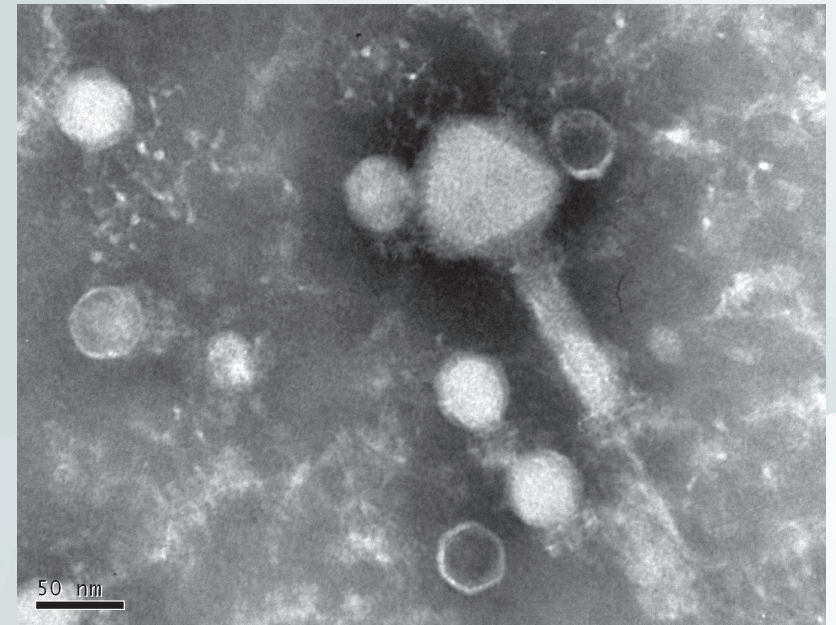


Бактеріофаги: теорія і практика

Харіна А.В., Корнієнко Н.О., Понятовський В.А.,
Пожилов І.М., Широбоков В.П., Андрійчук О.М.,
Будзанівська І.Г., Снігур Г.О., Шевченко О.В.

Бактеріофаги: теорія і практика



Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Національний медичний університет імені О.О. Богомольця



БАКТЕРІОФАГИ: ТЕОРІЯ І ПРАКТИКА

Монографія

Київ
2024

УДК 578.81

Б 19

Авторський колектив:

Харіна А.В., Корнієнко Н.О., Понятовський В.А., Пожилов І.М., Ширококов В.П., Андрійчук О.М., Будзанівська І.Г., Снігур Г.О., Шевченко О.В.

Б 19 Бактеріофаги: теорія і практика. Харіна А.В., Корнієнко Н.О., Понятовський В.А., Пожилов І.М., Ширококов В.П., Андрійчук О.М., Будзанівська І.Г., Снігур Г.О., Шевченко О.В. Київ: Компринт, 2024. 277 с.

ISBN 978-617-8456-26-9

У даній монографії детально обговорено практичне значення бактеріофагів, що впливає з їхньої здатності впізнавати та репродукуватись у бактеріальних клітинах. Розглянуто досягнення, проблеми та перспективи галузі фаготерапії, зокрема роль бактеріофагів у боротьбі з антибіотикорезистентними інфекціями. Особливу увагу приділено технологіям створення генетичних конструкцій на основі бактеріофагів, які можуть бути адаптовані для різних біотехнологічних застосувань. Окремі розділи присвячено можливостям використання бактеріофагів у різних галузях народного господарства, включаючи сільське господарство, харчову промисловість та охорону довкілля.

Монографія призначена для вірусологів, мікробіологів, біотехнологів, медичних працівників, студентів і викладачів вищих навчальних закладів відповідного профілю, які зацікавлені у впровадженні новітніх біотехнологій у практику.

Монографія створена за фінансової підтримки Національного фонду досліджень України (грант 2022.01/0065 «Бактеріофаги як біологічні агенти контролю бактеріальних ускладнень у постраждалих з вогнепальними та мінно-вибуховими травмами») та компанії ТОВ «НеоПроБіоКеар-Україна».



УДК 578.81

ISBN 978-617-8456-26-9

© Колектив авторів, 2024

Вступ.....	4
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА РОЛЬ БАКТЕРІОФАГІВ У ПРИРОДІ	6
1.1. Загальна характеристика бактеріофагів (Харіна А.В., Пожилов І.М.)	6
1.2. Екологія бактеріофагів (Харіна А.В., Корнієнко Н.О.)	41
1.3. Еволюція бактеріофагів (Будзанівська І.Г.)	68
РОЗДІЛ 2. ЗАСТОСУВАННЯ ФАГІВ У МЕДИЦИНІ (Понятовський В.А., Широбоков В.П.)	84
2.1. Взаємодія бактеріофагів з макроорганізмом. Бактеріофаги як частина мікробіому людини	84
2.2. Історія застосування бактеріофагів в медицині	87
2.3. Законодавче регулювання фаготерапії	93
2.4. Використання фагів в різних галузях медицини	93
2.5. Клінічні дослідження з фаготерапії.....	102
2.6. Обмеження та переваги фаготерапії.....	109
2.7. Перспективи використання фагів в медицині.....	116
РОЗДІЛ 3. ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ У БІОТЕХНОЛОГІЇ (Шевченко О.В., Снігур Г.О.)	138
3.1. Бактеріофаги як вектори	139
3.2. Гібридні вектори на основі бактеріофагів і плазмід.....	147
3.3. Експресійні вектори на основі бактеріофагів	150
3.4. Фаговий дисплей	151
РОЗДІЛ 4. ІНШІ СФЕРИ ЗАСТОСУВАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ (Корнієнко Н.О., Андрійчук О.М.)	200
4.1. Підходи до застосування фагів у харчовій промисловості	200
4.2. Застосування бактеріофагів у рослинництві.....	204
4.3. Застосування бактеріофагів у тваринництві	224
4.4. Фаготерапія в аквакультурі	233
4.5. Перспективи використання бактеріофагів у бджолярстві.....	235
4.6. Біосанація та біоконсервація з використанням бактеріофагів	236

Вступ

Відкриття бактеріофагів — вірусів, здатних репродукуватись в бактеріальних клітинах, відбулось понад сто років тому і стало важливим науковим проривом в біології та медицині. Відтоді дослідники намагалися втілити в життя практичний потенціал цих вірусів, і з перших кроків їхнього відкриття бактеріофаги розглядались як інструмент боротьби з патогенними бактеріями (для фаготерапії). Слід відмітити, що спочатку дослідження природи фагів відставали від їхньої імплементації у лікувальний процес, і між першими спробами лікування бактеріальних інфекцій за допомогою бактеріофагів та візуалізацією самих вірусних часток пройшло більше 10 років, а механізми взаємодії з бактеріальною клітиною були відкриті ще пізніше. Цей факт, а також впровадження у клінічну практику антибіотиків, відкинули розвиток фаготерапії, як однієї з сторін практичного застосування бактеріофагів, на більше ніж півстоліття. Подальші глибокі дослідження структури та життєвих циклів бактеріофагів пролили світло на особливості взаємодії цих вірусів зі своїми хазяями. Отримані фундаментальні знання відкрили нові перспективи для практичного використання бактеріофагів, і сьогодні ми розглядаємо бактеріофаги як зручні модельні системи для наукових досліджень, як потужні біотехнологічні інструменти, та як агенти боротьби з патогенними/шкідливими бактеріями.

Завдяки використанню бактеріофагів як модельних об'єктів вдалося значно розширити наше розуміння основних принципів генетики та молекулярної біології. Бактеріофаги стали важливими інструментами для дослідження процесів реплікації ДНК, передачі генетичної інформації та мутацій. Досліди з фагами сприяли відкриттю ролі ДНК як носія спадкової інформації, що стало фундаментом для подальших досліджень у галузі генетики. Крім того, бактеріофаги допомогли вивчити механізми регуляції генів і стали основою для розвитку технологій генної інженерії. Внесок цих досліджень важко переоцінити,

оскільки багато сучасних біотехнологічних та медичних досягнень спираються на результати, отримані завдяки вивченню цих вірусів.

Бактеріофаги, як об'єкти, які легко піддаються генетичним маніпуляціям, знаходять широке використання в біотехнологічних процесах та в біоінформатиці для створення фагових бібліотек, які допомагають ідентифікувати нові мішені для антимікробних препаратів. Завдяки своїй специфічності фаги можуть використовуватись для розробки біосенсорів.

В контексті розвитку кризи антибіотикотерапії ми знову повертаємось до питання фаготерапії. У сучасному світі проблема антибіотикорезистентності набула глобальних масштабів. Станом на 2024 р. фахівці з Всесвітньої організації охорони здоров'я заявляють про 4,95 мільйона щорічних смертельних випадків, пов'язаних із бактеріальною антибіотикорезистентністю. На фоні бойових дій ця проблема особливо гостро стоїть в Україні. Сучасні дослідження демонструють успішне використання бактеріофагів не тільки в клінічних умовах, але й у сільському господарстві та харчовій промисловості, де вони допомагають контролювати патогени, покращуючи санітарні умови та підвищуючи якість продукції.

Отже, у сучасному технологічно розвиненому світі бактеріофаги привертають дедалі більше уваги завдяки їхньому потенціалу стати ефективними антибактеріальними засобами, інструментами для діагностики, системами фагового дисплею, а також засобами для доставки вакцин.

Зважаючи на посилення інтересу та численні відкриття в цій галузі, автори даної монографії поставили собі за мету детально проаналізувати властивості фагів, які зумовлюють їхнє практичне застосування у різних галузях, і розглянути проблеми та потенційні напрями подальшого розвитку нових технологій на основі цих вірусів.

Автори висловлюють подяку Національному фонду досліджень України (грант 2022.01/0065 «Бактеріофаги як біологічні агенти контролю бактеріальних ускладнень у постраждалих з вогнепальними та мінно-вибуховими травмами») та компанії ТОВ «НеоПроБіоКеар-Україна» за фінансову підтримку досліджень.

РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА РОЛЬ БАКТЕРІОФАГІВ У ПРИРОДІ

1.1. Загальна характеристика бактеріофагів

1.1.1. Історичний екскурс

Бактеріофаги були відкриті на початку ХХ століття незалежно двома вченими: англійським бактеріологом Фредеріком Твортом і франко-канадським мікробіологом Феліксом д'Ерелем. Втім, перші згадки про бактеріофаги датуються кінцем ХІХ століття. Ще в 1896 році британський бактеріолог Ернест Хенкін зауважив, що вода з річки Ганг має властивість знищувати бактерії, проте ця властивість зникає після кип'ятіння. М.Ф. Гамалія у 1898 р. вперше описав явище лізису бактеріальних культур, збудників сибірської виразки, черевного тифу та холери. Він назвав агент, який спричиняв цей процес, бактеріолізином. Науковець зробив припущення, що бактеріолізін виділяється бактеріальними культурами під час їхнього росту.

В 1915 році Фредерік Творт описав агент, що інфікував культуру стафілокока з утворенням зон лізису на бактеріальному газоні. Вчений висловив припущення що літичний агент мав вірусну природу і ендогенне походження. Робота Ф. Творта в 1915 р. була надрукована в журналі «Ланцет», але не мала відгуку серед ученої спільноти, і подальші дослідження були припинені через відсутність їхньої підтримки.

Фелікс д'Ерель, який працював в інституті Пастера, у 1917 році проводив дослідження бактерій, що викликають дизентерію. Він помітив, що фільтрат зразків, отриманих від пацієнтів, містить агент, здатний руйнувати бактеріальні культури. Ф. д'Ерель назвав цей агент *бактеріофагом*, що означає «пожирач бактерій» (від грецьких слів *bakterion* та *φάγος* — пожирач). Він визначив, що *бактеріофаги* — це віруси, які специфічно інфікують і знищують бактерії. Усвідомлюючи значимість відкриття та можливості прикладного застосування бактеріофагів, Ф. д'Ерель детально описав свої спостереження. Відкриття

бактеріофагів стало важливим проривом у мікробіології, оскільки воно не лише розширило розуміння вірусів, але й відкрило нові можливості для лікування бактеріальних інфекцій. Перші дослідження показали ефективність фагів, і наукові роботи, пов'язані з вірусами бактерій, почали з'являтися у медичних журналах. Ці роботи поклали початок новому напрямку лікування бактеріальних захворювань – фаготерапії. Її розвиток пройшов через кілька етапів: від початкових відкриттів, через занепад методології і до сучасного відродження інтересу, зумовленого зростаючою проблемою антибіотикорезистентності. Детальніше про це буде описано в розділі 2.4.

Під час дослідження історії розвитку вчення про бактеріофаги впадає в око той факт, що практичне застосування цих об'єктів передувало вивченню їхніх біологічних властивостей. Дослідження морфології фагів стали можливими лише з появою електронного мікроскопа в 1938 році. Електронно-мікроскопічні дослідження бактеріофагів виявили, що вони представляють собою гетерогенну групу вірусів з різноманітними формами, розмірами та структурами віріонів, що заклало основу для першої систематики бактеріофагів.

Величезний внесок в розвиток розуміння природи бактеріофагів зробили Сальвадор Лурія і Макс Дельбрюк. Вони були одними із засновників «Фагового гуртка» – неформальної групи вчених, яка зібралася навколо досліджень бактеріофагів. Вони використовували бактеріофаги як модельні організми для вивчення фундаментальних аспектів вірусної структури та функцій. У цей період були зроблені важливі відкриття, що стосуються морфології та особливостей інфекційних циклів бактеріофагів. Учасники цієї групи, включно з такими видатними науковцями, як Альфред Херші, Джеймс Уотсон та Френсіс Крік, зіграли ключову роль у розвитку молекулярної біології. Завдяки їхній роботі були відкриті фундаментальні механізми спадковості та структури ДНК.

З розвитком методів кристалографії та криоелектронної мікроскопії у другій половині ХХ століття з'явилася можливість досліджувати тривимірну структуру бактеріофагів на атомарному рівні. Це дозволило детально описати будову їхніх капсидів та білків хвостових відростків, дослідити механізми прикріплення до

бактерій та введення генетичного матеріалу. Ці досягнення дали нові уявлення про взаємодію фагів з бактеріями та їхню еволюцію.

У 1970-х роках, на хвилі розвитку технології рекомбінантних ДНК, фаг λ став однією з перших векторних систем, широко застосовуваних для клонування генів. Його геном міг бути модифікований так, щоб включати значні фрагменти ДНК інших організмів, що робило його ідеальним інструментом для генетичних досліджень і розробок. З часом інші фаги були досліджені як векторні конструкції для переносу та маніпуляції генетичним матеріалом, про що детальніше буде описано в розділі 3.

З 90-х років ХХ століття дослідження бактеріофагів сягнуло нового рівня. Зокрема, були розкриті їхня екологічна роль та оцінений вплив на біосферу та процеси, які її формують. Підрозділ 1.2 присвячений глибшому аналізу ролі бактеріофагів у біосфері.

1.1.2. Загальна характеристика бактеріофагів

Бактеріофаги – гетерогенна група вірусів, які уражують представників царства *Eubacteria* домену *Bacteria*. Фаги – не єдині відомі віруси, що уражують мікроорганізми, поряд з ними існують віруси архей (домен *Archaea*). Часто під терміном «бактеріофаги» об'єднують усі види вірусів прокаріот, але це спірне питання. Також точаться суперечки щодо самого терміну «бактеріофаги», і деякі автори вважають більш коректним термін «віруси мікроорганізмів».

Перші бактеріофаги описані як віруси еубактерій, зокрема кишкової палички (*Escherichia coli*) та кишкових шигелл (*Shigella spp.*). Перші віруси архей виділено із мікроорганізмів (1974 р.), які вважалися бактеріями, та потім були відокремлені в домен *Archaea*. Після розподілу хазяїв «бактеріофагів» на окремі домени живого (1977 рік), деякі школи вірусологів почали ототожнювати віруси архей із бактеріофагами.

У західній літературі віруси архей інколи називають «архефагами» за аналогією із бактеріофагами. Віруси бактерій і віруси архей – це дві

поліфілетичні гілки вірусів, що інфікують групи прокаріотичних організмів. Окремі бактеріофаги здатні уражувати як клітини бактерій, так і клітини архей, зокрема фаг φН (родина *Vertoviridae*) та фаг φМ1 (родина *Autographiviridae*). Деякі представники родини *Tectiviridae* здатні уражувати бактерій, інші – архей. Подібне явище є винятковим для бактеріофагів, у той час як жоден відомий вірус із групи вірусів архей не здатний уражувати клітини евбактерій.

Як група вірусів, які уражують особливу групу хазяїв, бактеріофаги мають ряд ознак, які відрізняють їх від інших груп вірусів:

1. Геноми ~95% відомих бактеріофагів представлені дволанцюговою ДНК, а загалом ~97% відомих фагів мають ДНК-геном;
2. ДНК бактеріофагів є багатою на азотисті основи А-Т;
3. ДНК фагів можуть містити нетипові мінорні азотисті основи, зокрема 5-гідроксиметилцитозин та 6-метиламінопурин, які захищають геноми вірусів від деградації системами рестрикції-модифікації бактерії;
4. У ~95% бактеріофагів капсид має змішаний тип симетрії, і представлений голівкою ікосаедричного типу симетрії і хвостовим відростком спірального типу симетрії;
5. Бактеріофагам притаманне явище *мозаїчності геномів*: окремі генетичні блоки є мобільними і можуть дрейфувати з одного фагового геному в інший при суперінфекції, сприяючи генетичному різноманіттю;
6. Бактеріофаги мають найвищу швидкість реплікації серед відомих вірусів. В окремих випадках повний життєвий цикл, від ураження клітини до виходу фагового потомства, займає ~5 хвилин (бактеріофаг φX176);
7. Бактеріофаги відіграють ключову роль у процесі горизонтального переносу генів серед бактерій. Зокрема, вони здатні переносити гени вірулентності від одного бактеріального виду-хазяїна до іншого. Це призводить до формування нових, змінених штамів бактерій, які можуть мати посилені патогенні властивості або нові механізми стійкості до лікування (в тому числі, антибіотикорезистентності).

1.1.3. Невпинна революція в таксономії бактеріофагів

Таксономія бактеріофагів еволюціонувала від дисципліни, що базується головним чином на морфологічних критеріях (праці Девіда Бредлі та Ганса-Вольфганга Акермана), до підходу, заснованого на порівнянні генних послідовностей. Наразі для визначення таксономічного положення нового вірусу підкомітет з бактеріальних вірусів Міжнародного комітету з таксономії вірусів (ICTV) застосовує всебічний підхід, враховуючи загальну подібність ДНК/РНК, білкових структур і філогенетичні зв'язки. Величезна кількість повногеномних генетичних послідовностей, які зберігаються в Національному центрі біотехнологічної інформації (NCBI) та інших загальнодоступних базах даних, призвела до переоцінки принципів таксономії багатьох вірусів, і фахівці в галузі таксономії бактеріофагів отримали величезний шмат роботи.

На час написання даного огляду таксономія вірусів і, особливо, бактеріофагів, зазнала революційних змін, пов'язаних зі зміною старих звичних таксонів (*Caudovirales*, *Myoviridae*, *Podoviridae* і *Siphoviridae*), появою багатьох нових таксонів (клас *Caudoviricetes*, родини *Ackermann-viridae*, *Chaseviridae*, *Demerec-viridae*, *Drexler-viridae*, *Autographiviridae* та інші) і переходом до біноміальної номенклатури. Схему поділу класу *Caudoviricetes* на порядки і родини наведено на рис.1.1.

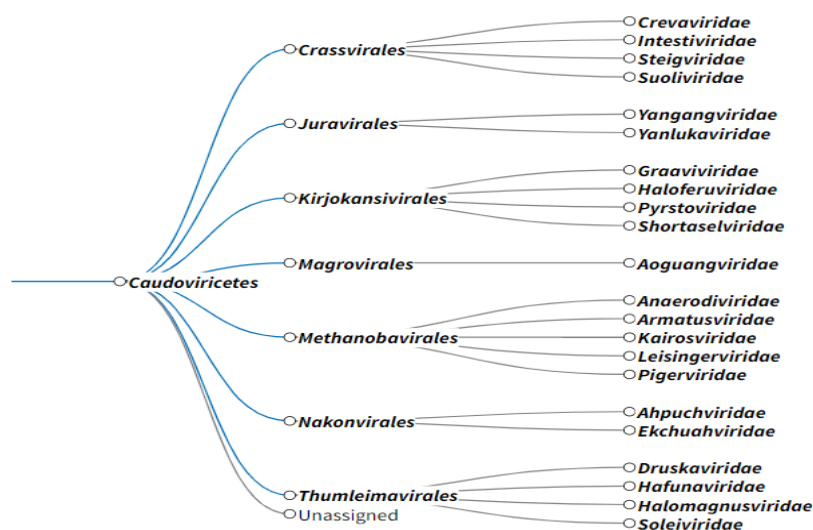


Рис. 1.1 – Схема поділу класу *Caudoviricetes* на таксони нижчого рівня (<https://ictv.global/taxonomy/visual-browser>)

Враховуючи результати численних незалежних досліджень, які свідчать, що «старі» морфологічні родини є поліфілетичними та неточно відображають спільну еволюційну історію, зміни в таксономії стали невідворотними. В даний час терміни міо-, сифо-, подовіруси надалі рекомендується застосовувати для опису морфології вірусних частинок відповідних вірусів (Turner et al., 2021).

Станом на 2024 р. фіксуються певні труднощі у пошуках точного таксономічного положення бактеріофагів і, насамперед, це пов'язано з уточненням назв багатьох вірусів. Наприклад, у останніх релізах таксономії бактеріофаг лямбда слід шукати як *Lambdavirus lambda* (*Enterobacteria phage lambda*), бактеріофаг T7 – *Teseptimavirus T7* (*Escherichia virus T7*), бактеріофаг T4 – *Tequatrovirus T4* (*Escherichia virus T4*). Загалом, більше 2500 видів бактеріофагів були перейменовані (Turner et al., 2023).

Отже, на даному етапі завдання навести характеристики всіх родин бактеріофагів втрачає свій сенс, оскільки їх доволі багато, і ситуація з класифікацією вірусів є надзвичайно динамічною. Члени ICTV активно працюють над розширенням таксономічних рівнів, залучаючи до роботи не тільки вірусологів, а й біоінформатиків, еволюційних біологів, мікробіологів. Якщо раніше класифікація обмежувалася родами та родинами, зараз з'являються такі нові рівні, як порядки, класи та навіть царства вірусів (таб. 1.1). Це дозволяє краще структурувати знання про віруси і систематизувати їх на основі генетичних, структурних та екологічних характеристик.

Таблиця 1.1 – Порівняння змін у таксономії бактеріофагів на прикладі бактеріофагу T7 (*Teseptimavirus T7*, *Escherichia virus T7*)

Стара класифікація	Класифікація після 2021 року
<p>Order: <i>Caudovirales</i></p> <p>Family: <i>Podoviridae</i></p> <p>Subfamily: <i>Autographivirinae</i></p> <p>Genus : <i>T7virus</i></p> <p><i>Enterobacteria phage T7</i></p>	<p>Realm: <i>Duplodnaviria</i></p> <p>Kingdom: <i>Heunggongvirae</i></p> <p>Phylum: <i>Uroviricota</i></p> <p>Class: <i>Caudoviricetes</i></p> <p>Family: <i>Autographiviridae</i></p> <p>Subfamily: <i>Studiervirinae</i></p> <p>Genus: <i>Teseptimavirus</i></p> <p><i>Teseptimavirus T7</i></p>

Починаючи з 2016 р. вносились щорічні правки з кардинальним стрибком у 2021 р. Нові релізи таксономії можна знайти на веб-сторінці ICTV (<https://ictv.global>), де вони доступні для завантаження у вигляді двох файлів формату Excel: головного списку видів (Master Species List) і ресурсу метаданих вірусів (Virus Metadata Resource).

1.1.4. Склад та структурна організація бактеріофагів

Бактеріофаги неоднорідні за своїми структурними, фізико-хімічними та біологічними властивостями і, найбільш ймовірно, вони мають поліфілетичне походження. Подібно до інших вірусів, бактеріофаги складаються з білків та нуклеїнової кислоти, а складні бактеріофаги мають у своєму складі ще й ліпіди. Геноми фагів представлені або ДНК, або РНК, які можуть бути дволанцюговими або одноланцюговими. Генетичний матеріал різних бактеріофагів упаковується в капсиди різної морфології (рис.1.3). Морфологія віріонів бактеріофагів тісно пов'язана з їхньою здатністю інфікувати бактеріальні клітини, та визначає спосіб прикріплення і проникнення в них. Виділяють наступні морфологічні типи вірусів бактерій:

1. **Ікосаедричні** (поліедричні) фаги. Генетичний матеріал цих фагів знаходиться в поліедричному капсиді. Прикладами таких фагів є представники наступних родин: *Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae* та *Cystoviridae*;
2. **Ниткоподібні** фаги – мають довгі, тонкі капсиди, які нагадують нитку або паличку (*Inoviridae*);
3. **Плеоморфні** фаги – мають змінну або нерегулярну форму (*Plasmaviridae*);
4. **Фаги з хвостовими відростками** (рис. 1.2) – віруси, у яких капсид (голівка) з'єднана з хвостовим відростком, який може бути коротким або довгим, а також простим або складним (клас *Caudoviricetes*).

Попри значну різноманітність у природі, близько 95% бактеріофагів, що вивчені, демонструють схожість у своїй структурі і здебільшого з докільця виділяють членів класу *Caudoviricetes* (раніше порядок *Caudovirales*). Представники цієї групи у своїх віріонах поєднують структури двох типів симетрії:

1. Голівка **ікосаедричного** типу симетрії, в якій зосереджено генетичний матеріал, а подекуди й білки, які приймають участь в захисті фагової ДНК від бактеріальних систем деградації чужорідної ДНК (РМ-системи) та систем захисту, які кодують інтегровані профаги;
2. Хвостовий відросток **спірального** типу симетрії, який виконує ряд життєво-важливих функцій, зокрема, розпізнавання рецепторів на поверхні клітини та забезпечення проникнення геному бактеріофагу до клітини-хазяїна.

В межах цього класу бактеріофаги значно відрізняються за розмірами. Розмір голівки може варіювати від 45 до 185 нм і, зазвичай, залежить від розміру геному. Близько 75% фагів мають ікосаедричні голівки, у решти спостерігаються видовжені капсиди (Dion et al., 2020).

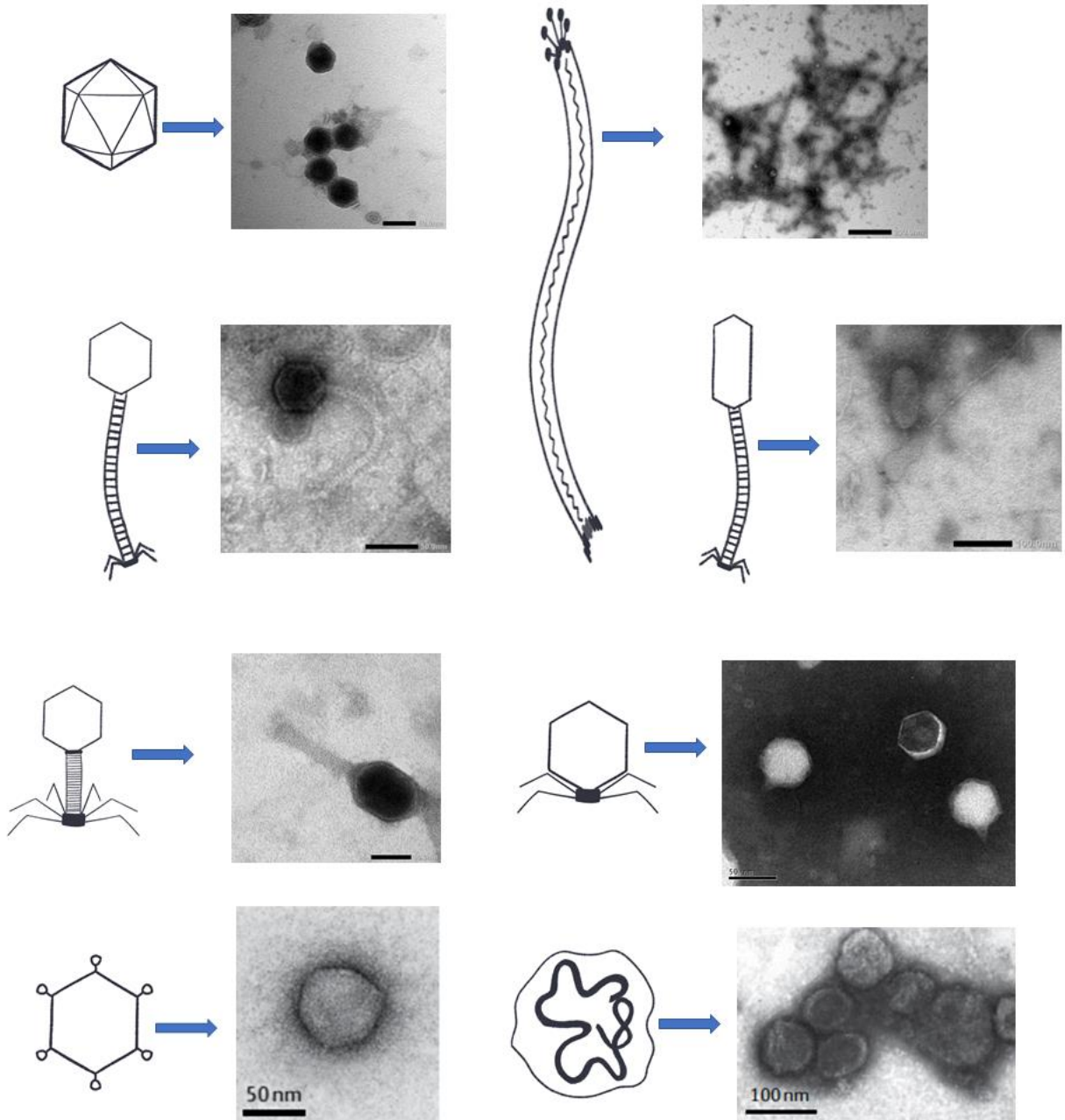


Рис. 1.2 – Морфологічне різноманіття бактеріофагів (праворуч наведено електронномікроскопічні зображення різних фагів, ліворуч – їхні схематичні зображення)

Цікавим є той факт, що мажорний капсидний білок у представників класу *Caudoviricetes* містить структурний мотив НК97 (НК97 fold). Ця структура відіграє вирішальне значення в процесі формування вірусних капсидів і вперше була виявлена у бактеріофага НК97 (Suhanovsky, Teschke 2015). Мотив НК97

характеризується унікальною топологією, яка дозволяє білкам вірусу взаємодіяти з утворенням стабільного капсиду у формі ікосаедра. Виявлення і дослідження цього мотиву у багатьох вірусів сприяє розкриттю механізмів еволюції вірусних структур, розумінню процесів самозбірки капсидів і їхньої стабілізації, а також відкриває нові можливості для розробки антивірусних препаратів та методів лікування, які можуть впливати на ці ключові етапи життєвого циклу вірусів.

До голівки приєднується трубчаста структура – **хвостовий відросток**, яка значно відрізняється у різних груп фагів. Приєднання відбувається через спеціальну структуру – конектор, котрий часто містить порталний білок та інші білки (білки дозрівання голівки, конекторні білки). Незважаючи на відмінності у амінокислотних послідовностях, структура порталного комплексу є подібною у багатьох фагів і являє собою дванадцятимерне кільце (Dedeo et al., 2019).

Хвостовий відросток може мати складну будову, включаючи базальну пластину, стрижень, короткі та довгі нитки (фібрили), які допомагають фагу прикріпитися до поверхні бактерії. У представників *Caudoviricetes* виділяють три основні типи хвостових відростків: довгі хвостові відростки (гнучкі нескорочувані у сифовірусів і жорсткі скорочувані у міовірусів), короткі нескорочувані у подовірусів (рис. 1.3).

Гнучкі хвостові відростки сифовірусів можуть мати багатокомпонентну структуру та складатись з кількох типів білків. Розміри таких відростків варіюють від 100 до 500 нм, залежно від фагу. В поодиноких випадках виявляють фаги з надзвичайно довгими хвостовими відростками. Наприклад, бактеріофаг *Thermus thermophilus* P74-26 має хвостовий відросток довжиною більше 875 нм (Agnello et al., 2022). У зв'язку з особливою морфологією бактеріофаг P74-26 навіть отримав прізвисько «Рапунцель».

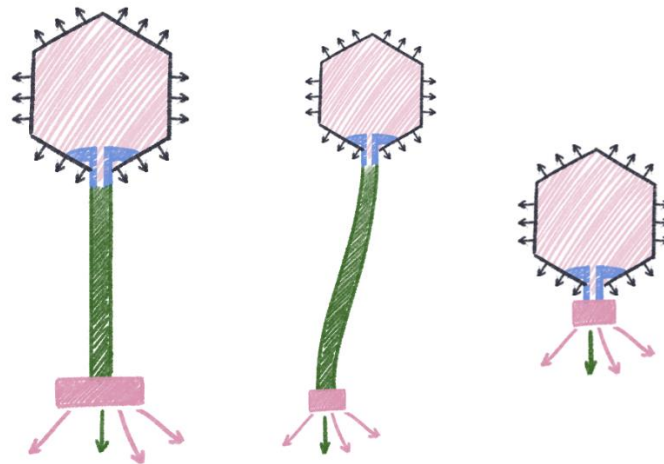


Рис. 1.3 – Різні типи хвостових відростків представників *Caudoviricetes* (зліва направо – міо-, сифо і подоподібні вірусні частинки)

Скорочувані хвостові відростки мають здатність скорочуватися під час інфікування бактерії. Такі структури складаються з внутрішньої трубки (стрижня) і зовнішньої оболонки (чохла).

Короткі хвостові відростки зазвичай містять менше структурних компонентів, але все одно виконують функцію введення генетичного матеріалу в бактеріальну клітину.

Базальна пластинка у бактеріофагів є структурним елементом міовірусів і сифовірусів, який відіграє важливу роль в інфекційному циклі. Вона розташована біля основи хвостового відростка бактеріофагів і пов'язана з хвостовими фібрилами та/або шипами. За своєю природою базальна пластинка є складною білковою структурою, що має форму шестикутної платформи або кільця. Вона складається з декількох різних типів білків, які утворюють функціональні комплекси для кріплення фага до клітини-мішені (рис. 1.4).

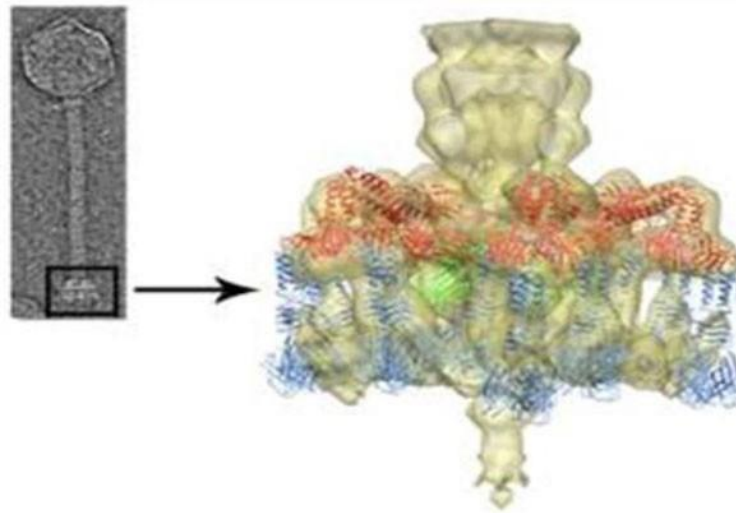


Рис. 1.4 – Структура базальної пластинки на прикладі фага *L. lactis* TP901-1.

Ліворуч: електронна мікрофотографія фага TP901-1, після негативного контрастування. **Праворуч:** тривимірна реконструкція апарату адсорбції (ця область виділена чорним квадратом на мікрофотографії). Базальна пластинка складається з 18 копій VppU (червоний колір), що розташовані навколо центрального гексамера Dlt (зелений колір) і утримують вісімнадцять тримерних білків, що зв'язуються з рецепторами (RBP, синій колір) (Mahony et al., 2014).

Ще однією важливою структурою бактеріофагів є **стрижень** – порожниста трубка, яка проходить крізь центральну частину хвостового відростка і використовується для перфорування клітинної стінки бактерії та введення генетичного матеріалу в клітину.

Загалом у багатьох бактеріофагів можуть бути присутні **додаткові структурні елементи**, такі як хвостові фібрили або ферменти, які допомагають проникнути через клітинну стінку бактерії.

Ліпидовмісні бактеріофаги

Фаги, які належать до родин *Tectiviridae* (наприклад, фаг PRD1) та *Corticoviridae* (наприклад, фаг PM2), мають ікосаедричні безхвості віріони, котрі містять внутрішню ліпідну мембрану та лінійні або кільцеві дволанцюгові ДНК-геноми, відповідно. Важливою характеристикою цих двох родин фагів є

тримерний мажорний капсидний білок (MCP), який містить особливі структури: β -циліндри. Структурний аналіз MCP фага PRD1 показав наявність N-кінцевої α -спіралі, яка безпосередньо взаємодіє з внутрішньою мембраною фага і має структурну гомологію з MCP аденовірусів. Крім того, рецептор-зв'язувальний білок (RBP), розташований на ікосаедричних вершинах капсидів фагів PRD1 і PM2, також структурно подібний до N-кінцевих доменів усіх аденовірусів людини. Фаг PRD1 не має хвостового відростка для введення свого геному в грам-негативного хазяїна, але було помічено, що його мембрана перетворюється на протеоліпідну трубку, яка може проникати крізь оболонки клітини-хазяїна. На відміну від фагів родин *Corticoviridae* та *Tectiviridae*, які мають внутрішні ліпідні мембрани, представники родини *Cystoviridae*, зокрема фаг ϕ 16, мають ліпідні мембрани, що оточують їхні ікосаедричні капсиди (аналогічно до суперкапсидів складних вірусів людини і тварин, чи рослин) рис. 1.5.

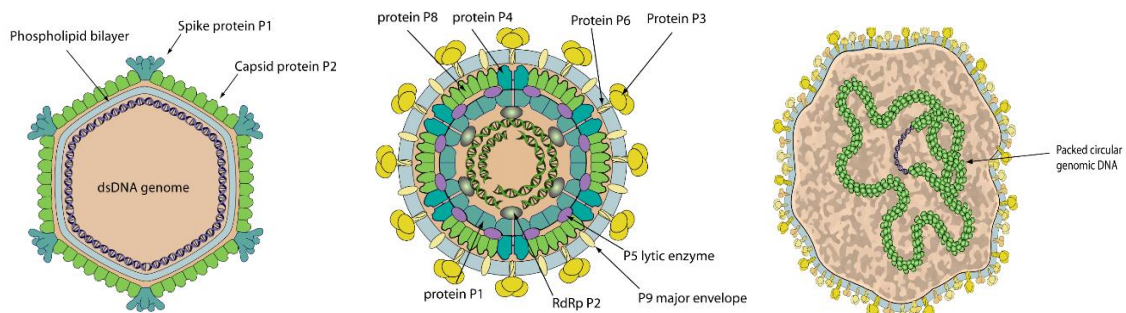


Рис. 1.5 – Порівняння віріонів бактеріофагів, які містять ліпіди у своєму складі (зліва направо: *Corticoviridae*, *Cystoviridae*, *Plasmaviridae*) (<https://viralzone.expasy.org/>)

Вірус *Acholeplasma laidlawii* phage L2 (AVL2; також відомий як MVL2) наразі є єдиним класифікованим членом родини *Plasmaviridae*. AVL2 інфікує безклітинні бактерії роду *Acholeplasma*, і нові віріони вивільняються шляхом брунькування мембрани без лізису клітини.

Фаги родини *Plasmaviridae* не мають капсиду, але їхні геноми вкриті білковою ліпідною везикулою, що має подібний склад до зовнішньої мембрани фага ϕ 16.

Геноми бактеріофагів

Фаги зазвичай мають унікальні описані вище морфологічні структури, які закодовані в їхньому геномі. Розміри фагових геномів значно варіюють і морфологія віріонів відіграє не останню роль у цьому. Хоча фаги не можуть розмножуватися самостійно, вони здатні швидко реплікуватися шляхом інфікування бактерій і використовуючи власну генетичну інформацію для реплікації та синтезу власних білків. Як результат, фаги стали важливим об'єктом досліджень у сфері реплікації ДНК, генетичної рекомбінації та механізмів генетичної регуляції. Генетичне різноманіття бактеріофагів вражає. Загалом, нуклеотидні послідовності геномів, отримані з фагів з різними спектрами хазяїв, рідко мають подібні послідовності. Подібно до інших вірусів, бактеріофагам притаманні різні типи геномів. За типом нуклеїнової кислоти бактеріофаги діляться на РНК-вмісні та ДНК-вмісні. Втім, слід зауважити, що серед бактеріофагів відсутні (-) РНК-геномні віруси, а також не виявлено фагів, у життєвому циклі яких присутня стадія зворотної транскрипції.

Незважаючи на розмаїття геномів, серед бактеріофагів домінують ДНК-вмісні віруси. Геномна ДНК бактеріофагів може бути різноманітною за своєю структурою та формою. Вона може бути у вигляді одно- або дволанцюгової молекули, а також бути лінійною, кільцевою чи суперспіралізованою. Серед ДНК-вмісних вірусів мікроорганізмів не виявлені представники з сегментованим чи фрагментованим геномом. Лінійні молекули ДНК часто характеризуються наявністю «липких» кінців, а також можуть включати прямі або інвертовані кінцеві повтори, або бути асоційовані з геномними білками. На рис. 1.6 наведено приклад генома *Bacillus phage SPO1*, типового представника родини *Herelleviridae*. Геном цього віруса представлений лінійною дволанцюговою ДНК з довгими кінцевими повторами.

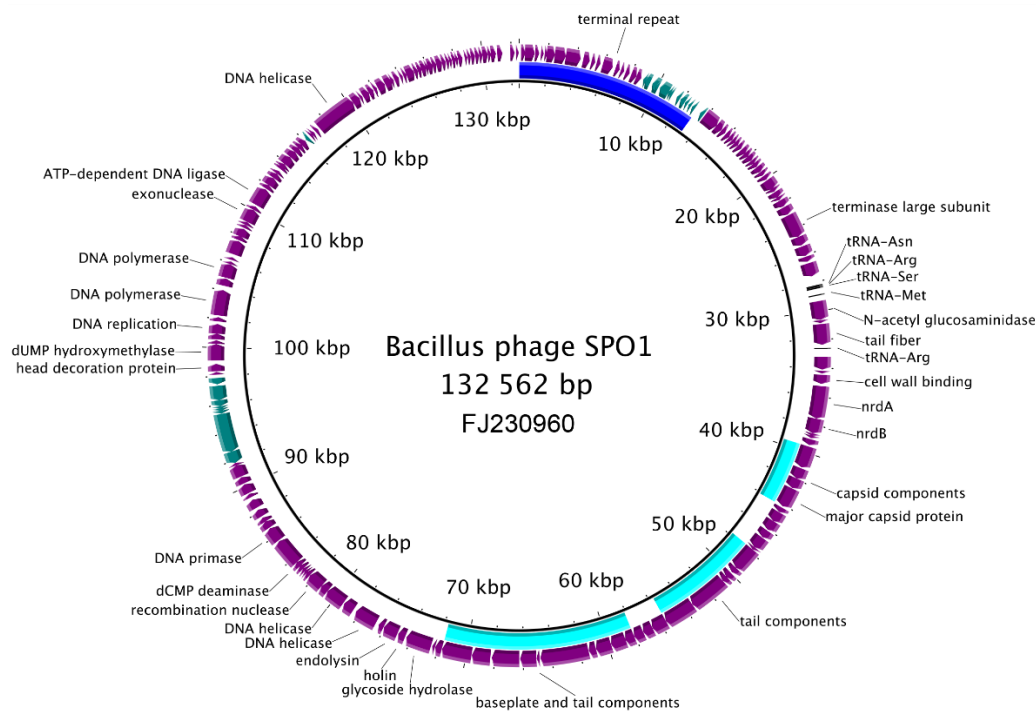


Рис. 1.6 – Організація геному *Bacillus phage SPO1*. Блакитним кольором позначено ділянку з довгими кінцевими повторами (<https://ictv.global/report/chapter/herelleviridae/herelleviridae>)

На даний момент описано 5 родин бактеріофагів, геном яких представлений одноланцюговою кільцевою ДНК: *Inoviridae*, *Paulinoviridae*, *Plectroviridae*, *Microviridae* and *Finnlakeviridae*. З-поміж представників цих родин найкраще охарактеризованими є геноми бактеріофагів фХ174 (*Enterobacteria phage phiX174*) та М13 (*Escherichia phage M13*).

ДНК бактеріофагів може бути глікозильованою, що забезпечує її модифікацію, або бути асоційованою з внутрішніми білками чи основними поліамінами, які відіграють важливу роль у стабілізації структури геному.

Характерною рисою багатьох бактеріофагів є наявність метильованих основ у складі їхньої ДНК, таких як 5'-метилцитозин або 6'-метиламінопурин. Ці метильовані основи можуть функціонувати як мінорні або мажорні компоненти ДНК, забезпечуючи захист фагової ДНК від деградації з боку систем рестрикції бактеріальної клітини-хазяїна, або виконувати інші регуляторні функції. Як приклад, ДНК бактеріофагів fd і фХ174 містить лише декілька метильованих

основ, в той час як у фага XI2, що інфікує бактерію *Xantomonas oryza*, звичайний цитозин повністю заміщений 5-метилцитозином. У Т-парних фагів замість цитозину присутній 5-оксиметилцитозин, а в ДНК фагів, що інфікують *B. subtilis*, таких як фаг SW, тимін замінюється 5-оксиметилурацилом. Ці аномальні основи виникають в результаті ферментативного метилювання вже синтезованого ланцюга ДНК. Специфічні метилази, відповідальні за цей процес, використовують S-аденозилметіонін як джерело метильних груп.

Така варіативність у структурі та модифікаціях геномної ДНК бактеріофагів забезпечує їхню адаптацію до різних умов існування та ефективну взаємодію з бактеріями, що робить бактеріофаги унікальними у біологічному контексті.

Геноми РНК-вмісних фагів можуть також бути представлені як дво-, так і одноланцюговими молекулами, хоча останні зустрічаються частіше. Типовим прикладом РНК-вмісних фагів є представник родини *Fiersviridae* (раніше *Leviviridae*), бактеріофаг MS2 (*Emesvirus zinderi*), який інфікує *Escherichia coli*. Геном бактеріофага MS2 представлений одноланцюговою «+»-РНК.

Сегментований РНК-геном містять представники родини *Cystoviridae*, з типовим представником *Pseudomonas phage phiB*. Як видно з рис. 1.7, геном даного фагу складається з трьох сегментів дволанцюгової РНК, загальна довжина яких становить близько 13,5 т.п.н. Цікавою особливістю цистовірусів є те, що вони — єдині бактеріофаги, які ближче споріднені з вірусами еукаріот, ніж з іншими фагами.

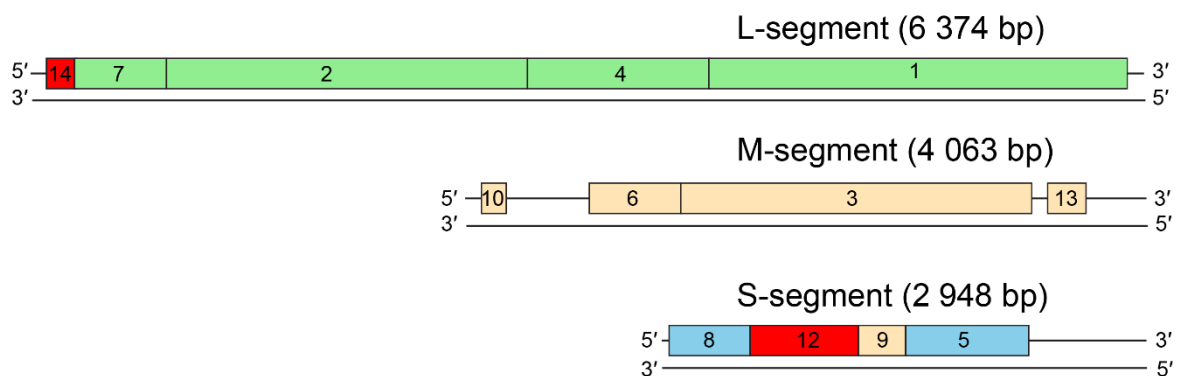


Рис. 1.7 – Організація геному бактеріофагу *Pseudomonas phage phiB* (<https://ictv.global/report/chapter/cystoviridae/cystoviridae>)

Як видно з наведених вище прикладів, розміри геномів фагів значно варіюють. Віруси з розміром геному 30-50 т.п.н. становлять майже половину від загальної кількості секвенованих бактеріофагів, тоді як фаги з геномами, меншими за 10 т.п.н. і з геномами 100-200 т.п.н., відповідно, складають приблизно 20% та 6% від загальної кількості. Важливо зазначити, що геноми фагів демонструють «накладання» відкритих рамок зчитування, коли один і той самий сегмент ДНК може кодувати різні білкові молекули, що ще раз підкреслює складність і різноманітність їхніх геномів.

