

<https://doi.org/10.17116/molgen201937031103>

Взгляд на фаготерапию через 100 лет после открытия бактериофагов

© Т.С. ИЛЬИНА¹, Э.Р. ТОЛОРДАВА¹, Ю.М. РОМАНОВА^{1, 2}

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия, 123098;

²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России, Москва, Россия, 119091

Резюме

Представлен краткий обзор данных литературы о применении бактериофагов для лечения как острых, так и хронических инфекционных заболеваний, вызываемых резистентными к антибиотикам возбудителями. Традиционно фаговая терапия основывается на использовании распространенных в природе фагов для инфицирования и лизиса бактерий в месте инфекции. Она имеет существенные преимущества по сравнению с антибиотикотерапией и в то же время проявляет ряд существенных отрицательных свойств. Применение биотехнологических методов позволяет в настоящее время устранять недостатки антимикробной фаговой терапии за счет создания рекомбинантных бактериофагов и в перспективе расширять ее возможности за счет использования литических белков фагов и их модифицированных производных.

Ключевые слова: бактериофаги, фаговая терапия, литические белки фагов, резистентность к антибиотикам и фагам, альтернатива антибиотикам.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Ильина Т.С. — e-mail: tamilailina@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0728-5427>

Толордава Э.Р. — <https://orcid.org/0000-0002-9920-2432>

Романова Ю.М. — e-mail: genes2007@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8547-1711>

АВТОР, ОТВЕТСТВЕННЫЙ ЗА ПЕРЕПИСКУ:

Романова Ю.М. — e-mail genes2007@yandex.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Ильина Т.С., Толордава Э.Р., Романова Ю.М. Взгляд на фаготерапию через 100 лет после открытия бактериофагов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2019;37(3):103-112. <https://doi.org/10.17116/molgen201937031103>

Looking at phage therapy 100 years after the discovery of bacteriophages

© T.S. ILYINA¹, E.R. TOLORDAVA¹, YU.M. ROMANOVA^{1, 2}

¹Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia, 123098;

²Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia, 119091

Abstract

The work is a brief review of the literature data on the use of bacteriophages for the treatment of both acute and chronic infectious diseases caused by antibiotic-resistant pathogens. Traditionally, phage therapy is based on the use of naturally occurring phages for infection and lysis of bacteria at the site of infection. It has significant advantages over antibiotic therapy and at the same time shows a number of significant negative properties. Application of biotechnological methods now allows to eliminate the shortcomings of antimicrobial phage therapy by creating recombinant bacteriophages and in the future to expand its capabilities through the use of lytic proteins of phages and their modified derivatives.

Keywords: bacteriophages, phage therapy, lytic proteins of phages, resistance to antibiotics and phages, alternative to antibiotics.

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Ilyina T.S. — e-mail: tamilailina@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0728-5427>

Tolordava E.R. — <https://orcid.org/0000-0002-9920-2432>

Romanova Yu.M. — e-mail: genes2007@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8547-1711>

CORRESPONDING AUTHOR:

Romanova Yu.M. — e-mail genes2007@yandex.ru

TO CITE THIS ARTICLE:

Ilyina TS, Tolordava ER, Romanova YuM. Looking at phage therapy 100 years after the discovery of bacteriophages. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2019;37(3):103-112. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/molgen201937031103>

Введение

Бактериофаги (фаги) — это вирусы с двунитевыми или однонитевыми ДНК- или РНК-геномами, которые инфицируют клетки бактерий и реплицируются в них. Они широко распространены в окружающей среде — в водных системах, почве, различных отложениях, т.е. там, где могут существовать их бактериальные хозяева. В настоящее время описано свыше 6000 различных бактериофагов, большинство из которых проявляет специфичность только в отношении одного вида или даже штамма бактерий и лишь некоторые — нескольких видов одного рода бактерий [1]. Классификация фагов осуществляется на основе морфологических и генетических признаков, а также специфичности в отношении хозяина, среды обитания и жизненного цикла. По своему жизненному циклу, проявляемому внутри бактериального хозяина, фаги делятся на вирулентные и умеренные. Вирулентные фаги после проникновения в клетку бактерии используют метаболическую активность хозяина для синтеза большого количества дочерних фаговых частиц, который завершается лизисом бактерий. Умеренные фаги часто интегрируют свой генетический материал в геном бактерии-хозяина, превращая такие бактерии в лизогенные, и сохраняются в клетках в виде профагов, реплицирующихся вместе с геномом хозяина неопределенно долгое время, пока не будет индуцирован литический цикл фага [2–4].

При инфекции фаг прикрепляется к специфическим рецепторам, расположенным на поверхности клетки. Такая специфичность взаимодействия фага с бактерией определяет круг хозяев данного фага и, кроме того, обеспечивает сохранность бактериальной флоры в окружающей среде, не родственной бактерии-хозяину.

Фаговую терапию стали применять еще до открытия антибиотиков при лечении заражения крови, инфекций мочеполового тракта, хирургических и кожных инфекций, перитонита, колита, оториноларингологических инфекций [5]. Хотя первые (и часто небезуспешные) попытки применить бактериофаги для борьбы с инфекциями были сделаны еще в 1919 г., практически сразу же после открытия этих вирусов, фаговая терапия строилась на чисто эмпирической основе и без должного понимания биологии фаговой инфекции и специфики взаимодействия популяций бактерий и бактериофагов. Во многом по этой причине результаты плохо воспроизводились, и в 1930–40-е гг. большинство западных ученых отказались от этой идеи. И поскольку это совпало с открытием пенициллина и сульфонамидных антибиотиков, а позднее многих других антибиотиков, энтузиазм в отношении фаготерапии быстро угас. Работы по выделению и использованию фагов в лечении ряда заболеваний продолжали проводиться лишь в СССР, Грузии, Польше [6–8].

Между тем эффективность исследований по биологии бактериофагов постепенно возрастала. С развитием молекулярно-биологических технологий многие бактериофаги были всесторонне изучены и послужили модельными биологическими системами, способствовавшими успешному развитию молекулярной биологии и генетики.

К возврату интереса по практическому использованию бактериофагов в медицине и других хозяйственных отраслях привел назревающий кризис, вызванный в последние два десятилетия повсеместным распространением резистентных к антибиотикам патогенных бактерий [9–12].

Широкое применение антибиотиков в терапии бактериальных инфекций привело к резкому снижению эффективности антибиотикотерапии. Многие изоляты патогенных бактерий, выделенные от больных и в госпиталях, отличаются множественной лекарственной устойчивостью и достаточно быстро приобретают устойчивость к новым антибиотикам с широким спектром действия. Распространению вновь появившейся резистентности у бактерий способствуют различные способы горизонтального переноса генов, включая участие мобильных генетических элементов.

