformatics approaches. *Int. J. Nanomedicine* 2018, 13, 2857-2867.
18. González-Menéndez E., Fernández L., Gutiérrez D., Pando D., Martínez B., Rodríguez A., García P.: Strategies to encapsulate the *Staphylococcus aureus* bacteriophage phiPLA-RODI. *Viruses* 2018, 10, 495.
19. Grygorowicz B., Grudziński M., Wasak A., Augustyniak A., Pietruszka A., Nawrotek P.: Bacteriophage-mediated reduction of *Salmonella* Enteritidis in swine slurry. *Appl. Soil Ecol.* 2017, 119, 179-182.
20. Gryko R., Parasian S., Mizak L.: Bakteriofagi i fagoterapia. *Med. Weter.* 2010, 66, 232-235.
21. Guo J., Gao S. H., Lu J., Bond P. L., Verstraete W., Yuan Z.: Copper oxide nanoparticles induce lysogenic bacteriophage and metal-resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 22298-22307.
22. Harada L. K., Silva E. C., Campos W. F., Del Fiol F. S., Vila M., Dąbrowska K., Krylov V. N., Balcão V. M.: Biotechnological applications of bacteriophages: State of the art. *Microbiol. Res.* 2018, 212-213, 38-58.
23. Henein A.: What are the limitations on the wider therapeutic use of phage? *Bacteriophage* 2013, 3, e24872.
24. Jou W. M., Haegeman G., Ysebaert M., Fiers W.: Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature* 1972, 237, 82-88.
25. Karimi M., Mirshekari H., Moosavi Basri S. M., Bahrami S., Moghooei M., Hamblin M. R.: Bacteriophages and phage-inspired nanocarriers for targeted delivery of therapeutic cargos. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016, 106, 45-62.
26. Kasprzykowska U., Sobieszkańska B. M.: Plastyczność bakteryjnych genomów – międzykomórkowy transfer informacji genetycznej. *Post. Mikrobiol.* 2014, 53, 165-171.
27. Liga M. V., Bryant E. L., Colvin V. L., Li Q.: Virus inactivation by silver doped titanium dioxide nanoparticles for drinking water treatment. *Water Res.* 2011, 45, 535-544.
28. Ling-Li L., Pingfeng Y., Xifan W., Sheng-Song Y., Jacques M., Han-Qing Y., Alvarez P. J. J.: Enhanced biofilm penetration for microbial control by polyvalent phages conjugated with magnetic colloidal nanoparticle clusters (CNCs). *Environ. Sci. Nano* 2017, 4, 1817-1826.
29. Lubowska N., Piechowicz L.: Biofilm *Staphylococcus aureus* i rola bakteriofagów w jego eradykacji. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2018, 72, 101-107.
30. Malik D. J., Sokolov I. J., Vinner G. K., Mancuso F., Cinquerrui S., Vladislavljiev G. T., Clokie M. R. J., Garton N. J., Stapley A. G. F., Kirpichnikova A.: Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017, 249, 100-133.
31. Malaczewska J.: Cytotoksyczność nanocząsteczek srebra. *Med. Weter.* 2010, 66, 833-838.
32. Meissner J. M., Toporkiewicz M., Matusiewicz L., Machnicka B.: Liposomy jako niewirusowe systemy dostarczania leków genetycznych. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2016, 70, 200-209.
33. Międzybrodzki R., Klak M., Jończyk-Matysiak E., Bubak B., Wójcik A., Kaszowska M., Weber-Dąbrowska B., Łobocka M., Górski A.: Means to facilitate the overcoming of gastric juice barrier by a therapeutic staphylococcal bacteriophage A5/80. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 467.
34. Mijowska E., Cendrowski K., Barylak M., Konicki W.: Sandwich-like mesoporous silica flakes for anticancer drug transport – synthesis, characterization and kinetics release study. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2015, 136, 119-125.
35. Moghtader F., Tomak A., Zareie H. M., Piskin E.: Bacterial detection using bacteriophages and gold nanorods by following time-dependent changes in Raman spectral signals. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2018, 46, 122-130.
36. Nawrotek P., Augustyniak A.: Nanotechnology in microbiology – selected aspects. *Post. Mikrobiol.* 2015, 54, 275-282.
37. Nogueira F., Karumidze N., Kusradze I., Goderdzhishvili M., Teixeira P., Gouveia I. C.: Immobilization of bacteriophage in wound-dressing nanostructure. *Nanomedicine* 2017, 13, 2475-2484.
38. Rodríguez-Rubio L., Gutiérrez D., Donovan D. M., Martínez B., Rodríguez A., García P.: Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2016, 36, 542-552.
39. Scibilia S., Lentini G., Fazio E., Franco D., Neri F., Mezzasalma A. M., Guglielmino S. P. P.: Self-assembly of silver nanoparticles and bacteriophage. *Sens. Bio-Sensing Res.* 2016, 7, 146-152.
40. Sękowski S., Miłowska K., Gabrylak T.: Dendrymery w naukach biomedycznych i nanotechnologii. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2008, 62, 725-733.
41. Sunderland K. S., Yang M., Mao C.: Phage-enabled nanomedicine: from probes to therapeutics in precision medicine. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2017, 56, 1964-1992.
42. Szermer-Oleárník B., Boratyński J.: Bakteriofagi – nanocząstki o szerokich zastosowaniach. *Chemik* 2014, 68, 761-765.
43. Thacker P. A.: Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 2013, 4, 35.
44. Vajtai R. (ed.): Springer Handbook of Nanomaterials. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013.
45. Wernicki A., Puchalski A., Urban-Chmiel R., Dec M., Stegierska D., Dudzic A., Wójcik A.: Antimicrobial properties of gold, silver, copper and platinum nanoparticles against selected microorganisms isolated from cases of mastitis in cattle. *Med. Weter.* 2014, 70, 564-567.
46. Westfall C., Flores-Mireles A. L., Robinson J. I., Lynch A. J. L., Hultgren S., Henderson J. P., Levin P. A.: The widely used antimicrobial triclosan induces high levels of antibiotic tolerance in vitro and reduces antibiotic efficacy up to 100-fold in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019, 63, e02312-18.
47. You J., Zhang Y., Hu Z.: Bacteria and bacteriophage inactivation by silver and zinc oxide nanoparticles. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2011, 85, 161-167.
48. Zabielska K., Lechowski R.: Nowe kierunki w leczeniu przeciwnowotworowym. Wykorzystanie nanotechnologii. *Med. Weter.* 2011, 67, 34-37.

Adres autora: dr hab. inż. Paweł Nawrotek, prof. ZUT, ul. Łucznicza 50/2, 71-472 Szczecin; e-mail: pawel.nawrotek@zut.edu.pl