Ще однією важливою рисою геномів більшості бактеріофагів є **блочний принцип** організації, який полягає в тому, що геном розбивається на відносно незалежні модулі або блоки. Ці блоки можуть відповідати певним генам (відкритим рамкам зчитування) або генним кластерам, що кодують білки або функціональні елементи, пов'язані з певними біологічними процесами.

Мозаїцизм геному як важлива риса геномів фагів — це явище, коли геноми бактеріофагів складаються з фрагментів генетичного матеріалу, котрі походять від різних джерел. Це результат частого обміну генами між різними фагами і навіть між фагами та їхніми бактеріальними хазяями за рахунок процесів горизонтального перенесення генів, рекомбінації та мутацій. Мозаїчні геноми часто мають комбінацію сегментів, які походять від різних фагів, що дозволяє їм бути дуже гнучкими та еволюційно пластичними. Мозаїцизм є важливим аспектом еволюції фагів і відіграє ключову роль у їх здатності швидко адаптуватися до змін навколишнього середовища або до нових бактерій.

Спектр хазяїв

Спектр хазяїв бактеріофага, як одна з основних біологічних характеристик конкретного бактеріального вірусу, визначається родами, видами та штамми бактерій, які він може інфікувати. Бактеріофаги характеризуються певною мірою специфічності, тобто інфікують бактерії одного виду (**моновалентні фаги**), окремі варіанти одного й того ж виду (**типові фаги**) або бактерії різних, але близьких між собою видів (**полівалентні фаги**). Специфічність бактеріофагів до

певного хазяїна – генетично детермінована ознака, і залежить від бактерії, в геномі якої заковані рецепторні білки, які розпізнаються вірусами при інфікуванні.

Фагові рецептори – це специфічні молекули на поверхні бактерій, до яких прикріплюється бактеріофаг для початку інфекції. Ці рецептори можуть бути різноманітними компонентами бактеріальної клітини, а саме ліпополісахаридами, тейхоєвими кислотами або навіть вуглеводними ланцюгами (рис. 1.8).

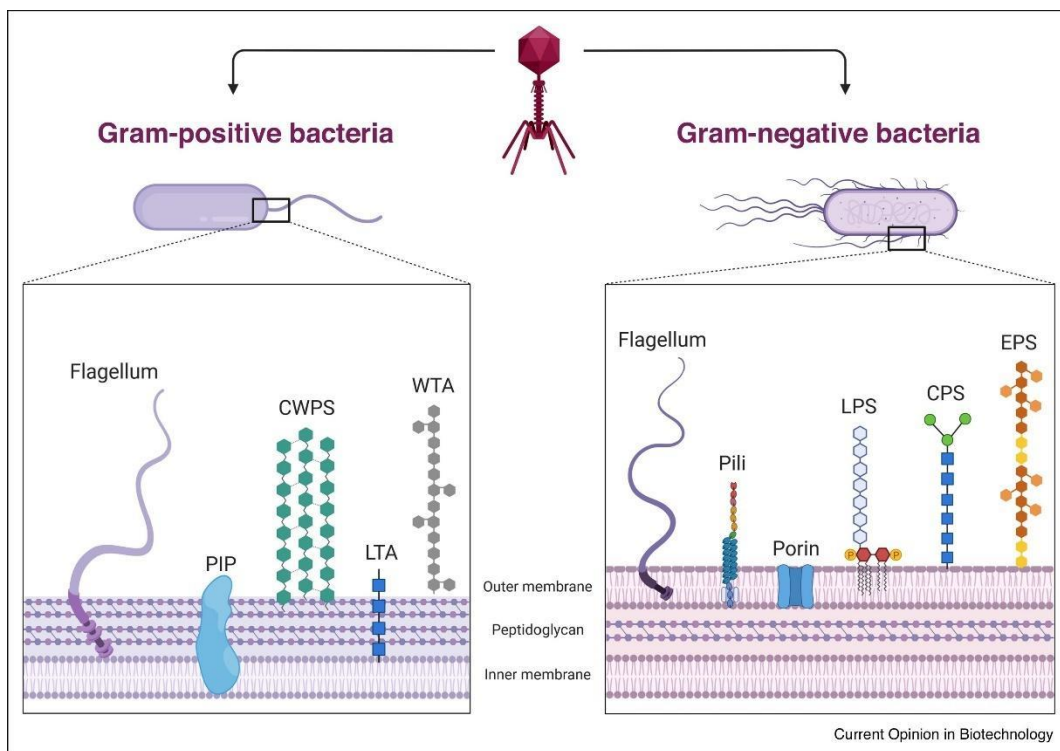


Рис. 1.8 – Приклади фагових рецепторів у грампозитивних (ліворуч) і грамнегативних (праворуч) бактерій (Shen, Loessner 2021)

Взаємодія між рецептором фага і рецептором клітини є високоспецифічною, і визначає спектр хазяїв фага. Моновалентність бактеріофагів пов'язують із здатністю взаємодіяти з певним типом рецепторів або специфічними ліпополісахаридами, у той час як полівалентні бактеріофаги можуть взаємодіяти із консервативними рецепторами бактерій, часто – з білками, які входять до складу статевих (F) пілей – пілінами (рис. 1.9). Відповідно, полівалентні фаги у переважній більшості є «стать»-специфічними, і результативність їх реплікації в хазяях, що належать до різних видів бактерій, залежить, в першу чергу, від систем

захисту, які наявні в ураженій бактеріальній клітині та здатності фагів уникати дії захисних систем (Rakhuba et al., 2010).

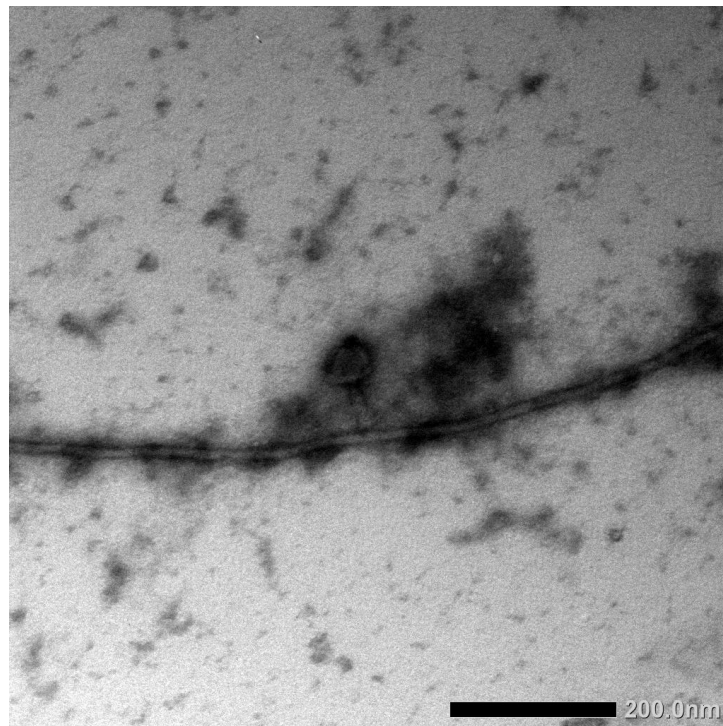


Рис. 1.9 – Електронно-мікроскопічне зображення бактеріофагу, адсорбованого на пілі бактерії

Рецептори клітини-хазяїна впізнаються спеціальними рецептор-зв'язувальними білками (RBP - receptor-binding protein), які локалізуються на хвостовому відростку або дистальному кінці вірусної частинки. RBP значно варіюють у різних фагів, відповідно до морфології фагів і специфічних механізмів, за допомогою яких фаги взаємодіють з бактеріальною клітиною. У той час як більшість фагів експресують лише один тип RBP, деякі фаги експресують кілька типів RBP, які розпізнають різні рецептори. Це дозволяє фагу інфікувати кількох різних хазяїв навіть за високої варіабельності молекул на їхній поверхні (Sørensen et al., 2021).

Найкраще вивченими є RBP у фагів, які мають хвостові відростки (міо-, сифо- і подовіруси). У цієї групи бактеріофагів виділяють дві категорії RBP: хвостові фібрили (TF) та хвостові шипоподібні білки (TSP). Прикладом

хвостових фібрил є gp37 (рис. 1.10) і gp75 у бактеріофага T4 і *Salmonella* phage FO1a, відповідно. Як правило, хвостовим фібрилам бракує ферментативної активності. Натомість, шипоподібні білки володіють і ферментативною активністю. Тому, окрім розпізнавання клітинного рецептору, вони також відіграють певну роль у проникненні фагу до клітини. Ці структури здатні зв'язувати та руйнувати ліпополісахариди (LPS) або капсульні полісахариди (CPS) клітинної стінки бактерій.

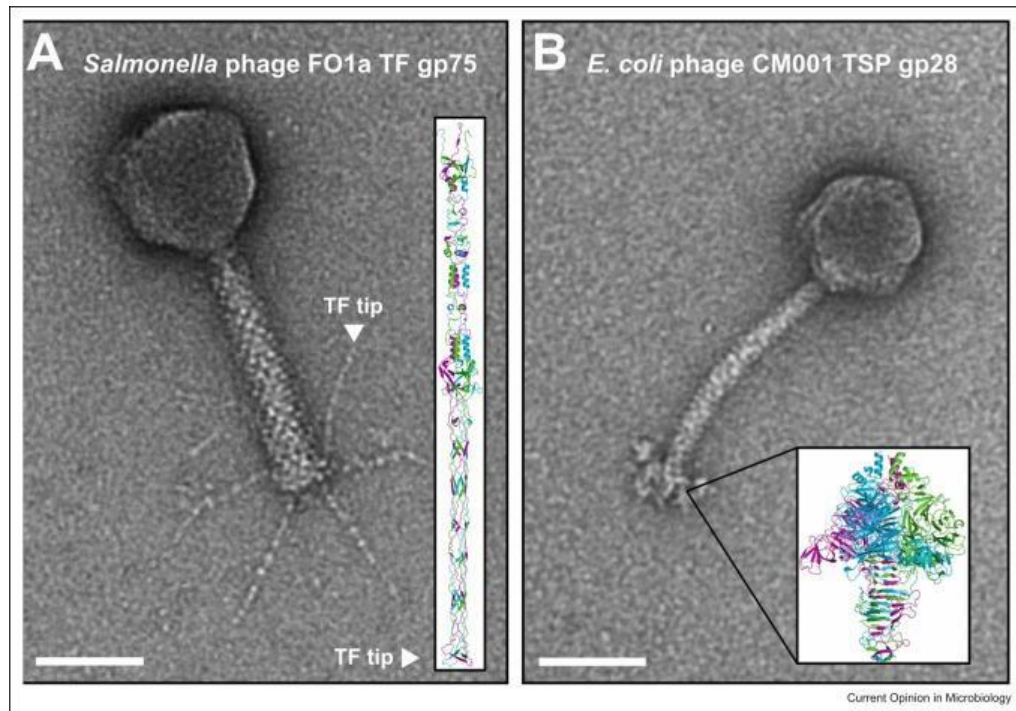


Рис. 1.10 – Електронно-мікроскопічне зображення фагів *Salmonella* FO1a (A) та фага *E. coli* CM001 (B), які використовують TF або TSP для розпізнавання бактерій-хазяїв, відповідно. Вставки: показано збільшені передбачені моделі гомотримерних комплексів TF (FO1a gp75, ~42 нм) і TSP (CM001 gp28, ~13 нм), (Klumpp et al., 2023)

При взаємодії з ліпополісахаридним шаром (ЛПС) деякі фаги за допомогою TSP розпізнають основні олігосахариди, але частіше вони зв'язуються із зовнішньою частиною цього шару О-антигеном. У той час як основні олігосахариди ЛПС є консервативними в межах виду, О-антиген складається з повторюваних полісахаридних ланцюгів, що можуть значно варіювати у різних штамів бактерій. Наприклад, у *E. coli* було виявлено понад 185 різних О-

антигенів, що забезпечує велику різноманітність поверхневих структур цього виду. Оскільки зв'язування TSP з O-антигеном є високоспецифічним, фаги кодують варіюючі TSP, щоб відповідати різноманітності бактеріального O-антигену (Dowah, Clokie 2018; Silva et al., 2016).

Дослідження рецептор-зв'язувальних білків бактеріофагів мають величезний прикладний потенціал при розробці антибактеріальних препаратів, які можна застосовувати з метою лікування бактеріальних інфекцій або коригування мікрофлори, або як агенти біоконтролю для боротьби з бактеріальними забрудненнями під час різних біотехнологічних процесів. Висока специфічність зв'язування RBP з бактеріальними рецепторами може бути використана для розробки діагностичних та моніторингових систем в різних галузях, від виробництва харчових продуктів до охорони здоров'я (див. детальніше у розділі 4).

Реплікативний цикл та стратегії взаємодії з клітинами

Бактеріофаги і їхні хазяї мають тривалий досвід взаємодії і коєволюціонують, ймовірно, мільйони років. Така довга взаємодія між вірусами та організмами-хазяями, вплив умов довкілля, а також специфіка функціонування бактеріальних клітин, зумовили розвиток різних життєвих стратегій реплікації бактеріофагів. Наразі прийнято виокремлювати три основні типи розмноження фагів: **літичний**, **нелітичний** і **лізогенний**. Втім, навіть в межах такого поділу розглядають різні варіанти взаємодії фаг-бактерія (Mäntynen et al., 2021).

Літичний цикл розвитку притаманний переважній більшості бактеріофагів. У популяціях, що складаються із пермісивних клітин, цикл розвитку бактеріофагу закінчується формуванням численного фагового потомства та лізисом уражених клітини. Віруси, які завершують свій життєвий цикл шляхом руйнування інфікованих бактеріальних клітин, відомі як **літичні** або **вірулентні** фаги. Вони не мають здатності до лізогенії, тобто не інтегрують свій генетичний матеріал у ДНК бактерії для тривалого прихованого існування у

латентному стані. Після зараження бактеріальної клітини такі фаги активно реплікуються, використовуючи її ресурси, що врешті призводить до лізису (розриву) клітини та вивільнення нових вірусних частинок. Літичні фаги не мають генетичних механізмів, необхідних для тривалої персистенції в геномі хазяїна, і тому їхня стратегія полягає в швидкому розмноженні та знищенні бактеріальних клітин. Літичні бактеріофаги конкурують між собою за хазяїна. Часто пермісивна клітина, яка здатна реалізувати репродукцію вірусу, уражується єдиною вірусною часточкою і стає несприйнятливою до інфікування іншими подібними вірусами внаслідок активації систем фагової інтерференції.

Літичні бактеріофаги з невеликими геномами, такі як представники родин *Leviviridae* та *Microviridae*, мають обмежену здатність до кодування складних білкових систем. Через це вони не можуть забезпечити захист від суперінфекції або абортів інфекції. Саме тому подібні віруси залучають використовують стратегію швидкої реплікації, що дозволяє їм ефективно розмножуватися та заражати нові клітини до появи суперників. Так, представник родини *Microviridae*, бактеріофаг phiX174 (*Sinheimervirus phiX174*) реплікується у клітині і руйнує її впродовж 5 хв, у той час як бактеріофаг T4 лізує уражені клітини за 25 хв. З практичної точки зору фаги, яким притаманний літичний розвиток, є найбільш перспективними для використання у якості протимікробних агентів.

За **лізогенного циклу розвитку** вірусний геном інтегрується в геном бактерії-хазяїна, утворюючи так званий **профаг**. У такому стані вірус не спричиняє активної інфекції. Встановлення лізогенії вимагає серії певних подій. Ймовірність встановлення лізогенії чи продуктивної інфекції варіює у різних фагів і залежить від умов культивування. Інтеграція вірусного генома до бактеріальної ДНК відбувається за умов, несприятливих для повноцінної реплікації вірусу (рис. 1.11).

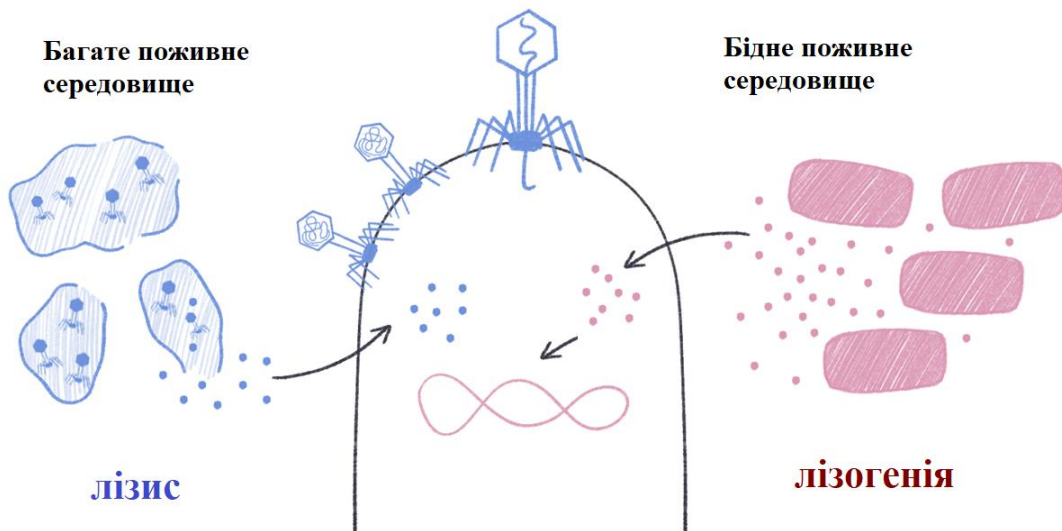


Рис. 1.11 – Вплив різних факторів на вибір шляху розвитку фагів

Наявність профагів в бактеріальній ДНК унеможливорює ураження даної клітини вірусом того ж виду, а часто і багатьма іншими вірусами через кодування профагами систем уникнення суперінфекції (СУС). З практичної точки зору помірні бактеріофаги є потужним знаряддям для створення штучних генетичних конструкцій.

Профаг може існувати в геномі бактерії як його частина впродовж тривалого періоду, і передаватися від покоління до покоління кожній дочірній клітині разом із поділом батьківської хромосоми. Лізогенний цикл може тривати довгий час, але за певних умов (наприклад, під впливом стресових факторів) вірус може активуватися і перейти до літичного циклу, під час якого він починає активно розмножуватися і руйнувати клітину-хазяїна. Віруси, яким притаманне явище лізогенії називають **лізогенними** або **помірними**. Слід відзначити, що навіть помірні фаги при першій інфекції чутливих до них бактерій викликають продуктивну (літичну) інфекцію у багатьох або навіть усіх клітин. Бактеріофаг λ - це класичний приклад лізогенного фага, який інфікує *E. coli*. Крім нього, добре вивченими є наступні лізогенні фаги: бактеріофаг P1 (*Escherichia phage P1*) і бактеріофаг $\phi 80$ (*Enterobacteria phage phi80*), а також бактеріофаг T12 (*Streptococcus phage T12*). Інфікування деяких штамів *Streptococcus pyogenes*

помірним бактеріофагом T12 призводить до перетворення нетоксигенного штаму на такий, що виробляє стрептококовий екзотоксин типу А (еритрогенний токсин). Цей токсин є одним із ключових факторів вірулентності бактерій і відповідальним за розвиток таких захворювань, як скарлатина та токсичний стрептококовий синдром.

Загалом, багато лізогенних фагів експресують гени, продукти яких безпосередньо впливають на фенотипові характеристики клітини-хазяїна. Цей процес називається **лізогенною конверсією** (зміною властивостей клітини під впливом лізогенного фага).

Бактеріофаги також здійснюють перенесення генетичної інформації між бактеріями за рахунок явища **трансдукції**. Трансдукція (від лат. *transductio* – переміщення) – це процес горизонтальної передачі ДНК від клітини-донора до клітини-реципієнта за участі бактеріофагів, який призводить до зміни спадкових властивостей бактерій. Явище трансдукції характерне як для помірних, так і для вірулентних фагів. Розрізняють два основні типи трансдукції:

1. Загальна трансдукція

Під час інфікування фагом відбувається випадкове включення фрагментів бактеріальної ДНК у нові вірусні частинки. Коли такі фаги інфікують іншу клітину, вони можуть ввести в неї ці фрагменти ДНК, які за рахунок гемологічної рекомбінації можуть бути включені у геном бактерії-хазяїна. Як правило, це явище характерне для літичних фагів.

2. Спеціалізована трансдукція

Відбувається, коли лізогенний фаг (який інтегрується в геном бактерії-хазяїна) випадково захоплює певні гени бактерії під час свого виходу з геному. У результаті такі фаги можуть передавати специфічні гени, які були поруч з сайтом інтеграції фага. Спеціалізована трансдукція властива лізогенним фагам.

Трансдукція відіграє важливу роль у еволюції бактерій, сприяючи поширенню генів, зокрема тих, що відповідають за стійкість до антибіотиків або вірулентність.

Деякі ДНК-вмісні фаги демонструють продуктивний хронічний інфекційний цикл (**нелітичний цикл розвитку**), при якому клітина-хазяїн не руйнується після вивільнення нових фагових частинок; натомість, вірусні частинки постійно виділяються через мембрану назовні. Залежно від типу фага, геном може інтегруватися в геном клітини-хазяїна або залишатися в цитоплазмі. Найкраще вивченими прикладами такої «хронічної» інфекції є ниткоподібні фаги з одноланцюговою ДНК (зокрема, Ff-фаги, що інфікують *E. coli* K12). Фізичні параметри ниткоподібних віріонів обумовлюють потребу в збірці частинок на клітинній мембрані. Однак можуть існувати відмінності в механізмах збірки та нелітичному вивільненні фагових частинок (рис. 1.12).



Рис. 1.12 – Схематичне зображення стратегії продуктивної хронічної інфекції, при якій фагові частинки нащадків вивільняються шляхом екструзії (ліворуч) або брунькуванням (праворуч) через клітинну мембрану без лізису бактерії-хазяїна (Mäntynen et al., 2021)

Упродовж останніх років деякі науковці стверджують про існування четвертого типу взаємодії вірус-бактерія – **псевдолізогенії**. За таких відносин геном бактеріофага існує у бактеріоплазмі у вигляді автономного генетичного елемента, як у деяких помірних фагів (Ff, Pfl), але його реплікація уповільнена або не відбувається взагалі і, відповідно, уражена клітина не продукує вірусні частинки. Ця риса псевдолізогенних вірусів нагадує поведінку інтегрованих профагів. Реактивація геному вірусу відбувається при активації бактеріального клітинного циклу, реплікація геному бактеріофагу синхронізується із

реплікацією бактеріального геному, і вірусні частки, що утворюються, залишають бактеріальну клітину при її поділі.

Псевдолізогенія часто розглядається як варіант літичного циклу розвитку або ж вірусоносійства, проте деякі бактеріофаги, зокрема представники родини *Cystoviridae* (φ6, φ7, φ8), розвиваються переважно вищезазначеним шляхом. Віріони цистовірусів мають зовнішню ліпідну оболонку і два шари білків. Капсиди цистовірусів депротейнізуються тільки частково, а тому існують у бактеріоплазмі у вигляді білкових тілець, всередині яких локалізовані 3 сегменти геномної двохланцюгової РНК. Псевдолізогенізація, як особливий тип взаємодії бактеріофагів і їх хазяїв, встановлюється у клітинах, які називають **персисторами**.

Життєвий цикл вірулентних фагів

Незважаючи на відмінності у подальшому розвитку літичної, нелітичної або лізогенної інфекції, початкові етапи життєвого циклу фага та його взаємодії з мікробною клітиною, включаючи внесення генетичного матеріалу фага в клітину, є практично однаковими. Загальні властивості фагів зазвичай слугують відображенням властивостей клітини-хазяя. Наявність жорсткої клітинної стінки у більшості бактерій потребує особливих механізмів проникнення та виходу вірусів. Прикріплення фага до бактеріальної клітини відбувається на клітинній поверхні. Оскільки клітинна поверхня відрізняється у різних бактерій, то існують різні способи взаємодії фага з бактеріальною клітиною. Як було описано вище, деякі фаги приєднуються до особливих виростів, так званих L- та F-пілей, які беруть участь у процесі кон'югації. Віріони інших фагів зворотно прикріплюються до джгутиків бактерій і потім ковзають уздовж них, при чому цьому процесу, швидше за все, сприяють рухи самих джгутиків. На поверхні бактеріальної клітини є специфічні рецептори для бактеріофагів (рис. 1.8). Проникнення генома бактеріофага до клітини супроводжується фізичним відокремленням нуклеїнової кислоти від капсидних білків, які залишаються зовні клітини. Крім нуклеїнової кислоти фага, всередину клітини потрапляє невелика

кількість білка та деякі інші речовини, в тому числі олігопептиди та поліаміни. Оскільки бактеріальні клітини здатні поглинати з середовища вільну ДНК (наприклад, плазмідну), то і геноми фагів можуть проникати таким чином до клітин. Це явище має назву **трансфекція**. Здатність бактерій поглинати молекули ДНК може виникати як нормальне явище на певних етапах росту, наприклад у *B. subtilis*. У деяких випадках це явище викликається штучно, як, наприклад, у *E. coli*. Проникнення генома бактеріофага до чутливої бактерії приводить до розвитку літичної або лізогенної інфекції, залежно від природи фага (а іноді – й бактерії) та умов довкілля. Життєвий цикл бактеріофага Т4 став класичним прикладом вивчення «онтогенезу» вірусів. Експеримент, вперше проведений Еморі Елліс та Максом Дельбрюком, дав змогу встановити загальну послідовність подій. Клітини *E. coli*, що активно ростуть, заражали бактеріофагом таким чином, щоб в середньому на одну клітину припадало по одній фаговій частинці. Протягом двох-трьох хвилин інкубації більшість фагів адсорбувались на клітинах. Всі неадсорбовані фаги потім інактивували, додаючи антифагову сироватку. Через декілька хвилин після цього культуру розбавляли більше ніж в сто разів, щоб зменшити концентрацію антитіл та запобігти інактивації фагових нащадків. Через певні проміжки часу в пробах інфікованої культури визначали концентрацію інфекційних одиниць віруса шляхом висіву проб на чашки Петрі з індикаторними бактеріями з подальшим підрахунком кількості негативних колоній на бактеріальному газоні. Результати цього експерименту графічно представлені на рис. 1.13. Протягом 24 хв після адсорбції бактеріофага на клітині кількість інфекційних одиниць в культурі залишалась стабільною. Через 24 хв кількість інфекційних одиниць починала зростати, оскільки інфіковані клітини лізувалися із звільненням бактеріофагів. На 30-й хвилині всі інфіковані клітини були вже зруйновані. Кількість інфекційних одиниць віруса до кінця дослідження приблизно в сто разів перевищувала кількість інфікованих клітин. Таким чином, з кожної інфікованої клітини виходило приблизно сто фагових нащадків. Першим етапом взаємодії бактеріофага Т4 з клітиною є адсорбція (рис. 1.14). В інтактному стані бактеріофага довгі фібрили

обвиваються навколо відростка так, що їхня середня частина підтримується короткими фібрилами, прикріпленими до місця з'єднання голівки з хвостовим відростком. Вірогідно, при контакті кінців фібрил з рецепторами клітини фібрили розправляються і випрямляються. Для цього необхідний L-триптофан в якості кофактору. Для наступного етапу взаємодії фага з бактерією необхідне правильне просторове положення базальної пластинки, що забезпечується, очевидно, контактом усіх шести фібрил з рецепторами клітини. Слід зауважити, що необернене прикріплення бактеріофага до клітини і проникнення в неї ДНК відбувається лише на окремих ділянках оболонки (у випадку *E. coli* їх загалом приблизно 300), де цитоплазма і зовнішні мембрани утворюють міцні контакти, стійкі до м'якого осмотичного шоку.

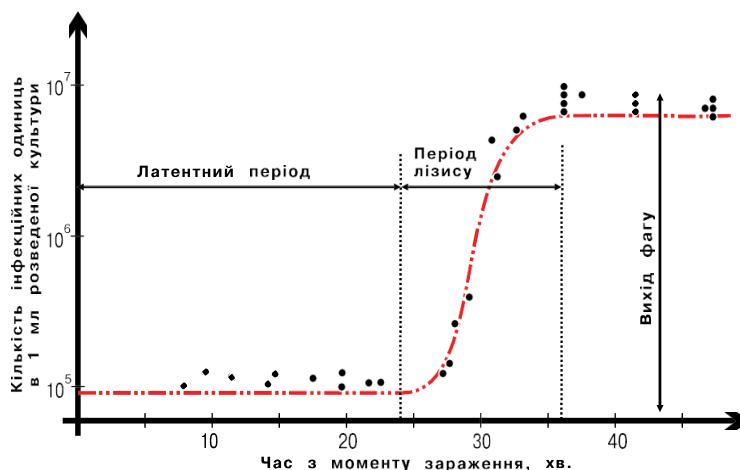


Рис. 1.13 – Одиничний цикл розвитку бактеріофага T4

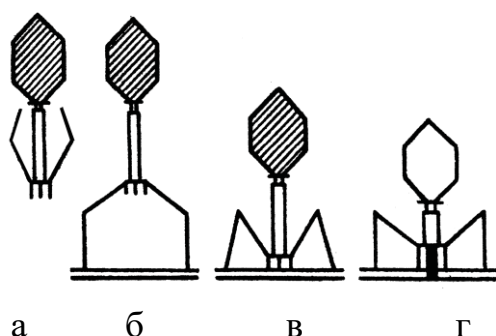


Рис. 1.14 – Схема основних етапів адсорбції фага T4 на бактерії *E. coli*:

а – вільна фагова частинка; б – приєднання довгих фібрил до оболонки бактерії; в – фіксація шипів базальної пластинки; г – скорочення хвостового чохла та ін'єкція фагової ДНК до клітини

Після адсорбції бактеріофага Т4 на клітині відбувається скорочення чохла, яке стимулюється базальною пластинкою, яка змінює свою конформацію. В процесі скорочення беруть участь усі 144 субодиниці чохла, переміщення яких призводить до зменшення довжини чохла у 2 рази та збільшення його діаметру на 30%. Дистальна частина стрижня щільно наближається до цитоплазматичної мембрани, і кінець стрижня проколуює нещільні шари клітинної оболонки, що були частково зруйновані лізоцимом вірусу. На наступному етапі відбувається ін'єкція ДНК всередину бактеріальної клітини.

Латентний період (час між інфікуванням і лізісом клітини) в стандартних умовах для бактеріофага Т4 становить 24 хвилини (рис. 1.15).

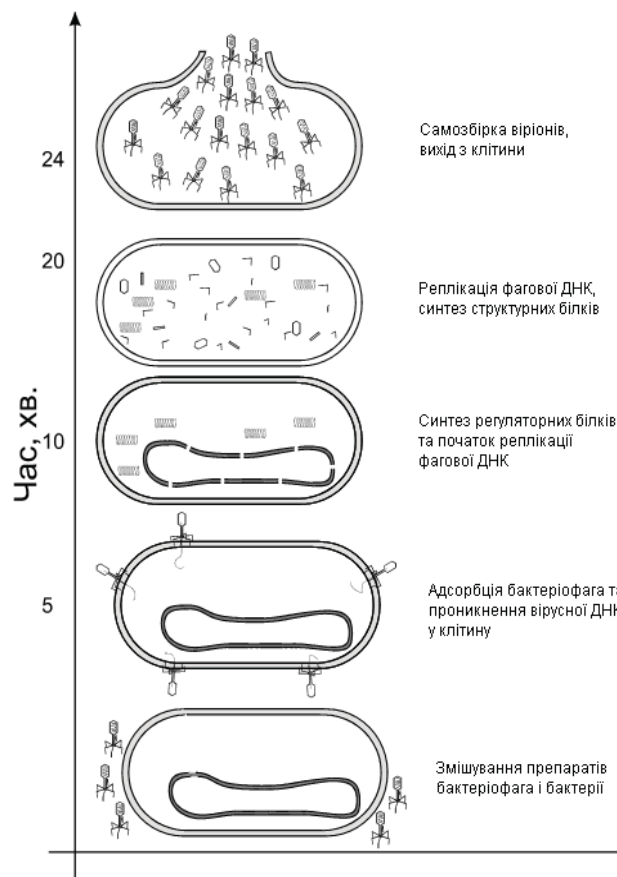


Рис. 1.15 – Схема розвитку процесу інфікування *E. coli* бактеріофагом Т4

Потрапивши всередину бактеріальної клітини, фагова ДНК викликає перебудову метаболізму зараженої клітини. Рибосоми клітини-хазяїна модифікуються таким чином, що починають транслювати мРНК фага ефективніше за клітинні мРНК. В клітині спочатку синтезуються «ранні» білки

віруса. Синтезуються такі ферменти: ДНК-полімераза; ДНК-дезоксирибонуклеаза, що руйнує ДНК клітини-хазяїна; ферменти, які необхідні для утворення 5-оксиметилцитозину та його фосфорилювання. Синтезована ДНК-дезоксирибонуклеаза не діє на ДНК фага, вочевидь, через наявність у ній аномальних азотистих основ, зокрема, 5-оксиметилцитозину. Ці вірусні ферменти забезпечують синтез ДНК бактеріофага. Після реплікації ДНК починається синтез структурних білків. Усі структурні білки віріонів та інші пізні білки (наприклад, лізоцим) синтезуються більш-менш одночасно і, накопичуючись, утворюють фонд «попередників». Потім вони специфічно взаємодіють з іншими молекулами, в результаті чого виникають субструктури, які надалі збираються вже в цілі віріони. Збирання віріонів складається з чотирьох основних етапів, що приводять до утворення проміжних структур, які взаємодіють між собою лише у визначених критичних точках, звідки і походить термін «диз'юнктивний спосіб збірки», за яким віруси іноді вважають радше неживими, аніж представниками дерева життя (рис 1.16).

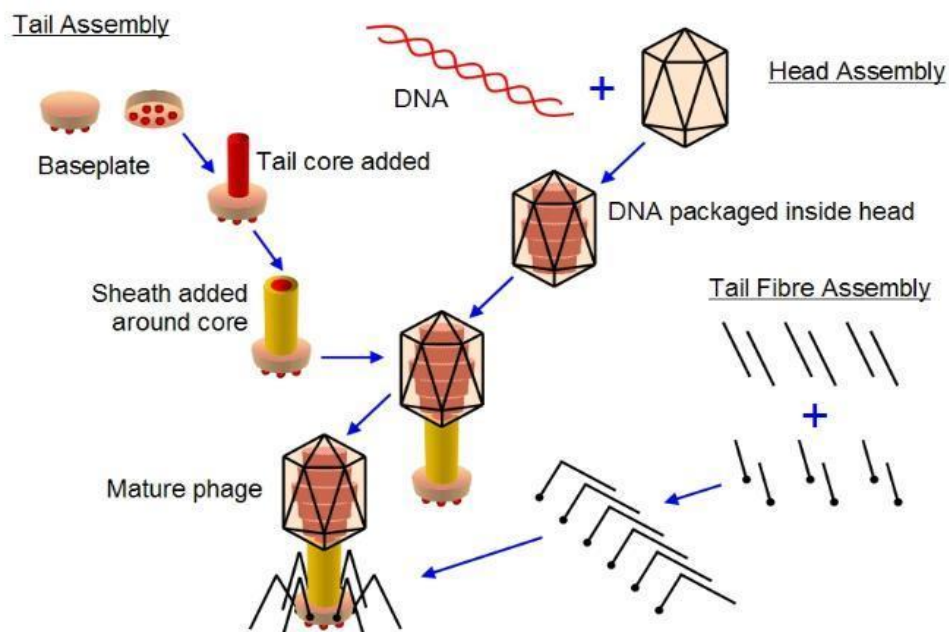


Рис. 1.16 – Схема основних етапів самозбірки бактеріофага T4. Збірка головки, хвостового відростка та інших субструктур відбувається незалежно, після чого вони утворюють зрілі вірусні частинки

(https://cronodon.com/images/T4_assembly.jpg)

На останньому етапі взаємодії фага та клітини накопичений лізоцим (продукт гена *e*) руйнує пептидоглікановий шар клітини зсередини. Лізоцим утворюється в інфікованій клітині задовго до початку лізису, однак лізис настає лише в тому разі, якщо лізоцим отримує доступ до шару пептидоглікану. Для цього необхідна реакція, що ініціюється фагом (продукт гена *t*). В результаті розщеплення пептидогліканів клітинна стінка бактерії стає розривається під дією осмотичного тиску, і відбувається вихід нащадків бактеріофага з клітини.

Життєвий цикл лізогенних бактеріофагів

Типовим прикладом помірних фагів є бактеріофаг λ . Цей вірус – модельний об'єкт молекулярної біології, генетики, вірусології тощо. У своєму життєвому циклі бактеріофаг λ «робить» вибір, яким шляхом йому розвиватися: літичним, при якому клітина-хазяїн програмується на виробництво нових вірусних частинок і потім гине, чи лізогенним, при якому відбувається вбудовування генетичного апарату вірусу в геном бактерії. Природним хазяїном цього бактеріофага є штам *E. coli* K12, генетика якого добре вивчена. Саме тому бактеріофаг λ був вибраний як об'єкт досліджень, спрямованих на з'ясування природи лізогенії і вивчення регуляції генної експресії.

Віріон бактеріофага λ складається з ікосаедричної голівки діаметром близько 60 нм і хвостового відростка завдовжки приблизно 150 нм, на кінці якого розміщені бокові фібрили. Геном бактеріофага представлений двохранцюговою ДНК із взаємокомплементарними «липкими» кінцями. У процесі реалізації свого життєвого циклу фагова частинка за допомогою хвостового відростка приєднується до клітини, «проколює» її оболонку та вводить свою ДНК, в той час як капсид вірусу лишається ззовні.

Подальші події можуть розвиватись двома напрямками (рис. 1.17). В одних клітинах спостерігається літичний шлях розвитку фага: ДНК фага λ інтенсивно реплікується, синтезуються структурні білки, в бактеріальній клітині

утворюються нові інфекційні віріони. Врешті-решт клітина лізується та вивільняє приблизно 100 фагових частинок.

В інших клітинах фагова ДНК лізогенізує клітину-хазяїна: більшість фагових генів виключаються, і фагова ДНК інтегрується у бактеріальний геном у вигляді профага. При поділі бактерії профаг пасивно реплікується та передається дочірнім клітинам. Цей процес може повторюватися безмежну кількість разів. Проте, при УФ-опроміненні чи дії іншого стресового фактора майже всі лізогенні клітини повертаються до літичного шляху, лізуються вірусом та утворюють нащадків фага λ .

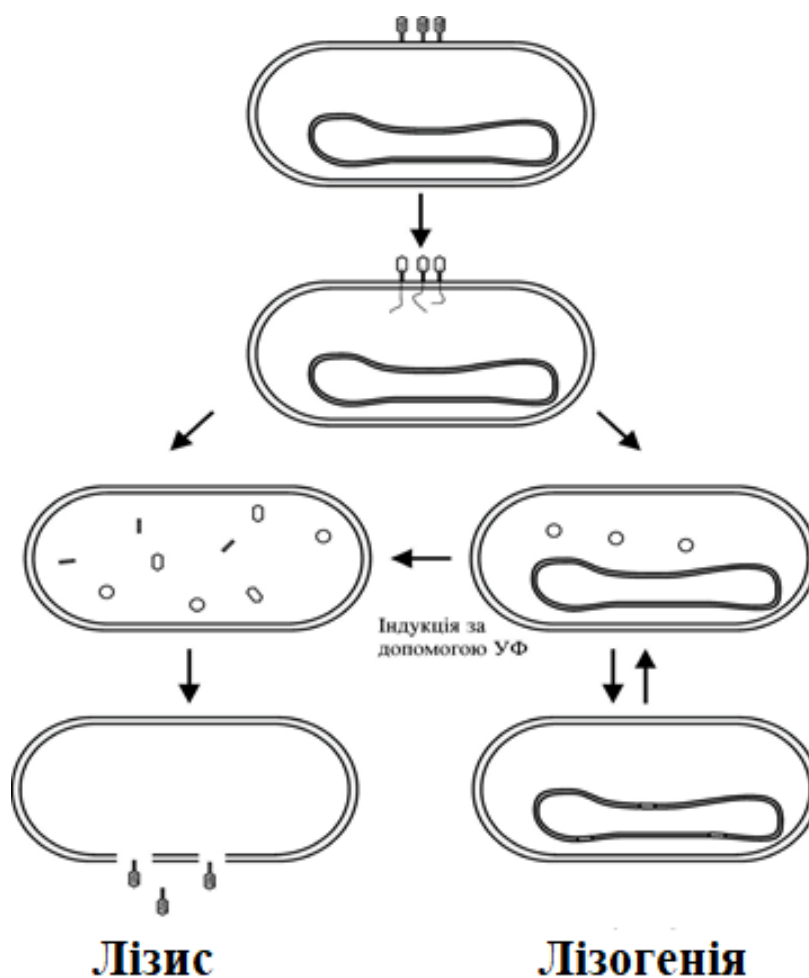


Рис. 1.17 – Літичний та лізогенний шляхи розвитку бактеріофага λ

Як було сказано вище, в лізогенній клітині працює вкрай обмежений генетичний репертуар фага, головним гравцем якого є ген, що кодує білок-

репресор фага λ . Репресор є позитивним та негативним регулятором експресії ряду генів вірусу. Приєднуючись до двох операторних ділянок ДНК фага λ , він «вимикає» всі інші гени бактеріофага та сприяє експресії власного гена (регуляція за принципом позитивного зворотного зв'язку).

Слід зауважити, що одразу після інфікування перші етапи регуляції експресії генів однакові незалежно від способу подальшого розвитку подій. На критичному етапі фаговий регуляторний білок «відчуває» стан клітини-хазяїна, і подальші події спрямовуються за одним з двох шляхів.

На рис. 1.18 наведена спрощена генетична карта фага λ . ДНК у складі віріона є лінійною, однак одразу після потрапляння в бактеріальну клітину набуває кільцевої форми. У результаті з'єднання «липких» кінців ДНК (cos-сайтів) групи генів лізису та хвостового відростка зближуються. Гени, які кодують білок репресор (CI) та білок, який запускає літичний шлях (Cro), розміщені поруч на ДНК фага. Ці гени транскрибуються у протилежних напрямках (рис. 1.19).

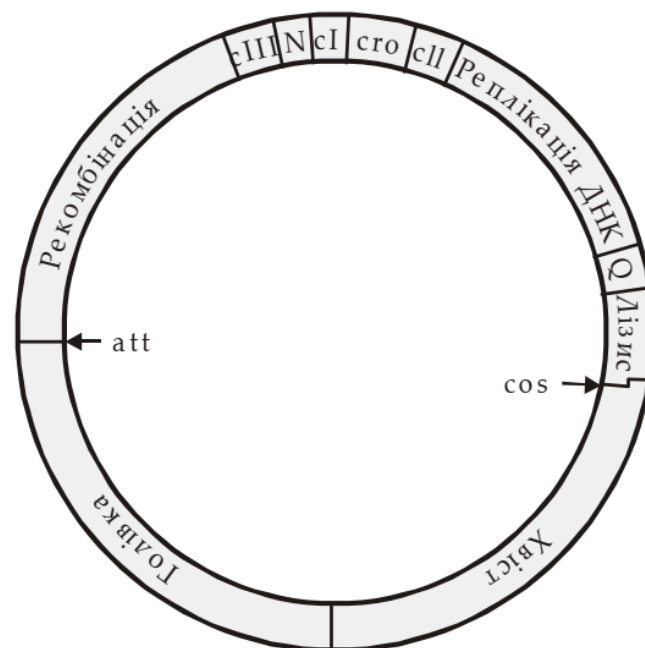


Рис. 1.18 – Генетична карта бактеріофага λ

Точки початку транскрипції цих генів розділені ділянкою 80 пар основ. У цій ділянці розміщені промотори та оператори, з якими з'єднуються білки-регулятори. Як видно з рис. 1.19, кожен із генів (*cI* та *cro*) має свій власний промотор ($P_{RE(RM)}$ та P_R , відповідно). Ці промотори не перекриваються між собою. O_{R1} , O_{R2} та O_{R3} – це операторні ділянки, до яких приєднуються білки *CI* та *Cro*, регулюючи таким чином активність обох промоторів. Слід відзначити, що кожна з операторних ділянок перекривається з одним з промоторів, а O_{R2} перекривається з обома промоторами.

ДНК-залежна РНК-полімераза – це фермент, що транскрибує фагову ДНК з утворенням мРНК. При зв'язуванні з P_R (промотор гена *cro*), полімераза забезпечує транскрипцію цього гена (праворуч), а при зв'язуванні з P_{RM} (промотор гена *cI*) транскрибується ген *cI* в інший бік. В клітині ці два промотори ніколи не бувають зайняті одночасно, адже залежно від стану апарату регуляції експресії полімераза зв'язується тільки з одним із них. У присутності білка-репресора *cI* полімераза може зв'язатись із P_{RM} , а в присутності *Cro* – з P_R .

Таким чином, репресор, приєднаний до O_{R2} , виключає експресію гена *cro*, перешкоджаючи зв'язуванню РНК-полімерази з P_R . У цьому разі репресор здійснює негативну регуляцію даного гена. З іншого боку, репресор, приєднавшись до O_{R2} , допомагає РНК-полімеразі зв'язатись і почати транскрипцію з P_{RM} . Ефективність транскрипції при цьому збільшується приблизно в 10 разів. Таким чином, білком-репресором здійснюється позитивна регуляція експресії власного гена.

У лізогенізованій клітині репресор завжди зв'язаний з O_{R1} та O_{R2} , тоді як O_{R3} зазвичай вільний від репресора. Таким чином, у цій клітині відбувається активний синтез білка репресора. За дуже високої концентрації білка-репресора в клітині він приєднується до ділянки O_{R3} і блокує власний промотор, що веде до пригнічення експресії гена білка-репресора (негативна регуляція експресії власного гена). При поділі клітини концентрація даного білка знижується. В результаті цього білок-репресор може від'єднатися від ділянки O_{R3} , і процес експресії гена *cI* поновлюється. За відсутності зовнішніх впливів ці динамічні

процеси можуть відбуватись необмежено довго, однак можуть бути призупинені будь-яким індуктивним зовнішнім впливом. Найкращим індуктором у цьому випадку є ультрафіолетове (УФ) опромінення.

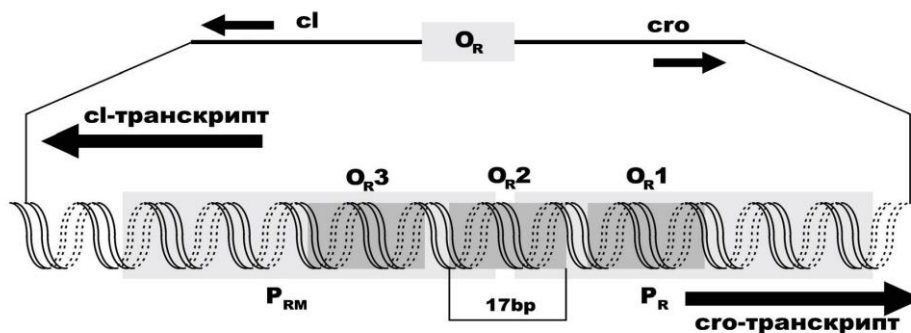


Рис. 1.19 – Схематичне зображення апарату перемикання генів у бактеріофага λ

Мішенню дії УФ-випромінення та інших індукуючих факторів є ДНК бактеріальної клітини. Пошкодження ДНК під впливом випромінення активує бактеріальний білок Rec A. Останній є високоспецифічною протеазою, що розщеплює мономери репресора λ та інших білків-репресорів, що взаємодіють з ДНК бактерії. Це призводить до двох наслідків. По-перше, в міру того, як білок-репресор звільняє ділянки O_{R1} та O_{R2} , швидкість синтезу даного білка знижується. По-друге, полімераза зв'язується з P_R та починає транскрипцію гена *cro*. Тепер саме білок Cro визначатиме подальший розвиток подій. Перша синтезована молекула білка Cro зв'язується з O_{R3} . Це пригнічує подальший синтез білка-репресора. Поки промотор P_R продовжує працювати і ген *cro* транскрибується, також транскрибуються гени, розмішені праворуч від *cro*. Продукти цих генів необхідні на ранніх етапах літичного циклу. Синтезується все більше білка Cro, поки його концентрація не досягне рівня, за якого блокуватимуться ділянки O_{R1} та O_{R2} . Таким чином, білок Cro «вимикає» синтез білка-репресора і запускає каскад експресії генів, відповідальних за літичний шлях розвитку фага λ .

1.2. Екологія бактеріофагів

Бактеріофаги є невід'ємною частиною глобальних екологічних систем і відіграють важливу роль у їх функціонуванні. Досліджуючи їхню роль у біосфері та в функціонуванні окремих екосистем, ми починаємо розуміти, що бактеріофаги, як і інші віруси, є важливими учасниками глобальних екологічних процесів. Ці нанорозмірні об'єкти не лише впливають на динаміку своїх хазяїв, але й мають вагоме значення у підтримці екологічної рівноваги. Усвідомлення ролі бактеріофагів допомагає краще зрозуміти їхній внесок у природні цикли, такі як колообіг вуглецю і азоту, а також у регулювання мікробних спільнот.