Появившаяся в последние два десятилетия проблема борьбы с множественно резистентными к антибиотикам патогенными бактериями обусловила необходимость поиска и разработки новых методов лечения инфекций, вызываемых такими бактериями. В настоящее время подобного рода исследования в разных направлениях проводятся во многих лабораториях мира.

Наряду с поиском новых подходов в эти же годы началось возрождение интереса к фаговой терапии, которая получила новые возможности благодаря применению и разработке новых молекулярно-биологических технологий.

Традиционно фаговая терапия основывается на использовании распространенных в природе фагов для инфицирования и лизиса бактерий в месте инфекции. Разработка биотехнологических методов позволяет в настоящее время расширить возможности фаговой терапии за счет создания биоинженерных бактериофагов и использования очищенных литических белков фагов. Проведенные исследования по использованию таких фагов и их литических белков при лечении инфекций, вызванных множественно устойчивыми к лекарственным препаратам бактериями, показали, что фаговая терапия может быть эффективной и как альтернатива, и как дополнение при лечении антибиотиками.

Фаговая терапия — альтернатива антибиотикотерапии. Ее преимущества и недостатки

Каждый тип антибактериальной терапии, фаговая или с применением антибиотиков, имеет свои преимущества и недостатки [13]. Для успешного применения

фаговой терапии необходимо быстро и точно идентифицировать патоген, вызвавший инфекцию. Строгая специфичность взаимодействия фага с хозяином с одной стороны является большим преимуществом, с другой — серьезным препятствием в борьбе с патогенным микроорганизмом. Несмотря на то что в настоящее время разработан ряд молекулярно-генетических методов, позволяющих достаточно быстро провести идентификацию патогенных бактерий, этот процесс ведет к потере времени до начала лечения. Потенциально эта проблема решается за счет использования фаговых коктейлей с расширенным спектром действия на бактерии.

Не все фаги, способные инфицировать, размножаться и вызывать лизис и гибель бактерий, являются подходящими для составления фаговых коктейлей [14, 15]. Так называемые умеренные фаги, способные интегрировать свой генетический материал в геном инфицируемой бактерии и трансдуцировать чужеродные гены, включая гены вирулентности и резистентности к антибиотикам, долгое время считались непригодными для терапевтических целей. В основном использовались хорошо охарактеризованные строго вирулентные фаги с наиболее широким кругом хозяев, которые эффективно и предпочтительно быстро размножаются в клетках патогенных бактерий. Успехи в применении технологий секвенирования и синтетической биологии в настоящее время обеспечивают новые возможности использования умеренных фагов в терапии инфекционных заболеваний [16].

Для преодоления узкой специфичности многих вирулентных фагов и полного охвата патогенных штаммов, вызвавших то или иное заболевание, используют так называемые фаговые коктейли из многих бактериофагов, отобранных из фаговых банков. Такие банки непрерывно пополняются за счет вновь выделенных фагов, поскольку бактерии быстро эволюционируют.

Фаги широко распространены в природе, поэтому выделение и селекция эффективных новых фагов осуществляются в относительно короткие сроки, тогда как выделение новых антибиотиков — длительный по времени и дорогостоящий процесс [17]. Новые фаги должны быть охарактеризованы, получены в достаточных количествах, очищены, допущены до клинического применения. Используются как стандартные, так и составленные для каждой инфекции коктейли.

Составление фаговых коктейлей представляет собой более сложный процесс, чем использование уже имеющихся стандартизованных коктейлей или составление комбинаций из антибиотиков, из-за большого разнообразия хранящихся в банках и вновь выделяемых фагов. Так как от состава фагового коктейля зависит успех фаговой терапии, предпочтение отдается вновь составленным с учетом особенностей бактериальной инфекции и свойств фагов.

В случае тяжелых инфекционных заболеваний используют также комбинации из бактериофагов и

антибиотиков, увеличивающие эффективность лечения [6, 18].

Фаговая терапия имеет целый ряд преимуществ, которые делают ее привлекательной альтернативой антибиотикотерапии. Выше уже указывалось, что фагам свойственна специфичность в отношении определенных штаммов бактерий. При инфекции они не повреждают нормальную бактериальную флору; риск возникновения вторичной инфекции, часто наблюдаемый при использовании антибиотиков, снижен. Эффективность лечения фагом достаточно высока благодаря тому, что он сохраняется и размножается до тех пор, пока присутствует специфический хозяин. Антибиотики же обычно довольно быстро выводятся или деградируют. После излечения от инфекции фаговые частицы не сохраняются в организме из-за отсутствия клеток бактериального хозяина, тогда как антибиотики способны сохраняться в окружающей среде [19]. Оказавшись в месте инфекции, экспоненциально размножающийся фаг достаточно эффективен при использовании его в более низких дозах и с более редкой частотой применения, чем это требуется при лечении антибиотиками.

Особенно важно, что фаги эффективно убивают как чувствительные, так и устойчивые к антибиотикам клетки бактерий. Поскольку фаги инфицируют только бактериальные клетки и не влияют на клетки млекопитающих, риск токсичности в отношении хозяина отсутствует.

Фаги и антибиотики в своем действии на бактерии проявляют одно общее свойство — способность неизбежно вызывать образование резистентных клонов. Бактерии в процессе эволюции приобрели ряд механизмов, предотвращающих связывание с фагами, инфицирование и репликацию фагов внутри клеток [20—24]. Адсорбция фагов с использованием поверхностных рецепторов бактериальных клеток предотвращается с помощью систем, блокирующих этот процесс (блокировка рецепторов, образование внеклеточного матрикса, продукция конкурентного ингибитора). Внутриклеточному развитию фагов препятствуют бактериальные системы рестрикции-модификации, CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR, и связанные с ними *cas*-гены) [25], BREX (Bacteriophage Exclusion) [26], разрезающие ДНК фаговых геномов [20, 23] или блокирующие репликацию ДНК [21]. Другим механизмом резистентности к фаговой инфекции являются системы исключения суперинфекции, кодируемые другими профагами, находящимися в геноме бактериальной клетки, защищающими ее от инфицирования родственными фагами [20]. Появление резистентных форм, что является главной проблемой при применении антибиотиков, менее значимо в случае фагов, так как всегда могут быть использованы другие фаги с той же специфичностью в отношении хозяев, преодолевающие эту резистент-

ность. Кроме того, показано, что образование фаго-резистентных бактерий происходит значительно реже, чем резистентных к антибиотикам бактерий [27].

Недавно появились работы, показавшие, что фаги, благодаря геномной пластичности и быстрому размножению, эволюционируют вместе со своими бактериальными хозяевами и приобретают способность преодолевать системы бактериальной защиты (Anti-CRISPRs, Anti-BREX гены) [21, 28, 29]. Они способны мутировать, производить геномные перестройки и обмениваться генетическим материалом с другими фагами или бактериями.