1.2.1. Історичний екскурс

Протягом більшої частини першого століття досліджень фагів їхнє екологічне значення не привертало значної уваги. Інтенсивний поштовх для розвитку проблематики екології бактеріофагів дали дослідження фагів у водних системах, тож даний розділ варто почати з невеликого екскурсу в історію дослідження біорізноманіття і кількості фагів у водних екосистемах. Загалом, до 1989 р. вважалось, що концентрація бактеріофагів у природних незабруднених водах є низькою, а отже віруси у воді розглядались як екологічно незначимі об'єкти. Стаття доктора Ойвінда Берга з колегами (Bergh et al., 1989), в якій мова йшла про новий метод підрахунку кількості фагових частинок у воді, перевернула уявлення наукової спільноти про екологію бактеріофагів. Авторам вдалось виявити до $2,5 \times 10^8$ віріонів у 1 см^3 морської води. Слід відмітити, що тогочасний методологічний потенціал не дозволяв оцінити біорізноманіття фагів.

Розробка та вдосконалення методів секвенування геномів і метагеномного аналізу відкрила нові можливості для розвитку уявлення про мікросвіт, який нас оточує. Так у 2004 р., після успішного пілотного проекту метагеномного секвенування зразків, відібраних в районі Бермудських островів, доктор Дж. Крейг Вентер з колегами з Інституту Вентера вирушили в експедицію *Sorcerer II*

Global Ocean Sampling (GOS). Команда вчених, натхнених морськими подорожами Чарлза Дарвіна і капітана Джорджа Нареса, на парусній яхті *Sorcerer II* подорожувала навколо Земної кулі понад два роки (рис. 1.20), зрештою подолавши 32000 морських миль, відвідавши 23 країни та групи островів на чотирьох континентах. В результаті аналізу відібраних зразків, з-поміж іншого, були виявлено численні нові гени, нові лінії вірусів бактерій та еукаріот. Аналіз отриманого матеріалу триває досі. Результати їхньої кропіткої роботи поклали початок новій галузі досліджень та серії подальших експедицій, метою яких було розширення уявлення про організацію водних екосистем і мікробне різноманіття.



Рис. 1.20 – У пошуках нових бактеріофагів
(<https://www.thevoyageofsorcererii.org/photo-gallery/#>)

Аналізуючи результати подібних експедицій, ми вже впевнено стверджуємо, що бактеріофаги є найбільш чисельними біологічними об'єктами на Землі. За приблизною оцінкою вчених, на планеті існує понад 10^{31} бактеріофагів (Comeau et al., 2008), а отже кількість фагів переважає кількість інших організмів, разом узятих. Не викликає сумнівів і той факт, що віруси мікроорганізмів є важливими гравцями, які обумовлюють динаміку мікробних харчових ланцюгів та мереж у різних типах водних середовищ, включаючи найекстремальніші водні екосистеми, такі як гідротермальні джерела, гіперсолоні водойми, тощо.

Дослідження бактеріофагів у водних екосистемах були логічно продовжені різними дослідниками для з'ясування ролі вірусів у просторово-структурованих середовищах (грунтах, організмах людини та тварин, тощо). Велике біорізноманіття фагів було виявлено в різних екологічних нішах. Загальновідомо,

що бактерії здатні окупувати будь-які екологічні ніші і виживати в різних умовах. Саме тому, фаги виявляють у тих середовищах, де присутні їхні хазяї, включаючи гіперсолоні середовища, полярні регіони, пустелі, на біологічних організмах і всередині них, у ґрунті та ін. (Naureen et al., 2020).

1.2.2. Основні розділи екології бактеріофагів

Бактеріофаги вражають своїм розмаїттям. Віріони фагів значно відрізняються за розміром, формою та складністю, а геноми, які вони містять, є ще більш різноманітними. Розмір геномів фагів коливається від 3,4 до майже 500 т.(п.)н., і для геномів фагів не виявленого спільного маркерного гена (як, наприклад, ген 16S рРНК у бактерій). Фаговим геномам притаманне явище мозаїцизму: подібно до слів, що утворюють речення, кожен унікальний геном представляє різну комбінацію тих самих модулів, які перемішувалися і модифіковувалися протягом мільярдів років еволюції. Дійсно, фагові геноми, ймовірно, являють собою найбільший резервуар недосліджених генів і білків будь-де в біосфері (Keen, 2015).

Для виділення бактеріофагів з довкілля використовують чутливі бактеріальні культури, які вирощують на живильних середовищах. В багатьох випадках процес прямого виділення фагів стає неможливим у зв'язку з тим, що фаг уражує бактерії, які не вдається культивувати в лабораторних умовах. В останньому випадку дані про наявність специфічних вірусів отримують за результатами електронної мікроскопії та метагеномного аналізу.

1.2.3. Популяційна екологія фагів

Популяційна екологія — це розділ екології, що вивчає динаміку популяцій живих організмів, тобто їх чисельність, структуру, зміну кількості індивідів у часі та просторі, а також взаємодію популяцій з навколишнім середовищем. Популяція в цьому контексті — це група індивідів одного виду, що мешкають на

певній території і взаємодіють між собою, наприклад, через розмноження, конкуренцію за ресурси чи співпрацю. Популяційна екологія вивчає такі процеси, як народжуваність, смертність, міграція, конкуренція, хижацтво, і як ці процеси впливають на чисельність і стабільність популяцій. Важливим аспектом є дослідження залежності популяцій від обмежених ресурсів, умов середовища та інших факторів, що регулюють її чисельність і виживання. Популяційна екологія розглядає характеристики, які притаманні групам індивідів, але не очевидні або значно менш очевидні серед окремих індивідів. До цих характеристик належать так звані внутрішньовидові взаємодії, тобто взаємодії між індивідами, що становлять одну популяцію, і можуть включати конкуренцію, а також кооперацію. Конкуренція може відбуватися як за швидкість росту популяції (особливо за умов низької щільності популяції в середовищах, багатих на ресурси), так і за збереження розмірів популяції (що особливо помітно при високій щільності популяції, де індивіди прямо конкурують за обмежені ресурси). Відповідно, ці явища поділяються на незалежні від щільності популяції та залежні від неї ефекти.

Популяційна екологія фагів розглядає питання темпів зростання популяцій фагів, а також взаємодії між фагами, які можуть виникати, коли два або більше фагів адсорбуються на одній бактерії.

Бактеріофаги, як і інші віруси, перебувають під постійним тиском факторів довкілля. На рис.1.24 показана залежність основних характеристик життєвого циклу фагів від внутрішніх та зовнішніх чинників. Показано, як ці риси, з одного боку, базуються на молекулярних характеристиках (ліворуч), і є засобами, за допомогою яких фаги взаємодіють довкіллям, з іншого боку (праворуч). Ефективний вихід вірусних частинок (**Effective burst size**) у бактеріофагів — це кількість віріонів, що утворюються після інфікування однієї бактерії, які не лише виділяються з клітини, але й успішно виживають і заражають нові бактерії. Тобто, це показник не тільки загального числа віріонів, котрі виробляються в результаті продуктивної інфекції, але й тих, котрі здатні до подальшої репродукції. Фактори, що визначають ефективний вихід вірусних часточок, включають:

- **Швидкість дозрівання віріонів** під час інфекції;
- **Тривалість латентного періоду**;
- **Стійкість віріонів** у довкіллі;
- **Успішність зараження** нових бактеріальних клітин.

Тому ефективний вихід зазвичай є меншим за загальний вихід через втрати віріонів, які не змогли успішно інфікувати нові бактерії або були знищені в навколишньому середовищі. На рис.1.21 також вказані різні механізми зворотного зв'язку, тобто ті, які змінюють фенотипи окремих організмів у екологічному часовому масштабі (наприклад, фізіологічна адаптація у відповідь на зміни в навколишньому середовищі або зворотний зв'язок), або ж ті, які змінюють генотипи організмів в еволюційному часовому масштабі (наприклад, у результаті мутації або природного добору, що є прикладом еволюційного зворотного зв'язку).



Рис.1.21 – Реплікативний цикл бактеріофагів як екологічний феномен (пояснення у тексті)

Існує можливість співвіднести різні адаптації з конкретними властивостями досліджуваного об'єкту, які зазвичай впливають або на розмноження, або на

виживання. Для фагів ці фенотипи можуть бути виміряні як багатофакторні аспекти реплікативних циклів фагів. Однак властивості об'єкту здебільшого повинні визначатися експериментально, оскільки ці властивості часто змінюються залежно від умов середовища, і їх важко передбачити, аналізуючи основні біохімічні аспекти. До таких фенотипових рис відносять стійкість віріонів, діапазон хазяїв, латентний період і ефективний вихід. Крім того, існують різні аспекти лізогенних циклів фагів. Оскільки ці явища можуть відбуватися в контексті життєвих циклів фагів, їх зазвичай можна вивчати з точки зору популяційної екології фагів, зокрема, щодо їх внеску у здатність фага конкурувати з іншими фагами того самого виду (Dennehy, Abedon 2021).

1.2.4. Екологія спільнот фагів

Екологія спільнот — це розділ екології, що вивчає взаємодії між різними видами організмів, які мешкають в одному середовищі, і як ці взаємодії впливають на структуру та функціонування спільнот. Спільнота складається з усіх біологічних об'єктів, які мешкають в певній екосистемі, включаючи різні види рослин, тварин, грибів, бактерій і вірусів.

Основна увага в екології спільнот приділяється міжвидовим взаємодіям, таким як:

- **Конкуренція** — боротьба між видами за обмежені ресурси;
- **Хижацтво** — коли один вид (хижак) живиться іншим видом (жертвою);
- **Симбіоз** — взаємовигідні або односторонньо корисні взаємодії між видами, наприклад, мутуалізм чи паразитизм.

Екологія спільнот досліджує, як ці взаємодії впливають на біорізноманіття, стабільність спільнот, розподіл видів у просторі та їхню еволюцію. Екологія спільнот вивчає ті характеристики спільнот, які не є очевидними або значно менш очевидні, якщо спільнота складається лише з однієї популяції. Важливим наслідком таких взаємодій є коеволуція.

З точки зору екології фагово-бактеріальних спільнот, можна розглядати, як профаги можуть підвищувати пристосованість бактерій завдяки лізогенній конверсії, або як бактерії можуть бути модифіковані через горизонтальне перенесення генів (трансдукцію). Важливим аспектом взаємодії фагів і бактерій у спільнотах є антагоністична коеволюція, коли бактеріальні механізми фагової резистентності долаються еволюцією фагів для розширення діапазону хазяїв у відповідь на цю резистентність. В свою чергу, це стимулює подальшу еволюцію бактеріальної резистентності - цей процес циклічно повторюється і отримав назву «гонка озброєнь».

Бактерії розвинули різні механізми захисту від фагів, такі як запобігання адсорбції фагів на поверхні бактерій-хазяїв (рис. 1.22); блокування ін'єкції нуклеїнової кислоти фагів через виключення суперінфекції; обмеження реплікації генів фагів у хазяїні за допомогою систем рестрикції-модифікації (R-M), CRISPR-Cas, переривання інфекції (Abi) та інших систем захисту; а також підсилення ефекту стійкості до фагів за допомогою кворумного чуття (QS).

У той самий час фаги також еволюціонували, розробивши різноманітні контрстратегії, такі як руйнування позаклітинних полімерних речовин (EPS), які маскують рецептори, або розпізнавання нових рецепторів, що дозволяє знову адсорбувати клітини-хазяї; модифікація власних генів для уникнення розпізнавання системами R-M або еволюція білків, що можуть інгібувати комплекс R-M; мутація генів, формування ядроподібних структур або еволюція анти-CRISPR (Acr) білків для протистояння системам CRISPR-Cas; а також вироблення антирепресорів або блокування взаємодії автоіндукторів з їхніми рецепторами для пригнічення відчуття кворуму.

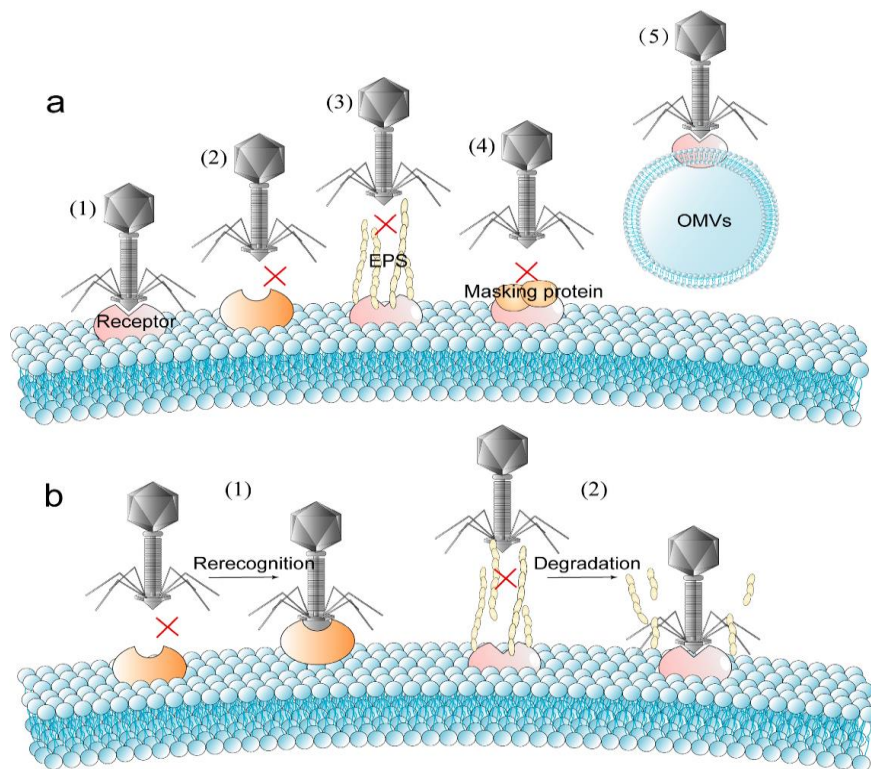


Рис. 1.22 – «Гонка озброєнь» між бактеріями та фагами під час фази адсорбції (червоними хрестиками показане блокування адсорбції фагів): **(а)** У нормальних умовах фаги адсорбуються на клітинах-хазяїх через рецептори на поверхні бактерій (1). Бактерії перешкоджають процесу адсорбції фагів шляхом зміни структури рецептора або шляхом блокування його експресії (2), утворюючи позаклітинні полімерні речовини (EPS) (3), маскуючи білки (4), або маскуючи рецептори фагів зовнішніми мембранними везикулами (OMVs), що містять рецептори фагів (5). **(б)** Фаги, в свою чергу, відновлюють здатність розпізнавати і адсорбуватися на хазяїні, розпізнаючи нові рецептори за допомогою мутантних білків зв'язування рецепторів (RBPs) (1), або деградуючи EPS за допомогою полісахариддеполімераз (2) (Wang et al., 2023)

Бактеріальним спільнотам часто властиве тимчасове коливання через доступність ресурсів, які перевищують час генерації бактерій і таким чином впливають на їхнє співіснування. Динаміка популяцій бактерій також формується бактеріофагами, які є основною причиною смертності бактерій. У літературі запропоновано кілька ймовірних сценаріїв взаємодії фагів з бактеріями, такі як «Убити переможця» («Killing the Winner»), «Спекулювати на невдачі»

(«Piggyback the loser») або «Спекулювати на переможці» («Piggyback the Winner»). Дві останні стратегії пов'язані з помірними фагами і визначаються переходом від літичної до лізогенної інфекції при зміні чисельності клітин хазяїна: від високої до низької або від низької до високої, відповідно (Voigt et al., 2021).

Стратегія «Убити переможця» стосується бактеріальних популяцій з високою чисельністю. Це так звані «переможці», котрі виграють у змаганні за ресурси, але стають основною мішенню для фагів. Бактеріофаги інфікують і вбивають ці популяції через літичний цикл, внаслідок чого кількість бактерій «переможців» різко знижується, що дозволяє іншим, менш численним бактеріям або видам, які не були основною мішенню для фагів, співіснувати або навіть відновити свої популяції. Таким чином, стратегія «Убити переможця» забезпечує біорізноманіття бактеріальних спільнот, запобігаючи домінуванню одного виду бактерій.

1.2.5. Екосистемна екологія фагів

Екосистема складається з біотичних та абіотичних компонентів середовища. Абіотичні складники не є живими, тому екосистема по суті є спільнотою, об'єднаною з неживим середовищем. На практиці основна увага екологів екосистем зосереджена на неорганічних поживних речовинах і енергії.

Фаги впливають на рух поживних речовин та енергії в межах екосистем головним чином через лізис бактерій. Фаги також можуть впливати на абіотичні фактори через кодування екзотоксинів (деякі з них здатні розчиняти тканини живих організмів). Предметом цього розділу екології також є вплив фагів на глобальний колообіг вуглецю, особливо в контексті феномена, відомого як мікробна петля.

Мікробна петля — це концепція, яка описує шлях потоку енергії та органічних речовин у водних екосистемах через мікроорганізми, зокрема бактерії, найпростіших і віруси. Вона є важливою частиною харчової мережі океанів, озер

та інших водойм, де традиційні харчові ланцюги включають лише великі організми, як-от планктон, риби та ін. Мікробна петля додає новий рівень, який допомагає зрозуміти, як мікроорганізми впливають на загальний колообіг енергії та речовин в екосистемах.

У складі мікробної петлі виділяють наступні компоненти:

1. **Розчинена органічна речовина (DOM):** Вода містить розчинені органічні сполуки, які виділяються як відмерлими, так і живими організмами. Ця речовина є важливим джерелом енергії для мікроорганізмів;
2. **Гетеротрофні бактерії:** Ці бактерії споживають DOM і перетворюють його на біомасу, яка може бути доступною для інших організмів у харчовій мережі;
3. **Протисти (найпростіші):** Найпростіші, такі як одноклітинні хижачки, харчуються бактеріями, і таким чином передають енергію та органічні речовини на вищі трофічні рівні;
4. **Віруси, особливо бактеріофаги:** Інфікують і руйнують бактерії, сприяючи вивільненню розчиненої органічної речовини назад у середовище, що створює замкнутий цикл всередині мікробної петлі (**вірусний шунт**).

Значення мікробної петлі полягає в тому, що вона дозволяє повторно використовувати енергію та речовини в екосистемі, збільшуючи її ефективність. Мікробна петля демонструє тісніші зв'язки між мікроорганізмами та іншими рівнями харчової мережі, забезпечуючи важливу роль у глобальному кругообігу вуглецю та поживних речовин.

1.2.6. Екологія окремих груп бактеріофагів

Віруси ціанобактерій (ціанофаги)

Ціанобактерії – це найбільша та найважливіша за впливом на біосферу група живих організмів на Землі: 90% живої маси всієї біосфери. Ціанобактерії зазвичай присутні у водних екосистемах і є основою водних

харчових мереж. Вони є одними з найуспішніших біологічних об'єктів на планеті, які відіграли ключову роль в еволюції біосфери і вважаються «винахідниками» фотосинтезу. Відповідно, ціанофаги – це віруси, які інфікують ціанобактерій і є одними з найпоширеніших біологічних об'єктів на планеті. Як було сказано вище, саме дослідження ціанофагів дали інтенсивний поштовх вивченню біорізноманіття фагів.

Ціанофаги, які співіснують з ціанобактеріями, відіграють важливу роль у підтримці екологічної динаміки та біологічного різноманіття цих бактерій. Завдяки своїй літичній активності вони опосередковують біогеохімічні цикли поживних речовин, і здатні перепрограмувати метаболічну активність своїх хазяїв.

Ціанофаги відзначаються значним різноманіттям і варіюють за морфологічними характеристиками, середовищем існування та спектром хазяїв. Їхнє структурне різноманіття охоплює широкий спектр форм і розмірів, що відображають різноманітні механізми адаптації до специфічних умов навколишнього середовища. У природі ціанофаги зустрічаються у найрізноманітніших екосистемах, таких як океани, прісноводні водойми, ґрунти, що свідчить про їхню здатність до виживання та процвітання в різних умовах. Крім того, ціанофаги здатні інфікувати широкий спектр хазяїв, що свідчить не лише про їхню високу спеціалізацію, а про адаптивність у виборі мішені для зараження. Таке різноманіття робить їх важливим об'єктом вивчення в галузях екології, вірусології та біотехнології.

Численні ціанофаги були виділені з різних середовищ та за морфологічними характеристиками розділені на три морфологічні групи: міоподібні, сифоподібні та подоподібні віруси. Донедавна ціанофаги класифікували до одноіменних родин, але з відходом таксономії вірусів від морфологічних критеріїв ці віруси були рекласифіковані. Ціанофаги також поділяють на різні класи залежно від морфології їхніх хазяїв і спектру літичної активності. Ціанофаги класу 1 зазвичай інфікують нитчасті ціанобактерії, які не мають гетероцист; ціанофаги класу 2 інфікують нитчасті ціанобактерії, незалежно від здатності фіксувати азот; а

ціанофаги класу 3 специфічні до одноклітинних або колоніальних ціанобактерій (Grasso et al., 2022).

Серед усіх відомих ціанофагів найкраще вивченими є морські віруси, котрі інфікують представників домінуючих в цих екосистемах родів ціанобактерій *Synechococcus* і *Prochlorococcus* (Zimmerman et al., 2020). Згідно з базою даних Virus-Host (<https://www.genome.jp/virushostdb>), станом на 2024 р. були секвеновані геноми більше 160 ціанофагів, переважна більшість з яких була виділена з морських ціанобактерій. Останнім часом з'являється все більше повідомлень про виявлення прісноводних ціанофагів (Zhang et al., 2021; Du et al., 2022). Загалом, виділено більше 20 прісноводних ціанофагів, проте дані метагеномного аналізу свідчать на користь того, що різні прісноводні середовища багаті на ціанофаги. Вважається, що ціанофаги відіграють важливу роль у підтриманні «здоров'я» прісноводних екосистем, і мають значний потенціал для подальших досліджень і практичного застосування. Було показано, що зменшення біомаси ціанобактерій в евтрофному озері є результатом розмноження ціанофагів, що дає перспективу їх можливого застосування при вирішенні проблеми цвітіння води (Gons et al., 2002). Проте, для успішного застосування ціанофагів з метою контролю цвітіння ціанобактерій необхідним є розуміння біології ціанобактерій і фагів, механізмів реактивації лізогенних фагів, особливостей взаємодії фаг-хазяїн. Крім того, для кращого розуміння взаємодії ціанофаг-ціанобактерія необхідно враховувати умови довкілля, які впливають на ріст ціанобактерій та перебіг вірусної інфекції. Слід враховувати, що деякі ціанофаги можуть бути важливими факторами, що впливають на кількість ціанотоксинів у прісноводному середовищі.

Показано, що поява кількох варіантів ціанотоксину може бути тісно пов'язана з надлишком вільних ціанофагів S-SRM01 і PA-SR01. Це свідчить про те, що інфекція ціанофагів може сприяти виробленню певних ціанотоксинів (Zhang et al., 2022). На противагу цьому, дослідження динаміки ціанофага Ma-LMM01 та гена *mscA* ціанобактерії *Microcystis aeruginosa* показали зменшення

кількості мікроцистин-продукуючих клітин в популяції, яка знаходилась під тиском вірусної інфекції (Yoshida et al. 2008).

Роботи багатьох науковців свідчать, що для розуміння динаміки інфекції недостатньо досліджувати поодинокі взаємодії фаг-бактерія. Умови довкілля значною мірою впливають на результат такої взаємодії. Абіотичні фактори (рН середовища, температура, ультрафіолетове випромінення, солоність, кількість опадів, тощо) можуть відігравати важливу роль у регулюванні динаміки популяції ціанофагів і ціанобактерій з точки зору росту ціанобактерій, стабільності вільного фага, розведення та розповсюдження фагових частинок.

Екологічні дослідження вірусних спільнот, показали що вони є надзвичайно гетерогенними. Для отримання цілісної картини нам бракує розуміння фізіологічних особливостей перебігу інфекції, що лежить в основі еволюції різноманітних ліній фагів. Однією з робіт, яка проливає світло на закономірності формування видових генофондів ціанофагів є робота Maidanik зі співавторами. Дослідження взаємозв'язків між фізіологічними параметрами інфекції, генетичним різноманіттям вірусів та умовами довкілля автори проводили на T7-подібних ціанофагах, які інфікують представників морських ціанобактерій *Synechococcus* і *Prochlorococcus* у Червоному морі. Ці віруси діляться на дві різні філогенетичні клади: А та В. Віруси, які належать до клади А, характеризуються вузьким колом чутливих хазяїв і переважно інфікують генотипи *Synechococcus*, тоді як фаги-представники клади В більш різноманітні та можуть інфікувати різні генотипи *Synechococcus* або *Prochlorococcus*. Було показано, що ціанофаги клади А, на противагу представникам клади В, мають високу вірулентність, активніше реплікуються з коротким латентним періодом і високим врожаєм вірусних частинок. Однак, ціанофаги клади В принаймні в 10 разів частіше зустрічаються у морській воді і мають ширше коло хазяїв незалежно від сезону. Автори роблять висновок, що кількість ціанофагів, частота інфекції і вірус-індукований лізис досягають пікових значень при помірних значеннях вірулентності. Відмінності у властивостях інфекції відображаються у філогенії вірусу на рівні клади. Крім того, автори вказують на те, що параметри інфекції разом з

відмінностями в різноманітності субкладів і спектрі хазяїв мають важливі екологічні наслідки. Причому менш вірулентні і більш різноманітні вірусні класи мають більш вагомий екологічний вплив (Maidanik et al. 2022). Результати моделювання свідчать про те, що менш агресивна стратегія інфікування може сприяти підтриманню вищої щільності популяції хазяїна. Це, у свою чергу, забезпечує стабільніші умови для існування і збільшення чисельності популяцій фагів. Таким чином, помірна інфекційна активність вірусів не лише зберігає життєздатність популяцій хазяїв, але й створює оптимальні умови для стійкого зростання кількості самих фагів, що позитивно впливає на довготривале співіснування обох видів у екосистемі.

На даний момент переважна більшість виділених ціанофагів є облигатно літичними. Дослідження в Червоному морі протягом річного періоду виявили, що чисельність і генетичне різноманіття ціанофагів змінюються залежно від змін в популяціях *Synechococcus*, що узгоджується з гіпотезою про те, що ціанофаги є важливим фактором у регулюванні екологічної сукцесії ціанобактерій (Naureen et al., 2020).

Цікавою особливістю ціанофагів є наявність у їхньому геномі генів, які кодують білки, що беруть участь у фотосинтетичній діяльності ціанобактерій. Найвідомішими в цьому контексті є поширені в геномах ціанофагів гени, які кодують основні білки фотосистеми II (PSII), а саме *psbA* для білка D1 і *psbD* для білка D2. Першим фотосинтетичним геном, ідентифікованим у ціанофагів, був *psbA*. 80% секвенованих геномів ціанофагів мають ген *psbA*, а 42% мають обидва гена *psbA* і *psbD*. Функція генів ціанофагів *psbA* і *psbD* ще не повністю вивчена, але, ймовірно, вони відіграють ключову роль в інфікуванні клітин за мінливих умов освітлення, які викликають фотоінгібування білків хазяя D1/D2. Світло-індуковане фотоінгібування призводить до швидшого руйнування D1/D2, ніж триває повний цикл розвитку ціанофага. Таким чином, інтродукція вірусом власних копій генів *psbA* (D1) і *psbD* (D2) під час інфекції дозволяє інфікованій клітині бути фотосинтетично активною стільки часу, скільки потрібно для повної реплікації вірусних частинок (Ślesak, Ślesak 2022).

Наявність цих генів у ціанофагів також не дає спокою еволюційним біологам. Згідно з найпоширенішою точкою зору, попередник ціанобактерій не мав фотосинтетичних генів, що кодують білки, які беруть участь у виробництві кисню. Фотосинтез, як механізм продукування кисню, ймовірно, виник приблизно 2,3–2,6 мільярда років тому під час так званої Великої кисневої події (GOE) через горизонтальне перенесення генів і злиття двох фотосинтетичних систем, що походили від первісних, не киснеутворюючих бактерій (Hohnmann-Marriott, Blankenship 2011). Результати філогенетичного аналізу свідчать, що білки D1/D2 і геноми ціанофагів, що їх кодують, виникли на дуже ранніх етапах еволюції ціанобактерій, які, ймовірно, коеволюціонували з ціанофагами. Реконструкція 3D-структури білків D1 і D2 *in silico*, а також вичення кодуючих послідовностей генів *psbA* та *psbD* у досліджуваних групах оксифототрофів і ціанофагів, свідчать про те, що D1/D2 є еволюційно давніми білками, які могли утворити первинну фотосистему II (*PSII*), здатну насичувати воду киснем на дуже ранніх етапах еволюції життя на Землі (Ślesak, Ślesak 2022).

Ще одна особливість ціанофагів – їхня активна участь у біогеохімічних процесах. Ціанофаги можуть впливати на кругообіг поживних речовин у різних масштабах – від окремих клітин до цілих екосистем. Наприклад, було показано, що вірусна інфекція призводить до зниження співвідношення вуглецю до азоту, що призводить до стехіометричного дисбалансу інфікованої клітини та, таким чином, до потенційних змін її харчової цінності (Ankrah et al., 2014). Продемонстровано, що віруси морських ціанобактерій *Synechococcus* (які нездатні фіксувати азот) використовують механізм поглинання поживних речовин хазяїна для отримання позаклітинного азоту (у формі нітратів) із навколишнього середовища, який потім включається до новосинтезованих вірусних частинок (Waldbauer et al., 2019).

Крім того, у вірусних метагеномах та геномах культивованих ізолятів ціанофагів ідентифіковані гени, що кодують білки, котрі беруть участь у поглинанні азоту (гомолог *amt*) (Monier et al., 2017) або окисленні амонію (гомологи *amoC* і *amoA*) (Ahlgren et al., 2019). Експерименти продемонстрували,

що ці гени (наприклад, *amt*) експресуються під час інфекції та підвищують швидкість поглинання амонію інфікованими клітинами (Monier et al., 2017). Крім того, з розвитком інфекції віруси можуть перейти від використання азоту, отриманого з біомаси хазяїна, до позаклітинних джерел азоту, щоб задовольнити потребу в азоті, необхідну для ефективною реплікації. Лізис інфікованих клітин і вивільнення розчиненого органічного та неорганічного азоту (вірусний шунт) індукує структурні та функціональні зміни в оточуючих мікробних спільнотах (Kuznesova 2020). Отже, вірусна інфекція та подальший лізис клітин можуть безпосередньо модулювати перетворення азоту в екосистемах. При цьому віруси впливають як на діазотрофні (азотфіксуючі), так і на нездатні до прямої фіксації азоту бактерії. Зараження вірусами може спричинити зміни в асиміляції азоту (фіксація N_2), зміни швидкості вивільнення амонію через метаболічне перепрограмування клітин хазяїна і перерозподіл азоту всередині інфікованих клітин шляхом перенаправлення внутрішньоклітинного пулу поживних речовин на виробництво нових віріонів.

Слід окремо зупинитись на ролі ціанобактерій у колообігу вуглеця. Ціанофаги відіграють значну роль у циркуляції вуглеця в екосистемах, особливо у водних середовищах. Насамперед ціанофаги регулюють чисельність ціанобактерій, котрі є основними фотосинтетиками у багатьох водних екосистемах. Після лізису ціанобактерій ціанофагами, вивільняються органічні сполуки, що містять вуглець, такі як розчинений органічний вуглець. Такий вуглець стає доступним для інших мікроорганізмів. Вірусне ураження ціанобактерій може впливати на рівень первинної продукції, яка є основним джерелом органічного вуглецю в екосистемах. Зниження чисельності ціанобактерій через дію ціанофагів може призвести до зменшення фіксації вуглеця шляхом фотосинтезу.

Лізис ціанобактерій також може впливати на передачу вуглеця в трофічних ланцюгах. Замість того, щоб бути спожитим вищими рівнями харчового ланцюга, вуглець із ціанобактерій перерозподіляється до мікробних спільнот, що може змінити структуру харчових мереж і вплинути на всю екосистему.

Отже, ціанофаги можуть безпосередньо контролювати чисельність хазяїна. Вони також визначають мікробне різноманіття, структуру спільноти та модулюють біогеохімічні процеси, керовані ціанобактеріями. Ці віруси можуть перетворювати ціанобактерії в розчинну органічну речовину. Приблизні оцінки свідчать, що в процесі вірусної інфекції та лізису у поверхневих водах видалається 20-40% постійного «запасу» прокариотів щодня (Suttle, 2007).

Віруси-екстремофіли

Віруси архей є однією з найбільш незвичайних і найменш досліджених груп вірусів. Археї — одна з груп живих організмів, до якої належать мікроскопічні одноклітинні прокариоти, що відрізняються низкою фізіолого-біохімічних ознак від справжніх бактерій (еубактерій). Слід відмітити, що у науковому світі досі точаться суперечки стосовно філогенезу різних груп біологічних об'єктів. Згідно з системою трьох доменів, розрізняють три фундаментальні філогенетичні групи представників органічного світу: археї, еукаріоти і бактерії. Незважаючи на морфологічну подібність до бактерій, археї мають гени та деякі метаболічні шляхи, подібні до таких у еукаріотів. Особливо яскравим прикладом є ферменти, які беруть участь у транскрипції та трансляції. Інші аспекти біохімії архей є унікальними, наприклад, їхня залежність від ефірних ліпідів у клітинних мембранах та можливість використовувати різноманітні джерела енергії, починаючи від органічних сполук, таких як цукор, до аміаку, іонів металів і навіть водню. Остання властивість дозволяє археям пристосуватись і існувати в екстремальних середовищах.

Якщо розглядати віруси архей, то вони є такими ж особливими як і їхні хазяї, але за способом реалізації реплікативного циклу вони часто нагадують бактеріофаги. Переважна більшість ізольованих вірусів архей інфікує гіпертермофілів та гіпергалофілів, які належать до типів *Crenarchaeota* та *Euryarchaeota*, відповідно. Проте, нещодавно було виділено та описано декілька вірусів метаногенів та архей, які окислюють аміак (*Thaumarchaeota*). Відомі віруси архей можна умовно поділити на дві категорії: такі, які морфологічно та

генетично є унікальними для архей, та такі, що мають чіткі структурні та генетичні гомологи бактеріофагів і вірусів еукаріот. Більшість вірусів, які інфікують галофільні археї, мають типову для бактеріофагів структуру і складаються з голівки та хвостового відростку. Інші віруси мають унікальну морфологію і збираються у раніше неописані структури. Виявлені віруси, віріони яких мають пляшко-, веретено- чи лимоноподібну форму (Wirth, Young 2020).

Для деяких вірусів архей (*Sulfolobus turreted icosahedral virus 1*, *Sulfolobus islandicus filamentous virus*) описаний особливий механізм виходу вірусу з клітини. Клітини, інфіковані цими вірусами, утворюють на своїх поверхнях вірус-асоційовані піраміди (VAP) заввишки близько 150 нм, які розкриваються, як пелюстки квітки, розриваючи зовнішній S-шар клітини і формуючи «отвір» для виходу вірусу. Подібні структури відрізняються за кількістю сторін. Так, для *Sulfolobus turreted icosahedral virus 1* показано формування семигранних структур (Daum et al., 2014), в той час як *Sulfolobus islandicus filamentous virus* призводить до експонування шестигранних структур (Baquero et al., 2021).

Деякі відомі віруси архей мають незвичні суперкапсиди. У той час як складні віруси зустрічаються у всіх трьох доменах життя, нова ліпідна структура та, ймовірно, новий механізм її набуття були виявлені у *Acidianus filamentous virus 1* (AFV1), хазяїн якого здатен існувати за температури до +80°C. суперкапсидна оболонка AFV1, отримана від клітини-хазяїна, набуває нехарактерної для клітинної мембрани U-подібної форми. U-подібні одношарові ліпідні мембрани утворюються шляхом згинання довгих гнучких ліпідів з мембрани хазяїна, які перепрофільовані для створення тоншої мембранної оболонки AFV1. Така структура, ймовірно, уможливорює високу кривизну, виявлену в довгому тонкому ниткоподібному капсиді вірусу (Daum et al., 2014).

Наразі всі досліджені віруси архей мають ДНК-геноми, розмір яких становить від 10 до 100 т.п.н. РНК-вмісні віруси архей не були виділені, хоча дані метагеномного аналізу свідчать про їхню присутність (Bolduc et al., 2012).

Деякі віруси архей, які належать до різних груп, кодують свою інформацію у вигляді двохланцюгової ДНК, якій притаманна А-форма. На відміну від В-

форми, А-форма ДНК дуже обмежено зустрічається в природі. Нещодавно було запропоновано виділити нову таксономічну групу (реалм *Adnaviria*), яка б об'єднувала ниткоподібні віруси архей з ДНК-геномами у А-формі та характерними мажорними капсидними білками, відмінними від тих, які кодуються іншими відомими вірусами (Krupovic et al. 2021). Втім, А-форма ДНК виявлена також у вірусів з інших морфологічних груп (паличкоподібних рудівірусів SIRV2 і SSRV1, ікосаедричного портоглобовіруса SPV1).

Не зважаючи на більш ніж 40 років досліджень вірусів архей, на даному етапі досліджень ми все ще далекі від повного розуміння їхнього біорізноманіття та особливостей взаємодії з чутливими хазяями. Виділенню та дослідженню вірусів архей перешкоджають труднощі культивування їхніх хазяїв. Метагеномний аналіз виявив величезну кількість потенційних вірусних послідовностей із середовищ по всьому світу. Наразі виділено дещо більше 100 вірусів архей, які за своїми характеристиками класифіковані у як мінімум 33 різних родини. Така велика кількість родин при відносно невеликій кількості їх представників вчергове свідчить про надзвичайне різноманіття цих вірусів, і що у майбутньому на нас чекають відкриття нових представників з унікальними характеристиками. Відкриття нових вірусів і нових генів, окрім фундаментального значення, може мати серйозне прикладне застосування, оскільки нові унікальні ліпіди, гени та білки знаходять своє застосування в біотехнології. Так, у деяких вірусів архей геноми містять кластери регулярно розташованих масивів коротких паліндромних повторів (CRISPR), які, ймовірно, захищають клітину хазяїна від певних вірусів. У деяких інших вірусів архей виявлені ефективні білки проти CRISPR, які також закодовані в геномі деяких бактеріофагів і плазмідах (Athukoralage et al., 2020).

Екологічні дослідження свідчать про важливу роль вірусів архей у структуруванні мікробних спільнот, зокрема у водних екосистемах. Інтенсивні дослідження на території Єллоустоунського національного парку, відомого численними гейзерами та іншими геотермічними об'єктами, дозволили пролити світло на взаємодію вірусів з археями. У Єллоустоуні зосереджено близько 3000

гейзерів (половина всіх гейзерів на планеті) та близько 10000 геотермальних джерел. Геотермальні басейни парку схожі на кольорові калюжі, і відрізняються між собою за кольором та хімічним складом. Барвисті відтінки водою – результат життєдіяльності мікроорганізмів. В кислотних термальних джерелах спостерігається значно спрощена за видовим складом мікробна спільнота, представлена в основному археями та їхніми вірусами. Цей факт робить термальні джерела ідеальним середовищем для проведення досліджень, метою яких є розкриття закономірностей взаємодії вірусів з хазяями. Декілька таких джерел були обрані вченими в якості модельних екосистем.

Наприклад, в термальному джерелі NL01 вивлено 7-8 типів клітин архей що підтримують реплікацію близько 115 різних вірусів архей. Отже, в таких умовах, більшість клітин (якщо не всі) постійно взаємодіють з вірусами. Очевидним є той факт, що в такій системі створюються умови для жорсткої конкуренції різних видів вірусів за клітини хазяїна. Спектр взаємодій вірус-хазяїн теж варіює: від типової літичної інфекції, яка призводить до загибелі клітини, до «хронічної» інфекції, яка надає певні переваги клітині. У архей «хронічні» вірусні інфекції спостерігаються досить часто. Існує думка, що такі інфекції можуть бути механізмом, за допомогою якого інфікована клітина «платить» нижчу ціну за захист від інших, більш вірулентних вірусів (Munson-McGee et al., 2018). Крім того, в середовищі гарячих джерел з низькою щільністю клітин формуються умови для поширення вірусів з вертикальним шляхом передачі, тоді як у вірусів, які використовують стратегії горизонтальної передачі, шанси знайти нового хазяїна знижуються (Weitz et al., 2019).

Віруси архей, подібно до ціанофагів, відіграють важливу роль у біогеохімічних циклах. Відомо, що домінуючі групи прибережних архей асимілюють неорганічний вуглець, та перетворюють органічні біополімери у біомасу та багаті карбоксильними групами аліциклічні молекули. Метилотрофні метаногени є основними виробниками метану. Анаеробні метанотрофні археї працюють з бактеріями-партнерами, щоб окислювати метан і сприяти випаданню карбонатів. Археї, що окислюють аміак, складають основну частину мікробної

біомаси на Землі і відіграють важливу роль у глобальному біогеохімічному циклі азоту.

Одним з основних аспектів важливості розуміння окислення аміаку є його роль у сільському господарстві, де аміак використовується як основний компонент багатьох добрив. Надмірне окислення аміаку може призвести до втрати доступного азоту в ґрунті, що, в свою чергу, знижує ефективність добрив і може викликати виснаження ґрунтів. Це явище знижує продуктивність сільського господарства та може створювати загрозу продовольчій безпеці в регіонах, де фермери залежать від агрохімічних добрив.

Аміак в навколишньому середовищі також є попередником утворення оксиду азоту (N_2O), одного з найпотужніших парникових газів. Окислення аміаку до оксиду азоту в процесі нітрифікації може призводити до збільшення концентрації цього газу в атмосфері. Викиди оксиду азоту сприяють глобальному потеплінню та зміні клімату. Тому вивчення механізмів і умов, які сприяють або заважають окисленню аміаку, є критично важливим для розробки стратегій зменшення викидів парникових газів. Процес окислення аміаку також впливає на якість водних ресурсів. Підвищення рівня нітратів внаслідок окислення аміаку може призводити до евтрофікації водних об'єктів, що викликає цвітіння водоростей і зниження вмісту кисню у воді. Це негативно впливає на водну фауну і флору, створюючи додаткові екологічні ризики.

Чисельні дослідження свідчать про ефективний лізис клітин архей у різних середовищах. Як приклад, було продемонстровано, що в глибинах океану лізис архей, опосередкований вірусами, відбувається швидше, ніж лізис бактерій, із середньою швидкістю 3,2% на день проти 1,6% на день, відповідно. Як наслідок, колообіг архей у верхніх шарах глибоководних відкладень становить до однієї третини загальної вбитої мікробної біомаси, що призводить до викиду приблизно від 0,3 до 0,5 гігатонни вуглецю на рік у всьому світі (Danovaro et al., 2016). Ймовірно, таку або подібну картину ми будемо спостерігати і у випадку архей, які окислюють аміак. Масовий лізис архей і бактерій свідчить про значний вплив вірусів на мікробні угруповання. Незважаючи на значні труднощі проведення

досліджень в цій галузі, роль архей, а отже і вірусів, які постійно взаємодіють з ними, в глобальних геохімічних процесах є беззаперечною.

Бактеріофаги в/на організмі людини і тварин

Бактеріофаги виділяють з абсолютно різних середовищ, і людський організм не є винятком. Фаги проникають у людський організм через різні джерела, такі як їжа, вода і контакт з довкіллям. Вони заселяють наш організм разом із бактеріями, формуючи значну частину мікробіому.

Останні дослідження довели, що фаги є найчисленнішою групою в людському віромі. Ці результати стали можливими завдяки сучасним технологіям секвенування, які дозволяють дослідникам аналізувати ДНК і РНК вірусів без потреби культивувати їх у лабораторії.

Хоча фаги були вперше виявлені в людському організмі ще кілька десятиліть тому, тільки останнім часом вдалося оцінити їхнє справжнє значення та кількість. Фаги відіграють важливу роль у регуляції бактеріальних популяцій у нашому організмі, допомагаючи підтримувати баланс мікробіому (рис. 1.23). Вони можуть впливати на наше здоров'я як позитивно, допомагаючи боротися з патогенними бактеріями, так і негативно, коли їхня дія призводить до дисбалансу мікробіоти, що може спричиняти захворювання.

Вчені передбачають, що приблизно 10^{15} фагів знаходяться в людському кишківнику, що становить приблизно 10^8 – 10^{10} фагів на грам людських екскрементів, залежно від методу виділення. Вміст фагів у зразках людських екскрементів може варіювати залежно від стану здоров'я донора, особливо при деяких шлунково-кишкових розладах (Łusiak-Szelachowska et al.; Gogokhia et al., 2019).

Фаги також можуть відігравати важливу роль у підтримці гомеостазу мікробіоти. Вони можуть регулювати різноманітність мікробіоти та бути залученими до підвищення проникності кишечника і порушень імунної системи (Tetz et al., 2017). Sutton і Hill наголосили на критичній потребі в ретельній

оптимізації та валідації всіх етапів протоколів аналізу віромів і біоінформатичних підходів, а також на необхідності всебічного вивчення ролі фагів у формуванні мікробіому людського кишечника з точки зору можливого застосування фагів як терапевтичного засобу (Sutton, Hill 2019).

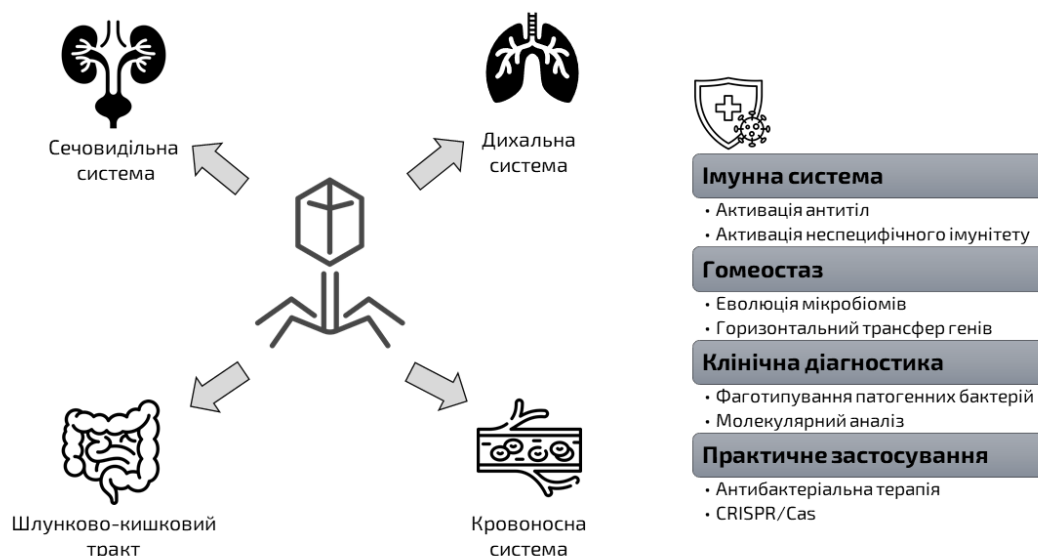


Рис. 1.23 – Наслідки взаємодії бактеріофагів з різними системами людського організму та можливості їхнього практичного застосування

Нові відомості про поведінку бактеріофагів у організмі людини відкривають перспективи для розробки нових методів лікування, таких як фаготерапія. Основні моменти, пов'язані з фаготерапією людських інфекцій, детальніше описані в розділі 2.

Таким чином, бактеріофаги існують в бактеріальних спільнотах, формують та структурують їх шляхом змін власної чисельності, різноманіття та вірулентності. Бактеріофаги опосередковують горизонтальне перенесення генів, змінюють метаболізм хазяїна та перерозподіляють біохімічні сполуки бактеріального походження шляхом лізису клітин, таким чином відіграючи важливу роль в екосистемі. Фаги співіснують і еволюціонують разом з бактеріями і володіють різними механізмами протидії клітинним захисним механізмам. Фаги завдячують своїм існуванням бактеріям-хазяям, тому вони

викликають зміни в геномах своїх хазяїв, передаючи гени резистентності та гени, що кодують токсини, для підвищення пристосованості хазяїна. Застосування фагів у біотехнології, доквіллі, сільському господарстві та медицині вимагає всебічних досліджень для розкриття множинних взаємодій фагів і бактерій.

1.2.7. Виділення фагів з доквілля

Бактеріофаги – найбільш розповсюджені форми життя на Землі. Віруси виявлені майже у всіх груп прокаріотичних організмів: від крихітних бделловібріонів, які самі паразитують на інших бактеріях, до порівняно великих ціанобактерій.

Виділити бактеріофаг можна з різних матеріалів, де могли на той момент міститись бактерії, на яких цей фаг розмножується. Так, наприклад, дизентерійні фаги та фаги кишкової палички виявляють у стічних водах, ґрунті, організмах комах та ін. Стафілококові фаги знаходять у слизу з носа, на шкірі та виділеннях із ран. Фаги, що уражують фітопатогенні бактерії, виділяють із рослинного матеріалу і ґрунту. Джерелом ціанофагів часто є морська вода. Іншими словами, фаги шукають там, де є чи можуть бути їхні хазяї.

Для первинного виділення бактеріофагів досліджуваний матеріал гомогенізують, звільняють від великих частинок і фільтрують через бактеріальні фільтри. При цьому часто застосовують обробку хлороформом для усунення бактеріального забруднення. Для підвищення концентрації вірусних частинок застосовують методику «збагачення». Для цього отриманий фільтрат висівають разом з відомими сприйнятливими бактеріями в рідкому поживному середовищі. Умови інкубації добирають оптимальні для бактерії (як правило, це 37⁰С протягом 14-18 годин, у випадку бактерії людини). Для видалення залишків бактерій після інкубації проводять низькошвидкісне центрифугування та фільтрування через бактеріальний фільтр. Після цього фільтрат, як правило,

висівають на агаризоване середовище. Для виділення фагів з лізогенної культури часто необхідно застосовувати індукцію виходу профага, як описано нижче.

Бактеріофаги, як і інші віруси, є облігатними внутрішньоклітинними паразитами і розмножуються виключно в клітинах бактерій. Їх розмноження на бактеріях в рідкому середовищі приводить до того, що бактеріальна культура, яка була мутною перед додаванням вірусу, через кілька годин інкубації стає прозорою (через лізис бактеріальних клітин). На твердому середовищі бактеріофаги зумовлюють або формування окремих негативних колоній («бляшок»), або призводять до утворення стерильних плям, залежно від кількості вірусу в досліджуваному зразку та методу титрування.

Дуже часто виявлені в досліджуваних зразках бактеріофаги є сумішшю фагів, що відрізняються між собою за біологічними властивостями. Тому після виявлення фага в досліджуваному зразку проводять виділення його «чистої лінії» з подальшим культивуванням цього фага на чутливій бактерії. У подальшій роботі з цим фагом керуються принципами Д'Ерелля – засновника бактеріофагії. Ці принципи полягають у наступному:

1. Як правило, дія бактеріофагів на бактерії є специфічною – певний бактеріофаг викликає лізис тільки відповідного виду бактерій. Проте існують винятки, коли той чи інший бактеріофаг здатен лізувати бактерії кількох, зазвичай близьких видів;
2. Бактеріофаги діють тільки на молоді активно вегетуючі бактерії (виняток – ціанобактерії);
3. Літична дія бактеріофагів на бактерії приводить до просвітлення мутної бульйонної культури, а на агарових газонах викликає утворення чистих «стерильних» зон (бляшок) різного розміру, обумовлених ізольованим розвитком нащадків кожної початково внесеної на газон фагової частинки. Останні, за аналогією з утворенням бактеріальних колоній при розмноженні бактерій, що вирости на агарі, мають назву **негативних колоній** фага. Кількість цих негативних колоній вказує на кількість фагових частинок, що міститься в 1 мл середовища;

4. При лізисі бактеріальної культури фагом серед великої кількості фагочутливих клітин може трапитися певна кількість стійких об'єктів, які при подальшому розмноженні можуть спотворювати картину дії фага. Від таких клітин обов'язково звільняються шляхом фільтрації, прогріванням або ж обробкою хлороформом.

Різні бактеріофаги формують різні негативні колонії на бактеріальному газоні (рис. 1.24-1.25). Таким чином, морфологія негативних колоній може попередньо вказувати на деякі властивості виділених бактеріофагів. Так, чисті прозорі негативні колонії здебільшого свідчать про належність фагів до вірулентної групи, а мутні, з ореолом по периферії можуть свідчити про виділення лізогенних фагів.

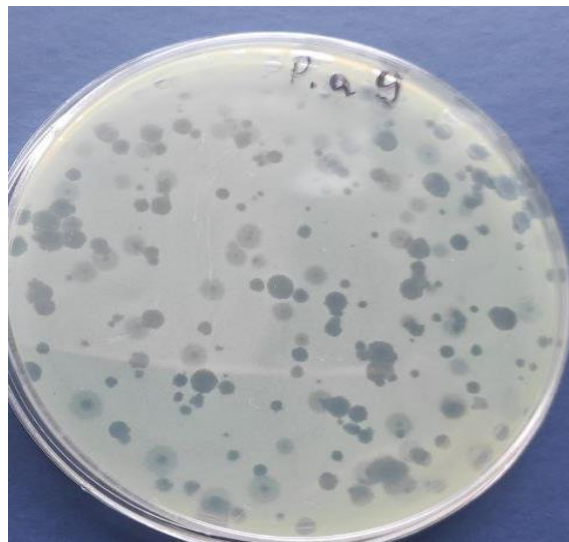


Рис. 1.24 – Різні типи негативних колоній при первинному висіві зразку стічної води на культурі *Pseudomonas aeruginosa*

Слід відмітити, що наявність ореолу навколо негативної колонії може вказувати і на присутність в геномі фага генів деполімераз – ферментів, які руйнують екзополісахариди (компоненти бактеріальних капсул). Подібні колонії часто зустрічаються на газонах, утворених *Klebsiella pneumoniae* (рис. 1.25). Характерною особливістю таких ореолів є їхнє збільшення в розмірі навіть після остаточного формування самої пляшки (рис. 1.26).

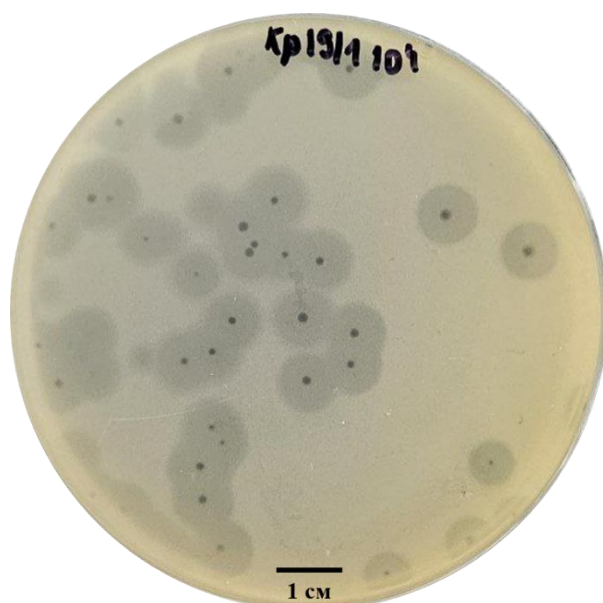


Рис. 1.25 – Негативні колонії на тест-культури *Klebsiella pneumoniae*

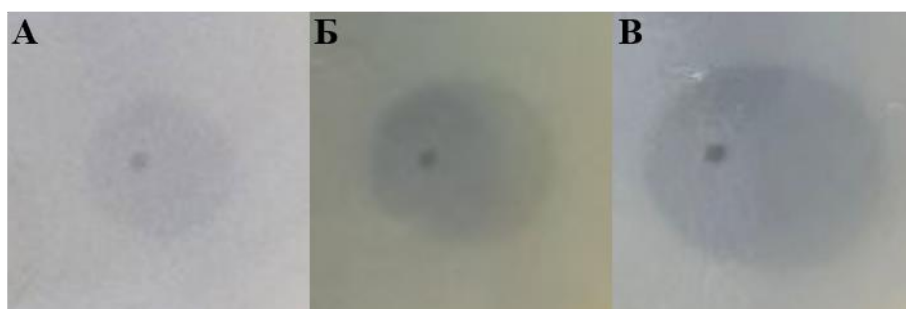


Рис. 1.26 – Збільшення ореолу навколо негативної колонії на газоні *K. pneumoniae* за різної тривалості інкубації: А – 24 год, Б – 48 год, В – 72 год

Крім того, розмір негативної колонії, незалежно від її морфології, може свідчити про розмір вірусних частинок, які достовірно вивчають за допомогою методу електронної мікроскопії.

Оскільки фаги маленьких розмірів переважно утворюються в більшій кількості та порівняно швидко дифундують в агарі, то в результаті утворюються негативні колонії великого розміру (1,5-10 мм). До фагів цієї групи належать бактеріофаги C_{Δ} та T1. На противагу цьому, невеликі негативні колонії розміром 1-2 мм утворюються порівняно великими бактеріофагами типу T2 і T4. Втім, присутність негативних колоній більшого розміру на фоні дрібних бляшок, може бути пов'язана з мутантними вірусами (r-мутантами як, наприклад, у бактеріофага T4).

1.3. Еволюція бактеріофагів

Еволюція вірусів, зокрема бактеріофагів, є однією з найбільш захоплюючих і важливих областей сучасної біології. Бактеріофаги складають значну частину біосфери Землі і до теперішнього часу є не до кінця дослідженою частиною біологічного світу (Pedulla et al., 2003), величезна кількість їх генетичних варіантів є погано вивченими чи взагалі залишаються невідомими. Наше розуміння взаємодії фагів з хазяями вивчене недостатньо. За оцінками, загальна кількість фагових частинок на Землі може становити 10^{31} , а еволюція фагів, імовірно, триває вже більше двох мільярдів років, породжуючи фантастичне генетичне різноманіття (Hendrix, 2002; Hatfull, Hendrix 2011).

Слід зазначити, що ці оцінки розміру та різноманіття фагової популяції виникли в основному на основі спостережень, отриманих із зразків води, які легко зібрати та оцінити кількісно (Suttle, 2007). Хоча поширеність фагів в ґрунті може становити відносно незначну частину від загальної кількості фагових частинок у біосфері, різноманіття прокаріотів у зразках ґрунту є дуже високим (Fierer, Jackson 2006), що, як очікується, відображається і на популяціях супутніх фагів. Кількісна оцінка різноманіття фагів у ґрунті та наземних зразках єможе бути складною, але, за оцінками, фаги присутні на рівнях, що наближаються до 10^9 частинок на грам ґрунту (Williamson et al., 2003).

Вивчення еволюції фагів дає унікальне розуміння генетичної різноманітності, механізмів адаптації та коєволюції вірусів і бактерій, що є ключовим для розуміння біологічних процесів в цілому.

Бактеріофаги відіграють ключову роль в еволюції мікроорганізмів (Canchaya et al., 2004; Bondy-Denon et al., 2007), кругообігу морських поживних речовин (Rodriguez-Brito et al., 2010) і захворюваннях людини (Łusiak-Szelachowska et al., 2020). Крім того, як вже зазначалося вище, фаги генетично різноманітні, а їх геномній архітектурі притаманна мозаїчність, що обумовлюється горизонтальним переносом генів з іншими фагами та геномами хазяїна (Pedulla et al., 2003).

Генетична різноманітність бактеріофагів є вражаючою. Фаги мають мозаїчні геноми, що складаються з різних генетичних модулів (Hatfull, 2020). Ці модулі можуть обмінюватися між собою шляхом рекомбінації, що дозволяє фагам швидко набувати нових функцій і адаптуватися до різних бактеріальних хазяїв. Така мозаїчна структура геномів є основою для еволюційної гнучкості фагів, забезпечуючи їхню здатність до швидкої адаптації. Особливістю та характерною рисою еволюції фагів є висока частота рекомбінаційних подій (Hendrix 2019).

Як зазначено вище, одним із основних механізмів, які використовують фаги для адаптації до своїх хазяїв, є *рекомбінація*. Це дозволяє їм швидко змінювати свої геноми та утворювати нові варіанти. Інший важливий механізм — *горизонтальне перенесення генів*, що дозволяє фагам інтегрувати гени з інших фагів або навіть бактеріальних хазяїв. Це сприяє високій генетичній різноманітності та здатності до швидкої адаптації в умовах змін (Comeau & Moreau, 2022).

Коеволюція бактеріофагів і їхніх бактеріальних хазяїв є динамічним і складним процесом, що часто описується як «гонка озброєнь». Для захисту від фагів бактерії розвивають різноманітні захисні механізми, такі як системи CRISPR-Cas. У відповідь фаги розвивають механізми для подолання такого захисту. Це призводить до постійної еволюційної динаміки, яка сприяє високій різноманітності та адаптивності обох сторін (Hendrix, 2019).

Важливо зазначити, що бактеріофаги не лише впливають на своїх бактеріальних хазяїв, але й відіграють значну роль у регулюванні популяцій бактерій, переносячи генетичну інформацію між бактеріями. Це має значні наслідки для екології та еволюції мікробіоти. Наприклад, фаги можуть сприяти горизонтальному перенесенню генів, що дозволяє бактеріям швидко набувати нових властивостей, таких як резистентність до антибіотиків або здатність до метаболізму нових субстратів (Hatfull & Pore, 2020).

Отже, вивчення еволюції бактеріофагів надає унікальні можливості для розуміння генетичної різноманітності, механізмів адаптації та коеволюції вірусів

і бактерій. Це, своєю чергою, сприяє нашому загальному розумінню еволюційних процесів, які впливають на всі форми життя.

Двома ключовими підходами до вивчення вірусного різноманіття та еволюції є метагеноміка загальних концентрованих зразків фагів, відібраних із навколишнього середовища, і аналіз геномів виділених та культивованих фагів. Ці два підходи сумісні, але мають різні результати. Метагеноміка генерує велику кількість даних послідовностей і забезпечує хороші показники різноманітності. Аналіз геномів окремих виділених фагів генерує менші набори даних, але вони цілісні і структуровані, та мають повну біологічну відповідність в контексті як вірусу, так і його потенційного хазяя (-їв). Оскільки геноми фагів є архітектурно мозаїчними, наявність повних геномів контекстуалізує складність відносин між фагами. Метагеномні підходи зазвичай не забезпечують очевидного зв'язку між вірусними послідовностями та потенційними бактеріями-хазяями, хоча й описані окремі методи збагачення. Для окремих виділених фагів коло хазяїв іноді можна визначити емпірично.

Еволюція бактеріофагів залежить від декількох факторів. В першу чергу, це тип хазяїна, а також життєвий цикл (літичний, лізогенний) і тип геному (ДНК чи РНК). Сьогодні, завдяки розквіту технологій швидкого та масштабного секвенування, біоінформатичних методів та ін., розроблено декілька еволюційних гіпотез для бактеріофагів. Ці гіпотези намагаються пояснити механізми, завдяки яким бактеріофаги змогли досягти такого високого рівня генетичної різноманітності та адаптивності. Основні гіпотези еволюції бактеріофагів включають **модульну гіпотезу, гіпотезу горизонтального перенесення генів та гіпотезу «гонки озброєнь».**

1.3.1. Модульна гіпотеза

Концепція модульної еволюції бактеріофагів була вперше представлена Фредеріком Дж. Сенгером та його колегами в їхній знаковій публікації (Sanger et al., 1977). Ідея полягала в тому, що бактеріофаги еволюціонують шляхом набуття

та обміну модульними генетичними елементами, що призводить до значного генетичного різноманіття та швидкої адаптації. Команда Сенгера першою повністю секвенувала геном фага фХ174, і їхні висновки щодо нього дали вирішальне розуміння модульної природи геномів фагів. Ця публікація заклала основу для розуміння того, як бактеріофаги можуть швидко еволюціонувати завдяки набуттю генетичних модулів, готуючи основу для подальших досліджень еволюції фагів і генетичного різноманіття.

Модульна гіпотеза передбачає, що геноми бактеріофагів складаються з незалежних генетичних модулів, які можуть обмінюватися між собою шляхом рекомбінації. Це дозволяє фагам швидко набувати нових функцій та адаптуватися до змін у середовищі. Ця гіпотеза має низку експериментальних підтверджень. Зокрема, було продемонстровано, що фаг Т4 зазнає частих рекомбінаційних подій, що призводить до утворення нових генетичних варіантів. Дослідження показують, що обмін генетичними модулями дозволяє фагам швидко адаптуватися до нових умов і бактеріальних захисних механізмів. Також, експерименти з лізогенними фагами показали, що інтегруючи свій геном у геном хазяїна, вони можуть обмінюватися генетичними модулями з геномами інших фагів, що підтримує ідею модульної еволюції.

1.3.2. Гіпотеза горизонтального перенесення генів, або мозаїчна гіпотеза

Окрім модульної гіпотези, іншою важливою концепцією еволюції бактеріофагів є ідея «мозаїчної еволюції». Мозаїчна еволюція описує, як геноми бактеріофагів збираються з різноманітного пулу генетичних елементів шляхом горизонтального перенесення генів, що призводить до появи геномів, які є складаються з «клаптиків» (мозаїки) генів, отриманих із різних джерел. Цей процес сприяє генетичному різноманіттю та адаптивності бактеріофагів.

Девід Ботштейн, автор цієї гіпотези, припустив, що геноми бактеріофагів еволюціонують шляхом отримання генів з різних джерел, створюючи мозаїку генетичної інформації. Цей механізм дозволяє фагам швидко адаптуватися до

нових середовищ і господарів шляхом включення корисних генів інших фагів і бактерій (Botstein, 1980).

Робота Ботштейна базується на розумінні важливості горизонтального переносу генів і рекомбінації у фагів, підкреслюючи важливість генетичного обміну в еволюційному процесі цих вірусів. З того часу мозаїчна еволюція стала фундаментальною концепцією у вивченні генетики та еволюції бактеріофагів.

Згідно гіпотези горизонтального перенесення генів, бактеріофаги можуть включати до свого геному гени інших фагів або навіть бактеріальних хазяїв, що забезпечує високу генетичну різноманітність та здатність до швидкої адаптації. Бактеріофаги є важливими учасниками процесів перенесення інших генетичних елементів, таких як плазміди, транспозони та інші мобільні генетичні елементи.

1.3.3. Гіпотеза «гонки озброєнь», або коеволюційна гіпотеза

Гіпотеза коеволюції, зокрема в контексті бактеріофагів та їх бактеріальних хазяїв, досліджує взаємний еволюційний вплив між цими двома суб'єктами. Цей процес підкреслює, як зміни в одному організмі спричиняють еволюційні реакції в іншому, що призводить до динамічної взаємодії, яка формує їхні генетичні та фенотипові характеристики.

Однією з піонерських робіт, яка прямо обговорює коеволюцію бактеріофагів і бактерій, є публікація Брюса Р. Левіна і Річарда Е. Ленскі (Levin, Lenski 1983) де автори надають вичерпний огляд коеволюційної динаміки між бактеріями та їхніми вірусами (бактеріофагами). Вони описують, як бактеріальні механізми захисту від фагів, такі як системи рестрикції-модифікації та системи CRISPR-Cas, розвиваються у відповідь на тиск, що спричинюється фаговою інфекцією. І навпаки, фаги розвивають механізми для подолання цих бактеріальних захисних механізмів, такі як білки, спрямовані на протидію системам рестрикції чи CRISPR.

Виділяють наступні ключові моменти, на яких базується дана гіпотеза: 1) бактерії та фаги постійно адаптуються до еволюційних змін один одного, що

призводить до гонки озброєнь, де кожна сторона розробляє нові стратегії, щоб випередити іншу; 2) коеволуція сприяє генетичному різноманіттю як бактерій, так і фагів. Бактеріальні популяції виявляють низку захисних механізмів, тоді як популяції фагів демонструють різноманітні протизахисні механізми. Також, взаємодія між бактеріями та фагами впливає на їхні еволюційні траєкторії та, зокрема, на такі аспекти, як частота мутацій, потік генів і динаміка популяції.

Коеволуція має значні екологічні та еволюційні наслідки, впливаючи на структури мікробних спільнот, вірулентність патогенів та еволюцію механізмів резистентності бактерій.

Показано, що при кокультивуванні *E.coli* та літичного бактеріофага T7 можна спостерігати складну просторово-часову динаміку з кількома генетично диверсифікованими адаптивними циклами. Системне вивчення понад 10000 фенотипів резистентності до інфекційності між бактеріями та ізолятами фагів показало диверсифікацію в кілька співіснуючих екотипів, демонструючи складну мережу взаємодій. Секвенування повного генома таких фагів і бактерій виявило багатий набір адаптивних мутацій у багатьох генетичних локусах, у тому числі в генах, раніше не пов'язаних із взаємодією фагів і бактерій. Синтетично реконструюючи такі нові мутації, були описані загальні фагові та фагоспецифічні фенотипи стійкості, а також відмічена суттєва синергія з класичними мутаціями стійкості до фагів (Shaer Tamar, 2022).

Отож, концепція коеволуції є центральною для розуміння еволюційної динаміки між бактеріофагами та їх бактеріями-хазяями. Гіпотеза «гонки озброєнь» описує коеволуційний процес між бактеріофагами та їхніми бактеріальними хазяями, який призводить до постійної еволюційної динаміки. Бактерії розвивають захисні механізми, такі як системи CRISPR-Cas, щоб захиститися від фагів, а фаги, у свою чергу, розвивають механізми для подолання цих захистів.

Існують також ще декілька гіпотез еволюції бактеріофагів, таких як **гіпотеза гіперрекомбінації** та **гіпотеза гіпермобільних елементів**. Ці гіпотези підкреслюють, що бактеріофаги демонструють надзвичайно високі рівні

рекомбінації, що сприяє утворенню нових вірусних ізолятів, а також те, що бактеріофаги можуть виступати як носії гіпермобільних генетичних елементів, що сприяє поширенню генетичної інформації в бактеріальних популяціях (поширення плазмід та інших мобільних елементів за посередництва фагів).

Окремо, можна описати **гіпотезу ендосимбіозу**. Ендосимбіотична гіпотеза еволюції, в першу чергу, стосується походження еукаріотичних клітин. Існує теорія про те, що мітохондрії та хлоропласти походять від вільноживучих бактерій, які вступили в симбіотичні відносини з клітиною-хазяїном. Однак термін «ендосимбіотичний» зазвичай не асоціюється безпосередньо з бактеріофагами. Натомість, бактеріофаги зазвичай розглядаються в контексті їх взаємодії з бактеріями-хазяями через такі процеси, як лізогенія та трансдукція (Weinbauer, 2004). При лізогенії бактеріофаг інтегрує свою ДНК до геному бактерії-хазяя, стаючи профагом. Як було описано у розділах вище, такий зв'язок може бути стабільним протягом тривалого періоду часу, коли профаг пасивно реплікується разом із геномом господаря. За певних умов профаг може вийти з лізогенного циклу і перейти до літичного циклу з утворенням нових вірусних частинок. Деякі фаги можуть інтегрувати в геном хазяїна як «ендосимбіонти», що сприяє довготривалим симбіотичним відносинам. Вона можлива тільки у помірних бактеріофагів, які мають лізогенний цикл розвитку, коли наявність фагових генів у складі генома бактеріального хазяя може бути корисним для останнього (наприклад, захищаючи його від інфікування іншими фагами або надаючи нові метаболічні шляхи). Експерименти з бактеріями та їхніми фагами показали, що такі симбіотичні відносини можуть бути стабільними та вигідними для обох сторін, що підтверджує гіпотезу ендосимбіозу.

Описані вище гіпотези разом формують комплексне розуміння еволюції бактеріофагів, показуючи, як генетична рекомбінація, горизонтальне перенесення генів та коеволюція з бактеріями сприяють їхній адаптивності та різноманітності. Ці процеси є критично важливими для регулювання бактеріальних популяцій та екологічної динаміки мікробних спільнот.

Таким чином, можна зробити декілька важливих узагальнень щодо еволюції бактеріофагів:

- Геноми бактеріофагів надзвичайно різноманітні та містять численні мобільні генетичні елементи, що сприяє їх швидкій еволюції;
- Завдяки високим рівням рекомбінації та горизонтального перенесення генів, фаги можуть швидко адаптуватися до змін у середовищі та нових захисних механізмів бактерій;
- Фаги відіграють ключову роль у регулюванні популяцій бактерій та перенесенні генетичної інформації між бактеріями, що має значні наслідки для екології та еволюції мікробіоти;
- Наше розуміння фагового генетичного різноманіття залишається недостатнім, і потрібні інтенсивні зусилля для широкого картування вірусних геномів;
- Визначення функцій генів, кодованих фагами, є критично важливим, але вимагає нових стратегій і підходів.

Використані джерела:

1. Agnello, E., Rajak, J., Liu, X., & Kelch, B. A. (2022). Structure and assembly of an extremely long bacteriophage tail tube. *bioRxiv*, 2022-10. doi: <https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510161>
2. Ahlgren, N. A., Fuchsman, C. A., Rocap, G., & Fuhrman, J. A. (2019). Discovery of several novel, widespread, and ecologically distinct marine Thaumarchaeota viruses that encode amoC nitrification genes. *The ISME journal*, 13(3), 618-631. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0289-4>
3. Ankrah, N. Y. D., May, A. L., Middleton, J. L., Jones, D. R., Hadden, M. K., Gooding, J. R., ... & Buchan, A. (2014). Phage infection of an environmentally relevant marine bacterium alters host metabolism and lysate composition. *The ISME Journal*, 8(5), 1089-1100. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.216>

4. Athukoralage, J. S., McMahon, S. A., Zhang, C., Grüşchow, S., Graham, S., Krupovic, M., White, M. F. (2020). An anti-CRISPR viral ring nuclease subverts type III CRISPR immunity. *Nature*, 577(7791), 572-575. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1909-5>
5. Baquero, D. P., Gazi, A. D., Sachse, M., Liu, J., Schmitt, C., Moya-Nilges, M., Krupovic, M. (2021). A filamentous archaeal virus is enveloped inside the cell and released through pyramidal portals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(32), e2105540118.. PMID: 34341107; PMCID: PMC8364153. <https://doi.org/10.1073/pnas.2105540118>.
6. Bergh, Ø., Børsheim, K. Y., Bratbak, G., & Heldal, M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340(6233), 467-468. PMID: 2755508. <https://doi.org/10.1038/340467a0>
7. Bertozzi Silva, J., Storms, Z., & Sauvageau, D. (2016). Host receptors for bacteriophage adsorption. *FEMS microbiology letters*, 363(4), fnw002., <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw002>
8. Bolduc, B., Shaughnessy, D. P., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., Roberto, F.F., Young, M. (2012). Identification of novel positive-strand RNA viruses by metagenomic analysis of archaea-dominated Yellowstone hot springs. *Journal of virology*, 86(10), 5562-5573. <https://doi.org/10.1128/JVI.07196-11>
9. Bondy-Denomy, J., Qian, J., Westra, E.R., Buckling, A., Guttman, D.S., Davidson, A.R., Maxwell, K.L. (2016). Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *The ISME journal*, 10(12), 2854-2866. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.79>
10. Botstein, D. (1980). A theory of modular evolution for bacteriophages. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 354, 484-490. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb27987.x>
11. Canchaya, C., Fournous, G., & Brüssow, H. (2004). The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Molecular microbiology*, 53(1), 9-18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04113.x>

12. Comeau, A.M., Hatfull, G.F., Krisch, H.M., Lindell, D., Mann, N.H., Prangishvili, D. (2008). Exploring the prokaryotic virosphere. *Research in microbiology*, 159(5), 306-313. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.05.001>
13. Danovaro, R., Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Rastelli, E., Cavicchioli, R., Krupovic, M., Prangishvili, D. (2016). Virus-mediated archaeal hecatomb in the deep seafloor. *Science Advances*, 2(10), e1600492. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600492>
14. Daum, B., Quax, T. E., Sachse, M., Mills, D. J., Reimann, J., Yildiz, Ö., ... & Prangishvili, D. (2014). Self-assembly of the general membrane-remodeling protein PVAP into sevenfold virus-associated pyramids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(10), 3829-3834. <https://doi.org/10.1073/pnas.131924511>
15. Dedeo, C.L., Cingolani, G., Teschke, C.M. (2019). Portal protein: the orchestrator of capsid assembly for the dsDNA tailed bacteriophages and herpesviruses. *Annual review of virology*, 6(1), 141-160. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015819>.
16. Dennehy, J.J., Abedon, S.T. (2021). Bacteriophage Ecology. In: Harper, D.R., Abedon, S.T., Burrowes, B.H., McConville, M.L. (eds) *Bacteriophages: biology, technology, therapy*, 253-294.. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41986-2_8
17. Dion, M.B., Oechslin, F., Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 125-138. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0311-5>
18. Dowah, A.S., Clokie, M.R. (2018). Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria. *Biophysical reviews*, 10, 535-542. <https://doi.org/10.1007/s12551-017-0382-3>
19. Du, K., Yang, F., Zhang, J. T., Yu, R. C., Deng, Z., Li, W. F., ... & Zhou, C. Z. (2022). Comparative genomic analysis of five freshwater cyanophages and reference-guided metagenomic data mining. *Microbiome*, 10(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01324-w>.

20. Fierer, N., & Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(3), 626-631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507535103>
21. Gogokhia, L., Buhrke, K., Bell, R., Hoffman, B., Brown, D. G., Hanke-Gogokhia, C., ... & Round, J. L. (2019). Expansion of bacteriophages is linked to aggravated intestinal inflammation and colitis. *Cell host & microbe*, *25*(2), 285-299. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.008>
22. Gons, H. J., Ebert, J., Hoogveld, H. L., van den Hove, L., Pel, R., Takkenberg, W., & Woldringh, C. J. (2002). Observations on cyanobacterial population collapse in eutrophic lake water. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *81*, 319-326. <https://doi.org/10.1023/A:1020595408169>
23. Grasso, C.R., Pokrzywinski, K.L., Waechter, C., Rycroft, T., Zhang, Y., Aligata, A., ... & Lamsal, A. (2022). A review of cyanophage–host relationships: Highlighting cyanophages as a potential cyanobacteria control strategy. *Toxins*, *14*(6), 385. <https://doi.org/10.3390/toxins14060385>
24. Hatfull, G.F. (2020). Actinobacteriophages: genomics, dynamics, and applications. *Annual review of virology*, *7*(1), 37-61. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-122019-070009>
25. Hatfull, G. F., & Hendrix, R.W. (2011). Bacteriophages and their genomes. *Current opinion in virology*, *1*(4), 298-303. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.06.009>
26. Hendrix H, Staes I, Aertsen A, Wagemans J. Screening for Growth-Inhibitory ORFans in Pseudomonas aeruginosa-Infecting Bacteriophages. *Methods Mol Biol*. 2019;1898:147-162. PMID:30570730. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8940-9_12
27. Hendrix, R. W. (2002). Bacteriophages: evolution of the majority. *Theoretical population biology*, *61*(4), 471-480. <https://doi.org/10.1006/tpbi.2002.1590>
28. Hohmann-Marriott, M. F., & Blankenship, R. E. (2011). Evolution of photosynthesis. *Annual review of plant biology*, *62*(1), 515-548. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103811>

29. Keen, E.C. (2015). A century of phage research: bacteriophages and the shaping of modern biology. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 37(1), 6. PMID: 25521633; PMCID: PMC4418462. <https://doi.org/10.1002/bies.201400152>
30. Klumpp, J., Dunne, M., Loessner, M. J. (2023). A perfect fit: Bacteriophage receptor-binding proteins for diagnostic and therapeutic applications. *Current opinion in microbiology*, 71, 102240., ISSN 1369-5274, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102240>.
31. Krupovic, M., Kuhn, J. H., Wang, F., Baquero, D. P., Dolja, V. V., Egelman, E. H., ... & Koonin, E. V. (2021). Adnaviria: a new realm for archaeal filamentous viruses with linear A-form double-stranded DNA genomes. *Journal of Virology*, 95(15), 10-1128.. <https://doi.org/10.1128/jvi.00673-21>
32. Kuznecova, J., Šulčius, S., Vogts, A., Voss, M., Jürgens, K., & Šimoliūnas, E. (2020). Nitrogen flow in diazotrophic cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae* is altered by cyanophage infection. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2010. PMID: 32973727; PMCID: PMC7466765. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02010>
33. Levin, B. R., & Lenski, R. E. (1983). Coevolution in Bacteria and Their Viruses and Plasmids. *Annual Review of Microbiology*, 37(1), 491-514.
34. Łusiak-Szelachowska, M., Weber-Dąbrowska, B., Żaczek, M., Borysowski, J., & Górski, A. (2020). The presence of bacteriophages in the human body: good, bad or neutral?. *Microorganisms*, 8(12), 2012. PMID: 33339331; PMCID: PMC7767151. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122012>
35. Mahony, J., Bottacini, F., van Sinderen, D., & Fitzgerald, G. F. (2014). Progress in lactic acid bacterial phage research. *Microbial Cell Factories*, 13, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S1>
36. Maidanik, I., Kirzner, S., Pekarski, I., Arsenieff, L., Tahan, R., Carlson, M. C., ... & Lindell, D. (2022). Cyanophages from a less virulent clade dominate over their sister clade in global oceans. *The ISME journal*, 16(9), 2169-2180. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01259-y>

37. Mäntynen, S., Laanto, E., Oksanen, H. M., Poranen, M. M., & Díaz-Muñoz, S. L. (2021). Black box of phage–bacterium interactions: Exploring alternative phage infection strategies. *Open biology*, *11*(9), 210188. PMID: 34520699; PMCID: PMC8440029. <https://doi.org/10.1098/rsob.210188>
38. Monier, A., Chambouvet, A., Milner, D. S., Attah, V., Terrado, R., Lovejoy, C., et al., (2017). Host-derived viral transporter protein for nitrogen uptake in infected marine phytoplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, E7489–E7498. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.1708097114>
39. Munson-McGee, J.H., Peng, S., Dewerff, S., Stepanauskas, R., Whitaker, R.J., Weitz, J. S., & Young, M. J. (2018). A virus or more in (nearly) every cell: ubiquitous networks of virus–host interactions in extreme environments. *The ISME journal*, *12*(7), 1706-1714. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0071-7>
40. Naureen, Z., Dautaj, A., Anpilogov, K., Camilleri, G., Dhuli, K., Tanzi, B., ... & Bertelli, M. (2020). Bacteriophages presence in nature and their role in the natural selection of bacterial populations. *Acta Bio-medica: Atenei Parmensis*, *91*(13-S), e2020024-e2020024. PMID: 33170167; PMCID: PMC8023132. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i13-s.10819>
41. Pedulla, M. L., Ford, M. E., Houtz, J. M., Karthikeyan, T., Wadsworth, C., Lewis, J. A., ... & Hatfull, G. F. (2003). Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell*, *113*(2), 171-182. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00233-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00233-2)
42. Pope, WH, Butela, KA, Garlena, RA, Jacobs-Sera, D, Russell, DA, Warner, MH; University of Pittsburgh SEA-PHAGES; Hatfull GF. Genome Sequences of 20 Bacteriophages Isolated on *Gordonia terrae*. *Microbiol Resour Announc.* 2020 Jan 16;9(3):e01489-19. doi: 10.1128/MRA.01489-19. PMID: 31948974; PMCID: PMC6965592.
43. Rakhuba, D.V., Kolomiets, E.I., Dey, E. S., & Novik, G. I. (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish journal of microbiology*, *59*(3), 145. <https://lup.lub.lu.se/record/1752346>

44. Rodriguez-Brito, B., Li, L., Wegley, L., Furlan, M., Angly, F., Breitbart, M., ... & Rohwer, F. (2010). Viral and microbial community dynamics in four aquatic environments. *The ISME journal*, 4(6), 739-751. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.1>
45. Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, J.C., ... & Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *nature*, 265(5596), 687-695. <https://doi.org/10.1038/265687a0>
46. Shaer Tamar, E., Kishony, R. (2022). Multistep diversification in spatiotemporal bacterial-phage coevolution. *Nature Communications*, 13(1), 7971. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35351-w>
47. Shen, Y., Loessner, M.J. (2021). Beyond antibacterials—exploring bacteriophages as antivirulence agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.11.004>.
48. Ślesak, I., Ślesak, H. (2022). Cyanophages as an important factor in the early evolution of oxygenic photosynthesis. *Scientific Reports*, 12(1), 20581. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24795-1>
49. Sørensen, A.N., Woudstra, C., Sørensen, M.C.H., Brøndsted, L. (2021). Subtypes of tail spike proteins predicts the host range of Ackermannviridae phages. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 4854-4867. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.030>.
50. Suhanovsky, M.M., Teschke, C.M. (2015). Nature' s favorite building block: Deciphering folding and capsid assembly of proteins with the HK97-fold. *Virology*, 479, 487-497. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.055>. PMID: 25864106; PMCID: PMC4424165.
51. Suttle, C.A. (2007). Marine viruses—major players in the global ecosystem. *Nature reviews microbiology*, 5(10), 801-812. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1750>
52. Sutton, T. D., Hill, C. (2019). Gut bacteriophage: current understanding and challenges. *Frontiers in endocrinology*, 10, 784. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00784>

53. Tetz, G.V., Ruggles, K.V., Zhou, H., Heguy, A., Tsirigos, A., Tetz, V. (2017). Bacteriophages as potential new mammalian pathogens. *Scientific reports*, 7(1), 7043. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07278-6>.
54. Turner, D., Kropinski, A. M., & Adriaenssens, E. M. (2021). A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses*, 13(3), 506.; <https://doi.org/10.3390/v13030506>
55. Turner, D., Shkoporov, A. N., Lood, C., Millard, A. D., Dutilh, B. E., Alfenas-Zerbini, P., ... & Adriaenssens, E. M. (2023). Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee. *Archives of Virology*, 168(2), 74. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05694-2>
56. Voigt, E., Rall, B. C., Chatzinotas, A., Brose, U., & Rosenbaum, B. (2021). Phage strategies facilitate bacterial coexistence under environmental variability. *PeerJ*, 9, e12194. <https://doi.org/10.7717/peerj.12194>. PMID: 34760346; PMCID: PMC8572521
57. Waldbauer, J.R., Coleman, M.L., Rizzo, A.I., Campbell, K.L., Lotus, J., Zhang, L. (2019). Nitrogen sourcing during viral infection of marine cyanobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(31), 15590-15595. <https://doi.org/10.1073/pnas.1901856116>
58. Wang, Y., Fan, H., Tong, Y. (2023). Unveil the secret of the bacteria and phage arms race. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4363. <https://doi.org/10.3390/ijms24054363>
59. Weinbauer, M.G. (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS microbiology reviews*, 28(2), 127-181. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.08.001>
60. Weitz, J.S., Li, G., Gulbudak, H., Cortez, M.H., Whitaker, R.J. (2019). Viral invasion fitness across a continuum from lysis to latency. *Virus evolution*, 5(1), vez006. <https://doi.org/10.1093/ve/vez006>
61. Williamson, K.E., Wommack, K.E., Radosevich, M. (2003). Sampling natural viral communities from soil for culture-independent analyses. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 69(11), 6628-6633.
<https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6628-6633.2003>
62. Wirth, J., Young, M. (2020). The intriguing world of archaeal viruses. *PLoS pathogens*, 16(8), e1008574. PMID: 32790746; PMCID: PMC7425843.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008574>
63. Yoshida, M., Yoshida, T., Kashima, A., Takashima, Y., Hosoda, N., Nagasaki, K., Hiroishi, S. (2008). Ecological dynamics of the toxic bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and its cyanophages in freshwater. *Applied and environmental microbiology*, 74(10), 3269-3273.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02240-07>
64. Zhang, D., He, Y., & Gin, K.Y.H. (2021). Novel freshwater cyanophages provide new insights into evolutionary relationships between freshwater and marine cyanophages. *Microbiology Spectrum*, 9(2), e00593-21.
65. Zhang, D., Te, S. H., He, Y., & Gin, K. Y. H. (2022). Cyanophage dynamics in a tropical urban freshwater lake. *Ecological Indicators*, 142, 109257. ISSN 1470-160X, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109257>.
66. Zimmerman, A.E., Howard-Varona, C., Needham, D.M., John, S.G., Worden, A. Z., Sullivan, M. B., ... & Coleman, M. L. (2020). Metabolic and biogeochemical consequences of viral infection in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 18(1), 21-34. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0270-x>

РОЗДІЛ 2. ЗАСТОСУВАННЯ ФАГІВ У МЕДИЦИНІ

2.1. Взаємодія бактеріофагів з макроорганізмом. Бактеріофаги як частина мікробіому людини

Віруси здатні інфікувати представників усіх доменів життя і, таким чином, вони присутні в усіх середовищах, де виявляється життя. Це панування в екологічних нішах поширюється й на організм людини, але значення різноманітних вірусів у складі людських мікробіоценозів на сьогоднішній день лише починає ставати зрозумілим.

Нещодавні експериментальні дослідження показують, що бактеріофаги, поряд із представниками бактеріального світу, заселяють усі біотопи людського організму. Було окремо введено поняття **віром** – вірусний компонент мікробіому, який являє собою сукупність усіх вірусів, що знаходяться в організмі людини.

Незважаючи на фундаментальні дослідження, людський віром залишається менш вивченим порівняно з тими представниками мікробіоценозів людського організму, які мають бактеріальну чи грибку природу. Дослідження вірому найчастіше проводять шляхом метагеномного аналізу ДНК/РНК з певного біотопу.

На сьогоднішній день найбільш дослідженим біотопом людського організму є кишечник. Мікробіом кишечника — це багаточисленний та метаболічно активний консорціум мікроорганізмів і вірусів, що знаходяться у нижніх відділах шлунково-кишкового тракту людського тіла. Бактерії та їхні віруси (бактеріофаги) є найпоширенішими членами цього біотопу людського організму. Вірусний компонент кишечника включає як еукаріотичні віруси, так і бактеріофаги, причому останні є найпоширенішими членами саме вірому кишечника. В останні роки вірусна метагеноміка зробила революцію в дослідженнях складних вірусних спільнот і дозволила нам каталогізувати сотні тисяч раніше невідомих фагів кишечника. Було показано, що щільність фагів зростає вздовж шлунково-кишкового тракту і досягає максимуму в 10^8 – 10^{10} віронів фагів на 1 грам екскрементів у товстому кишечнику. Вважається, що їх

співвідношення з бактеріальними господарями становить від 0,1:1 до 1:1. Таким чином, вони можуть потенційно чинити значний вплив на бактерії через різні механізми, такі як лізис, лізогенна конверсія, хронічна інфекція та фагова трансдукція. Це може призводити як до прямих, так і до непрямих впливів на людський організм. Вважається, що фаги відіграють ключову роль у формуванні складу та функції кишкового мікробіому людини як у здоровому стані, так і при захворюваннях. Було відзначено, що складна спільнота кишкових фагів, яка називається **фагомом** кишечника, є дуже варіабельною між індивідами (склад змінюється залежно від віку, споживання їжі, імунологічного статусу господаря, прийому ліків і факторів навколишнього середовища), водночас залишаючись стабільною у часі в межах однієї людини. Але, незважаючи на чисельність фагів і потенційну роль у формуванні складу та функцій мікробіому кишечника, фаги залишаються маловивченими — до 90% усіх вірусних послідовностей у базах даних залишаються невідомими (Tobin et al., 2023; Sutton, Hillet 2019; Kirk et al., 2019).

В рамках реалізації проекту по створенню спеціалізованої бази даних, яка містить інформацію про віруси, що присутні в людському кишечнику (Gut Virome Database – GVD), було показано, що таксономічно 97,7% вірусних популяцій кишечника складають бактеріальні віруси (бактеріофаги), 2,1% — еукаріотичні віруси, а 0,1% — віруси архей. Серед фагів 88% не мали класифікації Міжнародного комітету з таксономії вірусів (ICTV), а решта фракції складалася з родин «хвостатих» фагів з дволанцюговою геномною ДНК (представники колишніх родин *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, а також родини *Ackermannviridae*), та фаги родин *Microviridae* та *Inoviridae* (Gregory et al., 2020).

Окрім кишкового просвіту та екскрементів, велика кількість бактеріофагів присутня в/на слизовій оболонці шлунково-кишкового тракту, де вони регулюють як вроджений, так і адаптивний імунітет хазяїна. Дослідження показали, що деякі фаги, які мають варіабельні Ig-подібні домени на вірусних капсидах, зв'язуються з муциновими глікопротеїнами на слизовому шарі кишківника через взаємодію між Ig-подібними білками та глікозильованими залишками муцину. Ці численні

«адгезивні» фаги на поверхні слизової оболонки можуть сприяти формуванню вродженого імунного бар'єру, забезпечуючи первинний антимікробний захист від бактеріальних патогенів у просвіті кишківника. Метагеномний аналіз підтвердив наявність таких Ig-подібних білків у фагів, які були виділені з різних середовищ, особливо з сайтів, прилеглих до слизових поверхонь (Cao et al., 2022; Barr et al., 2013).

Barr та ін. запропонували модель адгезії бактеріофагів до слизу, яка забезпечує універсальний, але незалежний від хазяя імунітет, застосовний до слизових поверхонь, що отримав назву «фаговий імунітет». Модель передбачає, що слизові поверхні метазоїв і фаги спільно коеволюціонують для підтримки адгезії фагів. Це корисно як для метазоїв (оскільки обмежується кількість бактерій на слизових оболонках), так і для фагів (оскільки збільшується частота їхньої взаємодії з бактеріальними хазяями). Такі взаємини вказують на симбіотичний зв'язок між фагами та метазоїчними хазяями, який забезпечує раніше невизнаний антимікробний захист, що забезпечує активну охорону слизових оболонок (Barr et al., 2013).

На сьогоднішній день більшість експериментальних зусиль спрямована на характеристику вірому та фагому кишечника, як найбагатшій екологічній ніші людського тіла. Інші вірусні спільноти в різних біотопах людського тіла лише починають досліджуватися. Нещодавно було показано, що віром шкіри є високоспецифічним для кожної ділянки, та регулюється факторами оклюзії, себумом і вологістю. Основу шкірного вірому складають фаги з двохланцюговою ДНК (головним чином, представники колишнього порядку *Caudovirales*), які є специфічними до найпоширеніших бактерій шкіри, таких як *Propionibacterium* spp., *Streptococcus* spp. і *Staphylococcus* spp. Також, додатково було визначено представників міо- та сифовірусів (Chan et al., 2016).

Подібні висновки, що пов'язані з кишковим фагомом, відображені в вірусних метагеномних дослідженнях слини, зубного нальоту та мазків із порожнини рота як здорових людей, так і пацієнтів із пародонтитом. Приблизна кількість бактеріофагів у зразках слини складає 10^8 вірусоподібних частинок на

1 мл рідини, а в зубних відкладеннях - до 10^{10} на 1 мг нальоту. Незважаючи на велику кількість ідентифікованих бактеріофагів у ротовій порожнині, вірусні контиги зі зразків слини та зубного нальоту здорових людей показують, що лише невеликий відсоток цих бактеріофагів є характерним для великої кількості людей (Martínez et al., 2021).

У різних дослідженнях задокументовано високу кількість оральних бактеріофагів, що належать до колишнього порядку *Caudovirales*, а також зміну складу добре відомих колишніх родин *Siphoviridae*, *Myoviridae* та *Podoviridae* при пародонтальних захворюваннях (Martínez et al., 2021; Ly et al., 2014; Pérez-Brocal, Moya, 2018).

Бактеріофаги регулюють мікробіом шляхом перенесення генів, вбиваючи конкуруючі бактерії, щоб дозволити колонізацію біотопу бактеріям, що містять профаг, і таким чином заповнити частково «спорожнілу» нішу, або кодуючи токсини, які змінюють кишечник господаря, щоб стимулювати бактеріальний патогенез. Враховуючи важливість бактеріального мікробіому для нашої фізіології, ці ефекти бактеріального вірому можуть мати глибокий вплив на здоров'я та захворювання у людини.

2.2. Історія застосування бактеріофагів в медицині

Терапевтичний потенціал бактеріофагів вперше був показаний британським натуралістом та бактеріологом Ернестом Хенкіним при дослідженні антибактеріального ефекту води з річок Ямуна і Ганг в Індії. Населення Індії твердо вірить, що, приймаючи ванну в священних річках Ганг і Ямуна, можна вилікувати хвороби шкіри. Свої спостереження Хенків опублікував в журналі *Annales de l'Institut Pasteur* під назвою “L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange, sur le microbe du choléra”, де він заявив, що вода річок Ганг і Ямуна містить деякі біологічні агенти, які можуть знищувати збудників холери. Ним також було показано, що цей біологічний агент може проходити через

фільтруючу мембрану (Sagar et al., 2019; Hankin, 1896; Abedon et al., 2011).

У 1915 р. відомий британський журнал *The Lancet* опублікував статтю професора лондонського університету і британського бактеріолога Ф. Творта. Автор безпосередньо показав, що існує фільтруючий агент, який пов'язаний з ізолятами стафілококів та може перетравлювати колонію бактерій – феномен «з'їдених країв колоній стафілокока». Однак, Ф. Творт не зміг пояснити спостережувану подію і надав лише її опис (Twort, 1915; Chanishvili, 2012).