Некоторые фаги обладают врожденной способностью «обманывать» защитные механизмы бактерий с помощью кодируемых фагом метилаз [30]. Метилазы, связываясь с фаговыми геномами, нарушают их узнаваемость системами защиты и обеспечивают их выживаемость и появление фаговых частиц с более широким спектром специфичности, чем родительский фаг. Такие фаги представляют особый интерес для фаговой терапии.

В конце цикла размножения вирулентные фаги индуцируют лизис бактерий. Вместе с фаговым потомством в окружающую среду выделяются также различные продукты жизнедеятельности бактерий, такие как эндотоксины грамотрицательных бактерий, липополисахариды (LPS) и другие связанные с патогенностью факторы. Они способны инициировать врожденный иммунный ответ, влиять на вирулентность или вызывать побочные эффекты в организме хозяина, например воспалительные процессы, ведущие к повреждению ряда органов. Для преодоления таких последствий лечения фагами в настоящее время стали использовать генетически модифицированные фаги и литические фаговые продукты.

Биопленки и фаготерапия

Многие патогенные бактерии существуют в организме инфицированного хозяина в виде биопленок — сложных образований, характеризующихся специфической пространственной организацией, наличием внеклеточных полимерных образований (EPS) и повышенной толерантностью к антимикробным агентам [31, 32]. Образование бактериальных биопленок происходит спонтанно на инертных и биоматериалах и является чрезвычайно важным для выживаемости бактерий и их патогенности. Биопленочные бактерии проявляют устойчивость к средствам защиты хозяина и антибиотикотерапии. Благодаря этому они часто являются причиной многих трудно излечимых хронических заболеваний [33].

Обычно требуются высокие дозы антибиотиков для того, чтобы проникнуть в биопленки и в какой-то степени подавить рост бактерий. Полного излечения от бактерий не происходит, а по окончании применения антибиотиков начинается вторичный рост колоний [31, 34, 35]. Хотя низкие дозы многих анти-

биотиков обычно не являются токсичными, высокие концентрации могут вызвать токсикоз тканей [36].

Разработка методов борьбы с биопленками представляет в настоящее время одну из важных проблем медицины. Первые эксперименты с использованием фагов против биопленок были опубликованы в 1995 г., и с тех пор были проведены многочисленные исследования с использованием разных бактериофагов и различных бактериальных биопленок, подтвердившие способность фагов значительно уменьшать число биопленочных бактерий.

Целая серия работ показала, что фаги могут эффективно инфицировать и лизировать клетки бактерий, присутствующих в биопленках, образованных одним или несколькими их видами [32].

Используют две стратегии в борьбе с биопленками: в первом случае с помощью бактериофагов блокируют начало образования биопленки, во втором — уничтожают существующую биопленку [32, 35, 37]. Блокирование или, по крайней мере, замедление процесса образования биопленки может достигаться путем обработки имплантируемого оборудования до его непосредственного использования лечебными препаратами бактериофагов. На **рисунке** представлены данные по обработке урологических катетеров бактериофагами до их установки пациентам. Электронные микрофотографии получены с помощью сканирующей электронной микроскопии в режиме высокого вакуума в двулучевом электронном микроскопе Quanta 200 3D («FEI Company», США).

Взаимодействие фагов с уже сформировавшимися биопленками — относительно сложный и многообразный процесс. Он зависит от ряда причин, в частности от используемых бактериальных штаммов в качестве хозяев фагов, фаговых характеристик, структуры и состава биопленок. Первой, наиболее важной стадией инфицирования фагами клеток бактерий является адсорбция фаговых частиц на поверхности клеток при участии специфических рецепторов. В случае планктонных бактерий рецепторы полностью доступны для фагов, так как они не окружены EPS матриксом, создающим проблему для связывания фагов с рецепторами, как это имеет место у биопленочных бактерий. Наличие такого матрикса у биопленок вместе с уменьшенным метаболизмом биопленочных клеток и размножением внутри биопленок фагоустойчивых клонов создает основные ограничения в применении фаговой терапии при лечении заболеваний, вызванных биопленками.

Многие фаги способны преодолевать такие барьеры благодаря попаданию в матрикс биопленки частиц, продуцирующих ферменты, разрушающие внеклеточный полимер. Известны три категории гидролитических ферментов, кодируемых фагами, которые способны влиять на биопленки [38, 39]:

1. Ферменты, подвергающие гидролизу внеклеточные полимерные вещества биопленки;

2. Ферменты, разрушающие капсулу бактериальной стенки бактерий;

3. Ферменты, разрушающие клеточную стенку бактерий.

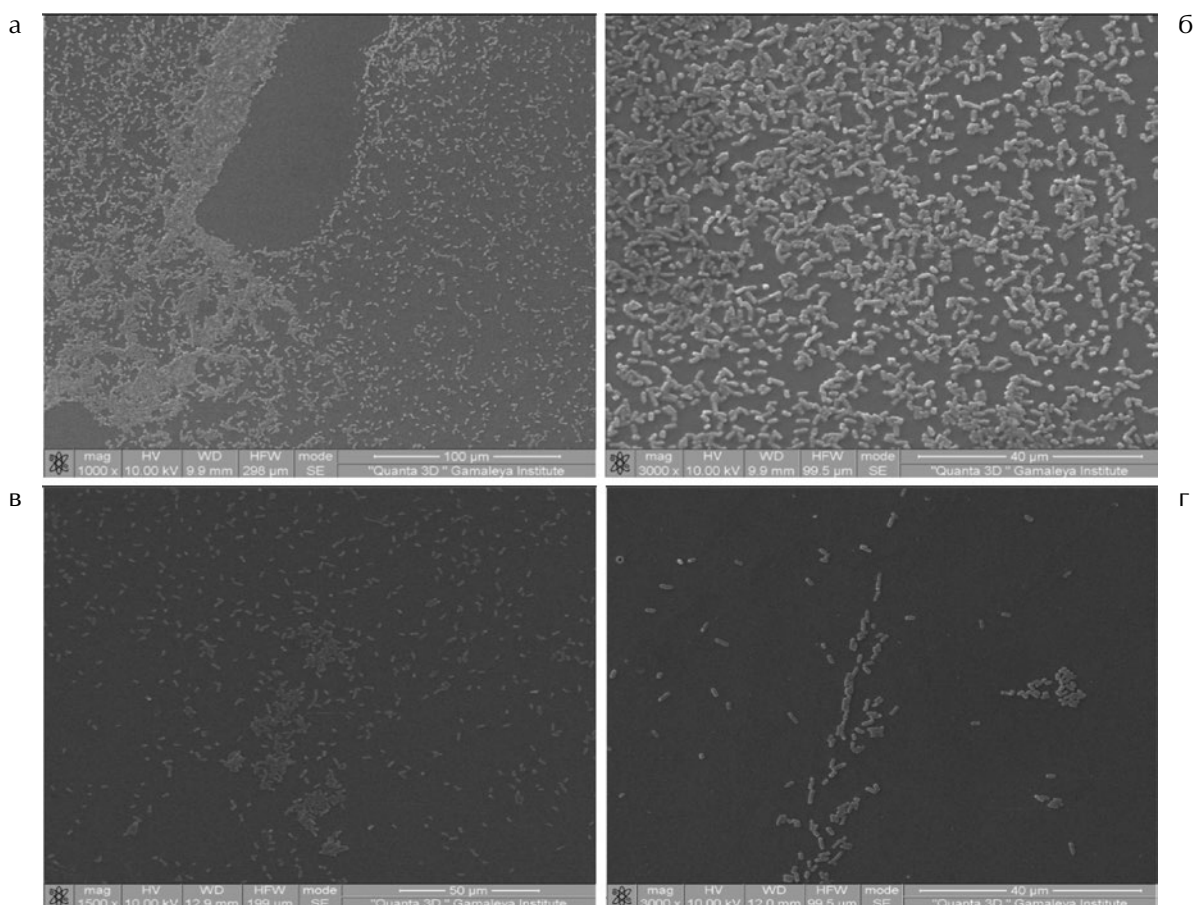
Такие ферменты, например EPS деполимеразы, находящиеся на поверхности капсида, вызывают деградацию внеклеточных полимерных веществ (EPS) и дисперсию внешних слоев бактериальных биопленок, в результате чего фаги получают доступ к бактериям внутри EPS матрикса [36]. Бактериофаги оказываются способными достигнуть фаговых рецепторов и инициировать продуктивную фаговую инфекцию [40]. Потомство фагов, выделяемое при завершении литического цикла, последовательно вызывает гибель бактерий в более глубоких слоях биопленок. Ферменты, которые разлагают материал бактериальных капсул, должны облегчить продвижение фага к отдельным и сопряженным бактериям. Ферменты, которые разлагают клеточную стенку бактерии, обычно способствуют фагам при выходе из зараженной клетки во время бактериального лизиса. Они могут убивать грам-

отрицательные и грамположительные бактерии, поэтому могут применяться против биопленок. Одним из важных компонентов матрикса биопленки является ДНК, необходимая для поддержания целостности структуры биопленки [41]. Известен, по крайней мере, один фаг, кодирующий ДНК-азу, функция которой состоит в разрушении этой ДНК, для обеспечения движения фага по матриксу [38].

Поскольку не все бактериофаги обладают способностью синтезировать деполимеразы и другие ферменты, вызывающие деструкцию биопленок, в настоящее время применяются методы генетической инженерии для получения модифицированных фагов, включивших гены EPS-деградирующих ферментов [35, 40, 42].

Стратегии фаговой терапии биопленочных заболеваний

Используются различные способы увеличения эффективности фаговой терапии биопленочных инфекционных заболеваний, включающие составление фаговых коктейлей, комбинации фагов с антианти-



Электронная микрофотография биопленок, сформированных на поверхности урологических катетеров, предварительно обработанных фаговыми препаратами, полученная в сканирующем двулучевом электронном микроскопе Quanta 200 3D в режиме высокого вакуума.

а и б — биопленка, сформированная клиническим изолятом *Escherichia coli* на поверхности урологического катетера за 24 ч. Ув. 1000 (а) и 3000 (б); в и г — биопленка, сформированная клиническим изолятом *Escherichia coli* на поверхности урологического катетера, обработанного коммерческим фаговым препаратом «Бактериофаг колипротейный» за 24 ч. Ув. 1500 (в) и 1000 (г).

ками или другими антимикробными препаратами, механическое повреждение биопленок и применение генной инженерии для направленной модификации фагов [43].

Препараты, содержащие несколько фагов с различным кругом хозяев и разной специфичностью к рецепторам бактерий, известные под названием «фаговые коктейли», создаются с целью расширения спектра их активности и предотвращения появления фагоустойчивых вариантов бактерий. В ряде работ показано, что лечение биопленочных инфекций с помощью таких препаратов приводит к уменьшению бактериальной биомассы в уже сформированных биопленках, в других случаях — к предотвращению образования биопленок [8, 44–48].

Комбинирование фагов с антибиотиками или антисептиками — другая стратегия применения фагов в качестве терапевтических средств. Она достаточно детально изучена в работах с использованием как планктонных культур бактерий, так и биопленок [6, 43, 49]. В большинстве случаев была показана повышенная антибактериальная активность таких комбинаций по сравнению с использованием лишь одного фага, одного антибиотика или антисептика. Обычно имеет место эффект синергизма (усиления), приводящего к быстрому удалению патогенных бактерий при использовании сублетальных концентраций антибиотиков и фага, часто с увеличением вирулентности фагов [43, 50]. На модели животных было показано, что такое лечение оказывается профилактическим в отношении образования резистентных бактерий [6, 51]. Некоторые из антибиотиков способны блокировать клеточный цикл бактерий, что приводит к увеличению размеров клеток, быстрому размножению в них фагов и их быстрому освобождению в результате лизиса клеток [52]. Успех комбинирования зависит от подбора фагов, бактерий и антибиотиков. Тот факт, что фаги и антибиотики действуют внутри клеток бактерий разными способами, создает этому виду терапии преимущество перед использованием фаговых коктейлей с одинаковыми способами действия фагов в отношении появления резистентных мутантов бактерий.

Повышению эффективности инфицирования биопленочных бактерий фагом также способствует механическое их разрушение благодаря созданию условий для доступности фага к клеткам бактерий [53].

Использование молекулярно-генетических технологий, способствующих созданию генетически модифицированных фагов с новыми функциями, является новым подходом, позволяющим более эффективно контролировать биопленки [54].

Быстрому прогрессу в этой области способствовали исследования по выяснению структуры фаговых компонентов и их роли во взаимодействии фаговых частиц с бактериями-хозяевами, а также появление в базе данных полностью секвенированных геномов многих фагов [42].