Через 2 роки Фелікс д'Ерелль також описав подібну знахідку під час власного дослідження бактеріальної дизентерії. Він виділив фаги зі зразка калу хворих на шигельоз, та називав їх «агентами проти Шига». Фелікс д'Ерелль провів ґрунтовні дослідження біології бактеріофагів. Результати були ним викладені у монографії «*The Bacteriophage: Its Role in Immunity*» (1922) (Herelle, Smith 1922). Фелікс д'Ерелль ретельно описав такі фундаментальні поняття бактеріофагії, як специфічність адсорбції і розмноження фагів; процес утворення і склад бляшок на газонах чутливих бактерій; процес лізису, за допомогою якого фагове потомства вивільняються з клітин господаря; залежність продукції фагів від стану бактеріальної клітини; виділення фагів з різних джерел; і фактори, що контролюють стабільність вільного фага (Kutter et al., 2013). Після кількох експериментальних процедур Фелікс д'Ерелль ввів бактеріофаги у клінічну медицину. На той час дизентерія була серйозною проблемою в Парижі, і він прийняв прохання лікувати хвору на дизентерію дитину в паризькій лікарні *Enfants-Malades*. Лікування цієї першої дитини було повністю успішним, і вінвилікував ще кілька дітей, але потім повернувся до інтенсивного вивчення фагів, перш ніж опублікувати результати або провести подальші терапевтичні застосування. У 20-30-х роках минулого століття Фелікс д'Ерелль також створив перші комерційні препарати у вигляді фагових коктейлів. На той час паризька комерційна лабораторія d'Herelle виготовляла щонайменше п'ять фагових засобів проти різних бактеріальних інфекцій. Препарати називалися *Vacté-coli-phage*, *Vacté-rhino-phage*, *Vacté-intesti-phage*, *Vacté-pyo-phage* та *Vacté-staphy-phage*. Їх реалізацією займалося підприємство, яке пізніше стало великою

французькою компанією L'Oréal (Chanishvili, 2012; Sulakvelidze et al., 2001; Sagar et al., 2019). У тих же 1920-х роках Георгій Еліава разом з Феліксом д'Ерелль створили Інститут бактеріології (наразі George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology), який займався виготовленням комерційних фагових препаратів, і робить це по сьогоднішній день (<https://eliava-institute.org/>).

У 1920-1930-х роках бактеріофаги вже використовували в усьому світі для лікування окремих інфекцій. Комерційні фагові препарати в той час виробляли також кілька великих фармацевтичних компаній: Eli Lilly (Індіанаполіс, Індіанаполіс, США) на початку 1930-х років, Abbott Labs (Чикаго, Іллінойс, США) на початку 1930-х років, і Bristol-Myers Squibb (Нью-Йорк, Нью-Йорк, США) з початку 1930-х до 1940-х років (Diallo, Dublanche 2023).

Ситуація щодо подальшого розвитку фаготерапії кардинально змінилася після відкриття і запровадження в практику перших антибіотиків. Інтерес щодо використання фагів у медицині швидко згасав на фоні масового виробництва нових хіміотерапевтичних препаратів та антибіотиків, які на той час були високоефективними, не обмежувалися явищами резистентності, були простішими у виробництві, зберіганні та використанні. Впровадження антибіотиків підвищило виживаність людей і швидко стало першим вибором для клініцистів.

Натомість, у Східній Європі та, зокрема, в колишньому Радянському Союзі, дослідження з фагової терапії продовжувалися. Виготовлення і поставка фагових препаратів для медицини здійснювалася протягом усього 20-го століття. Велика кількість фагів в медичній практиці використовувалася під час Другої світової війни. В Центрі фагової терапії «Еліава» була створена велика бібліотека фагів. Інститут отримував штами патогенних бактерій з усього Радянського Союзу. Були виділені, протестовані та адаптовані сотні бактеріофагів. Тестування включало перевірку вірулентності проти цільових бактерій, а також визначення спектра хазяїв із використанням відповідних панелей найпроблемніших на той момент штамів бактерій. У результаті було створене масштабне підприємство, в якому працювало 1200 осіб, більшість з яких займалися виробництвом фагів.

Виробничі потужності сягали приблизно 2 тонн фагових препаратів на тиждень. Основна частина продукції поставлялася в радянську армію (переважно для лікування діареї та ран), тоді як решта була доступна в різних формах для широкого загалу. Після розпаду колишнього Радянського Союзу цей виробничий підрозділ був приватизований, хоча він зберіг виробництво та свою репутацію на міжнародному рівні й по сьогоднішній день (Abedon et al., 2023).

Криза антибіотикорезистентності викликала ренесанс фагової терапії на Заході, де багато пацієнтів, клінічні потреби яких не могли бути задоволені антибіотиками, успішно лікувалися за допомогою фагової терапії (Abedon et al., 2021).

У 2005 р. було створено відділення фагової терапії в Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy у Вроцлаві, Польща (Ośrodek terapii fagowej). Зараз цей підрозділ є другим за величиною центром дослідження фагів у Європі після George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology.

З середини 2000-х років інститути та фармацевтичні лабораторії по всьому світу почали створювати власні банки фагів за зразком George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology. До них належать: Банк бактеріофагів Кореї (The Bacteriophage Bank of Korea), Ізраїльський фаговий банк при Єврейському університеті в Єрусалимі в Ізраїлі (Yerushalmy et al., 2020), Національна колекція типових культур, Колекція бактеріофагів у Великій Британії (NCTC bacteriophage collection and repository), Фагенбанк у Нідерландах (TU Delft Phage library), колекція DMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) у Німеччині (Leibniz Institute DSMZ), Військовий госпіталь королеви Астрід у Бельгії та Pherecydes Pharma у Франції, та ін. (Diallo, Dublanchet 2023).

Оскільки кількість доступних фагів дуже велика, а географічний розподіл фагів відповідає розподілу їх цільових бактерій (через коєволюцію вірусів та хазяїв), то, ймовірно, буде необхідно створювати та підтримувати бібліотеки фагів на місцевому рівні.

2.3. Законодавче регулювання фаготерапії

Фаготерапія із початку свого заснування відразу стала спірним способом лікування бактеріальних інфекцій. Основними дискусійними питаннями навколо цієї біологічної терапії, які частково залишаються актуальними і по сьогоднішній день, полягали в невеликій кількості інформації щодо біологічних властивостей фагів, особливостей їх взаємодії з бактеріальною клітиною та макроорганізмом, не до кінця з'ясованою фармакокінетикою та фармакодинамікою. Окрім того, окремі компанії, які займалися виробництвом комерційних фагових препаратів у ХХ столітті, прагнучи підвищити власний прибуток, робили перебільшені заяви щодо ефективності своїх продуктів. Це, в свою чергу, вплинуло на розвиток фаготерапії в цілому.

На сьогоднішній день в США та на території Європейського союзу фаги класифікуються як лікарські засоби. Як і інші лікарські препарати, вони підлягають дозволу на маркетинг і виробництво від Управління з продовольства і медикаментів у США (FDA – U.S. Food and Drug Administration) та Європейського агентства з лікарських засобів (EMA – European Medicines Agency) у ЄС.

Останні повідомлення демонструють значний прогрес у регулюванні питання фаготерапії в європейських країнах. Так, безпосередньо ЕМА пропонує створити наукові рекомендації для фармацевтичної розробки та виробництва лікарських засобів із бактеріофагів, що призначені для лікування або профілактики однієї чи кількох специфічних бактеріальних інфекцій у людей. Наразі такі рекомендації ЕМА розроблені для ветеринарних лікарських засобів.

Для отримання дозволу на маркетинг фагова терапія спочатку повинна бути добре вивчена в доклінічних дослідженнях, як в умовах *in vitro*, так і *in vivo*. Після їх завершення необхідно провести клінічні випробування I-IV фази, щоб підтвердити безпеку та ефективність фагових продуктів на людях. На сьогоднішній день жоден препарат для фагової терапії не досяг IV фази клінічних випробувань (Diallo, Dublanchet 2023; Fauconnier, 2017). Для отримання дозволу

на виробництво фагові продукти повинні відповідати стандартам належної виробничої практики (GMP – Good Manufacturing Practice), які передбачають високі вимоги щодо управління якістю при розробці, виробництві та контролі лікарських засобів. Однак, враховуючи відсутність відповідності цим стандартам, вірусну природу фагів та важкість стандартизації кожної партії готового фагового препарату, жоден бактеріофаговий продукт досі не був схвалений EMA або FDA для використання в медицині. Вищезазначені маркетингові регламенти та стандарти GMP також є додатковими бар'єрами, що обмежують фармацевтичні інвестиції у фагову терапію.

Згідно українського фармацевтичного законодавства, препарати на основі бактеріофагів відносяться до медичних імунобіологічних препаратів, а тому також підлягають державній реєстрації, як і лікарські засоби.

Все більше успішних випадків фагової терапії публікуються в науковій літературі, що чинить додатковий тиск на клініцистів, щоб вони зверталися до фагової терапії, як до альтернативи або доповнення до стандартної антибіотикотерапії при лікуванні інфекцій, що спричинені антибіотикорезистентними формами бактерій, або ж інфекцій, що важко піддаються лікуванню. Тому в деяких країнах західного світу виробництво фагів дозволено лише для використання зі співчуття відповідно до статті 37 Гельсінської декларації. Так, наприклад, фаготерапія у Бельгії з 2008 р. використовується згідно вищезазначеної статті як додатковий інструмент у боротьбі з антимікробною резистентністю бактерій. Починаючи з 2018 р. впроваджено концепцію, яка зосереджена на магістральному приготуванні фагів – це лікарський засіб, що виготовлений в аптеці згідно з медичним рецептом для окремого пацієнта (Pirna et al., 2018). У Великобританії фаги можуть використовуватися за певних обставин як неліцензований або «спеціальний» лікарський засіб. Такі препарати можуть використовуватися відповідно до вказівок MHRA (Medicine and Healthcare products Regulatory Agency) на неліцензійній основі, коли клініцист визначає, що ліцензовані альтернативи (наприклад, антибіотики) не відповідають клінічним потребам пацієнта (Jones et

al., 2023).

Процес схвалення фагових продуктів для лікування хронічної або небезпечної для життя бактеріальної інфекції в США вимагає подання заявки на одноразові досліджувані нові препарати (IND) для використання фагів з терапевтичною метою. У Центрі інноваційного застосування та терапії фагами (Center for Innovative Phage Applications and Therapeutics – IPATH) при UCSD (University of California San Diego) для проведення лікування фагами з моменту запиту в середньому потрібен 171 день (Aslam et al., 2020).

2.4. Використання фагів в різних галузях медицини

У 2022 р. вперше було надано комплексну оцінку глобального впливу резистентності мікроорганізмів до протимікробних препаратів (AMR) на здоров'я людини. Аналіз включав 23 патогени та 88 комбінацій патоген-протимікробний препарат, інформацію отримано з 204 країн і територій. Було підраховано, що у 2019 р. 4,95 мільйона смертей в усьому світі були пов'язані саме з AMR, причому 1,27 мільйона смертей були безпосередньо спричинені мікроорганізмами з антимікробною резистентністю. Більшість цих смертей сталася в країнах з низьким і середнім рівнем доходу, а три чверті були спричинені шістьма видами бактерій, які раніше були визначені Всесвітньою організацією охорони здоров'я (ВООЗ) як пріоритетні патогени (World Health Organization 2017; World Health Organization 2024; Murray et al., 2022).

Причинами зростання AMR є неправильне та надмірне використання антибіотиків у харчовій промисловості, тваринництві та медицині, а також скорочення спектру антибіотиків, оскільки фармацевтичні компанії все частіше відмовляються від розробки та впровадження в практику нових хіміотерапевтичних препаратів.

Зростаюча криза резистентності мікроорганізмів до протимікробних препаратів поживила дослідження різних альтернатив, і одним з найбільш перспективних напрямків є терапія з використанням бактеріофагів.

Фаготерапія є оригінальною та інноваційною стратегією лікування інфекцій, що спричинені мікроорганізмами із множинною лікарською стійкістю. Минуло вже понад 100 років з тих пір, як бактеріофаги стали використовуватися в якості лікувального засобу для людини. З того часу виробництво бактеріофагових препаратів різко еволюціонувало. Сучасні фагові засоби є більш ефективними та мають менше побічних ефектів завдяки низькому вмісту бактеріального ендотоксину. В результаті терапевтичні фаги стали переважаючим класом нових нетрадиційних протимікробних препаратів, і широко використовуються для лікування мультирезистентних інфекцій. Поточна комерціалізація фагової терапії повинна використовувати досягнення молекулярної біології (наприклад, синтетичної біології), біотехнології та сучасних біомедичних наук, а також специфічні знання про біологію фагів та її коеволюційні аспекти, щоб уникнути невдач минулого. Для використання фагів в терапевтичних цілях вони повинні переважно бути літичними, ефективно вбивати бактерію-хазяїна та бути повністю охарактеризованими, щоб виключити побічні ефекти. Розробка терапевтичних фагів вимагає скоординованих зусиль багатьох зацікавлених сторін.

Фаги були ідентифіковані та протестовані як препарати проти всіх бактерій з критичного списку Всесвітньої організації охорони здоров'я, включаючи стійкі до карбапенему *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* та представників родини *Enterobacteriaceae*, а також проти бактерій високого пріоритету, включаючи *Enterococcus faecalis*, *S. aureus* та *Salmonella* spp., які викликають важкі інфекції та виявляють високу стійкість до фторхінолонових антибіотиків (Chhibber et al., 2013).

Фагові препарати можуть складатися лише з одного типу фагів (монофаги) або кількох фагів різних типів (мультифаги), останні також відомі як «фагові коктейлі». Фагові коктейлі поєднують фаги з чіткими і часто

взаємодоповнюючими ознаками, наприклад, діапазоном хазяїна, для підвищення ефективності фагової терапії і зменшення появи фагорезистентних варіантів.

На сьогоднішній день існує декілька підходів щодо можливого застосування фагів з метою лікування бактеріальних інфекцій – традиційне використання комерційних фагових коктейлів на основі «природних бактеріофагів», генно-інженерне конструювання літичних фагів з широким спектром дії, та персоналізований підбір як природних так і генно-інженерних фагів під конкретного пацієнта і виготовлення на їх основі лікувальних засобів.

У підході «готовий до використання» збираються зразки з навколишнього середовища, зазвичай з таких джерел, як ставки або очисні споруди. Фаги очищують від супутніх мікроорганізмів, що містяться в зразках, і зберігають у біобанках. В подальшому декілька фагових ізолятів змішуються для отримання коктейлю, який можна вводити пацієнтам, сподіваючись, що принаймні один з ізолятів матиме виражену літичну активність у відношенні до цільового мікроорганізму.

У підході «на замовлення» вихідним матеріалом є клінічний зразок, який аналізується з метою виділення та ідентифікації патогенних бактерій, які є етіологічним чинником того чи іншого інфекційного захворювання/ускладнення. Фаги проти цієї бактерії відбирають або з нових зразків з навколишнього середовища, або з ізолятів, що зберігаються в банку. Підготовлені фаги у певній концентрації вводиться пацієнту, знаючи, що фаги розпізнають патогенну бактерію. Цей цілеспрямований метод має недолік: він вимагає багато часу, що робить його непридатним для невідкладної медичної допомоги.

Фагові коктейлі можуть бути розроблені та введені з використанням будь-якої з двох абсолютно різних стратегій дозування: активної, що залежить від унікальної здатності фага розмножуватися там, де це необхідно, і пасивної стратегії, при якій використовують набагато більшу кількість фагу таким чином, що його можна порівняти зі стандартними фармацевтичними препаратами, при цьому покладаючись на той факт, що фаги набагато рідше мають побічні ефекти при більш високих дозах, ніж більшість антибіотиків або інших поширених

препаратів. Активна стратегія дозування є основним підходом, який в даний час використовується в Грузії, Росії та Польщі. Він менше залежить від точного дозування препарату, що вводиться. При цій стратегії використовуються відносно низькі концентрації фага (до 10^5 БУО/мл препарату), і його ефективність залежить від самовідтворюваної природи фага в присутності відповідних бактерій-хазяїв для досягнення терапевтично значущих концентрацій фагів саме в тих місцях, де вони потрібні. Препарати для реалізації такої стратегії зазвичай поставляються у вигляді стерильних фільтрованих лізатів, що готові до використання (Kutter et al., 2013).

Хоча фаготерапія все ще обмежена невеликою кількістю доступних клінічних досліджень, останні результати свідчать про те, що вона може являти собою альтернативу або радше доповнення до використання антибіотиків при інфекціях, що важко піддаються лікуванню (кістково-суглобові інфекції, хронічні інфекції, опіки, протезні інфекції, та/або інфекції, що спричиненні мікроорганізмами з множинною лікарською стійкістю), при рецидивуючих інфекціях, муковісцидозі або хронічному захворюванні легень та/або у разі непереносимості звичайних антибактеріальних засобів.

В останнє десятиліття в клінічній, прикладній та фундаментальній науковій мікробіологічній літературі регулярно з'являється багато публікацій про бактеріофаги та їх можливе застосування. Кількість публікацій про фаготерапію експоненціально зростає починаючи з 2000-х років.

Однією з головних проблем фаготерапії з самого початку був вибір відповідних цільових захворювань. У перших дослідженнях, коли природа бактеріофагів була невідомою, часто обирали невідповідні мішені, деякі з яких, як тепер стало відомо, взагалі не мали бактеріального походження. Нещодавно, завдяки значно глибшому розумінню високої специфічності бактеріофагів і їхніх механізмів дії, стало можливим обирати показання, які мають вищі шанси на успішний терапевтичний результат.

Існує багато доказів того, що фаги ефективні при лікуванні рано-асоційованих інфекцій, і фагову терапію в цілому слід вважати високоефективною при відповідному призначенні пацієнтам.

Ефективність фаготерапії при рановому процесі була продемонстрована як на лабораторних тваринах, так і для лікування важких бактеріальних інфекцій у людини. На моделі пацюків було показано, що фаги у відношенні *P. aeruginosa* є ефективним способом лікування ранового процесу. Оброблені фагами модельні ділянки шкіри продемонстрували 100% закриття ран при високій якості регенерованої шкіри порівняно з нелікованими групами та групами, які отримували гентаміцин, завдяки повній елімінації бактеріальної інфекції. На 17-у добу в обох дослідних групах пацюків, які отримували фаги, спостерігалася швидка епітелізація ділянки рани, про що свідчив вищий відсоток закриття рани (99,84% та 99,93%) у групах, у яких фаг застосовували в одно- та багаторазових дозах відповідно. З іншого боку, негативна контрольна група, яка застосовувала стерильну марлю, показала нижчий відсоток закриття рани (69,66%). Крім того, у групі, яка отримувала гентаміцин, спостерігалася розширення та збільшення ділянки рани, що призводило до незагойних ран з гноєм та неприємним запахом (Högberg et al., 2006).

Схожі результати були продемонстровані при моделюванні діабетичної стопи на мишах. Діабетичні виразки є важким ускладненням діабету за рахунок розвитку нейропатії та ангіопатії. Здатність таких ран до загоєння різко знижується. Можуть розвиватися хронічні інфекції, які, в свою чергу, призводять до ампутації нижніх кінцівок. Було оцінено вплив місцевого застосування бактеріофагів у порівнянні з пероральним введенням амоксициліну-клавуланової кислоти на мишачій моделі ранової інфекції, що спричинена *S. aureus*. Дослідники встановили, що лікування із застосуванням бактеріофагів призводить до покращення клінічного загоєння та зменшення локального бактеріального навантаження через 7 і 14 днів після інфікування. На відміну від антибіотиків, фаготерапія не виснажувала кишкову мікробіоту модельних тварин. Амоксицилін призводив до зменшення альфа- та бета-різноманітності мишачої

мікробіоти та порушував склад нормофлори навіть через 7 днів після завершення лікування, тоді як фаготерапія не впливала на нормальну мікробіоту (Huon et al., 2020).

Ешкеназі та ін. використовували попередньо адаптований фаг для лікування 30-річного пацієнта з вибуховою травмою, який страждав на інфекцію, що була пов'язана з переломом і спричинена панрезистентною *Klebsiella pneumoniae* після тривалої (>700 днів) антибіотикотерапії. Додатково було використано меропенем і колістин, а згодом — цефтазидим/авібактам. Комбіноване лікування призвело до об'єктивного клінічного, мікробіологічного та радіологічного поліпшення стану ран і загального стану пацієнта. Комбінація бактеріофага та антибіотиків виявилася високоефективною проти штаму *K. pneumoniae* пацієнта в лабораторних умовах, як у 7-денних зрілих біоплівках, так і в суспензіях (Eskenazi et al., 2022).

Фіш та ін. проводили лікування серії випадків (6 пацієнтів) діабетичних виразок на пальцях ніг. В усіх пацієнтів спостерігалася стафілококова інфекція діабетичних виразок. Бактеріофаг, що використовувався в дослідженнях, був комерційним препаратом стафілококового бактеріофага Sb-1 виробництва Eliava BioPreparations. Препарат бактеріофага закапували в ранову порожнину, яку потім заповнювали марлевою пов'язкою, просоченою препаратом бактеріофага (0,1-0,5 мл), після чого покривали марлею, щоб запобігти витіканню розчину бактеріофага з пов'язки, і зверху накривали сухою марлею. Місцеве застосування одного бактеріофага, спрямованого на стафілокок, виявилось ефективним при важких виразках пальців ніг, що містять контаміновану /інфіковану кістку. У всіх випадках, коли пацієнти мали остеомиєліт або оголену та контаміновану кістку, прогресування до закриття було повним і набагато швидшим, ніж очікувалося, і жоден з них не прогресував до серйозної інфекції, що вимагала б ампутації. Жодних побічних ефектів, руйнування тканин або рецидиву інфекції не спостерігалось, а прогресування до закриття було плавним і безперервним після початку терапії бактеріофагами (Fish et al., 2017).

Гупта та ін. досліджували ефект терапії бактеріофагами при хронічній незагойній рані, що була інфікована *E. coli*, *S. aureus* і *P. aeruginosa*. У дослідження були включені пацієнти з хронічною незагойною раною, яка не реагувала на звичайну місцеву обробку рани та антибіотикотерапію. Дослідниками показано, що після 3-5 доз місцевої терапії бактеріофагами спостерігалось значне поліпшення загоєння ран, клінічних і мікробіологічних ознак інфекції не було. Сім з двадцяти пацієнтів досягли повного загоєння на 21-й день під час спостереження, а в інших спостерігалися здорові краї та здорова грануляційна тканина (Gupta et al., 2019). Це лише деякі з багатьох досліджень, що демонструють ефективність фагів у лікуванні інфікованих ран.

Незважаючи на чіткі підтвердження можливої ефективності фагової терапії при лікуванні інфікованих ран, в літературі існують суперечливі дані щодо ідеальної дози фагів, яку слід вводити для отримання найкращого терапевтичного ефекту (Beschastnov et al., 2021).

В даний час вивчають різні способи локального введення фагів в інфіковані рани. Є кілька варіантів для місцевого їх застосування, включаючи гелі, креми та мазі, пов'язки та гідрогелі. Пов'язки на рани є корисним варіантом місцевого лікування ран, оскільки вони підтримують адекватну концентрацію лікування в місці інфекції, запобігаючи його вимиванню рановим ексудатом (Beschastnov et al., 2021).

З'являється все більше доказів доклінічних досліджень (*in vitro* та *in vivo*) на користь того, що гідрогелі є ефективним способом доставки фагових препаратів при терапії пацієнтів (Meireles Gouvêa Boggione et al., 2021; Ferry et al., 2020; Kim et al., 2021). Гідрогелі — це зшиті мережі гідрофільних полімерних ланцюгів з тривимірною структурою. Завдяки їхнім унікальним властивостям, застосування гідрогелів для бактеріальних/антибактеріальних досліджень і лікування бактеріальних інфекцій набуває все більшого значення в останні роки (Dsouza et al., 2022). Одним із завдань при лікуванні ранової інфекції є створення та підтримка достатньої концентрації бактеріофагів у вогнищі запалення. Саме на це й спрямована дія гідрогелів – створення «депо» бактеріофагів. Для

забезпечення оптимального загоєння ран, перев'язувальний матеріал має бути біосумісним, біологічно розкладаним і пористим, щоб нагадувати структуру нормальної шкіри. Гідрогелі можуть імітувати природні живі тканини ефективніше, ніж інші синтетичні біоматеріали. Унікальні фізичні властивості гідрогелів дозволяють раціонально використовувати їх для іммобілізації та подальшого поступового вивільнення лікарських речовин (в тому числі, фагів) у ділянці місцевого застосування (Beschastnov et al., 2021).

Дані, отримані в результаті експериментів на тваринах, а також клінічних досліджень, вказують на те, що фагова терапія ранових інфекцій може запропонувати перспективне рішення в той час, коли стійкість до протимікробних препаратів все більше загрожує глобальному здоров'ю. Хронічні виразки та діабетичні ранові інфекції здаються найскладнішими дилемами терапії, і тому є найбільш очевидною мішенню для досліджень фаготерапії, спрямованих на підтвердження її цінності.

Використання бактеріофагів також позитивно себе зарекомендувало при лікуванні інфекцій уrogenітального тракту. Леткевич та ін. проводили дослідження щодо можливості використання фаготерапії при хронічних сечостатевих інфекціях, що спричинені мультирезистентними бактеріями. Препарати бактеріофагів вводилися внутрішньоміхурово, або внутрішньоміхурово та внутрішньопіхвово. При другому варіанті введення бактеріофагів призвело до значного підвищення рівня антифагових антитіл, хоча ці рівні залишалися досить низькими. Ці дані, у поєднанні з хорошими терапевтичними результатами, які були досягнуті у деяких пацієнтів, свідчать про те, що такий спосіб фаготерапії може бути ефективним засобом лікування уrogenітальних інфекцій і надійною моделлю для клінічних випробувань фаготерапії (Letkiewicz et al., 2021).

Тервіллігер та ін. проводили лікування 56-річного пацієнта після трансплантації печінки зі складними, рецидивуючими інфекціями передміхурової залози та сечовивідних шляхів, що були спричинені *E. coli*, які продукували бета-лактамази розширеного спектру дії (ESBL). Пацієнт переносив

фаготерапію без будь-яких побічних ефектів із зникненням симптомів. Нейтралізація фагової активності відбувалася з сироватками крові, що були відібрані через 1-4 тижні після першого введення фагів. У пацієнта розвинулася безсимптомна рецидивуюча бактеріурія через 6 і 11 тижнів після закінчення фагової терапії — стан, який не потребував лікування антибіотиками (Terwilliger et al., 2021).

Окремі публікації присвячені лікуванню важких інфекцій серцево-судинної системи та дихальної системи. Так, Рубальські та ін. досліджували можливість використання бактеріофагів в критичних випадках бактеріальної інфекції, що була пов'язана з кардіоторакальною хірургією. До експериментального дослідження, відповідно із статтею 37 Гельсінської декларації, було залучено вісім пацієнтів із множинною лікарською стійкістю або особливо стійкою інфекцією, що спричинялася *S. aureus*, *E. faecium*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* та *E. coli*. Пацієнти мали інфекції, пов'язані з імуносупресією після трансплантації органів, або ж мали інфекції судинних трансплантатів, імплантованих медичних пристроїв і хірургічних ран. Індивідуалізовані фагові препарати вводили місцево, перорально або інгаляційно протягом різної тривалості, залежно від випадку. Усі пацієнти продовжували приймати звичайні антибіотики під час лікування бактеріофагами. Ерадикація цільових бактерій була досягнута у семи з восьми пацієнтів. Серйозних побічних ефектів не спостерігалось (Rubalskii et al., 2020).

Все більшого значення набуває використання фаготерапії у пацієнтів з муковісцидозом. *Муковісцидоз* — це спадкове генетичне захворювання, яке хронічно вражає легені та травну систему дітей і дорослих у всьому світі. Легені пацієнтів з муковісцидозом часто колонізуються бактеріями *P. aeruginosa* ще в ранньому дитинстві, що може пошкодити епітеліальну поверхню, призводячи до змін у фізіології дихальних шляхів і порушення мукоциліарного кліренсу. Ця хронічна інфекція є однією з головних причин зниження функції легень та смертності у пацієнтів з муковісцидозом (до 80-95%). *P. aeruginosa* є особливо стійкою в легенях через свою аеробну природу і здатність утворювати біоплівки в легенях пацієнтів з муковісцидозом (Alemayehu et al., 2012).

Показано, що бактеріофаги є ефективними при лікуванні інфекцій дихальних шляхів, спричинених стійкими до антибіотиків бактеріями, включаючи муковісцидоз. В умовах *in vitro* було встановлено, що додавання коктейлю із 10 фагів, що активні проти *P. aeruginosa*, до 48 зразків мокротиння пацієнтів із муковісцидозом, які містили цільовий збудник, призводило до значного зниження концентрації мікробних клітин *P. aeruginosa* у порівнянні із контролем. У 45,8% цих зразків таке зменшення супроводжувалося збільшенням кількості бактеріофагів (тобто, їх ефективною реплікацією в чутливих бактеріальних клітинах) (Saussereau et al., 2014). Ці ж результати підтверджуються при використанні фаготерапії для лікування супутньої інфекції при муковісцидозі. Лоу та ін. повідомляли про успішне використання фаготерапії для лікування мультирезистентної пневмонії, спричиненої синьогнійною паличкою у пацієнта із муковісцидозом, стійкою дихальною недостатністю та нирковою недостатністю, яка була спричинена вживанням колістину. При внутрішньовенному введенні бактеріофагів разом із системними антибіотиками у цього пацієнта спостерігалось клінічний кліренс інфекції без розвитку побічних ефектів. Протягом 100 днів після закінчення фаготерапії у пацієнта не було рецидиву пневмонії, що була б спричинена *P. aeruginosa*, та загострення муковісцидозу, а через 9 місяців була проведена успішна двостороння трансплантація легенів (Law et al., 2019). Схожі результати були отримані при лікуванні хронічної інфекції у пацієнтів з муковісцидозом, що спричинялися *Achromobacter xylosoxidans* (Lebeaux et al., 2021).

2.5. Клінічні дослідження з фаготерапії

Подальший розвиток фагової терапії вимагає інвестицій у ретельні клінічні випробування такого ж дизайну та обсягу, як і ті, які були б застосовані для розробки низькомолекулярних антибіотиків. Ці дослідження повинні ґрунтуватися на доказових доклінічних дослідженнях і проводитися

впорядковано в фазах, аналогічних антимікробним дослідженням для демонстрації безпеки та ефективності фаготерапії. Нездатність повною мірою зрозуміти ключові доклінічні та фармакологічні принципи призвела до низки гучних невдач у ранніх клінічних випробуваннях терапії фагових препаратів.

Більшість досліджень щодо ефективності і безпечності фаготерапії проводилися на тваринах і не відповідали протоколам США та Європейського союзу. Незважаючи на великі досягнення фагової терапії в країнах Східної Європи, її основним недоліком вважають невідповідність західним стандартам. Жодне подвійне сліпе рандомізоване клінічне дослідження досі не дало даних, що підтверджують багатообіцяючі спостереження, отримані в результаті експериментальної терапії на тваринах і людях.

Примітно, що, незважаючи на більш ніж 100-річний клінічний досвід використання бактеріофагів, є лише невелика кількість клінічних досліджень або досліджень безпеки при фаготерапії. Тим не менш, за останні роки кількість таких клінічних досліджень починає збільшуватися. Наразі в системі <https://clinicaltrials.gov/> зазначено 41 клінічне дослідження з різними статусами, що направлені на дослідження безпеки, переносимості та ефективності бактеріофагів при різних захворюваннях – ранових інфекціях при опіках; інфекціях протезних суглобів; некістозному фіброзі; бронхоектазах; діабетичній стопі; інфекціях сечовидільних шляхів; супутніх бактеріальних інфекціях при COVID-19; бактеріальних інфекціях, що спричинені мікроорганізмами з множиною лікарською стійкістю; діареї; хронічних легеневих інфекціях; мікобактеріозах; бактеріємії (<https://clinicaltrials.gov/>).

Клінічні дослідження, що були спрямовані на вивчення безпеки фаготерапії, підтверджують, що використання природних фагів для терапії різними шляхами введення є безпечним. Так, Февре та ін. досліджували вплив коктейлю бактеріофагів, що активні проти *E. coli*, на кишкову мікробіоту та маркери кишкового та системного запалення у здорових людей. До подвійного сліпого плацебо-контрольованого перехресного дослідження були залучені дорослі люди з нормальною та надмірною вагою, що вживали бактеріофаги протягом 28 днів.

Результати клінічних досліджень засвідчили, що при вживанні бактеріофагів зменшувалося фекальне навантаження *E. coli*. При цьому не спостерігалось значних змін у параметрах альфа- та бета-різноманіття мікрофлори кишечника, що свідчить про те, що спожиті фаги загалом не впливали на мікробіом людини. Виробництво коротколанцюгових жирних кислот, маркери запалення та метаболізм ліпідів в основному не змінювалися, але спостерігалось зниження циркулюючого інтерлейкіну-4 (ІІ-4) (Febvre et al., 2019).

При вживанні суміші із 4 бактеріофагів здоровими дорослими із легким та помірним шлунково-кишковим дистресом було показано, що рівні аспартатамінотрансферази значно знижувалися, коли учасники отримували лікування, але не плацебо; однак усі середні значення залишалися в межах клінічно прийнятних діапазонів. Учасники клінічного дослідження також повідомляли про значне покращення кількох симптомів шлунково-кишкового дистресу під час отримання як лікування, так і плацебо (Gindin et al., 2018).

Побічних ефектів фаготерапії також не було виявлено під час проведення І фази клінічних досліджень із залученням 39 пацієнтів із хронічними венозними виразками ніг. Виразки лікували протягом 12 тижнів або контрольним фізіологічним розчином, або бактеріофагами проти *P. aeruginosa*, *S. aureus* і *E. coli*. Спостереження тривало до 24 тижня. Жодних побічних ефектів не було пов'язано з досліджуваним продуктом. Не було визначено суттєвої різниці ($p > 0,05$) між тестовою та контрольною групами щодо частоти побічних ефектів, швидкості загоєння або частоти загоєння (Rhoads et al., 2009). У таблиці 2.1 нижче узагальнені результати клінічних досліджень ефективності фаготерапії.

Таблиця 2.1 – Деякі результати клінічних досліджень ефективності фаготерапії

Рік	Дизайн дослідження	Кількість пацієнтів, що залучені до дослідження	Клінічна спрямованість	Мікроорганізми	Основні результати	Посилання
2009 - 2011	Рандомізовані подвійні сліпі плацебо-контрольовані дослідження	120 пацієнтів з бактеріальною діареєю	Гостра бактеріальна діарея	ETEC (Enterotoxigenic <i>E. coli</i>) та EPEC (Enteropathogenic <i>E. coli</i>)	Оральні коліфаги продемонстрували безпечний кишковий транзит у дітей, але не змогли досягти та покращити результати діареї, можливо, через недостатнє охоплення фагами та занадто низькі титри пагогенів <i>E. coli</i> , що потребує вищих пероральних доз фагів	Sarker et al., 2016
2009	Рандомізоване, подвійне сліпе, плацебо-контрольоване клінічне випробування фази I/II	24 пацієнта з хронічним отитом, що тривав кілька років. Учасники були рандомізовані у дві групи по 12 осіб, які отримували одноразову дозу Viophage-PA або плацебо з подальшим спостереженням через 7, 21 і 42 днів	Хронічний отит	Антибіотикорезистентні штами <i>R. aeruginosa</i>	Порівняно з днем 0, зведені клінічні показники, що повідомлені пацієнтами та лікарями, були кращими для групи, яка отримувала фаг, порівняно з групою плацебо. Відхилення від початкових рівнів було статистично значущим для об'єднаних даних за всі дні спостереження лише для групи, яка отримувала фаги. Бактеріальне навантаження <i>R. aeruginosa</i> було значно нижчою лише в групі, яка отримувала фаг. Повідомлень про побічні ефекти, що пов'язані з лікуванням, не фіксувалися.	Wright et al., 2009

<p>2017 - 2018</p>	<p>Рандомізоване плацебо-контрольоване подвійне сліпе дослідження</p>	<p>113 пацієнтів було випадковим чином розподілено на три групи (37 — на піофаг, 38 — на плацебо та 38 — на лікування антибіотиками)</p>	<p>Інфекції сечовивідних шляхів у пацієнтів, які перенесли трансуретральну резекцію простати</p>	<p><i>Enterococcus</i> spp., <i>E. coli</i>, <i>P. mirabilis</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.</p>	<p>Рівень успішності лікування не відрізнявся між групами. Нормалізація посіву сечі була досягнута у п'яти (18%) із 28 пацієнтів у групі піофагу порівняно з дев'ятьма (28%) із 32 пацієнтів у групі плацебо і 13 (35%) із 37 пацієнтів у групі антибіотиків. Побічні явища виникли у шести (21%) із 28 пацієнтів у групі піофагу порівняно з 13 (41%) із 32 пацієнтів у групі плацебо та 11 (30%) із 37 пацієнтів у групі антибіотиків</p>	<p>Leitner et al., 2017; eliava-institute.org</p>
<p>2015 - 2017</p>	<p>Рандомізоване, контрольоване, подвійне сліпе дослідження фази 1/2</p>	<p>27 пацієнтів було випадковим чином розподілено для отримання фагової терапії (n=13) або стандартного лікування (n=14)</p>	<p>Опікові рани</p>	<p><i>P. aeruginosa</i></p>	<p>Випробування було зупинено через недостатню ефективність фагу PP1131. У групі PP1131 шість із 12 учасників (50%), які підлягали аналізу, мали максимальне бактеріальне навантаження проти двох із 13 (15%) у групі стандартного лікування</p>	<p>Jault et al., 2019</p>

2019	Клінічне дослідження	20 пацієнтів	Пацієнти з хронічною незагойною раною, які не реагували на традиційну місцеву обробку рани та антибіотикотерапію	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> і <i>P. aeruginosa</i>	Спостерігалось значне поліпшення загоєння ран, клінічних і мікробіологічних ознак інфекції не було після 3-5 доз місцевої терапії бактеріофагами. Сім пацієнтів досягли повного загоєння на 21-й день під час спостереження, а в інших спостерігалися здорові краї та здорова грануляційна тканина.	Gurta et al., 2019
------	----------------------	--------------	--	--	---	--------------------

Незважаючи на велику кількість публікацій щодо поодиноких випадків ефективного використання фаготерапії, значна суспільна упередженість і нестандартизація методів фагової терапії (дозування та тривалість лікування, способи введення, склад препаратів, тощо) не дозволяють зробити однозначного висновку про беззаперечну ефективність фагів в медицині (Diallo, Dublanchet 2023).

Тим не менш, наявні клінічні результати малюють обнадійливу картину щодо безпеки та ефективності фаготерапії, особливо при лікуванні важких інфекцій, що спричинені мікроорганізмами з множиною лікарською стійкістю. Використання бактеріофагів для лікування бактеріальних інфекцій за своєю динамічною та біологічною природою представляє невід'ємні труднощі для моделі сучасних клінічних випробувань, що пов'язано із рядом причин:

- Фагові препарати вимагатимуть постійної корекції та переформулювання складу під час лікування, щоб адаптуватися до мінливих популяцій бактерій та моделей резистентності. Клінічні випробування з використанням одного фага, швидше за все, будуть неінформативними, оскільки, незважаючи на деякі винятки, їх, швидше за все, доведеться використовувати в комбінації з іншими фагами для зменшення ефекту розвитку резистентності у бактерій. Аналогічним чином, коктейль з фагів, що використовується у клінічних випробуваннях, швидше за все, вимагатиме постійного переформулювання шляхом зміни «активних компонентів» бактеріофагових препаратів;
- Клінічна та мікробіологічна ефективність використання фагових препаратів буде залежати від того, чи вдасться доставити потрібну кількість потрібних фагів у потрібне місце для лікування інфекцій, що містять достатню кількість чутливих бактеріальних клітин. Для деяких клінічних показань це буде простіше, ніж для інших, що може вимагати більш індивідуалізованого клінічного підходу;
- Існують значні відмінності між існуючими протоколами лікування. Це відображає як варіації в клінічній фаговій практиці, так і, за деяких

обставин, адаптацію протоколів клінічних фагів до окремих пацієнтів;

- Розвиток надійних і відтворюваних лабораторних методик для прогнозування клінічної активності фагів перебуває ще на початковій стадії і має стати пріоритетом у міру розвитку клінічних досліджень.

Найчастіше для відбору фагів з лікувальною метою використовуються класичні спот-тест на щільному поживному середовищі та визначення специфічної активності у рідкому поживному середовищі в 96-лункових планшетах. Спот-тест є простою методикою, яка не потребує складного лабораторного обладнання і дозволяє оцінювати ефективність утворення бляшок, а також виявляти, виділяти та характеризувати ізоляти вірусів із розширеним спектром хазяїв, що може доповнити терапевтичний репертуар фагів. Однак, він має і недоліки, оскільки вимагає візуальної оцінки кінцевих точок, яка є більш суб'єктивною і менш кількісною порівняно з рідинними тестами в мікропланшетах. Жоден з цих підходів поки що не є стандартизованим, а вибір середовищ, температури культивування та щільності інокуляту може впливати на інтерпретацію їх результатів. Необхідно також розробити суворі, відтворювані лабораторні методики для виявлення синергії або антагонізму між фагами, а також між фагами й антибіотиками. Наразі в Європейському комітеті з тестування чутливості до антимікробних препаратів (EUCAST) створено спеціальний підкомітет, основним завданням якого є розробка рекомендацій з тестування чутливості бактеріальних патогенів до фагів (Kowalska et al., 2020).

2.6. Обмеження та переваги фаготерапії

Фаготерапія має ряд переваг перед антибіотиками. Фаготерапія не обмежена тими ж механізмами резистентності, що і антибіотики. Таким чином, можна використати фаги, що активні проти мультирезистентних бактерій, які мають значний вплив на систему охорони здоров'я, зокрема карбапенем-резистентних *A. baumannii* та *P. aeruginosa*, та карбапенем-резистентних або резистентних до

цефалоспоринів 3-го покоління представників родини *Enterobacteriaceae* (Desgranges et al., 2019).

Фагові рецептори, що забезпечують їх адсорбцію на поверхні бактерій, надають їм дуже високу видову специфічність. Таким чином, фаги можуть бути використані для лізису окремих бактерій, що є етіологічним чинником інфекційного захворювання, зберігаючи при цьому коменсальну флору пацієнта, – на відміну від антибіотиків, дія яких спричиняє порушення у мікробіоценозах, що може супроводжуватися ускладненнями, такими як суперінфекція *Clostridioides difficile*. Ця специфіка має і недолік, оскільки необхідно виділяти мікроорганізми, що є етіологічним чинником, і попередньо перевіряти її чутливість до фагів. Цей тривалий експериментальний процес є обмежуючим фактором, який може поставити під загрозу лікування гострих інфекцій. Також, специфічність фагів є недоліком при лікуванні мікст-інфекцій, оскільки буде спостерігатися пригнічення лише певного мікроорганізму, без впливу на інші.

Бактеріофаги не є патогенними для еукаріотичних клітин. Як тільки відбувається елімінація збудника, фаги перестають розмножуватися і їх концентрація у вогнищі запалення різко зменшується. Однак нещодавні дослідження показують, що бактеріофаги можуть взаємодіяти як з макроорганізмом в цілому, так і з окремими еукаріотичними клітинами. Так, Каур та ін. встановили здатність деяких бактеріофагів вбивати внутрішньоклітинні бактеріальні патогени. Мікроорганізми з внутрішньоклітинним способом паразитизму є більш небезпечними, і їх важче знищити, ніж позаклітинні патогени, оскільки вони можуть уникати дії імунної системи та протимікробних препаратів, ховаючись усередині клітини-хазяїна. Показано, що бактеріофаги можуть лізувати метицилін-резистентні *S. aureus* (MRSA), що були попередньо фагоцитовані макрофагами мишей BALB/c, значно зменшуючи кількість бактерій всередині макрофагів (Kaur et al., 2014). Експериментально також було підтверджено здатність бактеріофагів проникати в еукаріотичні клітини та поширюватися через різні тканини. Окремі дослідження з використанням одношарових епітеліальних клітин кишечника (T84 і CaCo2), легенів (A549),

печінки (Huh7), мозку (hBMec) і нирок (MDCK) продемонстрували, що проникнення бактеріофагів до клітин здійснюється за рахунок трансцитозу із залученням ендомембранних систем еукаріотичних клітин, зокрема апарату Гольджі. Трансцитоз розпочинається, коли фагові частки поглинаються клітинною мембраною і переносяться до цитоплазми всередині невеликого пухирця (ендосоми). В подальшому така везикула проходить через апарат Гольджі, перш ніж вивільнитися на іншу сторону тієї ж клітини. Процес повторюється сусідніми клітинами, тим самим дозволяючи вірусним часткам бактеріофага проникати через структури клітини. Таке явище спостерігалось для кількох бактеріофагів, зокрема, фагів T4, T5, T7, SP01, SPP1 та P22 (Nguyen et al., 2017). Біше та ін. продемонстрували, що тип клітин відіграє важливу роль у процесі захоплення фагів, причому окремі клітини поглинають фаги з різною швидкістю, навіть серед клітин одного типу. Використовуючи візуалізацію клітин в режимі реального часу, автори встановили, що фаги накопичуються всередині клітин, і менші за розміром бактеріофаги поглинаються з вищою швидкістю, аніж більші фаги. Поглинання також залежало і від морфології фагових частинок. Було виявлено, що адгезовані фаги поглинаються шляхом макропіноцитозу протягом наступних 18 годин інкубації, при цьому функціональні фаги накопичуються та стабільно зберігаються в клітинах (Bichet et al., 2021).

На даний момент не виявлено серйозних несприятливих побічних ефектів використання бактеріофагових препаратів у людей, навіть після внутрішньовенних ін'єкцій даних препаратів. Проведений аналіз 10 випадків внутрішньовенного лікування важких бактеріальних інфекцій на базі Центру інноваційних фагових застосувань і терапії (Center for Innovative Phage Applications and Therapeutics – IPATH) показано, що внутрішньовенна фаготерапія була безпечною та мала успішний результат у 7 із 10 випадків інфекційних процесів, що спричинені антибіотикорезистентними мікроорганізмами (Le et al., 2023). Тхілаїшвілі та ін. повідомляли про успішне лікування хронічної рецидивуючої інфекції, що пов'язана з проводом

лівошлуночкового допоміжного пристрою (LVAD driveline), яка була спричинена мультирезистентним штамом *P. aeruginosa*, після місцевого та внутрішньовенного застосування бактеріофагів у поєднанні зі стандартною хірургічною та антимікробною терапією. Комбінована антибіотико-фагова терапія привела до повної ліквідації інфекції. Побічних ефектів не спостерігалось (Tkhilaishvili et al., 2021).

Фаги мають потенціал для перенесення генетичного матеріалу між хазяями за допомогою генералізованої або спеціалізованої трансдукції. Генералізована трансдукція — це процес, за допомогою якого фрагменти бактеріальної ДНК випадковим чином упаковуються в капсид під час літичного циклу фага, тоді як спеціалізована трансдукція обмежується помірними фагами, які інтегрують свої геноми в хромосому хазяїна в певних сайтах, забезпечуючи адаптативні можливості бактеріальної клітини. В окремих дослідженнях було показано високу поширеність гена *blaCTX-M-15*, який кодує резистентність до β -лактамних антибіотиків розширеного спектру дії, яка в тому числі була виявлена у фагів *E. coli* зі зразків стічних вод (Balcázar 2018; Roshini et al., 2017). Відповідно, виникають побоювання щодо можливості передачі генів резистентності під час фаготерапії. Сучасні методи геномного секвенування також дозволяють гарантувати, що бактеріофаги, які використовуються у фаготерапії, не несуть небажаних генів, що кодують стійкість до антибіотиків або токсинів. Також, при формуванні фагових коктейлів рекомендується використовувати тільки літичні фаги.

Наразі відсутні повідомлення про негативний вплив введення фагів на ефективність або безпеку інших препаратів. Систематичних досліджень з цього приводу не проводилося, але фаги настільки специфічні у своїх діях, що важко уявити, яким чином можуть відбуватися такі взаємодії. З іншого боку, окремі хімотерапевтичні протимікробні препарати можуть перешкоджати фаговій репродукції всередині бактеріальної клітини. Це може стати проблемою у тих випадках, коли фаги все ще можуть прикріпитися та проникати до інфікованої клітини, однак не можуть завершити свій цикл репродукції (Kutter et al., 2013).

Однак, існують також і численні обмеження фагової терапії. Тривале використання одного і того ж фагового препарату може призводити до імунної відповіді. Найбільш ймовірний розвиток імунологічної відповіді можливий при внутрішньовенному введенні фага, коли ефективно активуються компоненти вродженої та адаптивної імунної системи. Експериментально було підтверджено, що антифагова активність сироватки крові спостерігається з 15 по 60 добу фаготерапії. Підвищена інактивація фагів сироватками пацієнтів, які напередодні отримували бактеріофаги, зменшувалася після закінчення фаготерапії. Також, було встановлено, що антифагова активність у сироватці пацієнтів залежить від способу введення фага (пероральне, інтравенне, локальне) та його типу (Łusiak-Szelachowska et al., 2014). Ле та ін. було показано, що при внутрішньовенному введенні бактеріофагових препаратів часткова інактивація фагів сироваткою крові пацієнта спостерігається через 1 тиждень після введення фага. Після введення першої дози в сироватці крові пацієнта, зібраній через 15 хв після ін'єкції, були виявлені інфекційні фагові частинки, що свідчить про їх швидкий розподіл у системному кровотоці. Спостерігалось поступове зниження титру фагів при розрахунковому періоді напіврозпаду 0,4 год (Le et al., 2023).