Многие ограничения фаговой терапии могут преодолеваться с помощью современных технологий. Так, может быть потенциально расширен круг хозяев фагов, используемых против биопленок, образуемых разными бактериями. Например, был создан модифицированный фаг T7, экспрессирующий два фермента, лиазу и эндосиалидазу, прикрепленных к его поверхности, и способный реплицироваться в клетках *E. coli* B и *E. coli*, продуцирующих как K1, так и K5 полисахаридные капсулы [54]. Также были использованы другие ферменты, например дисперсин B (DspB), который после введения его гена в геном фага T7 *E. coli* делает этот фаг стократно более эффективным в удалении бактериальных биопленок, чем T7, не продуцирующий этот фермент [55]. Фаги T3, инфицирующий *E. coli*, и T7, способный инфицировать *E. coli* и некоторые виды *Yersinia*, были подвешены в клетках *Saccharomyces cerevisiae* сборке с экзогенным фаговым белковым доменом с целью изменения их хозяйской специфичности. В результате модифицированные фаги T3 и T7 приобрели способность заражать бактерии *Yersinia* и *Klebsiella* [56].

Рекомбинантные фаги могут также функционировать как векторы для доставки других антибактериальных агентов, которые могут быть включены в фаг или прикреплены к его поверхности. Например, для доставки активируемых светом антибактериальных агентов, фотосенсибилизаторов, рассматриваемых как альтернатива антибиотикам при лечении кожных инфекций.

Биоинженерные модификации до сих пор в основном касались строго литических фагов, использование умеренных фагов в терапевтических целях привлекло внимание исследователей лишь в последние годы. Это обусловлено легкостью их выделения из лизогенных бактерий благодаря возрастанию числа их полностью секвенированных геномов, необходимостью пополнения банка новыми фагами, расширением возможностей инженерных манипуляций с этими фагами с целью получения вариантов с новыми и нужными свойствами [16].

Возникает опасение, что баланс между естественными и генноинженерными бактериофагами в природе может быть нарушен. Однако недавно было показано, что мутантные фаги не являются конкурентными естественным в специфичности по отношению к хозяевам, будучи неспособными длительно сохраняться в природных условиях [57].

Литические белки бактериофагов

Одним из перспективных направлений в фаговой терапии является использование белков фагов с антибактериальным потенциалом [58–60]. Они включают фаговые ферменты, такие как эндолизины, вирион-связанные лизины (virion-associated lysins, VALs) и полисахарид-деполимеразы. Эндолизины являются литическими ферментами, используемыми фагами в конце цикла репликации для деградации пептидогли-

кана (PG), ведущей к быстрому лизису бактериальных клеток и освобождению фагового потомства.

Белки VALs и деполимеразы связаны с частицами вирионов и в начале инфекции используются для преодоления поверхностных барьеров клеток бактерий. VALs ответственны за деградацию PG, необходимую для инъекции генетического материала фага в инфицируемую клетку хозяина, деполимеразы вызывают деградацию полисахаридных молекул (капсул, липополисахаридов, матриксов биопленок) и способствуют проникновению фага в биопленки и клетки бактерий [43]. Другой группой белков являются вирионсвязанные пептидогликан гидролазы, включающие лизоцимы, литические трансгликозилазы, эндопептидазы или глюкозаминидазы. В отличие от эндолизинов, действующих в конце цикла репликации фагов, они способствуют доставке в клетки хозяина генетического материала фага [61]. В лизисе клеток также участвует трансмембранный белок холин, который накапливается в клеточной мембране во время сборки вирусных частиц и в конце литического цикла запускает процесс лизиса внутренней стороны мембраны, обеспечивая подход эндолизина, гидролизующего клеточную стенку. Несмотря на то что оба белка образуются большинством фаговых видов, им свойственна высокая степень вариабельности, структурной и биохимической. Каждый фаг может кодировать несколько уникальных лизинов и холинов, некоторые из которых высокоспецифичны, а другие отличаются широким спектром активности в отношении разных штаммов и даже видов бактерий (например, недавно открытый лизин АВgp46 способен лизировать несколько грамотрицательных и множественно резистентных патогенов, таких как *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *Salmonella typhimurium*).

Ферменты лизины (эндолизины и VALs) в отличие от холина способны в одиночку вызывать лизис бактерий, поэтому именно они привлекли внимание исследователей как потенциальные антимикробные агенты. В литературе описан ряд положительных результатов при излечивании от бактериальных инфекций, вызванных множественно резистентными стрептококками, стафилококками и другими патогенами [62–64].

Специфичность ферментов фагов, деградирующих бактерий и образуемые ими биопленки, варьирует и зависит от белковых характеристик, а также от видовой и родовой принадлежности фагов, из которых эти белки получены [60, 62, 63].

Так, активность лизинов фагов, специфичных в отношении грамположительных бактерий, ограничена определенными бактериальными видами или даже серотипами из-за сильной вариации в их пептидном составе и модификаций их гликановых цепей. Такая узкая специфичность белков позволяет селективно вызывать гибель определенных патогенов, не затрагивая окружающую микрофлору [65].

У грамотрицательных бактерий структура пептидогликановых слоев отличается высокой консервативностью, и разные виды бактерий сходны по этому признаку. В результате эндолизины и VALs обычно активны против широкого круга хозяев [60].

Лизины характеризуются отсутствием токсичности, различным спектром активности, низкой вероятностью развития резистентности к ним и высокой эффективностью действия против бактерий. В отличие от антибиотиков фаговые лизины являются чрезвычайно эффективными биологическими соединениями, убивающими бактерии в течение нескольких секунд [58, 66, 67]. Недавно эндолизины успешно использовали *in vivo* с целью лечения инфекций, вызванных грамположительными, устойчивыми к антибиотикам бактериальными патогенами, такими как метициллинрезистентный *S. aureus*. Одним из наиболее хорошо охарактеризованных эндолизинов с активностью против множества видов стафилококков является LysK [68]. Однако в случае грамотрицательных бактерий препятствием в применении эндолизинов как антибактериальных агентов являлась непроницаемость липополисахаридного слоя, окружающего их клеточную стенку. Эта проблема была решена благодаря созданию рекомбинантных производных, артилизинов (Artilyns), обладающих высокой антибактериальной активностью против грамотрицательных патогенных бактерий [69]. Артилизины представляют собой комбинации из поликатионных пептидов и модулярных эндолизинов. Они способны проникать через внешнюю мембрану и достигать пептидогликана, где проявляют свою активность, вызывая гибель бактерий, включая множественно резистентные к антибиотикам.

Различные эндолизины и их инженерные производные способствуют разрушению или уменьшению бактериальных биопленок, создающих проблемы не только в медицине, но и в пищевой отрасли и других промышленных и сельскохозяйственных сферах деятельности человека [70, 71].

Однако не все лизины одинаково эффективны терапевтически. Попытки их оптимизации с помощью биоинженерии в ряде случаев оказались многообещающими.

Другими перспективными фаговыми белками для использования их в качестве антимикробных агентов являются полисахарид-деполимеразы, которые узнают, связываются и деградируют полисахаридные соединения, обеспечивая доступ к ранее недоступным фаговым рецепторам на поверхности бактериальных клеток.