Поява резистентних до фагів бактерій також викликає серйозне занепокоєння у практикуючих лікарів, які впровадили фагову терапію у свою практику. Перші антифагальні системи бактерій, системи рестрикції-модифікації, були відкриті ще в 1950-х роках. Враховуючи величезну різноманітність систем рестрикції-модифікації, а також їх майже повсюдну присутність у бактеріальних геномах (Brüssow, 2019), вважалося, що системи рестрикції-модифікації є єдиним і широко розповсюдженим бактеріальним противірусним захистом (Tesson, Bernheim, 2023). Пізніше був відкритий ще ряд «імунних» систем бактерій, які чинять опір фаговій інфекції – антифагальна система CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat – адаптивна імунна система, яка захищає бактерії від бактеріофага) (Alseth et al., 2019), система BREX (Bacteriophage Exclusion – дозволяє адсорбуватися фагам, але блокує реплікацію їх ДНК) (Goldfarb et al., 2014) та DISARM (Defence Island

System Associated with Restriction-Modification, що є новим типом мультигенного модуля рестрикції та модифікації) (Ofir et al., 2017), SspABCD–SspE (порушення реплікації НК фагів) (Xiong et al., 2020), CBASS (Cyclic oligonucleotide-based antiphage signaling system – забезпечує синтез асоційованого ефекторного білка Cap, що призводить до загибелі клітини і переривання фагової інфекції) (Duncan-Lowe, Kranzusch, 2022) та ін. Таким чином, вважається, що противірусний арсенал прокаріотів може складатися з сотень, якщо не тисяч різних типів противірусних систем.

Існують численні занепокоєння з приводу використання помірних фагів в лікувальних цілях. Через свої біологічні властивості, помірні фаги часто йдуть по лізогенному життєвому циклу, під час якого вони інтегрують до бактеріального геному і реплікуються синхронно з бактеріями. Такий «стан спокою» (латентність фага) може зберігатися протягом тривалого часу, якщо клітина не піддається стресу навколишнього середовища, який може спричинити індукцію профагу та його перехід до літичного життєвого циклу. Використання помірних бактеріофагів у фаготерапії може не призвести до негайного бактерицидного ефекту. Крім того, при інтеграції в бактеріальну хромосому, помірні фаги можуть призвести до розвитку імунітету до суперінфекції, роблячи чутливі до фагів бактерії нечутливими до подальших фагових інфекцій (Monteiro et al., 2019).

Одна із перешкод на шляху комерційного впровадження стратегій по боротьбі із бактеріальними патогенами на основі бактеріофагів стосується аспектів регулювання та захисту інтелектуальної власності. Патенти можуть діяти як інструмент для стимулювання інновацій у галузі. Вони надають заявнику (-ам) право забороняти іншим використовувати їхній винахід протягом двадцяти років у певній географічній зоні, у якій було подано патент. Проте патентування біологічних речовин, таких як бактеріофаги, виявилось складним. Тим не менш, залишається відкритим питання про те, чи можуть фаги та продукти, що містять фаги, захищатися патентами, та якою є сфера дії таких патентів (Holtappels et al., 2019).

При використанні бактеріофагів для лікування діареї в Бангладеші було визначено наступні перешкоди для використання пероральних фагів: втрата значної кількості перорально застосовуваних фагів при проходженні через шлунковий бар'єр; поліетіологічність окремих захворювань (наприклад, діарея, пневмонія, тощо), що робить неможливим використання монокомпонентних фагових препаратів; генетична мінливість окремих патогенів, що потребує формування фагових коктейлів з великою кількістю бактеріофагових штамів; проблеми, що пов'язані з інтерференцією, коли коктейль показує менше покриття патогенів, ніж сума окремих фагів; фаготерапію важче організувати та проводити при гострих, а не при хронічних інфекціях, оскільки коротка тривалість захворювання часто потребує раннього використання фагів, ще до того, як стануть доступними результати мікробіологічного дослідження, що призводить до залучення великої кількості неінформативних пацієнтів для яких фаготерапія буде неефективною; додатковою перешкодою є той факт, що цільовий збудник повинен бути доступний для застосовуваного фага (наприклад, прискорення перистальтики кишечника при діареї ускладнює ймовірність контакту фага з цільовим збудником) (Brüssow 2019; Sarker 2016).

На відміну від антибіотиків, відсутність інформації про фармакокінетику/фармакодинаміку є серйозною проблемою для фагової терапії. Оскільки терапевтичні фаги є біологічними об'єктами зі здатністю до самовідтворення в присутності чутливих бактерій, їх фармакокінетика/фармакодинаміка є набагато складнішою, ніж у антибіотиків (Nang et al., 2023).

У зв'язку з видоспецифічним, а іноді навіть штамоспецифічним способом інфікування бактерій фагами важливо досліджувати ефективність фага *in vitro* проти бактерій пацієнта. Такий процес іноді називають тестуванням на чутливість до фагів, і він вважається аналогом сучасного тестування чутливості до антибіотиків.

2.7. Перспективи використання фагів в медицині

2.7.1. Геноінженерні фаги

Синтетична біологія відноситься до раціонального проектування, перетворення і навіть синтезу *de novo* організмів відповідно до конкретних цілей під керівництвом інженерії, що є хорошим способом подолання деяких обмежень природних бактеріофагів. Ефективність зараження фагами можна підвищити шляхом додавання функціональних генів до геному фага. Вірулентні гени та гени, що не виконують життєво важливих функцій, максимально видаляються, а потім використовується основний геном фага для досягнення мети висококонтрольованої біобезпеки (Sun et al., 2023).

Усі фаги можна розглядати як вектори для доставки. Будь-який генетичний матеріал, що упакований у їхній капсид, може бути доставлений до специфічного для фага хазяїна, та ініціювати розвиток нових фагів і лізис клітини або брати участь у рекомбінації, транскрипції чи інших процесах, які призводять до зміни фенотипу або смерті інфікованої клітини. Це відкриває різноманітні можливості для модифікації геному фагів, що або не втручаються в природні процеси розмноження та упаковки фагів, або вимагають упаковки ДНК фага *in vitro*. Деякі зміни в ДНК фага можуть бути спрямовані на модифікацію його капсиду, аби вона набула афінності до певних бактеріальних або еукаріотичних клітин, які зазвичай не є мішенями вихідного фага (Łobocka et al., 2021).

В даний час розроблені різні методи генного інженерингу фагів, з метою модифікації ареалу їх господаря, підвищення безпеки і антимікробної активності. Система CRISPR-Cas9 широко використовується для нокауту, вставки та сайт-спрямованої мутації геному фага. З розвитком технології секвенування і синтезу генів все більше і більше великих фрагментів ДНК можуть бути ефективно синтезовані *in vitro* і *vivo*, включно з геномами фагів (Sun et al., 2023).

Перше успішне лікування за допомогою сконструйованих фагів відбулося в 2019 р. у пацієнта з муковісцидозом, що був інфікований стійкою до антибіотиків

Mycobacterium abscessus після двосторонньої трансплантації легень (Dedrick et al., 2019).

Окрім редагування фагового геному, білки, що входять до складу фагового капсиду, також можуть бути модифіковані з метою підвищення ефективності знищення бактерій. Ран та ін. розробили фотодинамічний антимікробний агент (APNB) на основі катіонного фотосенсибілізатора і бактеріофага для точної знищення бактерій і ефективною абляції біоплівки. Бактеріофаг обумовлює специфічне прикріплення до бактеріальної клітини, а фотосенсибілізатор забезпечує ефективне знищення мікроорганізмів шляхом продукції активних форм кисню. Модифікований бактеріофаг проявив високу активність у відношенні мультирезистентного *A. baumannii* як в умовах *in vitro*, так і в умовах *in vivo* (Ran et al., 2021).

2.7.2. Комбіноване використання з антибіотиками

Комбіноване використання фагів з антибіотиками або іншими антимікробними засобами також є перспективним варіантом для подолання екологічної обмеженості фагової терапії.

Однією із негативних сторін використання фагів в медицині є те, що бактерії здатні розвивати резистентність до фагів за різними механізмами, тим самим зменшуючи їх терапевтичний ефект (Arias et al., 2022). Комбінація фаго- та антибіотикотерапії була запропонована як один із способів обійти негативні ефекти обох лікувальних підходів та підвищити ефективність боротьби із антибіотикорезистентними мікроорганізмами шляхом поєднання цих двох впливів на бактерії. На даний час з'являється все більше наукових публікацій, які показують ефективність комбінацій фаг-антибіотик, як в умовах *in vitro*, так і *in vivo*, в порівнянні із окремим використанням антибіотиків чи бактеріофагів (Himmelweit et al., 1945). Крім того, комбіноване застосування може дати такі можливі переваги, як посилене пригнічення розмноження бактерій, більш інтенсивне проникнення антибактеріальних засобів в біоплівки та зниження

здатності бактерій розвивати резистентність до фагів та/або антибіотиків (Bulssico et al., 2023; Chhibber et al., 2013; Torres-Barceló C, Hochberg, 2016).

Взаємодія бактеріофагів з антибактеріальними засобами, як і комбінація інших стресорів, може проявлятися у вигляді синергізму, антагонізму чи адитивному ефекті при їх спільному використанні. Хоча успіх лікування більш вірогідний у випадку синергідних ефектів, прості адитивні взаємодії, під час яких ефекти окремих антибіактеріальних засобів сумуються, також є важливим фактором для боротьби із патогенними мікроорганізмами в умовах *in vivo* (Torres-Barceló C, Hochberg, 2016). Ефекти взаємодії між фагами та антибіотиками залежать від типу антибіотиків та, власне, бактеріофагів. Більшість механізмів, що лежать в основі певного типу взаємодії між антибіотиками та фагами, на сьогоднішній день залишаються невизначеними.

У 2007 р. було введено окреме поняття – фагово-антибіотиковий синергізм (PAS – Phage Antibiotic Synergy). Під терміном PAS розумілося те, що сублетальні концентрації певних антибіотиків можуть суттєво стимулювати продукцію деяких вірулентних фагів бактеріальною клітиною-хазяїном (Comeau et al., 2007). Так, авторами було показано, що низька доза цефотаксиму та цефалоспорину збільшувала продукцію фага wMFP уропатогенним штамом *E. coli* більш, ніж у 7 разів. Схожий ефект спостерігався при комбінованому використанні T4-подібних фагів з β -лактамними антибіотиками та хінолоновими хімотерапевтичними засобами, а також мітоміцином C (Comeau et al., 2007). Це явище пояснювалося авторами як наслідок бактеріальної клітинної філаментації. В подальшому кількість публікацій, які присвячені вивченню синергідного ефекту при комбінованому використанні антибіотиків та бактеріофагів, різко зросла.

Використання трьох фагів з широким спектром дії PSP2 (*Yuavirus*), PSP3 (*Pbunavirus*) і PSP30 (*Bruynoghevirus*) та антибіотиків ципрофлоксацину, меропенему і цефтазидиму на зрілих біоплівках *P. aeruginosa* PAO1 показало, що використання даних комбінацій призводить до значного зменшення як кількості клітин, так і біомаси біоплівок для всіх комбінацій фагів та антибіотиків.

Найбільше зменшення кількості життєздатних клітин спостерігалось для PSP3 і PSP2 у поєднанні з цефтазидимом, за якими йшли всі комбінації фагів з ципрофлоксацином. Найбільше зменшення біомаси було досягнуто шляхом комбінування PSP3 з ципрофлоксацином (29,8%). Метаболічні тести підтвердили ці результати (De Soir et al., 2024).

Використовуючи 48-годинні біоплівки на поліетеретеркетоні біолюмінесцентного штаму *S. aureus*, Джу та ін. тестували комбінацію стафілококових фагів з ванкоміцином. Автори показали, що ванкоміцин і стафілококові фаги можуть знижувати загальне бактеріальне навантаження. Більшість комбінацій фагів та антибіотиків продемонструвала більше логарифмічне зниження кількості бактерій у порівнянні з використанням одного протимікробного агента, що свідчить про антимікробну синергію (Joo et al., 2023).

Актюрк та ін. перевірили дію гентаміцину як коад'юванта фагів у рановій моделі з подвійною видовою біоплівкою (*P. aeruginosa* та *S. aureus*), сформованій на штучній дермі. Здатність знищувати біоплівки за випробуваних методів лікування була значно збільшена, коли фаги комбінували з гентаміцином і застосовували кілька разів (три дози, кожні 8 годин) (Akturk et al., 2023).

Гордійо Альтамірано та ін. вивчали в умовах *in vivo* на мишачій моделі при важкій бактеріемії бактерицидний ефект комбінації фагів і антибіотиків на резистентний штам *A. baumannii* AB900, використовуючи фаг øFG02, який зв'язується з капсульними полісахаридами. Результати експериментальних досліджень дали змогу встановити, що фаг øFG02 надійно стимулює в умовах *in vivo* еволюцію *A. baumannii* AB900 до капсуло-дефіцитного, фагостійкого фенотипу, який знову стає чутливий до цефтазидиму. Цей механізм підкреслює клінічний потенціал використання фагової терапії для націлювання на *A. baumannii* та відновлення чутливості до антибіотиків (Gordillo Altamirano et al., 2022).

Є також деякі докази того, що як природні, так і сконструйовані бактеріофаги спонукають бактерії до втрати існуючої стійкості до антибіотиків,

що свідчить про можливу роль комбінацій бактеріофагів із звичайними антибіотиками (Chan et al., 2016; Högberg et al., 2006).

2.7.3. Фагові лізини

У терапевтичних цілях не обов'язково використовувати безпосередньо самі фаги. За мільйони років еволюції бактеріофаги розробили цілий арсенал специфічних білків – інструментів для розпізнавання цільових мікроорганізмів та маніпуляцій із біополімерами жертви, на основі яких можна створювати протибактеріальні препарати. Розвиток молекулярної біології та нових методів секвенування відкрили нові можливості в дизайні сконструйованих фагів і рекомбінантних білків, що отримані з фагів. Дані протимікробні препарати отримали назву **ензибіотики**, що походить від двох слів «фермент» і «антибіотики». Ензибіотики — це ферменти або, в деяких випадках, неферментативні похідні фагів, які широко використовуються завдяки своїм антибактеріальним властивостям (Kakkar et al., 2024).

Необхідно відзначити, що в процесі життєвого (літичного) циклу бактеріофагів відбуваються 2 акти лізису клітинної стінки бактерій: «лізис ззовні» та проникнення ДНК фага в клітину з подальшим диз'юнктивним способом розмноження, та «лізис зсередини» при виході нових фагових частинок.

Обнадійливі результати, в якості створення нових протимікробних препаратів, були відзначені для фагових ферментів, які беруть участь на першому етапі вірусної інфекції, і відповідальні за деградацію клітинної стінки бактерій.

Ензибіотики є багатообіцяючою альтернативою стандартним антибіотикам, оскільки мають нові механізми дії проти патогенів. Найчастіше до ензибіотиків відносяться **ендолізини** або просто лізини, які є пептидоглікангідролазами. Останнім часом до цього поняття також віднесли ще одну групу ферментів бактеріофагів – **полісахариддеполімерази**, що можуть бути активні щодо

матриці біоплівки, бактеріальних капсул, слизових шарів або ліпополісахаридів (Danis-Włodarczyk et al., 2021).

Лізини, що отримані з фагів, руйнують бактеріальні пептидоглікани, і класифікуються на п'ять груп залежно від зв'язків, які ці ферменти розщеплюють у пептидоглікані бактерій (Ramos-Vivas et al., 2021). Наявність зовнішньої мембрани у грамнегативних бактерій забезпечує ефективний фізичний захисний бар'єр проти ендолізинів, які можуть безпосередньо націлюватися на зв'язки в пептидоглікані та лізувати клітинну стінку грампозитивних бактерій, які не мають зовнішніх мембран. Це відкриття спонукало вчених спробувати використати бактеріолітичні властивості ендолізинів для лікування бактеріальних інфекцій, що спричинені грампозитивними мікроорганізмами. Багато рекомбінантних ендолізинів вже експресовані, ідентифіковані та очищені, і вони демонструють значну бактеріолітичну активність проти грампозитивних мікроорганізмів (Liu et al., 2023).

Кілька досліджень продемонстрували ефективність ендолізинів у знищенні MRSA як в умовах *in vitro*, так та *in vivo*. Наприклад, нещодавнє дослідження показало, що химерний ендолізин, що складається з лізостафіну та лізостафіноподібного домену (LysKLD), був ефективним проти 23 із 24 клінічних ізолятів MRSA, включаючи ті, які були стійкі до більшості антибіотиків (Hartinger et al., 2019).

Фагові ендолізини можуть знищувати стафілококові та стрептококові біоплівки за короткий час (Fenton et al., 2013). Експериментально було підтверджено, що очищений лізин СНАР(К), який наносився на біоплівки *S. aureus* DPC5246, повністю усунув стафілококові біоплівки протягом 4 годин. Крім того, СНАР(К) зміг запобігти утворенню біоплівки цим же штамом. Лізин СНАР(К) також знижував *S. aureus* у моделі деколонізації шкіри. Отримані дані демонструють потенціал СНАР(К) як біоцидного агента для профілактики та лікування стафілококових інфекцій, що пов'язані із утворенням біоплівки (Fenton et al., 2013).

Фаулер та ін. проводили клінічне дослідження препарату Eхеbacase із залученням 121 пацієнта з інфекцією кровотоку/ендокардитом, що спричинені *S. aureus*. Eхеbacase – це антистафілококовий лізин, який має швидку бактеріолітичну дію, знищує біоплівки та синергізує з антибіотиками. На 14-й день рівень клінічної відповіді становив 70,4% у групі Eхеbacase + антибіотики, та 60,0% у групі, яка отримувала лише антибіотики. У заздалегідь визначеній підгрупі MRSA різниця склала 42,8 процентних пункти (Fowler et al., 2020).

Деполімеризи фагів наразі є предметом інтенсивних досліджень. Загалом, було ідентифіковано 160 потенційних деполімераз у 143 фагів, які інфікують 24 роди бактерій, причому розмір даних ферментів варіював від 197 до 2417 амінокислот. Фагові деполімерази існують у двох формах: як інтегральні компоненти фагових часток, або ж як розчинні білки, що утворюються під час лізису клітини-хазяїна (Pires et al., 2016).

В цілому, фаги з деполімеразною активністю мають покращену ефективність проти своїх цільових бактерій, оскільки ці ферменти допомагають фагам у багатьох важливих процесах, таких як адсорбція, інвазія та розпад бактеріальної клітини-хазяїна, а також порушення біоплівки (Yan et al., 2013).

Зурабов та ін. підтвердили, що досліджуваний ними фаговий коктейль із деполімеразною активністю був здатен ефективно руйнувати біоплівки, утворені *K. pneumoniae* з множиною лікарською стійкістю (Zurabov et al., 2023).

Використані джерела:

1. Abedon, S. T., Danis-Wlodarczyk, K. M., & Alves, D. R. (2021). Phage therapy in the 21st century: is there modern, clinical evidence of phage-mediated efficacy?. *Pharmaceuticals*, 14(11), 1157. <https://doi.org/10.3390/ph14111157>.
2. Abedon, S. T., Kuhl, S. J., Blasdel, B. G., & Kutter, E. M. (2011). Phage treatment of human infections. *Bacteriophage*, 1(2), 66-85. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15845>.

3. Abedon, S. T., Thomas-Abedon, C., Thomas, A., & Mazure, H. (2011). Bacteriophage prehistory: is or is not Hankin, 1896, a phage reference? *Bacteriophage* 1 (3): 174–178. <https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16591>.
4. Akturk, E., Melo, L. D. R., Oliveira, H., Crabbé, A., Coenye, T., & Azeredo, J. (2023). Combining phages and antibiotic to enhance antibiofilm efficacy against an in vitro dual species wound biofilm. *Biofilm*, 6, 100147. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100147>.
5. Alemayehu, D., Casey, P. G., McAuliffe, O., Guinane, C. M., Martin, J. G., Shanahan, F., Coffey, A., Ross, R. P., & Hill, C. (2012). Bacteriophages Φ MR299-2 and ϕ nh-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis Lung Airway Cells. *mBio*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00029-12>.
6. Alseth, E. O., Pursey, E., Luján, A. M., McLeod, I., Rollie, C., & Westra, E. R. (2019). Bacterial biodiversity drives the evolution of CRISPR-based phage resistance. *Nature*, 574(7779), 549-552. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1662-9>.
7. Arias, C. F., Acosta, F. J., Bertocchini, F., Herrero, M. A., & Fernández-Arias, C. (2022). The coordination of anti-phage immunity mechanisms in bacterial cells. *Nature communications*, 13(1), 7412. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35203-7>.
8. Aslam, S., Lampley, E., Wooten, D., Karris, M., Benson, C., Strathdee, S., & Schooley, R. T. (2020). Lessons learned from the first 10 consecutive cases of intravenous bacteriophage therapy to treat multidrug-resistant bacterial infections at a single center in the United States. *Open Forum Infectious Diseases*, 7(9). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa389>.
9. Balcázar, J. L. (2018). How do bacteriophages promote antibiotic resistance in the environment?. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(5), 447-449. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.010>.
10. Barr, J. J., Auro, R., Furlan, M., Whiteson, K. L., Erb, M. L., Pogliano, J., ... & Rohwer, F. (2013). Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-

- derived immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(26), 10771-10776. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305923110>.
11. Bichet, M. C., Chin, W. H., Richards, W., Lin, Y. W., Avellaneda-Franco, L., Hernandez, C. A., ... & Barr, J. J. (2021). Bacteriophage uptake by mammalian cell layers represents a potential sink that may impact phage therapy. *IScience*, *24*(4). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102287>.
 12. Boggione, D. M. G., Santos, I. J. B., de Souza, S. M., & Mendonça, R. C. S. (2021). Preparation of polyvinyl alcohol hydrogel containing bacteriophage and its evaluation for potential use in the healing of skin wounds. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *63*, 102484. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102484>.
 13. Brüssow, H. (2019). Hurdles for phage therapy to become a reality—an editorial comment. *Viruses*, *11*(6), 557. <https://doi.org/10.3390/v11060557>.
 14. Bulsico, J., Papukashvili, I., Espinosa, L., Gandon, S., & Ansaldi, M. (2023). Phage-antibiotic synergy: Cell filamentation is a key driver of successful phage predation. *PLoS Pathogens*, *19*(9), e1011602. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011602>.
 15. Cao, Z., Sugimura, N., Burgermeister, E., Ebert, M. P., Zuo, T., & Lan, P. (2022). The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *EBioMedicine*, *81*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104113>.
 16. Chan, B. K., Siström, M., Wertz, J. E., Kortright, K. E., Narayan, D., & Turner, P. E. (2016). Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific reports*, *6*(1), 26717. <https://doi.org/10.1038/srep26717>.
 17. Chanishvili, N. (2012). Phage therapy—history from Twort and d’Herelle through Soviet experience to current approaches. *Advances in virus research*, *83*, 3-40. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394438-2.00001-3>.
 18. Chhibber, S., Kaur, T., & Kaur, S. (2013). Co-therapy using lytic bacteriophage and linezolid: effective treatment in eliminating methicillin resistant

- Staphylococcus aureus (MRSA) from diabetic foot infections. *PloS one*, 8(2), e56022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056022>.
19. Clinicaltrials.gov [Internet]. [cited 2024 Oct 14]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/search?cond=phage+therapy&limit=100&page=1>.
 20. Comeau, A. M., Tétart, F., Trojet, S. N., Prère, M. F., & Krisch, H. M. (2007). Phage-antibiotic synergy (PAS): β -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PloS one*, 2(8), e799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000799>.
 21. d'Herelle F., & Smith G.H. (1922). The bacteriophage, its rôle in immunity. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.31194>.
 22. Danis-Wlodarczyk, K. M., Wozniak, D. J., & Abedon, S. T. (2021). Treating bacterial infections with bacteriophage-based enzybiotics: In vitro, in vivo and clinical application. *Antibiotics*, 10(12), 1497. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121497>.
 23. De Soir, S., Parée, H., Kamarudin, N. H., Wagemans, J., Lavigne, R., Braem, A., Merabishvili, M., De Vos, D., Pirnay, J.-P., & Van Bambeke, F. (2024). Exploiting phage-antibiotic synergies to disrupt *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms in the context of orthopedic infections. *Microbiology Spectrum*, 12(1). <https://doi.org/10.1128/spectrum.03219-23>.
 24. Dedrick RM, Guerrero-Bustamante CA, Garland RA, Russell DA, Ford K, Harris K, et al., Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant mycobacterium abscessus. *Nature Medicine*. 2019 May;25(5):730–3. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>.
 25. Desgranges, F., Bochud, P. Y., & Resch, G. (2019). Customised infectiology- Phage therapy: from theory to clinical evidence. *Revue médicale suisse*, 15(646), 771-775. <https://doi.org/10.53738/revmed.2019.15.646.0771>.
 26. Development and manufacture of human medicinal products specifically designed for phage therapy - Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA). (2023, December 22). European Medicines Agency (EMA). <https://www.ema.europa.eu/en/development-and-manufacture-human->

medicinal-products-specifically-designed-phage-therapy-scientific-guideline

(cited 2024 Sept 19).

27. Diallo, K., Dublanchet, A. (2023). A century of clinical use of phages: a literature review. *Antibiotics*, 12(4), 751. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040751>.
28. Dsouza, A., Constantinidou, C., Arvanitis, T. N., Haddleton, D. M., Charmet, J., & Hand, R. A. (2022). Multifunctional composite hydrogels for bacterial capture, growth/elimination, and sensing applications. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(42), 47323-47344. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c08582>.
29. Duncan-Lowey, B., & Kranzusch, P. J. (2022). CBASS phage defense and evolution of antiviral nucleotide signaling. *Current opinion in immunology*, 74, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2022.01.002>.
30. ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2008. (n.d.). AST of bacterial phages. EUCAST. <https://www.eucast.org/frequently-asked-questions-faq/phage-susceptibility-testing>.
31. Eskenazi, A., Lood, C., Wubbolts, J., Hites, M., Balarjishvili, N., Leshkasheli, L., ... & Pirnay, J. P. (2022). Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Communications*, 13(1), 302. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27656-z>.
32. Fauconnier, A. (2018). Guidelines for bacteriophage product certification. *Bacteriophage therapy: From lab to clinical practice*, 253-268. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_19
33. Febvre HP, Rao S, Gindin M, Goodwin ND, Finer E, Vivanco JS, et al., Phage study: Effects of supplemental bacteriophage intake on inflammation and gut microbiota in healthy adults. *Nutrients*. 2019 Mar 20;11(3):666. doi: <https://doi.org/10.3390/nu11030666>.
34. Fenton, M., Keary, R., McAuliffe, O., Ross, R. P., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2013). Bacteriophage-derived peptidase. *International Journal of Microbiology*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/625341>.

35. Ferry, T., Batailler, C., Petitjean, C., Chateau, J., Fevre, C., Forestier, E., ... & Lustig, S. (2020). The potential innovative use of bacteriophages within the DAC® hydrogel to treat patients with knee megaprosthesis infection requiring “debridement antibiotics and implant retention” and soft tissue coverage as salvage therapy. *Frontiers in medicine*, 7, 342. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00342>.
36. Fish, R., Kutter, E., Wheat, G., Blasdel, B., Kutateladze, M., & Kuhl, S. (2018). Compassionate use of bacteriophage therapy for foot ulcer treatment as an effective step for moving toward clinical trials. *Bacteriophage therapy: from lab to clinical practice*, 159-170. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7395-8_14.
37. Fowler, V. G., Das, A. F., Lipka-Diamond, J., Schuch, R., Pomerantz, R., Jáuregui-Peredo, L., Bressler, A., Evans, D., Moran, G. J., Rupp, M. E., Wise, R., Corey, G. R., Zervos, M., Douglas, P. S., & Cassino, C. (2020a). Exebacase for patients with Staphylococcus aureus bloodstream infection and endocarditis. *Journal of Clinical Investigation*, 130(7), 3750–3760. <https://doi.org/10.1172/jci136577>.
38. George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology. (2024). Available from: <https://eliava-institute.org/?lang=en>. (cited 2024 Sept 19)
39. Gindin, M., Fevre, H. P., Rao, S., Wallace, T. C., & Weir, T. L. (2019). Bacteriophage for gastrointestinal health (PHAGE) study: evaluating the safety and tolerability of supplemental bacteriophage consumption. *Journal of the American College of Nutrition*, 38(1), 68-75. <https://doi.org/10.1080/07315724.2018.1483783>.
40. Goldfarb, T., Sberro, H., Weinstock, E., Cohen, O., Doron, S., Charpak-Amikam, Y., ... & Sorek, R. (2015). BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *The EMBO journal*, 34(2), 169-183. <https://doi.org/10.15252/embj.201489455>.
41. Gordillo Altamirano, F. L., Kostoulias, X., Subedi, D., Korneev, D., Peleg, A. Y., & Barr, J. J. (2022). Phage-antibiotic combination is a superior treatment against

- Acinetobacter baumannii in a preclinical study. *eBioMedicine*, 80, 104045. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104045>.
42. Gregory, A. C., Zablocki, O., Zayed, A. A., Howell, A., Bolduc, B., & Sullivan, M. B. (2020). The gut virome database reveals age-dependent patterns of virome diversity in the human gut. *Cell host & microbe*, 28(5), 724-740. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.08.003>.
43. Gupta, P., Singh, H. S., Shukla, V. K., Nath, G., & Bhartiya, S. K. (2019). Bacteriophage therapy of chronic nonhealing wound: clinical study. *The international journal of lower extremity wounds*, 18(2), 171-175. <https://doi.org/10.1177/1534734619835115>.
44. Hankin, E. (1896). L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Ann Inst Pasteur*, 10, 511. (Fre).
45. Hannigan, G. D., Meisel, J. S., Tyldsley, A. S., Zheng, Q., Hodkinson, B. P., SanMiguel, A. J., ... & Grice, E. A. (2015). The human skin double-stranded DNA virome: topographical and temporal diversity, genetic enrichment, and dynamic associations with the host microbiome. *MBio*, 6(5), 10-1128. <https://doi.org/doi:10.1128/mbio.01578-15>.
46. Hartinger, T., Edwards, J. E., Gómez Expósito, R., Smidt, H., ter Braak, C. J., Gresner, N., & Südekum, K.-H. (2019). Differently pre-treated alfalfa silages affect the in vitro ruminal microbiota composition. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02761>.
47. Himmelweit, F. (1945). Combined action of penicillin and bacteriophage on staphylococci. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(45\)91422-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(45)91422-x).
48. Högberg, L., Ekdahl, K., Sjöström, K., Olsson-Liljequist, B., Walder, M., Melander, E., ... & Normark, B. H. (2006). Penicillin-resistant pneumococci in Sweden 1997–2003: increased multiresistance despite stable prevalence and decreased antibiotic use. *Microbial Drug Resistance*, 12(1), 16-22. <https://doi.org/10.1089/mdr.2006.12.16>.

49. Holtappels, D., Lavigne, R., Huys, I., & Wagemans, J. (2019). Protection of phage applications in crop production: A patent landscape. *Viruses*, *11*(3), 277. <https://doi.org/10.3390/v11030277>.
50. Huon, J. F., Montassier, E., Leroy, A. G., Grégoire, M., Vibet, M. A., Caillon, J., ... & Navas, D. (2020). Phages versus antibiotics to treat infected diabetic wounds in a mouse model: a microbiological and microbiotic evaluation. *Msystems*, *5*(6), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/msystems.00542-20>.
51. Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J. P., Que, Y. A., Resch, G., ... & Gabard, J. (2019). Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *The Lancet Infectious Diseases*, *19*(1), 35-45. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30482-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30482-1).
52. Jones, J. D., Trippett, C., Suleman, M., Clokie, M. R., & Clark, J. R. (2023). The future of clinical phage therapy in the United Kingdom. *Viruses*, *15*(3), 721. <https://doi.org/10.3390/v15030721>.
53. Joo, H., Wu, S. M., Soni, I., Wang-Crocker, C., Matern, T., Beck, J. P., & Loc-Carrillo, C. (2023). Phage and antibiotic combinations reduce staphylococcus aureus in static and dynamic biofilms grown on an implant material. *Viruses*, *15*(2), 460. <https://doi.org/10.3390/v15020460>.
54. Kakkar, A., Kandwal, G., Nayak, T., Jaiswal, L. K., Srivastava, A., & Gupta, A. (2024). Engineered bacteriophages: A panacea against pathogenic and drug resistant bacteria. *Heliyon*, *10*(14). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34333>.
55. Kaur, S., Harjai, K., & Chhibber, S. (2014). Bacteriophage-aided intracellular killing of engulfed methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by murine macrophages. *Applied microbiology and biotechnology*, *98*, 4653-4661. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5643-5>.
56. Kim, H. Y., Chang, R. Y. K., Morales, S., & Chan, H. K. (2021). Bacteriophage-delivering hydrogels: current progress in combating antibiotic resistant bacterial infection. *Antibiotics*, *10*(2), 130. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020130>.

57. Kirk, D., Costeira, R., Visconti, A., Mirzaei, M. K., Deng, L., Valdes, A. M., & Menni, C. (2024). Bacteriophages, gut bacteria, and microbial pathways interplay in cardiometabolic health. *Cell Reports*, 43(2). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.113728>.
58. Kutter, E. M., Gvasalia, G., Alavidze, Z., & Brewster, E. (2013). Phage therapy. In *Biotherapy-History, Principles and Practice: A Practical Guide to the Diagnosis and Treatment of Disease using Living Organisms* (pp. 191-231). Dordrecht: Springer Netherlands. 10.1007/978-94-007-6585-6_8.
59. Law, N., Logan, C., Yung, G., Furr, C.-L. L., Lehman, S. M., Morales, S., Rosas, F., Gaidamaka, A., Bilinsky, I., Grint, P., Schooley, R. T., & Aslam, S. (2019). Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa infection in a cystic fibrosis patient. *Infection*, 47(4), 665–668. <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01319-0>.
60. Le, T., Nang, S. C., Zhao, J., Yu, H. H., Li, J., Gill, J. J., ... & Aslam, S. (2023). Therapeutic potential of intravenous phage as standalone therapy for recurrent drug-resistant urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(4), e00037-23. <https://doi.org/10.1128/aac.00037-23>.
61. Lebeaux, D., Merabishvili, M., Caudron, E., Lannoy, D., Van Simaey, L., Duyvejonck, H., Guillemain, R., Thumerelle, C., Podglajen, I., Compain, F., Kassis, N., Mainardi, J.-L., Wittmann, J., Rohde, C., Pirnay, J.-P., Dufour, N., Vermeulen, S., Gansemans, Y., Van Nieuwerburgh, F., & Vaneechoutte, M. (2021). A case of phage therapy against Pandrug-resistant *Achromobacter xylosoxidans* in a 12-year-old lung-transplanted cystic fibrosis patient. *Viruses*, 13(1), 60. <https://doi.org/10.3390/v13010060>.
62. Leibniz Institute DSMZ. (2024, September 23). <https://www.dsmz.de/>.
63. Leitner, L., Sybesma, W., Chanishvili, N., Goderdzishvili, M., Chkhotua, A., Ujmajuridze, A., ... & Kessler, T. M. (2017). Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *BMC urology*, 17, 1-6. <https://doi.org/doi:10.1186/s12894-017-0283-6>.

64. Leitner, L., Ujmajuridze, A., Chanishvili, N., Goderdzishvili, M., Chkonia, I., Rigvava, S., ... & Kessler, T. M. (2021). Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(3), 427-436. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30330-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30330-3).
65. Letkiewicz, S., Łusiak-Szelachowska, M., Międzybrodzki, R., Żaczek, M., Weber-Dąbrowska, B., & Górski, A. (2021). Low immunogenicity of intravesical phage therapy for urogenitary tract infections. *Antibiotics*, 10(6), 627. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060627>.
66. Liu, H., Hu, Z., Li, M., Yang, Y., Lu, S., & Rao, X. (2023). Therapeutic potential of bacteriophage endolysins for infections caused by gram-positive bacteria. *Journal of Biomedical Science*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s12929-023-00919-1>.
67. Łobocka, M., Dąbrowska, K., & Górski, A. (2021). Engineered bacteriophage therapeutics: Rationale, challenges and future. *BioDrugs*, 35(3), 255–280. <https://doi.org/10.1007/s40259-021-00480-z>.
68. Łusiak-Szelachowska, M., Żaczek, M., Weber-Dąbrowska, B., Międzybrodzki, R., Kłak, M., Fortuna, W., ... & Górski, A. (2014). Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral immunology*, 27(6), 295-304. <https://doi.org/10.1089/vim.2013.0128>.
69. Ly, M., Abeles, S. R., Boehm, T. K., Robles-Sikisaka, R., Naidu, M., Santiago-Rodriguez, T., & Pride, D. T. (2014). Altered oral viral ecology in association with periodontal disease. *MBio*, 5(3), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mbio.01133-14>.
70. Martínez, A., Kuraji, R., & Kapila, Y. L. (2021). The human oral virome: shedding light on the dark matter. *Periodontology 2000*, 87(1), 282-298. <https://doi.org/10.1111/prd.12396>.

71. Monteiro, R., Pires, D. P., Costa, A. R., & Azeredo, J. (2019). Phage therapy: going temperate?. *Trends in microbiology*, 27(4), 368-378. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.008>
72. Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., ... & Tasak, N. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0).
73. Nang, S. C., Lin, Y. W., Fabijan, A. P., Chang, R. Y., Rao, G. G., Iredell, J., ... & Li, J. (2023). Pharmacokinetics/pharmacodynamics of phage therapy: a major hurdle to clinical translation. *Clinical Microbiology and Infection*, 29(6), 702-709. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.01.021>.
74. NCTC bacteriophage collection and repository. Culture Collections. (n.d.). <https://www.culturecollections.org.uk/culture-collection-news/nctc-bacteriophage-collection-and-repository/>.
75. Nguyen, S., Baker, K., Padman, B. S., Patwa, R., Dunstan, R. A., Weston, T. A., ... & Barr, J. J. (2017). Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers. *MBio*, 8(6), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/mbio.01874-17>.
76. Ofir, G., Melamed, S., Sberro, H., Mukamel, Z., Silverman, S., Yaakov, G., ... & Sorek, R. (2018). DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nature microbiology*, 3(1), 90-98. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0051-0>.
77. Order of the Ministry of Health of Ukraine dated 26.08.2005 No. 426 (as amended by the Order of the Ministry of Health of Ukraine dated 23.07.2015 No. 460) «Procedure for conducting the examination of registration materials for medicinal products submitted for state registration (re-registration), as well as the examination of materials regarding amendments to registration materials during the validity of the registration certificate». [Ukrainian].
78. Ośrodek Terapii Fagowej - Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej. (2023, April 28). Instytut Immunologii I Terapii Doświadczalnej.

- <https://hirszfeld.pl/struktura/centrum-medyczne/osrodek-terapii-fagowej/> (cited 2024 Oct 14).
79. Pérez-Brocal, V., & Moya, A. (2018). The analysis of the oral DNA virome reveals which viruses are widespread and rare among healthy young adults in Valencia (Spain). *PloS one*, *13*(2), e0191867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191867>.
80. Phage library. TU Delft. (n.d.). <https://www.tudelft.nl/en/delft-outlook/articles/phage-library-wants-to-clarify-bacteriophage-effects>.
81. Pires, D. P., Oliveira, H., Melo, L. D., Sillankorva, S., & Azeredo, J. (2016). Bacteriophage-encoded depolymerases: Their diversity and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(5), 2141–2151. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7247-0>.
82. Pirnay, J. P., Verbeken, G., Ceysens, P. J., Huys, I., De Vos, D., Ameloot, C., & Fauconnier, A. (2018). The magistral phage. *Viruses*, *10*(2), 64. <https://doi.org/10.3390/v10020064>.
83. Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2017(WHO/EMP/IAU/2017.12).
84. Ramos-Vivas, J., Superio, J., Galindo-Villegas, J., & Acosta, F. (2021). Phage therapy as a focused management strategy in Aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(19), 10436. <https://doi.org/10.3390/ijms221910436>.
85. Ran, B., Yuan, Y., Xia, W., Li, M., Yao, Q., Wang, Z., Wang, L., Li, X., Xu, Y., & Peng, X. (2021). A photo-sensitizable phage for multidrug-resistant acinetobacter baumannii therapy and biofilm ablation. *Chemical Science*, *12*(3), 1054–1061. <https://doi.org/10.1039/d0sc04889e>.
86. Rezk, N., Abdelsattar, A. S., Elzoghby, D., Agwa, M. M., Abdelmoteleb, M., Aly, R. G., ... & El-Shibiny, A. (2022). Bacteriophage as a potential therapy to control antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection through topical application onto a full-thickness wound in a rat model. *Journal of Genetic*

- Engineering and Biotechnology*, 20(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s43141-022-00409-1>.
87. Rhoads, D. D., Wolcott, R. D., Kuskowski, M. A., Wolcott, B. M., Ward, L. S., & Sulakvelidze, A. (2009). Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *Journal of wound care*, 18(6), 237-243. <https://doi.org/10.12968/jowc.2009.18.6.42801>.
88. Roshini, J., Raj, M., & Karunasagar, I. (2017). Prevalence of blaCTX-M-15 in coliphages isolated from sewage. *Advanced Science Letters*, 23(3), 1869-1871. <https://doi.org/10.1166/asl.2017.8511>.
89. Rubalskii, E., Ruemke, S., Salmoukas, C., Boyle, E. C., Warnecke, G., Tudorache, I., Shrestha, M., Schmitto, J. D., Martens, A., Rojas, S. V., Ziesing, S., Bochkareva, S., Kuehn, C., & Haverich, A. (2020). Bacteriophage therapy for critical infections related to cardiothoracic surgery. *Antibiotics*, 9(5), 232. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050232>.
90. Sagar, S., Kaistha, S., Das, A. J., Kumar, R., Sagar, S., Kaistha, S., ... & Kumar, R. (2019). Bacteriophage: a new hope for the control of antibiotic-resistant bacteria. *Antibiotic Resistant Bacteria: A Challenge to Modern Medicine*, 153-164. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9879-7_11.
91. Sarker, S. A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., Charton, F., ... & Brüssow, H. (2016). Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh. *EBioMedicine*, 4, 124-137. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.12.023>.
92. Saussereau, E., Vachier, I., Chiron, R., Godbert, B., Sermet, I., Dufour, N., Pirnay, J.-P., De Vos, D., Carrié, F., Molinari, N., & Debarbieux, L. (2014). Effectiveness of bacteriophages in the sputum of cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(12). <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12712>.
93. Stacey, H. J., De Soir, S., & Jones, J. D. (2022). The safety and efficacy of phage therapy: a systematic review of clinical and safety trials. *Antibiotics*, 11(10), 1340. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101340>.

94. Strathdee, S. A., Hatfull, G. F., Mutalik, V. K., & Schooley, R. T. (2023). Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. *Cell*, *186*(1), 17-31. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.017>.
95. Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris Jr, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *45*(3), 649-659. <https://doi.org/10.1128/aac.45.3.649-659.2001>.
96. Sun, Q., Shen, L., Zhang, B.-L., Yu, J., Wei, F., Sun, Y., Chen, W., & Wang, S. (2023). Advance on engineering of bacteriophages by Synthetic Biology. *Infection and Drug Resistance*, Volume 16, 1941–1953. <https://doi.org/10.2147/idr.s402962>.
97. Sutton, T. D., & Hill, C. (2019). Gut bacteriophage: current understanding and challenges. *Frontiers in endocrinology*, *10*, 784. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00784>.
98. Terwilliger, A., Clark, J., Karris, M., Hernandez-Santos, H., Green, S., Aslam, S., & Maresso, A. (2021). Phage therapy related microbial succession associated with successful clinical outcome for a recurrent urinary tract infection. *Viruses*, *13*(10), 2049. <https://doi.org/10.3390/v13102049>.
99. Tesson, F., & Bernheim, A. (2023). Synergy and regulation of antiphage systems: toward the existence of a bacterial immune system?. *Current Opinion in Microbiology*, *71*, 102238. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102238>.
100. The Bacteriophage Bank of Korea. (n.d.). http://www.phagebank.or.kr/intro/eng_intro.jsp.
101. Tkhilaishvili, T., Merabishvili, M., Pirnay, J. P., Starck, C., Potapov, E., Falk, V., & Schoenrath, F. (2021). Successful case of adjunctive intravenous bacteriophage therapy to treat left ventricular assist device infection. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.05.027>.
102. Tobin, C. A., Hill, C., & Shkoporov, A. N. (2023). Factors affecting variation of the human gut phageome. *Annual Review of Microbiology*, *77*(1), 363-379. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032421-105754>.

103. Torres-Barceló, C., & Hochberg, M. E. (2016). Evolutionary rationale for phages as complements of antibiotics. *Trends in microbiology*, 24(4), 249-256. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.12.011>.
104. Twort, F.W. (1915). An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *The Lancet*. 186(4814):1241–3. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(01\)20383-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(01)20383-3).
105. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2024.
106. Wright, A., Hawkins, C. H., Änggård, E. E., & Harper, D. R. (2009). A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clinical otolaryngology*, 34(4), 349-357. <https://doi.org/10.1111/j.1749-4486.2009.01973.x>.
107. Xiong, X., Wu, G., Wei, Y., Liu, L., Zhang, Y., Su, R., ... & Wang, L. (2020). SspABCD–SspE is a phosphorothioation-sensing bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nature microbiology*, 5(7), 917-928. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0700-6>.
108. Yan, J., Mao, J., & Xie, J. (2013). Bacteriophage polysaccharide Depolymerases and biomedical applications. *BioDrugs*, 28(3), 265–274. <https://doi.org/10.1007/s40259-013-0081-y>.
109. Yerushalmy, O., Khalifa, L., Gold, N., Rakov, C., Alkalay-Oren, S., Adler, K., Ben-Porat, S., Kraitman, R., Gronovich, N., Shulamit Ginat, K., Abdalrhman, M., Copenhagen-Glazer, S., Nir-Paz, R., & Hazan, R. (2020). The Israeli Phage Bank (IPB). *Antibiotics*, 9(5), 269. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050269>.
110. Zhang, X., Zhang, C., Liang, C., Li, B., Meng, F., & Ai, Y. (2022). CRISPR–cas9 based bacteriophage genome editing. *Microbiology Spectrum*, 10(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00820-22/>

111. Zyman, A., Górski, A., & Międzybrodzki, R. (2022). Phage therapy of wound-associated infections. *Folia Microbiologica*, 67(2), 193-201. <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00946-1>.

РОЗДІЛ 3. ВИКОРИСТАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ У БІОТЕХНОЛОГІЇ

Біотехнологія є синтезом біологічних, хімічних і технічних наук, і передбачає використання живих організмів, клітин, біологічних систем і процесів у виробництві. Ультимативною метою будь-якого біотехнологічного виробництва є отримання органічного продукту. Найчастіше таким продуктом виступають певні сполуки, які неможливо, небезпечно або невигідно отримувати іншим шляхом.

Сучасна біотехнологія дуже тісно пов'язана із генетичною модифікацією існуючих організмів або, фактично, створенням штучних організмів із заданими властивостями (наприклад, стійкість рослин чи бактерій до гербіцидів чи антибіотиків, синтез бактеріями інтерферону та ін.). Очевидно, що такі маніпуляції (окрім етичних питань, які не є метою даного огляду) потребують достеменних знань у галузі генетики, біохімії та молекулярної біології конкретних об'єктів, а також розроблених методик для роботи з їх ДНК (ампліфікації, рестрикції, секвенування та ін.).

Історично склалося так, що молекулярна біологія та біотехнологія завдячують більшості своїх успіхів саме вірусам, на моделі яких були не тільки відпрацьовані різноманітні методики (зокрема, секвенування білків та нуклеїнових кислот), але й створені і підтверджені важливі гіпотези та теорії. Наприклад, перші вирішальні експерименти, які підтвердили, що носієм спадкової інформації є нуклеїнова кислота, були проведені саме з РНК вірусу тютюнової мозаїки (1956 р.), капсидний білок якого був першим секвенованим білком (1960 р.).

Завдяки множинності інфекції та короткотривалому життєвому циклу віруси, а особливо віруси бактерій – бактеріофаги – виявилися зручними об'єктами у генетиці, а пізніше – й у генетичній інженерії, яка сьогодні є основою абсолютної більшості біотехнологічних процесів. Врешті, завдяки множинності інфекції, короткому інкубаційному періоду та простій структурі геному саме бактеріофаги

свого часу стали першими модельними об'єктами для розробки та валідації технологій секвенування нуклеїнових кислот. До прикладу, вперше у світі послідовність ДНК повного гена була визначена на моделі бактеріофага MS2 Уолтером Файерсом ще у 1972 р. (Min Jou et al., 1972), тоді як лише п'ять років по тому Сенгером вже був вперше секвенований повний геном живого організму – бактеріофага PhiX174 (Sanger et al., 1977). Згодом бактеріофаг PhiX174 (точніше, його очищена ДНК) став класичним внутрішнім позитивним контролем успішності секвенування інших генетичних послідовностей в лабораторіях по всьому світу. Аналогічним чином, при розробці технології полімеразної ланцюгової реакції таким внутрішнім позитивним контролем стала ДНК іншого відомого вірусу – бактеріофага λ (Pham et al., 1998).