Описано более 160 деполимераз, отличающихся большим разнообразием. Они включают сиалидазы, леваназы, ксилозидазы, декстраназы, гиалуронидазы, пептидазы, а также пектат/пектинлиазы, найденные у 143 полностью секвенированных фагов, активных в отношении 24 родов бактерий.

Деполимеразы либо связаны с фаговыми частицами, либо находятся в растворимой форме и освобождаются во время лизиса бактериальных клеток, не будучи интегрированными в фаговые частицы [59, 60].

В случае биопленочных образований деполимеразы обеспечивают облегченный доступ к рецепторам бактерий благодаря способности вызывать деградацию внеклеточных полимерных веществ и далее облегчать доступ фагам к рецепторам клеток внутри различных слоев биопленок. Такими рецепторами могут быть как внешние мембранные, так и внедренные в клеточные стенки белки.

Некоторые бактерии продуцируют капсульные полисахариды (CPSs, или К-антигены), плотно прилегающие к клеткам. Другие секретируют внеклеточные полисахариды в виде слизи (EPSs) при образовании биопленок [60]. Оба типа полисахаридов отличаются большим разнообразием как внутри родов, так и внутри видов, которое также зависит от фазы роста бактерий и окружающей среды. Внешняя мембрана грамотрицательных бактерий состоит из липополисахаридных молекул с переменным О-полисахаридом (О-антигеном), в то время как у грамположительных бактерий существенным компонентом ее являются (липо) тейхоевые кислоты в составе пептидогликана (PG). Вместе с пили и флагеллами эти полисахариды часто являются первичными рецепторами для фагов. Ферменты деполимеразы узнают, связываются и деградируют полисахариды, обеспечивая доступ к рецепторам на поверхности бактериальных клеток.

Как лизины, так и деполимеразы фагов являются специфичными в отношении уникальных и высококонсервативных бактериальных структур (полисахаридов или пептидогликанов), которые отсутствуют в клетках млекопитающих. Поэтому они не являются токсичными для последних.

Применение фаговых ферментов

Литические ферменты фагов, эндолизины и VALs, имеют доменную структуру и наследуют по крайней мере один домен (CD, Catalytic Domain), ответственный за ферментативное разрезание пептидогликана (PG), основного структурного компонента клеточной стенки бактерий (CW, Cell Wall). Макромолекулы PG образуют подобие мешка вокруг цитоплазматической мембраны и придают необходимую резистентность к лизису, который может быть вызван повышением тургорного давления в клетках.

В естественных условиях фаговой инфекции PG разрезается литическими ферментами контролируемым способом, сначала не нарушая жизнеспособность клеток при доставке фаговой ДНК, а затем строго перед завершением цикла репликации фага. При экзогенном добавлении к бактериям очищенных ферментов пептидогликан-деградирующая активность ферментов способна вызывать быстрый осмотический лизис и гибель клеток. Это свойство яви-

лось определяющим для исследования возможности их использования в качестве антибактериальных агентов как части более обширной группы ферментов, получившей название «энзиобиотики» [62]. Первоначальной моделью изучения терапевтического потенциала в отношении грамположительных патогенов служили эндолизины (примерно 2 десятилетия), и были получены обнадеживающие результаты [63, 68, 72]. Интерес к VALs появился недавно [60, 61], когда были выявлены некоторые преимущества у этих ферментов при сравнении способов действия эндолизин и VALs на клеточную стенку бактерий.

Однако природные литические белки часто проявляют свойства, связанные с нестабильностью, растворимостью, спектром активности, которые ограничивают их применение в качестве антибактериальных агентов. В последнее время исследования направлены на улучшение бактерицидных свойств литических ферментов с помощью манипуляций с их функциональными доменами или биоинженерии, позволяющей придавать ферментам новые или дополнительные свойства [69, 73]. Такими способами может быть повышена убивающая активность против бактерий в различных условиях и окружении, расширен природный бактерицидный спектр, включены другие литические ферменты в группу эффективных антибактериальных агентов.

Модулярный характер некоторых литических белков позволяет более широко использовать инженерные стратегии для слияния и перемещения доменов различного происхождения для создания химерных литических ферментов с измененными свойствами. Другие подходы включают слияние литических ферментов полной длины, делетирование доменов, случайный или направленный мутагенез, слияние пептидов и их комбинации [69, 72, 74].

Предварительные исследования эффективности фаговых ферментов на моделях животных и в клинических испытаниях подтвердили их антибактериальное действие и безопасность [68, 72]. Однако в настоящее время их использование для терапевтических целей, особенно в случаях долгосрочных обработок, еще ограничено из-за недостатка данных о взаимодействии этих ферментов с организмом человека. Тем не менее уже зарегистрированы первые данные о местном применении препаратов фаговых лизинов, которые коммерчески доступны [75]. Также начаты первые клинические испытания антистафилококкового эндолизина SAL200 [76, 77].

Для ферментов деполимераз характерна высокая субстратная специфичность, так как бактерии синтезируют разнообразные гликаны, такие как капсулы (CPS, К-серотип), О-полисахаридные цепи (LPS, О-серотип) или внеклеточные полисахариды (EPS). Хотя большинство этих белков не обладает бактерицидной активностью, как эндолизины и VALs, они представляют интерес благодаря их антивирулентно-

му потенциалу [78]. Утрата или модификация поверхностных структур бактерий, влияющих на их вирулентность, способность к колонизации и образованию биопленок, делает бактерии менее патогенными или более чувствительными к другим антимикробным агентам или средствам защиты хозяина [60, 79]. Терапевтическая эффективность рекомбинантных деполимераз, модифицирующих фенотип бактериальных клеток без влияния на их выживаемость и скорость роста, была подтверждена в экспериментах на животных [78]. Например, при оральном применении специфичной в отношении *Salmonella* эндорамнозидазы фага P22 у цыплят не наблюдали колонизации кишечника патогеном и его проникновения во внутренние органы [80]. Деградация альгината, образуемого мукоидными штаммами *P. aeruginosa*, с помощью фермента альгинатлиазы открывала доступ макрофагам к бактериям у легочных больных, нарушала рост бактерий в биопленках, уменьшала вязкость мокроты [81].

Деполимеразы могут также применяться в комбинации с обычными антимикробными агентами против множественно резистентных патогенов, осо-

бенно тех, которые живут в биопленочных сообществах. Синергидное действие рекомбинантных деполимераз с антибиотиками или обычными дезинфектантами было показано на примере подавления инфекций, вызванных штаммами *Klebsiella* [82, 83].