Варто зазначити, що всі ці віруси інфікують одну з найбільш типових та досліджених бактерій – *Escherichia coli*, яка вже тоді була і сьогодні залишається класичною моделлю не лише для досліджень, але й для біотехнологічного виробництва рекомбінантних продуктів, скринінгу потенційно активних речовин та ін.

3.1. Бактеріофаги як вектори

З викладеного вище зрозуміло, що без вірусів та вірусології як науки розвиток молекулярної біології загалом та генетичної інженерії як одного з її прикладних напрямків були б неможливі.

Генетичною інженерією (або технологією рекомбінантних ДНК) називають сукупність експериментальних процедур, що дають можливість здійснювати перенесення генетичного матеріалу з одного організму в інший. З хімічної точки зору ДНК усіх живих істот практично однотипні. Таким чином, при роботі в системі *in vitro* можна об'єднати фрагменти генетичного матеріалу практично будь-яких організмів. Звичайна генетична рекомбінація потребує гомології послідовностей ДНК, а отже, може відбуватися лише в межах одного або

близькоспоріднених видів. Рекомбінація *in vitro* відрізняється тим, що відкриває можливості для перенесення генів у межах усіх живих організмів.

Віруси можна розглядати як природні системи горизонтального перенесення генів. Ще у 1952 р. на прикладі помірної бактеріофага P22 стало відомо, що фаги здатні до так званої загальної трансдукції (Zinder, Lederberg, 1952), а вже за чотири роки було відкрито явище специфічної трансдукції бактеріальних генів помірним фагом λ в клітинах *E. coli* (Morse et al., 1956).

Отже, віруси бактерій є природними векторами (від лат. *vector* – той, що несе; носій; переносник) генетичної інформації у світі прокариотів. Логічно, що у сучасній генетичній інженерії віруси (або фрагменти їх геномів) і використовуються переважно як вектори для перенесення рекомбінантної ДНК у відповідну клітину. На основі бактеріофагів, вірусів безхребетних та хребетних тварин і людини створено цілу низку векторів для клонування нуклеїнових кислот та отримання рекомбінантних білків. Перший фаговий вектор (генетично модифікований фаг λ) був сконструйований у 1974 р. (Murray, Murray, 1974).

Часто при створенні різноманітних генетичних конструкцій навіть невірусної природи (плазмід, фагмід та інших різновидів векторів) використовуються суто вірусні регулятори реплікації, транскрипції і трансляції. Також не можна уявити технології рекомбінантних ДНК без використання вірусних ферментів, таких як зворотна транскриптаза ретровірусів, ДНК- та РНК-полімерази, лігаза фага T4 тощо.

Окрім того, в сучасних генно-інженерних технологіях для виявлення рекомбінантних молекул (генетичних конструкцій) набули застосування гени деяких вірусів, наприклад *kil*-гени фага Mu, ген тимідинкінази вірусу герпесу.

Зрештою геноми рекомбінантних вірусів використовуються для дослідження процесів регуляції реплікації, транскрипції та трансляції, ідентифікації відповідних регуляторів, а також для визначення нуклеотидних послідовностей молекул ДНК.

Не зважаючи на те, що більшість біотехнологічних процесів зводяться до синтезу «еукаріотичних» продуктів, на практиці більша частина або взагалі вся

робота може проводитися в прокаріотичних системах із залученням модельних бактерій. Сьогодні практично будь-яку послідовність ДНК можна клонувати в бактеріальних клітинах. Переважно для маніпуляцій з рекомбінантними ДНК використовуються клітини *E. coli*. Тому навіть нині бактеріофаги та гібридні вектори на їх основі (фагміди) залишаються вкрай затребуваними.

У класичному розумінні фагові вектори складаються з частини або взагалі повного генома бактеріофага, в який вставлена ДНК, що кодує цільовий білок або пептид. Як правило, залишок генома фага залишається незмінним і забезпечує інші генні продукти, необхідні для життєвого циклу фага (Lennarz, Lane, 2013).

За застосуванням розрізняють наступні вектори загалом і на основі бактеріофагів зокрема:

- **клонувальні** – використовуються для клонування будь-яких фрагментів ДНК.
- **експресійні** – використовуються для синтезу мРНК і білків.

Клонувальний вектор – це вірус, що забезпечує «перенесення» і реплікацію чужорідної ДНК у вигляді **інертної** частини свого генома в клітині-реципієнті. Тобто це **технічний** вектор для генетичних маніпуляцій і накопичення цільової ДНК (в т.ч., створення бібліотек ДНК на основі векторів), наявність якого в клітині **не веде** до транскрипції такої ДНК та утворення цільового білкового/пептидного продукту. За визначенням більшість векторів у біотехнології є клонувальними, оскільки саме з переносу потрібного гена до потрібного вектора і потім до потрібної клітини починається будь-який біотехнологічний процес, що передбачає створення генетично модифікованих організмів.

Натомість, **експресійний вектор** завжди спрямований на принаймні транскрипцію мРНК відповідних трансгенів (цільових генів, вставлених у вектор), а найчастіше має на меті синтез фінального білкового продукту (білка чи пептида). Очевидно, що вимоги до експресійного вектора значно вищі, бо окрім власне трансгена він повинен також мати засоби контролю експресії (промотор

та термінатор для відповідної клітинної системи), а нерідко – і трансляції (сайт зв'язування рибосом та ін.). Також експресійні вектори висувають значно суворіші вимоги до клітин-реципієнтів, оскільки останні повинні забезпечувати не просто існування та/чи реплікацію вектора як молекули ДНК, але й ще транскрипцію його генів разом із трансгеном (-ами), що спричинює значне метаболічне навантаження на клітинні синтетичні системи.

Фагові вектори створюють на базі ДНК бактеріофагів таким чином, щоб зберігалася інформація, яка забезпечує збірку віріонів *in vivo*.

Особливості та переваги фагових векторів:

1. При використанні фагових векторів життєздатним продуктом, що містить рекомбінантну ДНК, є **популяція віріонів бактеріофага**, які морфологічно повністю ідентичні вірусним частинкам вихідного вірусу;
2. Не потрібно проводити клонування і відбір клітин, які містять вектор – рекомбінантний фаговий геном можна клонувати безпосередньо (на газоні чутливих клітин утворюються бляшки);
3. Рекомбінантні фагові геноми можна внести в клітини пермісивного хазяя шляхом трансфекції (у вигляді ізольованої ДНК) чи інфекції (у складі реконструйованих вірусних часток, що зберігають інфекційність);
4. Фагові вектори ефективніші за плазмідні вектори при клонуванні великих вставок ДНК, оскільки віруси мають природний спосіб проникнення до чутливої клітини шляхом її інфікування, тоді як плазмідні вектори потрібно штучно вводити в клітини, ефективність чого обернено пропорційна розміру плазміди;
5. Виявляти потрібну вставку ДНК з негативних колоній фага легше, ніж із бактеріальних колоній.

Фаг λ можна вважати природним вектором перенесення чужорідної ДНК. Розмір геному фага складає 48,5 т.п.н. Приблизно третина генома між 20 т.п.н. та 38 т.п.н. містить гени, необхідні для лізогенізації клітини, але не важливі для літичної інфекції. Неістотною також є ділянка *nin* розміром близько 3,5 т.п.н., розташована між генами *P* і *Q*.

Фагові вектори поділяють на:

- **вектори включення** – несуть один сайт для обраної рестриктази. Довжина геному такого вектора дорівнює сумі довжин ДНК вектора і ДНК вставки (вектор λ_{gt} , наведений на рис. 3.1);
- **вектори заміщення** – несуть два сайти для обраної рестриктази (чи, частіше, двох різних рестриктаз). Фрагмент ДНК, який клонується, вбудовується замість обмеженого цими рестрикційними сайтами буферного («баластного») фрагмента (вектор λ_{781} , наведений на рис.3.1).

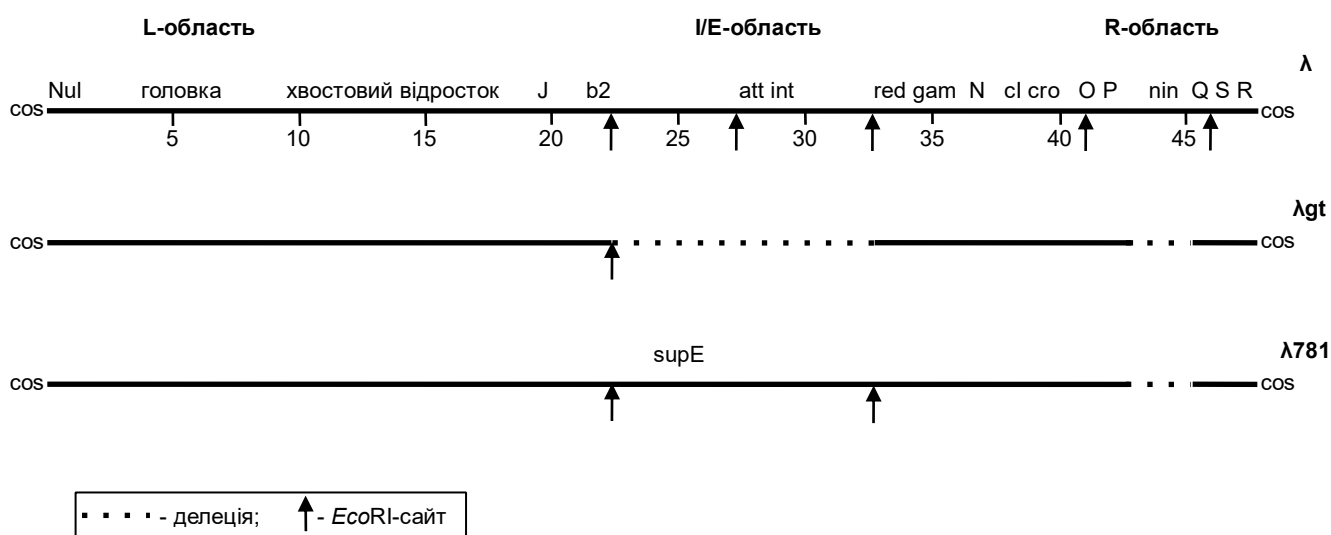


Рис. 3.1 – Генетична карта фага λ (вгорі) та деяких векторів, створених на його основі (λ_{gt} та λ_{781}): L-область – «ліве плече» фагової ДНК, містить переважно гени структурних білків; R-область «праве плече» фагової ДНК, містить переважно гени літичного циклу розвитку фага; I/E - центральна ділянка фагової ДНК, несуттєва для літичного циклу розвитку вірусу, яка містить гени, що відповідають за інтеграцію профага у бактеріальну ДНК і його вирізання; *supE* – бактеріальний ген, супресор амбер-мутації в гені *lac E. coli*

Стратегія створення **векторів заміщення** на основі фагу λ полягає в тому, що центральна область, несуттєва для літичного циклу, замінюється вставкою (тобто фаговий вектор втрачає здатність до лізогенізації чутливих клітин, але

зберігає здатність до їх лізису з виходом популяції новоутворених **генетично модифікованих** віріонів з клітини).

Для векторів на основі фагу λ , як і для переважної більшості інших вірусних векторів, існує обмеження розміру фрагмента-вставки через необхідність подальшої упаковки їх геномів у капсиди (таке обмеження може бути відсутнє у випадку створення гібридного вектору на основі геному фага і плазмідної ДНК – фагміди). Для фага λ максимальний розмір ДНК, що може запакуватися в головку, становить ~ 52 т.п.н., а мінімальний – ~ 38 т.п.н. Гени, необхідні для літичного розвитку фага λ , займають ~ 29 т.п.н. Отже, максимальна можлива ємність вектора заміщення на основі фагу λ становить ~ 23 т.п.н.

Натомість, у випадку **векторів включення** на основі фагу λ (який міститиме всі «рідні» гени вихідного фага та додаткову цільову ДНК) розмір вставки (трансгена) може складати до ~ 4 т.п.н.

Як видно з наведеного вище, фаг λ не лише був першим фагом, на основі якого був створений вірусний вектор, але й сьогодні залишається вельми затребуваним. Тим не менш, це не єдиний приклад бактеріофага, який набув такого значення у генній інженерії. Іншою оазою для біотехнологів стали іновіруси – ниткоподібні бактеріофаги M13 та споріднені з ним фаги fd і fl. Геном іновірусів представлений одноланцюговою ДНК, через що історично вони були ідеальною моделлю для клонування одноланцюгових ДНК і безпосереднього використання з метою визначення нуклеотидної послідовності (сиквенування). На сьогодні саме фаг M13 є, безперечно, одним з найбільш затребуваних у біотехнології, оскільки саме цей вірус дав початок технології **фагового дисплею** (phage display), про яку детально йтиметься нижче.

Геном бактеріофага M13 значно менший за геном фага λ і складається з кільцевої одноланцюгової ДНК розміром лише $\sim 6,4$ т.п.н., яка містить 11 генів, з яких 3 залучені до реплікації ДНК, 5 – кодують структурні білки капсиду, а ще 3 гени кодують білки, необхідні для збірки (морфогенезу) капсиду (рис. 3.2).

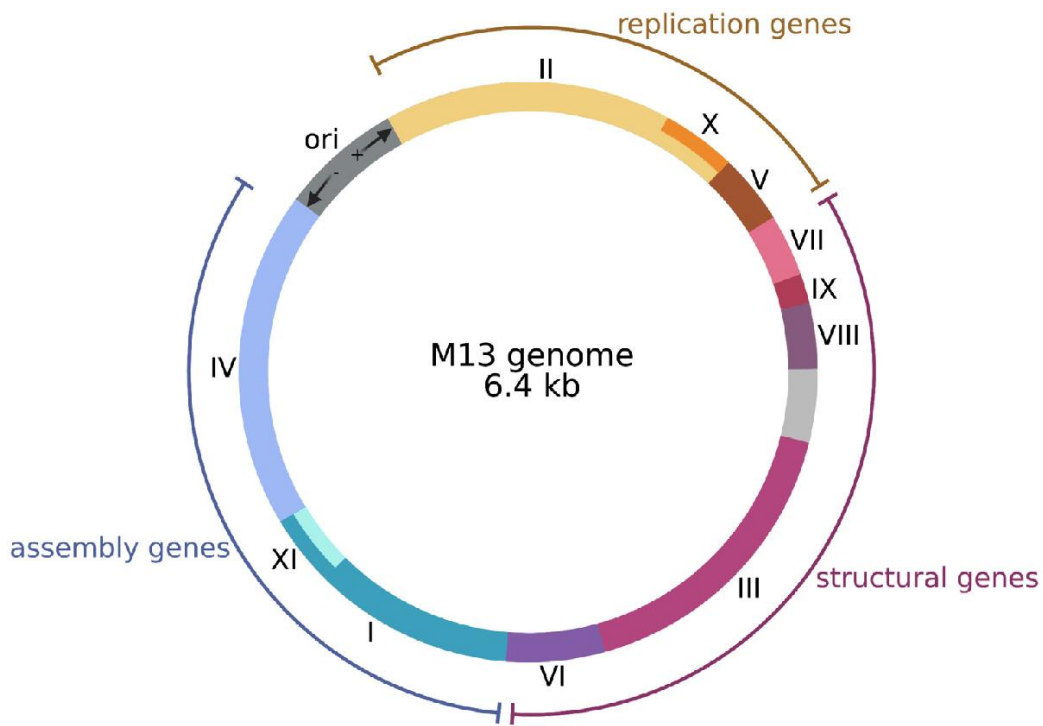


Рис. 3.2 – Організація геному фага M13. Геном бактеріофага M13 містить 11 генів, які можна класифікувати на три окремі групи залежно від функції кодованих білків: структура капсиду (гени III, VI, VII, VIII, IX), реплікація ДНК (гени II, V, X) і збірка фагів (гени I, IV, XI) (Arap 2005; Hamzeh-Mivehroud et al., 2013)

Віріон фага M13 представлений білковим ниткоподібним трубчастим капсидом $\sim 900\text{-}1000 \times 6$ нм, побудованим з мажорного білка pVIII (~ 2700 субодиниць) та мінорних білків pIII, pVI, pVII та pIX (~ 5 субодиниць кожного з боків вірусної частинки), всередині якої знаходиться молекула кільцевої одноланцюгової ДНК. Важливо, що розмір будь-якого нитко- чи паличкоподібного віріона залежить виключно від довжини геному вірусу і наявних капсидних білків у клітині. Таким чином, збільшення розміру геному через клонування в нього трансгена до певних меж не є проблемою для збірки вірусу – капсид спіральної симетрії буде збиратися навколо геному, аж поки він увесь не буде вкритий білковими субодиницями. Це дозволяє використовувати фаг M13 та інші ниткоподібні фаги (та деякі ниткоподібні віруси рослин у генетичній інженерії рослин) для клонування відносно великих фрагментів цільової ДНК. Іншою перевагою використання іновірусів у біотехнології є те, що

вони індукують у чутливих клітинах особливий тип інфекції («хронічну» інфекцію), коли клітина залишається позитивним продуцентом вірусу, і вірусні частинки секретуються з клітини постійно без її лізису. При цьому, однак, такі віруси затримують ріст бактеріальної культури на 25-50%.

Виділяють наступні переваги фага M13 та інших подібних фагів для створення векторів:

1. У геномі фага між генами *II* і *IV* розташовується міжгенна ділянка – спейсер, куди можна вбудовувати чужорідні гени;
2. Розмір капсиду залежить від розміру ДНК, що упаковується, тобто можна клонувати великі фрагменти;
3. M13 продукується клітиною постійно, його концентрація може сягати 10^{12} часток в 1 мл;
4. У складі вектора на основі фага M13 зручно клонувати одноланцюгову ДНК для визначення її нуклеотидної послідовності.

Недоліком векторів на основі фага M13 є нестабільність ДНК, що в них клонується, особливо у випадку великих вставок. Це пов'язано з тим, що фаги з великими вставками мають значно триваліший життєвий цикл.

Конструювання векторних ДНК здійснюється з використанням дволанцюгових реплікативних форм. Стратегія створення векторів на основі фага M13 полягає у вбудовуванні в спейсерну ділянку унікальних сайтів рестрикції та селективних маркерів.

Широкого розповсюдження набули вектори серії M13mp, в яких селективною ознакою є утворення активної форми β -галактозидази, наступне розщеплення субстрату X-Gal та утворення продукту синього кольору у присутності відповідного індуктора.

Введення в бактеріальні клітини векторної ДНК здійснюється трансфекцією клітин, при цьому двохланцюгова ДНК трансфікується ефективніше за одноланцюгову.

На основі споріднених з M13 фагів fd і fl (гомологія ~97%) також створено ряд векторів для клітин *E. coli*. Використані при цьому методичні підходи в цілому збігаються з такими для фага M13.

3.2. Гібридні вектори на основі бактеріофагів і плазмід

Існує декілька форм гібридних векторів, які поєднують у собі окремі властивості та структурні елементи як геномів бактеріофагів, так і плазмід. Основними серед них є **косміди**, **фагміди** та **фазміди**. Сенс їх створення полягав у поєднанні переваг та особливостей кожного з типів векторів для створення платформи, зручної для виконання конкретних задач.

Косміда – один із гібридних векторів, сконструйований на основі плазмід, в яку вбудовано *cos*-сайти бактеріофага λ (звідки і назва) (Hohn, Murray, 1977). Такі за своєю суттю плазмідні вектори здатні пакуватися *in vitro* у фаговий капсид за рахунок *cos*-сайтів і потрапляти в клітину шляхом інфекції (у вигляді віріона), проте їхня реплікація відбувається за плазмідним типом.

Розмір космід у середньому становить близько 5 т.п.н., отже їх можна використовувати для клонування фрагментів ДНК розміром від 33 до 47 т.п.н. (корисний розмір вставки визначається розміром ДНК, яка може упакуватися у головку фага λ) (рис. 3.3). Космідні вектори часто використовуються для створення банків генів.

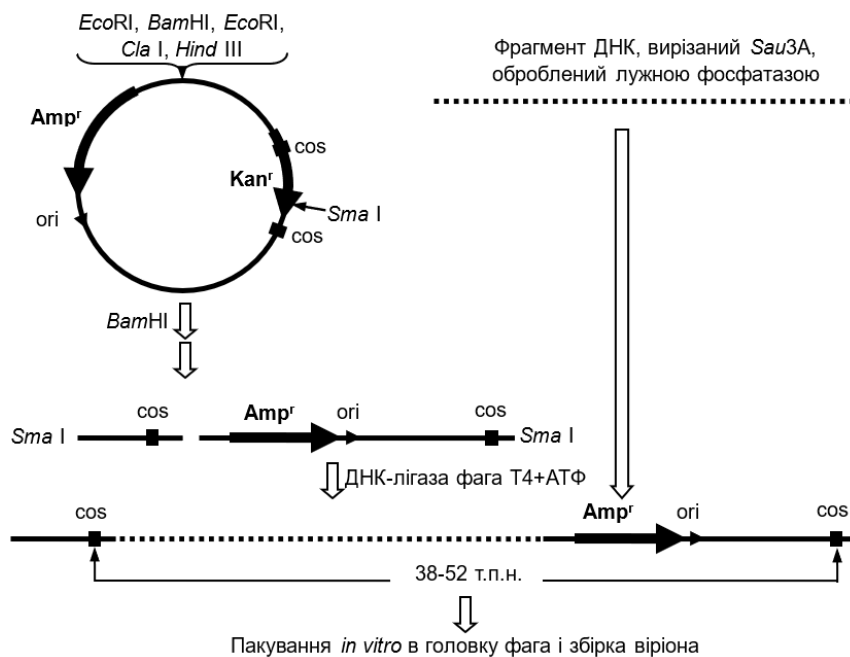


Рис. 3.3 – Схема створення рекомбінантної косміди і її пакування у фаговий капсид

Фагміда – плазмідний вектор, який містить *ori*-сайт ниткоподібного бактеріофага, зазвичай M13 або λ . Вектори такого типу отримують включенням до плазмідного вектора міжгенної (спейсерної) ділянки фагів, яка містить *pac*-сайт, необхідний для морфогенезу фагових віріонів, та сайти *ori*(+) і *ori*(-). У присутності фага-помічника фагміди здатні реплікуватися з *ori*(+)-сайта як фагові ДНК і пакуватися у вірусний капсид. Таким чином, за допомогою фагмід фрагмент ДНК, що клонується, може бути отриманий в одно- і двохланцюговій формах. На відміну від векторів M13 *mp*, у фагмідних векторах можна стабільно клонувати великі фрагменти ДНК (Wilson, Walker, 2010). Фагміди часто використовуються у технології фагового дисплею, про що йтиметься нижче.

Фазміда – гібрид фага і плазміди, здатний існувати в клітині і у вигляді фага, і у вигляді плазміди (Qi et al., 2012). Фазміди не є виключно штучною конструкцією. Наприклад, бактеріофаг P1 може розвиватися в клітинах *E. coli* літичним шляхом або підтримуватися у вигляді низькокопійної плазміди завдяки наявності двох реплікаторів (точок *ori*): *oriL* – для літичного розвитку та *oriR* – для плазмідного.

У фазмідних векторах поєднуються корисні властивості фагових і плазмідних векторів. Сучасні фазмідні вектори складаються з лінеарізованої плазмиди, фланкованої сегментами генома фага (наприклад, бактеріофага λ), які містять усі гени, необхідні для літичної інфекції. На рис. 3.4 наведено генетичну карту фазміди λ pMYF131.

Модифікація правого плеча фага λ полягає у видаленні 2,8 т.п.н. в ділянці *nin* та зміні гена *cI* на чутливий до температури *cI^{ts}*. Між L- та R-областями інтегрована плазміда pUC19. Отже, при температурі 28-30°C функціонуватиме плазмідний реплікатор, а при підвищенні температури до 42°C – фаговий. Сумарна довжина фазміди – ~33,3 т.п.н. – недостатня для її пакування в мономерній формі і надто велика для пакування димерів в головку фага λ (для фага λ максимальний розмір ДНК, що може запакуватися в головку, становить ~52 т.п.н., а мінімальний – ~38 т.п.н.). Тому негативні колонії можуть утворювати лише рекомбінантні молекули.

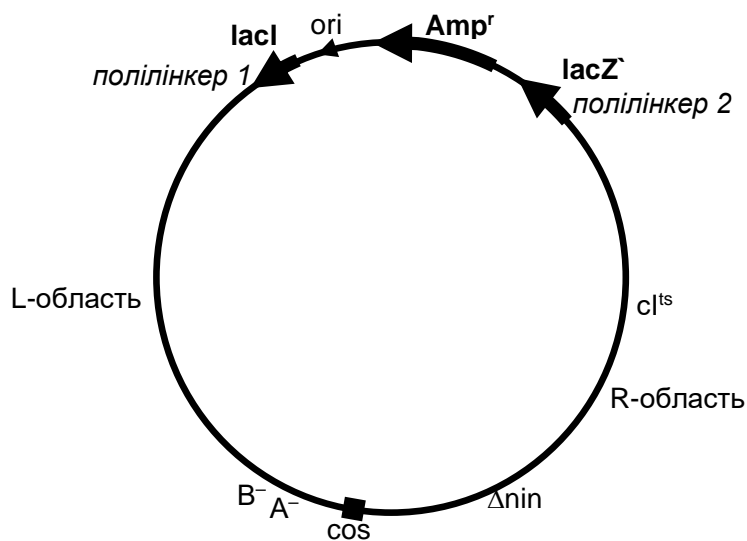


Рис. 3.4 – Генетична карта фазмідного вектора λ pMYF131 (полілінкер 1: *Bam*HI, *Xba*I, *Sal*I, *Pst*I, *Sph*I, *Hind*III; полілінкер 2: *Bam*HI, *Sma*I, *Kpn*I, *Sac*I, *Eco*RI)

Фазмідні вектори, як і фагові, використовуються для клонування геномних і кДНК. Ефективність пакування рекомбінантних фазмід у фаговий капсид з

наступним інфікуванням бактеріальних клітин може перевищувати ефективність їх трансформації плазмідами приблизно на два порядки.

3.3. Експресійні вектори на основі бактеріофагів

Основним завданням біотехнологічного процесу є отримання кінцевого продукту, найчастіше – білку. Слід зауважити, що сам факт отримання рекомбінантної ДНК та її успішного введення в клітину ще не означає, що вбудований ген буде експресуватися.

Експресійний вектор – система, що забезпечує експресію, тобто транскрипцію і трансляцію трансгена протягом певного часу у пермісивній клітинній системі. Кожній експресійній системі притаманні свої переваги і недоліки. Вибір тієї чи іншої системи обумовлюється природою та бажаними властивостями кінцевого продукту (біологічна активність, розчинність, здатність секретуватися тощо).

Відмінністю експресійних векторів від клонувальних є не просто наявність цільового трансгена, який переноситиметься до чутливої клітинної системи, а забезпечення його ефективної експресії. Отже, трансген має бути представлений у такому «середовищі», яке б ефективно розпізнавалося і транскрибувалося клітинними ДНК-залежними РНК-полімеразами, а надалі отримана мРНК транслювалася на рибосомах. Отож, ультимативним результатом використання експресійних фагових векторів є накопичення у клітині/позаклітинному середовищі цільового і функціонального білкового продукту, який надалі можна буде виділити та очистити з клітин/культурального середовища для подальшого використання.

Експресійна касета – конструкція, що включає промотор (P), сайт зв'язування рибосом (rbs) та термінатор (t) транскрипції, специфічні для тих клітин, в яких має відбуватися експресія (природа клітин визначає природу цих генетичних структур). Між сайтом зв'язування рибосом і термінатором

знаходиться полілінкер, куди лігується трансген (рис. 3.5). Промотор забезпечує приєднання ДНК-залежної РНК-полімери, сайт зв'язування рибосом (лідерна частина продукту транскрипції) – подальшу ефективну трансляцію мРНК, а термінатор – термінацію транскрипції. Вбудовування трансгена в експресійну касету, як правило, призводить до його експресії у відповідному типі клітин.



Рис. 3.5 – Схема будови експресійної касети

Вектори, створені на основі бактеріофагів, можуть забезпечувати не лише клонування, а й експресію трансгенів. Фагові вектори здатні лізувати клітину-продуцент, вивільняючи внутрішньоклітинні білки, що спрощує і здешевлює отримання кінцевого продукту. При цьому векторна ДНК передається наступній клітині при подальшій інфекції. Зокрема, як експресійні можуть бути використані вектори λ gt11 та λ ZAP на основі фагу λ та численні вектори на основі фагів T7 та M13.

3.4. Фаговий дисплей

Фаговий дисплей – технологія синтезу та накопичення рекомбінантного білка у прокаріотичних клітинах шляхом зливання його гену з геном структурного білка (капсидного білка) бактеріофага. Таким чином, створюється «химерний» ген, експресія якого веде до синтезу химерної білкової молекули (структурного білка вірусу у поєднанні з цільовим білковим продуктом, який злитий із N- чи С-кінцем вихідного вірусного білка). Такий злитий білок надалі буде «відображений» на поверхні капсиду фага.

«Відображення» (надалі «дисплей», оскільки така назва вже прижилася у літературі) пептидів і білків на поверхні бактеріофагів є потужним методом ідентифікації специфічних лігандів. Сьогодні технологія фагового дисплея є добре відомим методом, який революціонізував наші можливості до відбору

потрібних цільових молекул. Ця технологія, яка була представлена в 1985 р. завдяки дисплею пептидів на поверхні ниткоподібного бактеріофага M13 (Smith, 1985), зараз наймовірно поширилася, торкнувшись усіх галузей науки. Доступно безліч розроблених систем дисплея, в тому числі комерційних, і фактично будь-які пептиди можуть успішно демонструватися на поверхні фагів та використовуватися в різних галузях. Потужність технології фагового дисплею впливає з того факту, що існує прямий фізичний зв'язок між пептидом або білком, що демонструється на поверхні носія (вірусної частинки), та ДНК, що кодує такий пептид. Крім того, оскільки цільова вірусна частинка може реплікуватися (адже зберігає свої інфекційні властивості), то амінокислотний склад демонстрованої білкової молекули можна розшифрувати шляхом секвенування ДНК фага (Phages..., 2005).

Як зазначалося вище, для дисплею використовуються фагові вектори із химерним геном (ген структурного білка віруса зливається із нуклеотидною послідовністю, яка кодує цільовий пептид/білок), після чого утворюється рекомбінантний злитий білок. Отож, за класичним визначенням такі фагові вектори є **експресійними** векторами, адже індукують появу чужорідного білкового продукту у клітині-хазяї. Тим не менш, існує значна відмінність векторів, що застосовуються для фагового дисплея, від класичних експресійних векторів. Останні містять у некритичній ділянці геному чужорідний ген під окремим промотором та з окремим термінатором (див. рис.3.5 вище), і результатом експресії такого гена у пермісивній клітині буде функціональний білковий продукт, який виділяється у клітину чи культуральне середовище. У випадку векторів, що застосовуються для фагового дисплея, окремого білкового продукту у клітині не утворюється. Натомість, модифікується існуючий вірусний ген для синтезу химерного/злитого білка (частково вірусного, а частково – чужорідного), який надалі експонуватиметься виключно на поверхні вірусних частинок і не буде виділятися у вигляді окремого продукту у клітину чи культуральне середовище. Відповідно, окрема експресійна касета для трансгена як така відсутня, і експресія химерного гена регулюється промотором

відповідного гена фага (або ж опосередковується модифікованим/іншим промотором замість нативного фагового промотора). Таким чином, результатом застосування фагового дисплея є не окремий пептид/білок, а популяція інфекційних рекомбінантних (генетично модифікованих) фагових частинок, що експонують на своїй поверхні цільовий білковий продукт.

Фаговий дисплей використовується головним чином для вивчення білок-білкових, білок-пептидних та ДНК-білкових взаємодій. Завдяки цьому технологія фагового дисплея набула широкого використання у галузі пошуку нових активних антитіл та створення бібліотек антитіл, вивчення імунної відповіді, отримання терапевтичних антитіл та розробки ліків протиракової та протизапальної дії. Також фагові частинки використовуються в діагностичних тест-системах багатьох вірусних захворювань, при розробці біосенсорів, для ідентифікації пухлиноспецифічних маркерів для діагнозу і прогнозу ракових захворювань та ін.

3.4.1. Принцип створення векторів для фагового дисплея

Методика створення фагових векторів для дисплея цільових пептидів чи білків мало чим відрізняється від технологій створення інших фагових векторів. Основна відмінність полягає у тому, що нуклеотидну послідовність, що кодує цільовий пептид чи білок, потрібно злити із 5'- чи 3'-кінцем відповідного структурного гена віруса таким чином, що це не перешкоджало морфогенезу капсиду, виходу вірусних частинок з клітини та їх інфекційним властивостям.

При розробці перших векторів для фагового дисплея зазвичай використовували відомі нуклеотидні послідовності (які кодували пептиди з наперед відомими амінокислотними послідовностями), які зливали із відомими вірусними генами. Сьогодні через значне масштабування такої технології зазвичай використовують цілі бібліотеки кДНК з рандомними послідовностями. Таким чином, утворюються вірусні частинки, які експонують різні пептиди з невідомими амінокислотними послідовностями. Це дозволяє дуже швидко і

дешево проводити скринінг мільйонів (а іноді і мільярдів) потенційно активних сполук і секвенувати надалі лише ті з них, які проявили афінність до певного ліганду. Такий підхід потребує системи селекції потрібних рекомбінантних вірусів, яка отримала назву **біопанінга**.

Біопанінг – це технологія афінної селекції, яка дозволяє відбирати пептиди, які зв'язуються з певною мішенню (лігандом) (Ehrlich et al., 2000). Усі пептидні послідовності, отримані в результаті біопанінгу з використанням комбінаторних пептидних бібліотек, зберігаються в спеціальній базі даних з вільним доступом BDB (He et al., 2016). Ця технологія також часто використовується для селекції специфічних антитіл.

Процес біопанінгу складається з наступних основних етапів: 1) підготовка бібліотек фагового дисплея (на рисунку нижче не показаний); 2) інкубація фагових частинок, що експонують **різні** пептиди, з цільовими лігандами і зв'язування з ними деяких афінних частинок; 3) видалення незв'язаних (неспецифічних до ліганду) вірусних частинок; 4) елюція зв'язаних (специфічних до ліганду) фагових частинок; 5) накопичення специфічних до ліганду (цільових) фагових частинок у пермісивній системі (зазвичай, 2-5 раундів в *E. coli*) і отримання генетично однорідної популяції віріонів; 6) перевірка афінності специфічних до ліганду (цільових) фагових частинок методом імуноферментного аналізу; 7) секвенування геному фага та визначення амінокислотної послідовності експонованого на ньому пептиду (-ів) (рис. 3.6).

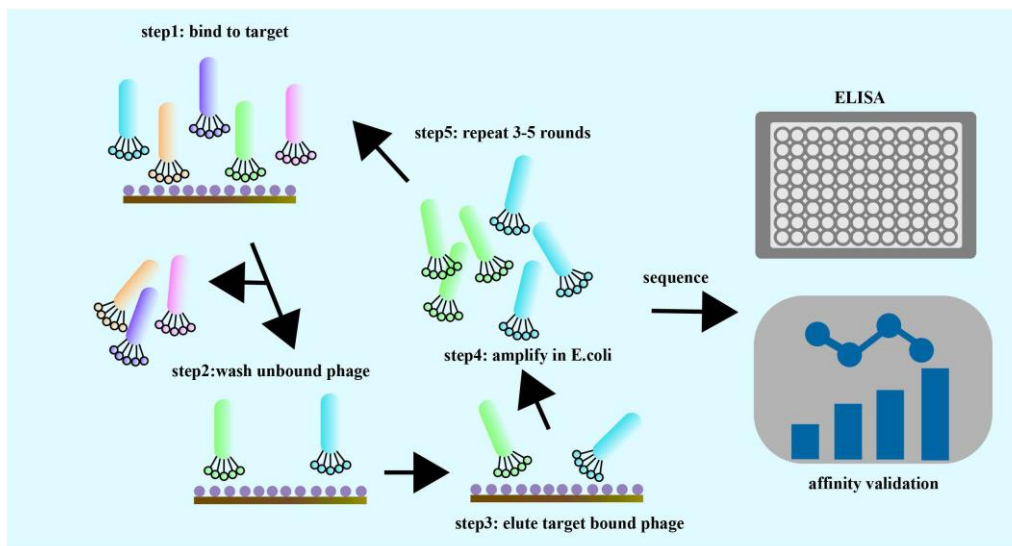


Рис. 3.6 – Загальні рекомендації щодо технології фагового дисплея та біопанінгу високоафінних пептидів. Процес біопанінгу використовується для вибору високоафінних пептидів, що зв’язуються з цільовою мішенню, зі складної суміші мільйонів-мільярдів пептидів, що відображаються на фагах у комбінаторній бібліотеці (Li et al., 2023)

3.4.2. Різні платформи фагового дисплею

Зі збільшенням реалізації потенціалу технології фагового дисплея з’являється необхідність у розробці таких платформ дисплея, які надають користувачеві гнучкість для роботи з різноманітним репертуаром пептидів і білків, що відрізняються за розміром і складом. Найпопулярнішою і, мабуть, найпростішою платформою для фагового дисплея історично є ниткоподібний бактеріофаг M13, у якому відбувається злиття цільового білка/пептида з мажорним капсидним білком gpVIII або з мінорним капсидним білком gpIII, а іноді – з іншими мінорними капсидними білками, такими як gpVI (Sidhu, 2001).

Проте певні недоліки та обмеження системи на основі фага M13 призвели до розробки альтернативних систем фагового дисплея з використанням таких бактеріофагів, як λ , T4 і T7, збірка віріонів яких відбувається у цитозолі клітини (на відміну від M13), а вихід – шляхом її лізису (Castagnoli et al., 2001). Кожна із систем має свої переваги і недоліки, що обговорюються нижче.

3.4.3. Система дисплея на основі бактеріофага M13

Ниткоподібний бактеріофаг M13 є найпопулярнішим і широко уживаним засобом для дисплея пептидів та білків. Ниткоподібні бактеріофаги класу Ff (fl, fd і M13) мають в якості геному кільцеву одноланцюгову ДНК, яка упакована в циліндричний капсид, що складається з кількох білків. В якості рецептора для інфікування ці фаги використовують F-пілі *Escherichia coli* і, таким чином, є специфічними для штамів *E. coli*, що містять F-плазмиду. Як згадувалося вище, геном фага містить 11 генів (I-XI), які кодують 11 функціональних білків (gpI-gpXI). З них gpVIII є мажорним капсидним білком, тоді як gpIII, gpVI, gpVII та gpIX – мінорними капсидними білками фага.

Збірка частинок фага M13 відбувається в периплазматичному просторі, де субодиниці мажорного капсидного білка gpVIII збираються навколо фагової ДНК, причому мінорні капсидні білки gpVII та gpIX присутні у кількості кількох субодиниць лише на кінці капсиду, що формується. Білок gpVIII продовжує полімеризуватися навколо ДНК, доки не буде досягнуто кінця геному, після чого збірка завершується додаванням декількох субодиниць мінорних капсидних білків gpVI та gpIII (Russel, M. 1993, Russel, M. 1995, Russel et al., 1997).

Було показано, що всі п'ять капсидних білків фага M13 підходять для функціонального дисплея. В більшості випадків ці білки толерують злиття з чужорідним пептидом як з N-, так і з C-кінця (Jespers et al., 1995, Gao et al., 1999). Три капсидних білка добре толерують злиття з чужорідними пептидами. Мажорний капсидний білок, gpVIII, здатний відображати сотні ідентичних копій пептидів на поверхні фага, тоді як мінорні білки (зокрема, gpIII) – до п'яти копій, а білок gpVI, окрім того, залишається функціонально активним лише у випадку злиття з чужорідними пептидами на його C-кінці.

Тим не менш, білки gpVIII і gpIII є найбільш популярними партнерами для фагового дисплея на основі фага M13. Для дисплея рекомбінантних білків (продуктів злиття вірусних білків gpIII та gpVIII з чужорідними білками/пептидами) на поверхні вірусної частинки послідовність ДНК, що кодує

цільовий чужорідний пептид, вставляється між послідовністю для сигнального пептиду та амінокінцевою кодуючою ділянкою зрілого капсидного білка. Така вставка призводить до експресії «злитого» (фузійного) білка, який спрямовується до периплазми та вбудовується в фагову частинку, що збирається. Врешті решт, утворюються інфекційні фагові частинки, які демонструють на своїй поверхні цільовий пептид (злитий з субодиницею капсидного білка фага), який є доступним для взаємодії з лігандами в навколишньому середовищі.

На основі фага M13 розроблено чимало зручних векторів для дисплея пептидів і білків, злитих з капсидними білками gpVIII і gpIII (Gupta et al., 1999). Ці векторні системи теоретично дозволяють експонувати три-п'ять копій чужорідного білка або пептиду у розрахунок на фагову частинку за допомогою мінорного капсидного білка (gpIII) або ж до 2700 копій за допомогою мажорного капсидного білка (gpVIII). Однак через можливість деградації злитого пептиду реальні цифри експонованих цільових пептидів, ймовірно, будуть нижчими. Крім того, мажорний капсидний білок не дозволяє експонувати пептиди розміром більше шести-восьми амінокислот (Greenwood et al., 1991). Вірогідно, це спостерігається через те, що більший експонований пептид перешкоджає збірці фагових частинок (Iannolo et al., 1995). Тому для дисплея на білках gpIII або gpVIII фага M13 часто використовуються гібридні системи (Felici et al., 1991, Greenwood et al., 1991). У таких системах «кістяк» (backbone) вектора походить від фагміди, що несе касету, яка складається з регульованого промотора, за яким слідує сигнальна послідовність і сайти клонування для вставки чужорідної ДНК на 5'-кінці гена, що кодує gpIII або gpVIII (рис. 3.7). Фагові частинки утворюються за рахунок інфікування нативним (нерекомбінантним) фагом клітин *E. coli*, попередньо трансформованих такою фагмідою. Під час збірки вірусних часток злиті білки, кодовані фагмідою, вбудовуються в частинки фага разом із нативними капсидними білками, що кодуються фагом-помічником (Corey et al., 1993).

Успіх будь-якої технології дисплея залежить від ефективності, з якою поліпептиди можуть експонуватися на поверхні фага. В ідеальній ситуації

цільовий пептид мав би експонуватися на кожній субодиниці вихідного вірусного білка (тобто, із 100%-ю щільністю), але фактичні показники бувають значно нижчими. Оскільки потреба у дисплеї пептидів з високою щільністю відчувається все більше (що обговорюється наприкінці даного розділу), постійно докладаються зусилля для покращення щільності дисплея у векторів M13 на основі генів *gpIII* та *gpVIII*. Зокрема, повідомлялося про помітні покращення фагмідних систем на основі гена *gpIII* в результаті використання варіантів фагів-помічників, які забезпечують відсутність або дуже низький рівень експресії *gpIII* «дикого» типу в селективних умовах (Rondot et al., 2001, Kramer et al., 2003). Однак, оскільки *gpIII* є мінорним капсидним білком і у вірусній частинці представлений у кількості п'яти субодиниць, то лише п'ять копій злитого білка і може бути експоновано на одній фаговій частинці.

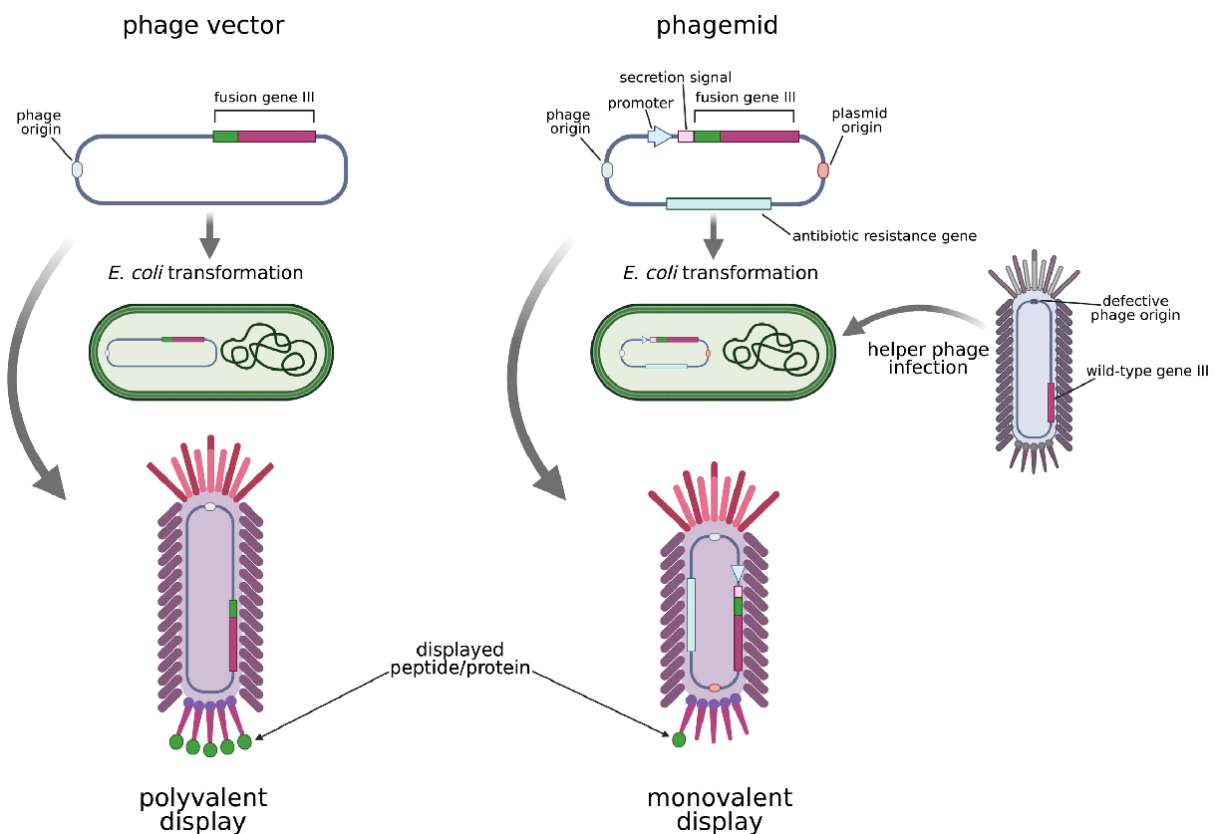


Рис. 3.7 – Порівняння систем фагового дисплея на основі фагового вектора M13 та фагміди. Основною відмінністю між фаговим вектором і фагмідою є щільність дисплея. Якщо фаговий вектор містить лише одну копію рекомбінантного гена, що кодує пептид, експонований на капсидному білку, то фаговий дисплей буде

завжди полівалентним (щільним) (ліворуч). Використання фагміди (праворуч) веде до нижчої щільності (яка у випадку використання білка рIII може бути моновалентною), оскільки фаг-помічник несе ген капсидного білка «дикого» типу, який зазвичай більш експресується ефективніше за рекомбінантний (злитий) білок (Jaroszewicz et al., 2022)

Іншим підходом до підвищення щільності дисплея білків, злитих з мажорним капсидним білком gpVIII у системі на основі фагмід, було виділення мутантних капсидних білків з підвищеною ефективністю експонування чужорідних пептидів (Sidhu et al., 2000). Для цього були створені бібліотеки мутантів gpVIII. Було виявлено, що N-кінцева частина білка була надзвичайно толерантною до амінокислотних замін, на відміну від C-кінцевої частини. Віріони, зібрані з таких мутантних субодиниць мажорного капсидного білка gpVIII, продемонстрували на кілька порядків більше зв'язування в імуноферментному аналізі у порівнянні з фаговими частинками, що експонують той самий білок, злитий з gpVIII «дикого» типу. Такі дослідження демонструють, що капсид фага M13 є надзвичайно пластичним і може бути модифікований для більш ефективного дисплея чужорідних білків.

В одному з досліджень система селекції з використанням бібліотеки M13 ДНК *Staphylococcus aureus* на основі мінорного капсидного білка gpIII призвела до отримання 20- 40% позитивних клонів після двох раундів селекції у біопанінгу. Коли ж кількість злитих білків була збільшена за допомогою дисплея на основі мажорного білка gpVIII, то частка потрібних клонів зросла до 75-100% (Jacobsson, Frykberg, 2001).

Система M13, хоч і надзвичайно популярна через простоту роботи з нею (завдяки малому розміру генома фага, одноланцюговій ДНК, ...), має кілька недоліків. Вимога щодо периплазматичної секреції експонованого пептиду накладає обмеження на репертуар, а особливо на розмір послідовностей, які можуть бути ефективно представлені на поверхні вірусної частинки. Крім того, у системах на основі фага M13 не вдалося досягнути стабільної щільності

дисплея в об'ємі кількох сотень копій різноманітних пептидів чи білків. Використання векторів на основі фага M13 для дисплея бібліотек кДНК також не набуло достатнього поширення через неможливість ефективного дисплея пептидів на С-кінцевій частині капсидних білків. Останнім часом набули широкого використання альтернативні системи на основі фагів із значно більшим геномом, – T7, T4 і λ .