Благодаря высокой специфичности деполимераз разрушение бактерий и образуемых бактериальных биопленок достигается без повреждения полезной микробной флоры в организме человека и клеток органов человека [58].

Бактериофаги с деполимеразной активностью проявляют высокую степень активности против бактерий-мишеней, поскольку эти ферменты участвуют во многих процессах, помогая фагам адсорбироваться, проникать в клетки бактерий, вызывать деграцию клеток и биопленок [74]. Ожидается, что и ферменты деполимеразы внесут ощутимый вклад в фаговую терапию.

Финансирование работы. Работа не имела специальной финансовой поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Ackermann H-W, Prangishvili D. Prokaryote viruses studied by electron microscopy. *Arch Virol*. 2012;157:1843-1849. PMID:22752841. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1383-y>
- Lwoff A. Lysogeny. *Bacteriol Rev*. 1953;17:269-337. PMID: 13105613.
- Adams MH. *Bacteriophages*. New York: Interscience Publishers; 1959.
- Siringan P, Connerton PL, Cummings NJ, Connerton LF. Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of Compylobacter jejuni. *Open Biol*. 2014;4:130200. PMID: 24671947. <https://doi.org/10.1098/rsob.130200>
- Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*. 2011;1:66-85. PMID:22334863. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>
- Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutics or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol*. 2010;28:591-595. PMID:20810181. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.08.001>
- Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2001;45:649-659.
- Chanishvili N. *A literature review of the practical application of bacteriophage research*. Nova Science Publishers, Hauppauge, N.Y., USA, 2012.
- Cisek A, Dabrowska I, Gregorczyk K, Wyzewski Z. Phage therapy in bacterial infections treatment. One hundred years after the discovery of bacteriophages. *Curr Microbiol*. 2016;74:277-283.
- WHO (World Health Organization). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. Geneva. Switzerland, 2014.
- Shurma S, Chatterjee S, Datta S, Prasad RK, Vaizala MG. Bacteriophages and their applications: an Overview. *Folia Microbiol*. 2016;62:17-55.
- Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phagotherapy: an alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017;6:8(3):162-173.
- Abedon ST. Ecology of anti-biofilm agents I: antibiotics versus bacteriophages. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015;8(3):525-558.
- Gill JJ, Hyman P. Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2010;11:2-14.
- Chan BK, Abedon ST, Loc-Carillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol*. 2013;8:769-783.
- Monteiro R, Pires DP, Costa AR. Phage Therapy: Going Temperate? *Trends in Microbiology*. 2019;27(4):378-378.
- Golkar Z, Bagasra O, Pace DG. Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. *J Infect Dev Countries*. 2014;8:129-136.
- Kutateladze M. Experience of the Eliava Institute in bacteriophage therapy. *Virol Sinica*. 2015;30:80-81.
- Nilsson AS. Phage therapy — constraints and possibilities. *Ups J Med Sci*. 2014;119:192-198.
- Labrie J, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev*. 2010;8:317-327.
- Goldfarb T, Sberro H, Weinstock W, Cohen O, Doron S, et al. BREX, a phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J*. 2015;34:169-183.
- van Houte S, Buckling A, Westra ER. Evolutionary ecology of prokaryotic immune mechanisms. *MMBR*. 2016;80(3):745-760.
- Doron S, Melamed S, Ofir G, Leavitt A, Lopatina A, et al. Systematic discovery of antiphage defence systems in the microbial pangenome. *Science*. 2018;359(6379).
- Ofir G, Melamed S, Sberro H, Mukamel Z, Silverman S, et al. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nat Microbiol*. 2018;3(1):90-98.
- Gasiunas G, Sinkunas T, Siksnys V. Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cell Mol Life Sci*. 2014;71:449-465.
- Barrangou R, Van ger Oost J. Bacteriophage exclusion, a new defence system. *The EMBO J*. 2015;34(2):134-135.
- Hanlon GW. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30:118-128.
- Bondy-Denomy J, Pawluck A, Maxwell KL, Davidson AR. Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR-Cas bacterial immune system. *Nature*. 2013;493:429-432.
- Borges AL, Davidson AR, Bondy-Denomy J. The discovery, mechanisms and evolutionary impact of anti-CRISPRs. *Annu Rev Virol*. 2017;4(1):37-59. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-101416-041616>
- Murphy J, Mahony J, Ainsworth S, Nauta A, van Sinderen D. Bacteriophage orphan DNA methyltransferases: insights from their bacterial origin, function, and occurrence. *Appl Environ Microbiol*. 2013;79(24):7547-7555.
- Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents*. 1999;11:217-221.
- Parason S, Kwiatek M, Gryko R, Mizak L, Malm A. Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development. *Polish J Microbiol*. 2014;63(2):137-145.
- Romanova YuM, Mulabaev NS, Tolordava ER, Seregin AV, Seregin IV, Alexeeva NV, Stepanova TV, Levina GA, Barkhatova OI, Gamova NA, Goncharova SA, Didenko LV, Rakovskaya IV. Microbial Communities on Kidney Stones. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2015;30(2):78-84.

34. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284:1318-1322.
35. Azeredo J, Sutherland IW. The use of phages for the removal of infections biofilms. *Curr Pharmaceutical Biotechnol*. 2008;9:261-266.
36. Abedon ST. Ecology of anti-biofilm agents I: antibiotics versus bacteriophages. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2015;8:525-558.
37. Różalska B, Walecka E, Sadowska B. Wykrywanie biofilmów stanowiących problemy medyczne i perspektywy ich eradykacji. *Zakażenia*. 2010;10:13-21.
38. Дрюккер В.В., Горшкова А.С. Бактериофаги и их функционирование в биопленках. *Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология»*. 2012;5(3):8-16.
- Drukker VV, Gorshkova AS. Bacteriophages and their functioning in the biofilms. *Izvestiya of Irkutsk State University. Seria «Biology. Ecology»*. 2012;5(3):8-16. (In Russ.).
39. Adhya S, Merrill CR, Biauvas B. Therapeutic and prophylactic applications of bacteriophage components in modern medicine. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4:a012518.
40. Donlan RM. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophages. *Trends Microbiol*. 2009;17:66-72.
41. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PS, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002;295(5559):1487.
42. Pires DP, Cleto S, Sillancorva S, Azeredo J, Lu TK. Genetically engineered phages: a review of advances over the last. *Microbiol Mol Biol Reviews*. 2016;80(3):523-542.
43. Pires DP, Melo L, Vilas Boas D, Sillancorva S, Azeredo J. Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections. *Curr Opin Microbiol*. 2017;39:48-56.
44. Gu J, Liu X, Li Y, Han W, Lei L, et al. A method for generation cocktail with great therapeutic potential. *PLoS One*. 2012;7:e31698.
45. Jaiswal A, Koley H, Ghosh A, Palit A, Sarkar B. Efficacy of cocktail phage therapy in treating *Vibrio cholerae* infection in rabbit model. *Microbiol Infect*. 2013;15:152-156.
46. Chan BK, Abedon ST. Phage therapy pharmacology phage cocktails. *Adv Appl Microbiol*. 2012;78:1-23.
47. Chan K, Abedon ST, Los-Carillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol*. 2013;8:6.
48. Al-Wrafy F, Brzozouska E, Gorska S, Gamian A. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* — the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig Med Dosw (online)*. 2016;70:78-91.
49. Valerio N, Oliveira C, Jesus V, Branco T, Pereira C, et al. Effects of single and combined use of bacteriophages and antibiotics to inactivate *E. coli*. *Virus Res*. 2017;240:8-17.
50. Domingo-Calap P, Delgado-Martinez J. Bacteriophages: protagonists of a post-antibiotic era. *Antibiotics*. 2018;7:66-82.
51. Torres-Barcelo C, Hochberg M. Evolutionary rationale for phages as complements of antibiotics. *Trends Microbiol*. 2016;24:249-256.
52. Comean A, Tetart F, Trojet S, Prere M, Krisch H. La «synergie phage-antibiotiques». *Med Sci*. 2008;24:449-451.
53. Wittebole X, De Roock S, Opal S, A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*. 2013;5:226-235.
54. Lu TK, Collins JJ. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophages. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:11197-11202.
55. Itoh Y, Wang Y, Hinnesbush BJ, Preston JF, Romeo T. Dimerization of beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamin disrupts the integrity of diverse bacterial biofilms. *J Bacteriol*. 2005;187:382-387.
56. Ando H, Lemire S, Pires DP, Lu TK. Engineering modular viral scaffolds for targeted bacterial population editing. *Cell Syst*. 2015;1:187-196.
57. Gladstone EG, Molineux IJ, Bull JJ. Evolutionary principles and synthetic biology: avoiding a molecular tragedy of the commons with an engineered phage. *J Bio Eng*. 2012;6:13.
58. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Strobek G, Maciejewska B, Delattre A-S, Lavigne R. Learning from bacteriophages — advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr Protein Peptide Sci*. 2012;13:699-722.
59. Pires DP, Oliveira H, Melo LD, Sillancorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: Their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(5):2141-2151.
60. Latka A, Maciejewska B, Majkowska-Skrobek G, Briers Y, Drulis-Kana Z. Bacteriophage encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101:3103-3119.
61. Rodriguez-Rubio L, Martinez B, Donovan D, Rodriguez A, Garcia P. Bacteriophage virion-associated peptidoglycan hydrolases: potential new enzymatics. *Crit Rev Microbiol*. 2013;39:427-434.
62. Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:4107-4112.
63. Nelson DC, Schmelcher M, Rodriguez-Rubio L, Klumpp J, Pritchard DG. Endolysins as antimicrobials. *Adv Virus Res*. 2012;83:299-365.
64. Vazquez R, Demenech M, Iglesias-Bexiga M, Menendez M, Garcia P. Csl2, a novel chimeric bacteriophage lysine to fight infections caused by *Streptococcus suis*, an emerging zoonotic pathogen. *Sci Rep*. 2017;7:16506.
65. Boryowski J, Weber-Dabrowska B, Gorski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med*. 2006;231:366-377.
66. Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11:393-400.
67. Fischetti VA. Development of phage lysins as novel therapeutics: a historical perspective. *Viruses*. 2018;10:310-319.
68. Haddad Kashani H, Schmelcher M, Sabzalipoor H, Seyed Hosseini E, Moniri R. Recombinant endolysins as potential therapeutics against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: current status of research and novel delivery strategies. *Clin Microbiol Rev*. 2017;31(1). Pii: e00071-17.
69. Gersmans H, Criel B, Briers Y. Synthetic biology of modular endolysins. *Biotechnol Adv*. 2018;36(3):624-640.
70. Schmelcher M, Donovan DM, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials. *Future Microbiol*. 2012;7:1147-1171.
71. Chen BK, Abedon ST. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Curr Pharm Des*. 2015;21:85-99.
72. Roach DR, Donovan DM. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage*. 2015;5:e1062590.
73. Sao-Jose C. Engineering of phage-derived enzymes: improving their potential as antimicrobials. *Antibiotics*. 2018;7:29-60.
74. Yang H, Yu J, Wei H. Engineered bacteriophage lysins as novel anti-infectives. *Front Microbiol*. 2014;5:542.
75. Totte JEE, van Doom MB, Pasma SGMA. Successful treatment of chronic *Staphylococcus aureus*-related dermatoses with the topical endolysin staphfect SA100: a report of 3 cases. *Case Rep Dermatol*. 2017;9:19-25.
76. Jun SY, Jang IJ, Yoon S, Jang K, Yu K-S, et al. Pharmacokinetics and tolerance of the phage endolysin-based candidate drug SAL200 after a single intravenous administration among healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61:02629-02616.
77. Mosiejewska B, Olszak T, Drulis-Kawa Z. Application of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic applications? *Appl Microb Biotechnol*. 2018;102:2563-2581.
78. Majkowska-Skrobek G, Latka A, Berisio R, Maciejewska B, Squeglia F, et al. Capsule-targeting depolymerase, derived from *Klebsiella* KP36 phage, as a tool for the development of anti-virulent strategy. *Viruses*. 2016;8(12):E324.
79. Pan YJ, Lin TL, Lin YT, Su PA, Chen CT, et al. Identification of capsular type of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains by wzc sequencing and implications for capsule depolymerase treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:1038-1047.
80. Wasch S, Hanifi-Modhaddam P, Coleman R, Mcsotti M, Ryan S, et al. Orally administered P22 phage tailpike protein reduces salmonella colonization in chickens: prospects of a novel therapy against bacterial infections. *PLoS One*. 2010;5:e13904.
81. Glonti T, Chanishvili N, Taylor PW. Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginate acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol*. 2010;108:695-702.
82. Bansal S, Soni SK, Harjai K, Chhibber S. *Aeromonas punctata* derived depolymerase that disrupts the integrity of *Klebsiella pneumoniae* capsule: optimization of depolymerase production. *J Basic Microbiol*. 2014;54:711-720.
83. Chai Z, Wang J, Too S, Mou H. Application of bacterial-borne enzyme combined with chlorinedioxide on controlling bacterial biofilm. *LWT Food Sci Technol*. 2014;59:1159-1165.

Поступила в редакцию 21.02.19

Received 21.02.19

После доработки 21.03.19

Revised 21.03.19

Принята к публикации 23.03.19

Accepted 23.03.19