3.4.4. Система дисплея на основі бактеріофага T7

T7 – це фаг із двохланцюговою ДНК, збірка якого відбувається всередині клітин *E. coli*, а вихід – шляхом лізису (Dunn, Studier, 1983) (на відміну від фага M13). Система дисплея на основі бактеріофага T7 дозволяє експонувати пептиди довжиною до 50 амінокислот у високій кількості копій (415 на фагову частинку), або пептиди чи білки довжиною до 1200 амінокислот у низькій кількості копій (від 0,1 до 1 на фагову частинку). У системі дисплея T7Select (пропонується компанією Novagen) використовується капсидний білок T7 для дисплея пептидів або білків на поверхні фага (Rosenberg et al., 1996). Капсидний білок T7 існує у двох формах: 10A (344 амінокислоти) і 10B (397 амінокислот), і присутній у вигляді 415 копій на капсид. Білок 10B утворюється шляхом трансляційного зсуву рамки зчитування в амінокислоті 341 білка 10A. В системі T7Select існує два основних типи векторів для фагового дисплея, а саме вектор T7Select 415-1 для дисплея високої кількості копій пептидів та вектори T7Select-1 і -2 для дисплея пептидів з низькою кількістю копій або більших за розміром білків.

Вектор T7Select 415 використовується для дисплея функціональних пептидів довжиною до 39 амінокислот. Експресія капсидного гена T7Select 415 контролюється сильним фаговим промотором ($\phi 10$), а сайт ініціації трансляції (S10) аналогічний такому у фага «дикого» типу. Злитий з пептидом капсидний білок під час інфекції виробляється у великій кількості. Капсид фага повністю складається зі злитого капсидного білка, завдяки чому на поверхні фага відображається 415 копій пептиду. Дисплейний вектор T7Select-1 з низьким

числом копій не містить промотору гена капсидного білка, а сайт ініціації трансляції був змінений. мРНК гена капсидного білка ще транскрибується завдяки фаговим промоторам, розташованим перед даним геном, однак це призводить до синтезу значно меншої кількості капсидного білка. Фаг T7Select-1 вирощують на комплементарних клітинах-хазяях (BLT 5403 або BLT 5615), які забезпечують синтез великої кількості капсидного білка 10A, кодованого плазмідною (як і у випадку з векторами на основі фага M13, йдеться про фагмідну систему).

Система T7Select 415 використовується для дисплея пептидів довжиною 10-39 амінокислотних залишків із високою щільністю (кількістю копій) (415 на фагову частинку). Вектори T7Select-1 використовуються для дисплея пептидів і білків у низькій щільності (кількості копій). Кількість копій на фагову частинку, виміряна за допомогою вестерн-блотингу, становила 0,5 для білка Tag вірусу простого герпесу, 0,3 для білка фага T7, що зв'язує одноланцюгову ДНК, 0,2 для β -галактозидази та 0,1 для РНК-полімерази T7 (Rosenberg et al., 1996).

У системі з використанням фага T7 елюцію зв'язаного фага після біопанінгу неможливо здійснити за допомогою низького рН (на відміну від систем дисплею на основі ниткоподібних фагів). Тому рекомендується використовувати 1% додецилсульфат натрію. Злиті білки, експоновані на поверхні капсида фага, не заважають збірці хвостового відростка чи інфекційності фага. Фаг T7 надзвичайно стійкий, і для процедур відбору фагів-кандидатів можна використовувати різноманітні агенти. Фаг залишається інфекційним не лише після обробки 1% додецилсульфатом натрію, а й 5 М NaCl, 4 М сечовиною, 2 М гуанідин-HCl, 10 мМ EDTA або при використанні лужних розчинів із до рН 10. Ще одна властивість, яка робить T7 привабливим вектором для технології фагового дисплея, є короткотривалість його реплікації. Бляшки утворюються протягом 3 годин при 37°C, а бактеріальні культури лізуються протягом ~2 годин після інфікування. Це дає змогу виконувати кілька раундів відбору фагів-кандидатів під час біопанінгу за короткий час.

Бібліотеки кДНК у технології фагового дисплея на основі фага T7 були використані для ідентифікації та характеристики нового ангіотензин-зв'язуючого білка (Kang et al., 2004), кандидатів на вакцину проти *Brugia malayi* (Gnanasekar et al., 2004), інгібіторів бактеріальної рибонуклеази (Krajikova, Hartley, 2004), для вивчення взаємодій білків (Gearhart et al., 2002, Houshmand, Bergqvist, 2003) та клонування білків, що зв'язують РНК (Danner, Velasco, 2001). Доступність комерційної системи фагового дисплея на основі фага T7, оптимізованих протоколів і готових бібліотек для відбору потрібних векторів призвела до все більшого використання цієї системи для різноманітних досліджень.

Сьогодні система фагового дисплея на основі фага T7 знайшла використання у розробці профілактичних вакцин проти вірусів гепатита В та ящура. Також розробляються терапевтичні вакцини на основі одноланцюгових фрагментів антитіл проти вірусів гепатита С, пташиного грипу та сказу, і засоби доставки молекулярних ліків для діагностики та терапії ракових захворювань (Deng et al., 2017).

3.4.5. Система дисплея на основі бактеріофага T4

Капсид фага T4 складається з трьох основних капсидних білків, а саме мажорного капсидного білка gp23 (960 копій на фагову частинку) і двох мінорних капсидних білків gp24 (білок вершини; 55 копій на частинку) і gp120 (портальний білок вершини; 12 копій на частинку). Крім того, зовнішня поверхня капсиду покрита двома «несуттєвими» зовнішніми білками капсиду: НОС (40 кДа) і СОС (9 кДа). Наступні особливості цих двох білків роблять їх придатними для дисплея пептидів і білків: 1) білки НОС і СОС неважливі для морфогенезу капсиду T4, але за їх наявності вони високоафінно зв'язуються з ділянками на зовнішній поверхні капсиду після завершення його збірки, але до упаковки ДНК; 2) білки НОС і СОС присутні у великій кількості копій (160 копій НОС і 960 копій СОС на фагову частинку); 3) елімінація одного або обох білків шляхом мутації не впливає на продуктивність, життєздатність або інфекційність фага. Очевидно, ці

білки забезпечують додаткову стабільність віріонів фага T4 за несприятливих умов, таких як екстремальні значення рН або осмотичний шок.

Завдяки таким властивостям НОС і СОС використовуються для експонування різноманітних пептидів і білків. У випадку білка СОС спочатку створюється химерний (злитий) ген у плазміді, який надалі вбудовується в геном фага T4 шляхом гомологічної рекомбінації між фагом і плазмідною з обох боків гена *soc* плазмід. Система дисплея на основі T4 СОС була використана для експонування 43-амінокислотного домену (V3) білка gp120 вірусу імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1) з великою кількістю копій на капсид. Такі фаги T4-V3 виявилися високоімуногенними у мишей і індукували появу антитіл, реактивних до нативного gp120 ВІЛ (Ren et al., 1996). Система також використовувалася для дисплея капсидного білка поліовірусу VP1 (312 амінокислотних залишків), хоча і з меншою кількістю копій. Фаг T4, що експонує СОС-VP1, було отримано за допомогою двох циклів простої процедури біопанінгу, що вказує на можливість експонування білків масою щонайменше 35 кДа. Також на С-кінці СОС вдалося експонувати важкі та легкі ланцюги імуноглобуліну G проти лізоциму яєчного білка (271 амінокислотний залишок) в його активній формі. Подібним чином інший білок капсиду НОС використовувався для експонування рецептора CD4 для ВІЛ-1 (183 амінокислотних залишки), який детектувався моноклональними антитілами проти доменів 1 і 2 рецептора CD4 людини (Ren et al., 1998). Кількість білкових молекул, що експонувалися на одній фаговій частинці, була невеликою (від 10 до 40 на фаг), однак важливо, що експоновані молекули мали нативну конформацію. Jiang et al., використовували системи T4 СОС і НОС для дисплея 36-амінокислотного пептиду PorA з *Neisseria meningitidis* у вигляді N-кінцевого фрагменту (Jiang et al., 1997). Було продемонстровано, що рекомбінантні фаги PorA-НОС і PorA-СОС були високоімуногенними у мишей, і викликали появу високих титрів антипептидних антитіл навіть при використанні слабкого ад'юванта або без ад'юванта взагалі. Це свідчить про те, що система T4 НОС-СОС може бути перспективною для створення наступного покоління багатокomпонентних вакцин. За допомогою системи фагового дисплея на основі

фага T4 також були створені випадкові бібліотеки пептидів шляхом злиття ДНК, що кодують п'ять рандомізованих амінокислот на 3'-кінці *soc* і 5'-кінці *hoc* (Malys et al., 2002).

Отже, великою перевагою системи фагового дисплея на основі фага T4 є висока щільність експонованих пептидів чи білків. Однак дана система відрізняється складністю стратегій клонування, зокрема, через великий розмір геному фага.

3.4.6. Система дисплея на основі бактеріофага λ

Одним із білків фага λ , які використовуються для дисплея, є стабілізуючий капсидний білок gpD. gpD – це невеликий білок (11,4 кДа), присутній у кількості 405-420 на капсид фага. Функція gpD полягає у стабілізації головки фага і даний білок (подібно до білків НОС та СОС фага T4) не є необхідним для головок, що містять <82% генома фага λ . Така «необов'язковість» білка gpD свідчить про те, що його можна використовувати як носій для експонованого пептида/білка, і що злиті пептиди та білки не заважатимуть збірці фагів. Іншим білком, який використовується в системі фагового дисплея на основі фага λ , є білок gpV хвостового відростка. Було встановлено, що С-кінцева частина gpV, яка утворює виступи на зовнішній поверхні хвостового відростка, не є критичною для біологічних властивостей вірусу (Katsura, 1976, 1981). Це робить його ідеальною платформою для дисплея пептидів і білків, злитих з його вкороченим С-кінцем.

У багатьох дослідженнях було підтверджено можливість експонування пептидів, злитих з білками gpD та gpV. Зокрема, Sternberg and Hoess продемонстрували можливість дисплея білків, злитих з N-кінцем gpD та подальше вибіркоче захоплення такого фага за допомогою реагенту, що специфічно розпізнає рекомбінантну частину злитого білка (Sternberg, Hoess, 1995). Mikawa et al., (Mikawa et al., 1996) показали, що злиття чужорідного білка можна здійснити як з N-, так і з С-кінцем gpD, і що навіть такі великі білки, як β -лактамаза та тетрамерна β -галактозидаза можуть бути представлені на поверхні

фагової частинки у функціонально активній формі. На основі ферментативної активності було підраховано, що фаговою частинкою експонується приблизно 34 копії β -галактозидази. В іншому дослідженні було виявлено, що кількість молекул, що відображаються в розрахунку на капсид, залежить від їх розміру, і малі пептиди розміром приблизно 10 амінокислотних залишків були присутні в кількості 405 копій на фагову частинку (Gupta et al., 2003).

Злиття з С-кінцем білка хвостового відростка gpV фага λ вперше було здійснено з використанням β -галактозидази та аглютиніну рослини *Bauhinia purpurea*. Було показано, що експонована β -галактозидаза присутня в тетрамерній, функціонально активній формі (Miyuama et al., 1994). Загалом білок хвостового відростка gpV фага λ використовувався як партнер для злиття різних пептидів і більших білкових молекул (Dunn, 1995, 1996a, 1996b).

Дисплей на основі бактеріофага λ використовувався для картування епітопів моноклональних антитіл проти великої кількості людських і бактеріальних білків (Gupta et al., 2003, Kuwabara et al., 1997, Kuwabara et al., 1999, Moriki et al., 1999, Stolz et al., 1999), і визначення ДНК-зв'язуючої специфічності експонованих білків (Zhang et al., 2000). Одним із найбільш багатообіцяючих потенційних застосувань дисплея на основі бактеріофага λ є створення бібліотек, кодованих кДНК. В одному з таких досліджень бібліотека кДНК вірусу гепатиту С експонувалася на поверхні віріонів фага λ та була використана для афінного відбору з використанням моноклональних антитіл та сироватки крові пацієнтів (Santini et al., 1998). Також були створені подібні бібліотеки клітинних ліній HeLa та HepG2 (Niwa et al., 2000), і використані для афінного відбору з сироватками крові пацієнтів із хронічним аутоімунним захворюванням, що призвело до виявлення нових аутоантигенів, відповідальних за відповідний синдром (Zhang et al., 2000). Геномна бібліотека дріжджів, експонована завдяки системі дисплея на основі бактеріофага λ , була використана для вивчення взаємодії білків і відбору клонів, які зв'язуються з фактором теплового шоку (Lin, Lis, 1999).

На відміну від дисплея з використанням ниткоподібних фагів, дисплей на основі бактеріофага λ використовувався для обмеженої кількості застосувань. Це

пояснюється кількома причинами: 1) біологія λ -фага значно складніша та таку у фага M13; 2) фаг λ має великий геном (48 т.п.н.), що ускладнює виділення вірусної ДНК, вставку визначених користувачем сайтів рестрикції, клонування чужорідних фрагментів і упаковку лігованого продукту *in vitro* для утворення інфекційних частинок фага λ , а досягнуті розміри бібліотек були менші, ніж отримані з векторами M13 на основі фагмід (Sheets et al., 1998); 3) внутрішньоклітинна збірка фага λ може перешкоджати утворенню дисульфідних зв'язків в експонованій молекулі.

Тим не менш, фаг λ є привабливим носієм для дисплея чужорідних білків, оскільки дозволяє експонувати мультимерні білки і не потребує секреції експонованих злитих білків (на відміну від систем на основі фага M13). Система на основі фага λ все частіше використовується для дисплея кДНК-бібліотек (Hoess, 2002). Окрім того, геном фага λ толерує інтродукцію великих вставок чужорідної ДНК без впливу на морфогенез фага і ефективність експонування чужорідних кодованих пептидів.

Порівняно нещодавно була описана система на основі бактеріофага λ для дисплея пептидів і білків, злитих з С-кінцем білка gpD головки фага λ . У даній системі за допомогою високоефективного процесу фагової інфекції та рекомбінації *in vivo* нуклеотидна послідовність, що кодує експонований пептид, інтегрується до геному фага λ , і даний пептид, кодований клонованою послідовністю, відображається як злитий з білком gpD на поверхні новоутворених вірусних частинок фага λ (Gurta et al., 2003). У цій стратегії ДНК, що кодує чужорідний пептид або білок, спочатку вставляється на 3'-кінці сегмента ДНК, що кодує gpD, під контролем *lac*-промотору в плазмідному векторі (донорній плазміді), який також несе мутантні рекомбінаційні послідовності *lox_{Pwt}* і *lox_{P511}*. Клітини, що експресують сайт-специфічну рекомбіназу (Cre), трансформують такою плазмідною і згодом інфікують фагом λ -реципієнтом, який несе сегмент ДНК, фланкований сайтами *lox_{Pwt}* і *lox_{P511}*. Рекомбінація відбувається *in vivo* в сайтах *lox*, утворюючи рекомбінантний фаг, який експонує чужорідний білок, злитий з С-кінцем gpD. Оскільки клонування

здійснюється в плазміді, це дозволяє досягти високої ефективності трансформації (шляхом електропорації). Крім того, рекомбінаційні події також відбуваються *in vivo*, що усуває необхідність виділяти ДНК фага λ , клонувати в неї цільові послідовності ДНК і упаковувати рекомбінантний фаг λ *in vitro*. Частота рекомбінантів на рівні плазмід та фагів у такому разі становить >90%, на відміну від 3-15% у випадку прямого клонування у вектори для дисплея на основі фага λ (Niwa et al., 2000).

Така система на основі фага λ може використовуватися для дисплея білків різних розмірів (72-231 амінокислота), а кількість копій кожного експонованого білка на одну фагову частинку фага λ була на 2-3 порядки вищою, ніж у випадку дисплея на основі фага M13.

3.4.7. Система дисплея на основі бактеріофага Q β

Фаг Q β – це літичний вірус із родини *Leviviridae* діаметром 28 нм (Hess, Jewell, 2020). Генوم представлений короткою одноланцюговою молекулою РНК розміром 4,2 т.п.н., що кодує лише кілька білків: мажорний капсидний білок CP, білок дозрівання A2, капсидний білок A1 і репліказу (Kashiwagi, Yomo, 2011). Подібно до ниткоподібних фагів, для проникнення до чутливих клітин *E. coli* даний фаг використовує F-пілі. Капсидний білок A1 утворюється лише зрідка через слабкий стоп-кодон. Саме білок A1 є мішенню для фагового дисплея. Незважаючи на те, що дисплей на основі бактеріофага Q β все ще розробляється, ця нова платформа може бути застосована в спрямованій еволюційній біотехнології та афінному дозріванні (Nchinda et al., 2021). Аналогічно до фага MS2, бактеріофаг Q β вважається перспективним «носієм» для створення вакцин, про що детальніше йтиметься нижче.

3.4.8. Система дисплея на основі бактеріофага MS2

Подібно до фага Q β , фаг MS2 також є представником родини *Leviviridae*, і має подібну біологію. Одноланцюговий РНК-геном розміром 3,6 т.п.н. кодує мажорний капсидний білок CP, білок дозрівання А, репліказу та білок лізису L. Для фагового дисплею використовується помітна бета-шпилька середньої частини мажорного капсидного білка CP (Fu, Li, 2016). Розроблені вірусоподібні частинки (VLP) на основі фага MS2 для бібліотек рандомних пептидів (Spingola, Peabody, 1997). Подібна платформа також застосовується для дисплея одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл (scFv) (Lino, Caldeira, Peabody, 2017).

3.4.9. Застосування технології фагового дисплея

Технологія фагового дисплея набула величезного поширення та популярності в останні роки, і використовується в незліченних дослідженнях. Нижче висвітлено невичерпний перелік основних галузей застосувань цієї технології.

Перший приклад застосування фагового дисплея навів George Smith для експонування пептидів і білків на поверхні бактеріофага M13 (Smith, 1985, Smith, Scott, 1993). Сьогодні майже всі види білкових і пептидних послідовностей можна успішно експонувати на поверхні фагових частинок. Бібліотеки випадкових пептидних послідовностей вже комерційно доступні і можуть бути використані для отримання пептидних партнерів по зв'язуванню практично з будь-яким лігандом.

Технологія фагового дисплея має феноменальний успіх у сфері виявлення та розробки антитіл (Soderlind et al., 2001). Окрім зручності даної технології для швидкої високопродуктивної ідентифікації антитіл і з'ясування їх епітопів, фаговий дисплей зробив реальним виробництво повністю людських антитіл, спрямованих проти всіх можливих антигенів. У поєднанні з розробкою антитіл

та їх продукцією всередині тіла людини фаговий дисплей антитіл торує шлях до розробки молекулярних ліків (Vaughan et al., 1998, Pini, Bracci, 2000, Hoogenboom, Chames, 2000, Hoogenboom, 2002, Kretschmar, von Ruden, 2002).

Фаговий дисплей у поєднанні з іншими технологіями білкової інженерії, такими як «перетасування» ДНК і випадковий або спрямований мутагенез, розширили природний репертуар структури та функції білків, уможливаючи синтез індивідуальних або «дизайнерських» пептидів і білків (Forrer et al., 1999, Kallen et al., 2000, Graddis et al., 2002).

Фаговий дисплей використовувався для створення нових доменів розпізнавання ДНК, таких як штучні транскрипційні фактори для селективної регуляції експресії генів та для їх потенційного терапевтичного застосування (Wolfe et al., 2000, Falke, Juliano, 2003, Petrenko, Vodyanoy, 2003, Turnbough, 2003). Такий підхід дозволяє підвищувати або знижувати регуляцію транскрипції (на відміну від підходів на основі РНК-інтерференції, які лише пригнічують експресію генів).

Бібліотеки фагового дисплея використовуються для ідентифікації малих пептидних лігандів і антитіл, які можна використовувати для виявлення агентів біологічної загрози, включаючи токсини, бактерії, спори та віруси (Petrenko, Vodyanoy, 2003, Turnbough, 2003), тобто для розробки біосенсорів.

Генна терапія є багатообіцяючою для лікування захворювань, для яких ефективна фармакологічна терапія недостатня або відсутня. Вектори, які зараз використовуються для перенесення генів, демонструють низьку ефективність через відсутність тканинспецифічності. Найбільшою проблемою для всіх таких систем доставки є пошук лігандів, які мають більшу спорідненість до клітин-мішеней, ніж до нормальних клітин.

Технологія фагового дисплея була використана для ідентифікації пептидних лігандів, які є селективними для конкретних типів клітин, і для створення нових векторів для перенесення генів, що включають такі вибрані пептиди, що тим самим підвищує ефективність засобів носіїв для доставки генів (Aina et al., 2002, Baker, 2002). Фаговий дисплей знайшов застосування в дослідженнях

рецепторних взаємодій, включно з ідентифікацією клітинних, тканинних і хворобо-специфічних рецепторів та їх лігандів, а також пептидів і антитіл, які модулюють активність рецепторів для використання в розробці ліків (Forrer et al., 1999, Qiu et al., 1999).

Бібліотеки дисплея використовуються для ідентифікації різноманітних аутоантитіл при аутоімунних захворюваннях, для картування аутоантигенних епітопів (Weetman, 2003), для ідентифікації пептидних імітаторів для небілкових антигенів, таких як антитіл до ДНК при системному червоному вовчаку (Deocharan et al., 2002), а також антитіл до капсульних полісахаридів при менінгіті та інших захворюваннях (Qiu et al., 1999, Moe et al., 1999, Mertens et al., 2001), та для ідентифікації пептидних антагоністів різних клітинних взаємодій (Cochran, 2000).

Бібліотеки комбінаторних пептидів і кДНК знайшли використання у вивченні білок-білкових взаємодій (Dowd et al., 2001) та ідентифікації мішеней для лікарських засобів (Lohse, Wright, 2001, Rodi et al., 2002).

Технологія фагового дисплея використовується для вивчення появи нових антигенів та імунної відповіді пацієнтів у різних медичних станах, пов'язаних зі старінням, вірусними та бактеріальними інфекціями, раком, гематологією (Kristensen et al., 2000, Voorberg, van den Brink, 2000, Mullaney, Pallavicini, 2001) та алергією (Edwards et al., 2001).

Фаговий дисплей також використовується для розробки індивідуальних синтетичних лігандів для афінної хроматографії з метою виробництва терапевтичних плазмових продуктів (Burnouf, Radosevich, 2001).

Фаговий дисплей *in vivo* широко використовується для виділення пептидів, які специфічні до певних органів чи пухлин, з метою адресної доставки хіміопрепаратів, пептидів, факторів росту та цитокінів (Brown, 2000, Kolonin et al., 2001). Клітинноспецифічні пептиди будуть корисні не тільки як засоби доставки ліків, але також в якості діагностичних агентів, реагентів афінності для очищення клітин, засобів для доставки генів, зондів для вивчення клітинної поверхні та реагентів для радіотерапії.

3.4.10. Важливість щільності дисплея

Скринінг бібліотек пептидів і білків, що експонуються на фагах, є ефективним методом пошуку вкрай необхідних «голок» у величезній молекулярній «копиці сіна». Важливою властивістю платформ фагового дисплея в цьому аспекті є кількість копій пептиду або білка, що експонується на поверхні окремої вірусної частинки. Така властивість називається щільністю дисплея. Низька щільність дисплея (коли, наприклад, на фаговій частинці експонується одна копія білка) важлива для білкової інженерії, коли потрібно виділити цільові речовини з підвищеною спорідненістю до певної «приманки». Типовим прикладом є отримання молекул антитіл з високою афінністю до відповідного ліганду. Однак для дослідження слабших взаємодій бажана щільність дисплея має становити декілька сотень молекул на фагову частинку.

Фаговий дисплей використовується для вивчення особливостей імунної відповіді пацієнтів з різними захворюваннями, раком, аутоімунними та віковими захворюваннями (Deocharan et al., 2002, Ditzel, 2000, Sioud et al., 2000, Weetman, 2003). Це передбачає використання бібліотек випадкових пептидів або бібліотек ДНК для ідентифікації пептидів, проти яких у пацієнтів виникає імунна відповідь. У більшості випадків титри антитіл у сироватці таких пацієнтів є відносно низькими, що обумовлює потребу у високій щільності експонованих на вірусній частинці пептидів для ефективною та селективною ідентифікації специфічних епітопів (Gupta et al., 2003).

Фаги, що експонують специфічні пептиди або антитіла, використовуються в якості біосенсорів для різноманітних небезпечних агентів, таких як віруси, бактерії, спори та токсини. Очевидно, що при такому застосуванні фаги із більш щільним дисплеєм пептиду або антитіла будуть більш чутливими сенсорами (Petrenko, Vodyanoy, 2003).

Технологія фагового дисплея використовується й для розробки ефективних засобів доставки генів до еукаріотичних клітин. Фаги на сьогодні вважаються кращими засобами доставки генів у порівнянні з іншими існуючими системами,

оскільки вони прості у використанні, економічні у виробництві і накопиченні, не мають власного тропізму до різних типів еукаріотичних клітин (що є недоліком багатьох інших існуючих векторів з точки зору їх безпеки та ефективності) і відносно прості у контексті генетичних маніпуляцій і модифікацій. При цільовій доставці генів за рахунок фагів використовується специфічна взаємодія вірусного рецептору із клітинним, яка вочевидь залежить від концентрації таких рецепторів, часу їх взаємодії та взаємної афінності. Хоча такі властивості клітинного рецептора змінити неможливо, ми можемо модифікувати носій генетичної інформації, тобто зробити більш щільними (численними) та афінними рецептори на вірусній частинці.

Фагові вектори можуть бути сконструйовані для рецептор-опосередкованої доставки генів до клітин ссавців (Monaci et al., 2001). Дослідження показали, що бактеріофаги, які експресують клітинноспецифічні пептиди, можуть поглинатися клітинами ссавців, що забезпечує доставку в такі клітини чужорідних генів, що містяться в фаговому геномі. Знову ж таки, така система виграє від високої щільності дисплея цільового пептиду.

Окрім цього, для забезпечення високої ефективності носіїв для доставки генів також важливо мати на поверхні такого вектора достатню кількість копій пептидів для мембранного транспорту (переносу генів всередину клітини). До прикладу, як обговорювалося вище, фаг λ може експонувати різні пептиди на своєму капсиді без їх негативного впливу на морфогенез капсиду чи стабільність вірусних частинок. Таким чином, рекомбінантні частинки фага λ , які містять ДНК із заданими властивостями (терапевтичні гени) та експонують пептиди для забезпечення трансмембранного транспорту такої ДНК до клітини, є перспективними засобами доставки генів в еукаріотичних системах (Nakanishi et al., 2003).

В унікальному дослідженні Frenkel and Solomon (Frenkel, Solomon, 2002) показали, що рекомбінантний ниткоподібний фаг здатний проникати в центральну нервову систему і доставляти експоновані на віріонах анти- β -амілоїдні антитіла шляхом інтраназального введення в мозок мишей. В іншому

дослідженні ниткоподібний фаг, на поверхні якого були експоновані кокаїн-зв'язуючі білки, досягав мозку мишей після інтраназального введення та секвестрував кокаїн у мозку (Carrera et al., 2004), що створює передумови для «білкового лікування» синдрому зловживання наркотиками. Цілком можливо, що для такої доставки в мозок буде корисною висока щільність дисплея, а фаг λ може бути більш перспективним кандидатом, ніж ниткоподібні фаги. Проте ще належить з'ясувати, чи досягне фаг λ мозку після інтраназального введення.

Фагові вектори можна вдосконалити для більш селективного «тропізму» щодо цільових клітин, підвищення стабільності частинок, зниження їх імуногенності, та модифікації інших властивостей, які є бажаними для ефективної доставки генів. Такі засоби доставки також є корисними для доставки ліків до певних клітин і вакцин (Lambkin, Pinilla, 2002).

Розробка живих вакцин з використанням гетерологічних носіїв передбачає використання вірусів або інших носіїв, які експонують на своїй поверхні пептид-кандидат в якості імуногена. Зрозуміло, що у такому випадку кращими імуногенами будуть такі носії, які мають дуже щільний дисплей цільового пептида-кандидата, який в ідеалі повинен вкривати всю поверхню носія.

Отже, висока щільність дисплея є важливою вимогою для різноманітних перспективних застосувань даної технології, наприклад, при цільовій доставці генів, діагностиці *in vivo*, розробці біосенсорів чи вакцин, тощо.

3.4.11. Останні тенденції розвитку технології фагового дисплея

Основними напрямками використання технології фагового дисплея стали біомедичні спрямування, зокрема, розробка вакцин, біосенсорів, діагностичних систем, засобів таргетної доставки ліків (в тому числі, для терапії пухлин) та генної інженерії. Нижче наведені показові приклади таких застосувань.

Фаги можуть бути генетично модифіковані для експресії гетерологічних націлюючих пептидів або бажаних рецепторів, які зливаються з капсидними білками. Завдяки цьому фаг фактично набуває додаткового тропізму до

еукаріотичних клітин і може використовуватися для таргетної доставки ліків (наприклад, до пухлинних клітин з особливим рецепторним представництвом) (Peng, Chen, 2021).

Також, технологія фагового дисплея сприяє розробці вакцин, що дає можливість скринінгу та ідентифікації функціональних пептидів або білків з необхідними імуногенними характеристиками (Lopes et al., 2018). У той же час висока імуногенність фагів може бути використана для посилення імунної відповіді на доставку вакцини фагом.

Остання галузь набула особливої ваги, в тому числі через перспективу лікування ракових захворювань шляхом спрямованого знищення пухлинних клітин. Технологія фагового дисплея пропонує ефективний підхід до ідентифікації поверхневих маркерів ракових клітин і розробки функціональних протипухлинних пептидів для терапевтичного використання (Wang et al., 2024). Адаптовані імуногенні вірусні частинки створюють шляхом злиття антигенів з поверхневими білками фага. Кілька кандидатів таких вакцин на основі фагів вже були оцінені як вакцини проти раку у доклінічних дослідженнях. Серед них були фаги, що експонують епітопи рецептора 2 фактора росту судинного ендотелію (VEGFR2), рецептора епідермального фактора росту (EGFR), HER2, гена антигену меланоми (MAGE), муцину 1 (MUC1), рецептора фактора росту фібробластів (FGFR), Fms-подібної тирозинкінази 4 (Flt4) та мімотопи пухлиноасоційованих вуглеводних антигенів (ТАА). Деякі з цих протипухлинних фагових вакцин були успішно використані в імунотерапії раку (Fang et al., 2005, Liu et al., 2006, Ren et al., 2009, Ren et al., 2011, Asadi-Ghalehni et al., 2015, Barati et al., 2018, Yin et al., 2018). У таблиці 3.1 узагальнена інформація щодо ракових маркерів, до яких були створені рекомбінантні фаги для лікування раку (Ragothaman, Yoo, 2023).

Таблиця 3.1 – Маркери, до яких були створені рекомбінантні фаги для лікування раку

Маркер	Біологічне застосування	Фаг/фагова бібліотека
GM-CSF	Колоректальний рак	M13
TAA	Рак молочної залози	T7
MAGE A1	Протипухлинна активність	Fd
VEGF	Перешкоджання ангиогенезу	M13
EGFR	Рак легень	Ph.D.-12
VEGF	Карцинома молочної залози	Ph.D.-12
HER2	Рак фаллопієвої труби	λ
MAGE-A10, MAGE A3	Протипухлинна активність	Fd
FGFR	Меланома	Ph.D.-7
FGFR1	Перешкоджання ангиогенезу	6-мерний фаг
FGFR1	Перешкоджання ангиогенезу	Ph.D.-C7C
FGF8b	Рак простати	Ph.D.-7
EGFR	Карцинома легень	M13
TAA	Протипухлинна активність	M13
FGFR	Перешкоджання ангиогенезу	M13

У контексті боротьби з раком система фагового дисплея на основі фага MS2 також знайшла використання для таргетної доставки мікроРНК до клітин гепатоцелюлярної карциноми (Zhang et al., 2021).

Іншою цікавою розробкою для боротьби з раком є створення фагового дисплея на основі фага fd, на якому одночасно експонуються пептиди, споріднені з раковими клітинами (tumor-homing peptides) (на кінці віріона) та платиновмісні нанозими, злиті із мажорним капсидним білком (на бічній стінці віріона). Перші забезпечують потрапляння фагових частинок до ракових клітин молочної залози у мишей, а другі – утворення реактивних форм кисню у таких клітинах, які надалі ефективно знищуються шляхом фотодинамічної терапії (Yang et al., 2024).

Створення терапевтичних засобів та вакцин на основі фагів не обмежується лікуванням раку. На сьогодні поки не існує жодної фагової вакцини, яка б була схвалена американськими або європейськими інституціями (FDA або EMA), не зважаючи на багатообіцяючі результати (до)клінічних випробувань. Тим не менше, ряд таких вакцин наразі проходять такі клінічні випробування, зокрема, вакцина проти SARS-CoV2. У таблиці 3.2 нижче узагальнена інформація щодо перспективних вакцин на технології основі фагового дисплея (Palma, 2023).

Таблиця 3.2 – Вакцини, що розробляються на основі бактеріофагів

Стан	Агент	Цільовий антиген	Фаг
Вірусні інфекції	SARS-CoV-2	S, NP	λ , AP205, Q β , Vxb1, Vxb2
	Вірус грипу А	3M2e	T4
	Вірус Денге	NS1	Q β
	Вірус ящура	VP1	MS2, T7
	Вірус Зіка	E	Q β
Бактеріальні інфекції	<i>Chlamydia trachomatis</i>	CT584, MOMP	Q β , MS2
	<i>Escherichia coli</i>	STh	AP205
	<i>Vibrio cholera</i>	OSP	Q β
	<i>Bordetella pertussis</i>	Пентасахарид	Q β
Паразитичні інфекції	<i>Rhipicephalus microplus</i>	Sbm746	M13
	<i>Fasciola hepatic</i>	Катепсин	M13KE
	<i>Plasmodium falciparum</i>	Pfs47	AP205
Дріжджові інфекції	<i>Candida albicans</i>	Fba1	M13
Ракові захворювання	Рак молочної залози	HER2, хСТ	λ , M13, MS2
	Лейкемія	ASPH	SNS-301
	Загальний	GD2	Q β

	Метастази та солідні пухлини	MUC1	Q β
	Меланома	Неоантигени	T7
Інші стани	Таутопатії	Tau	Q β
	Підвищений артеріальний тиск	CaV1.2	Q β
	Алергічний риніт	H4R	M13
	Серцево-судинні захворювання	ApoB, PCSK9, CETP	Q β
	Контроль фертильності	Гонадотропіни	f8

Іншим і не менш показовим прикладом застосування технології фагового дисплея стали біосенсори. Відповідно до Міжнародного союзу теоретичної та прикладної хімії (IUPAC), **біосенсором** називають систему, яка складається з компоненту біодетекції (біорецептору/біозонду – як раз ним виступають рекомбінантні фаги), пов'язаного із датчиком (сенсором) для перетворення біологічного сигналу у цифровий сигнал у комп'ютерній системі для його інтерпретації (Qian et al., 2017). Біосенсорні платформи на основі фагів зазвичай складаються з популяції цілих або часткових віріонів, що після розпізнавання відповідного ліганда продукують колориметричний, електричний, флуоресцентний або люмінесцентний сигнал (Al-Hindi et al., 2022). Сигнали сприймаються за допомогою методів спектрофотометрії, електрохімічної імпедансної спектроскопії (EIS), поверхневого плазмонного резонансу (SPR), польових транзисторів на вуглецевих нанотрубках (CNT-FET), диференціальної імпульсної вольтамперометрії (DPV) (Peltomaa et al., 2019) та інших технологій, включно із хроматографічними експрес-тестами (LFIA), які були розроблені на основі фагового дисплея, зокрема, для SARS-CoV2 (Kim et al., 2021).

У контексті технології фагового дисплея найчастіше йдеться про те, що на поверхні фагової частинки експонуються антиген-зв'язуючі фрагменти антитіл (scFv, Fab), специфічні щодо конкретного патогена/токсина і т.п. У таких

дисплеях найчастіше використовуються помірні ниткоподібні фаги (M13, f1, fd тощо). Популярність технології пояснюється простотою та швидкістю отримання найрізноманітніших антитіл.

Сьогодні є чимало розробок для детекції багатьох небезпечних патогенів людини та тварин на основі фагового дисплея, в тому числі вірусів Зіка, Ебола, Марбург, Хендра, Ніпа, Ханта, Чикунгунья, Денге, японського енцефаліту, MERS, SARS та SARS-CoV-2, вірусів пташиного грипу, діареї великої рогатої худоби, ящура, вірусних гепатитів, різних герпесвірусів людини, коро- та ротавірусів, поліовірусів та ін., в тому числі навіть вірусів рослин (вірусів шарки сливи, огіркової мозаїки та ін.). Вичерпний актуальний перелік таких патогенів наведений у огляді Guliy et al., (Guliy et al., 2023).

Окрім того, дана технологія набула особливої фаги для експрес-діагностики так званих ESKAPE-патогенів бактеріальної природи (E – *Escherichia faecium*, S – *Staphylococcus aureus*, K – *Klebsiella pneumoniae*, A – *Acinetobacter baumannii*, P – *Pseudomonas aeruginosa* та E – *Enterobacter*) (Sachdeva et al., 2024).

Одним з найбільш популярних сучасних напрямів використання фагових векторів (але вже не фагового дисплея) у біотехнології є інжиніринг фагів для генної модифікації бактерій. Через надмірне використання антибіотиків у людей і тварин швидко і повсюдно формується антимікробна резистентність (AMR), яка наразі є величезною проблемою. Фаги можуть вбивати бактерії з більшою специфічністю, ніж антибіотики, і існує великий досвід «класичної» фаготерапії людини, тварин і навіть рослин шляхом виділення і селекції специфічних фагів до відповідних патогенних бактерій (детально з такими здобутками читач може ознайомитися в інших розділах даної монографії). Натомість, відомо, що прокаріоти можуть мати власну адаптивну «іmunну» систему: систему CRISPR-Cas. За оцінками, близько 40% бактерій кодують принаймні одну систему. На сьогодні вже описані два класи, шість типів і 33 підтипи систем CRISPR-Cas у бактерій (Makarova et al., 2020). Незважаючи на різноманітність, системи CRISPR-Cas зазвичай використовують подібний механізм, який включає три основні етапи: 1) адаптація, яка полягає у включенні екзогенних фрагментів ДНК

(спейсерів) у масив CRISPR; 2) експресія та дозрівання РНК CRISPR (crRNA) з отриманих спейсерів; та 3) інтерференція, коли комплекс crRNA-Cas розпізнає та зв'язує комплементарну нуклеотидну послідовність, яка часто, але не завжди, фланкована протоспейсерним сусіднім мотивом (PAM), що дозволяє розщеплювати ДНК або РНК Cas-нуклеазами (Zheng et al., 2020). Як видно, за логікою роботи дана система доволі подібна до системи РНК-інтерференції, яка була давно описана для еукаріотичних клітин.

За допомогою такої захисної системи бактерії можуть захищатися від вторгнення геномів фагів або інших мобільних генетичних елементів, таких як плазміди (Vranciianu et al., 2020). Цікаво, що, як і аутоімунні захворювання людини, системи CRISPR-Cas бактерій іноді можуть націлюватися на власний бактеріальний геном, яким вони кодуються. Дослідження показали, що наявність самонацілюючих спейсерів може призводити до загибелі бактерій, якщо розщеплена геномна ДНК не була ефективно відновлена (Bikard, Barrangou, 2017, Wimmer, Beisel, 2020). Цей феномен бактеріального «аутоімунітету» підкреслює антимікробний потенціал перепрограмування систем CRISPR-Cas. Завдяки перепрограмуванню активності Cas-нуклеази її стало можливим націлити на вбивство бактеріальних клітин (De La Fuente-Nunez, Lu, 2017, Vranciianu et al., 2020).

Власне, така ідея і дала початок вивченню перспектив використання фагів як засобів доставки екзогенних або модифікації ендогенних систем CRISPR-Cas бактерій з метою знищення антибіотикорезистентної патогенної мікробіоти. На сьогодні розроблені способи доставки систем CRISPR-Cas в бактерії з використанням двох типів фагових векторів: фагмід та сконструйованих помірних/вірулентних фагів. Фагмідні вектори CRISPR-Cas складаються з плазмідної конструкції, в яку клоновано послідовність для упаковки ДНК фага і потрібні елементи системи CRISPR-Cas (Fagen et al., 2017). Фагмідна ДНК, як і плазміди, може реплікуватися в бактеріях, бути упакованою в капсид фага і доставлена в цільовий бактеріальний штам під час трансдукції. Було успішно доставлено фагміди із системою CRISPR-Cas9 у різні бактеріальні моделі, такі

як *E. coli* або *S. aureus*, що призводило до селективного знищення бактерій (Bikard et al., 2015, Citorik et al., 2014). Оскільки фагміди не кодують вірусних білків, їм потрібні фаги-помічники для забезпечення збірки вірусного вектора. Інший підхід полягає у введенні системи CRISPR-Cas до геному вірулентних або помірних фагів для підвищення їх антибактеріальної активності порівняно з вихідними фагами «дикого». Однією з головних проблем розробки таких фагів є уникнення порушення реплікації та збірки вірусів. Оскільки розмір вірусного геному часто напряму пов'язаний з розміром капсиду фага, введення у геном фага великого чужорідного фрагмента ДНК, такого як система CRISPR-Cas, може зменшити ефективність його збірки. Отож, може знадобитися видалити «несуттєву» частину геномної ДНК фага, щоб звільнити місце для нової вставки. Добре відомий фаг λ був успішно сконструйований шляхом введення системи CRISPR-Cas3 і масиву CRISPR із видаленням генів, які не беруть участь у реплікації (було видалено приблизно 8,5 т.п.н. генома фага). Рекомбінантні фаги були здатні реплікуватися та сенсibiliзувати *E. coli* до антибіотиків, опосередковуючи CRISPR-Cas розщеплення генів антибіотикорезистентності (Yosef et al., 2015). У деяких випадках при ретельному виборі фагової моделі навіть не потрібно видаляти вірусні гени. Наприклад, Park et al., використовували гомологічну рекомбінацію для вставки CRISPR-Cas9 і масиву CRISPR у фаг *S. aureus* fSaBov без видалення будь-яких генів (Park et al., 2017). Ефективність реплікації отриманого рекомбінантного фага при цьому не була знижена порівняно з фагом «дикого» типу. Основні підходи до створення рекомбінантних фагів як засобів доставки екзогенних або модифікації ендогенних систем CRISPR-Cas бактерій наведені на рис. 3.8.

Фагмідний підхід для доставки екзогенної системи CRISPR-Cas (рис. 3.8a):

- 1) фагова частинка адсорбується на бактерії та вводить плазмиду в клітину;
- 2) екзогенні гени *cas* експресуються, а спейсери, що містяться в масиві CRISPR плазмиди, дозрівають у *crRNA*.
- 3) *crRNA* спрямовують екзогенні білки Cas для розщеплення цільових протоспейсерів у бактеріальному геномі або в плазмідах;
- 4) розщеплення призводять до загибелі клітини, якщо бактерія не в змозі

відновити свій геном, або повторної сенсibilізації до антибіотиків при руйнуванні плазмідної ДНК.

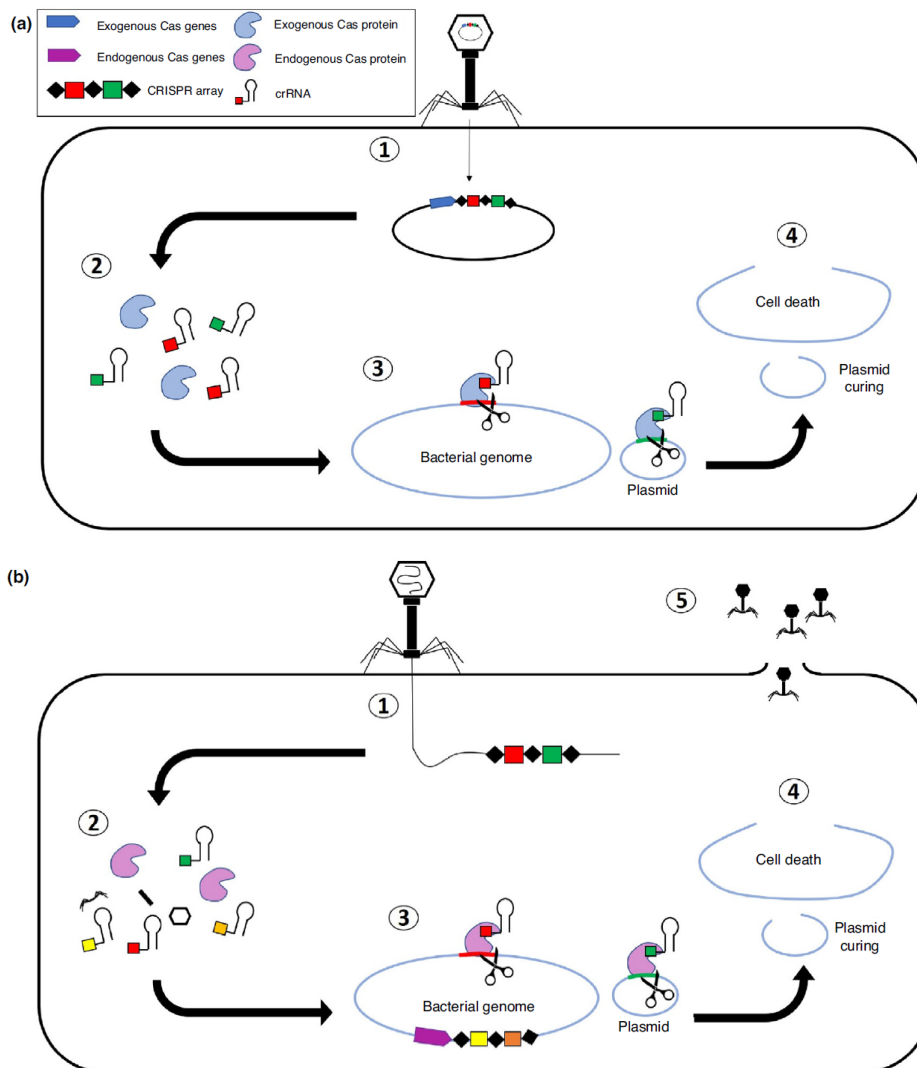


Рис. 3.8 – Різні стратегії на основі фагів для доставки або перепрограмування CRISPR-Cas як антимікробних засобів (пояснення в тексті) (Fage et al., 2021)

Реплікативний фаговий підхід для доставки масиву CRISPR для перепрограмування ендогенної системи CRISPR-Cas (рис. 3.8b): 1) фагова частинка адсорбується на бактерії та вводить свій геном у клітину; 2) фаг починає реплікативний цикл. Спейсери, що містяться в масиві CRISPR фагового геному, експресуються та дозрівають у crRNA; 3) екзогенні crRNA направляють ендогенні білки Cas для розщеплення цільових протоспейсрів у бактеріальному геномі або в плазмідах; 4) розщеплення призводить до загибелі клітини, якщо

бактерія не в змозі відновити свій геном, або повторної сенсibilізації до антибіотиків при руйнуванні плазмідної ДНК; 5) фаг завершує свій реплікативний цикл, збираються нові вірусні частинки, клітина лізується і вивільняються нові віріони.

Технологія створення рекомбінантних фагів на основі системи CRISPR-Cas набула такої популярності, що сьогодні пропонується навіть для регулювання мікробіома людини (Hosseini et al., 2017), у тому числі для подолання масової множинної стійкості бактерій у ньому (Nath et al., 2022).

Технологія створення фагових векторів та фагового дисплея зокрема досягла зрілості і стала критично важливим інструментом у поточну еру геноміки, протеоміки та (мікро/віро)біому загалом. Незважаючи на те, що доступно багато систем фагового дисплея та є тисячі публікацій, що описують конкретні застосування цієї технології, залишаються затребуваними нові та вдосконалені платформи фагового дисплея, і подальші дослідження практичного використання фагів, які експонують пептиди на своїй поверхні, принесуть багато нових захоплюючих відкриттів в різних галузях науки і медицини.

Використані джерела:

1. Aina, O. H., Sroka, T. C., Chen, M. L., & Lam, K. S. (2002). Therapeutic cancer targeting peptides. *Peptide Science: Original Research on Biomolecules*, 66(3), 184-199. <https://doi.org/10.1002/bip.10257>
2. Al-Hindi, R. R., Teklemariam, A. D., Alharbi, M. G., Alotibi, I., Azhari, S. A., Qadri, I., ... & Bhunia, A. K. (2022). Bacteriophage-based biosensors: A platform for detection of foodborne bacterial pathogens from food and environment. *Biosensors*, 12(10), 905. <https://doi.org/10.3390/bios12100905>
3. Arap, M. A. (2005). Phage display technology: applications and innovations. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 1-9. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572005000100001>.

4. Asadi-Ghalehni, M., Ghaemmaghami, M., Klimka, A., Javanmardi, M., Navari, M., & Rasaei, M. J. (2015). Cancer immunotherapy by a recombinant phage vaccine displaying EGFR mimotope: an in vivo study. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 37(3), 274-279. <https://doi.org/10.3109/08923973.2015.1027917>
5. Baker, A. H. (2002). Development and use of gene transfer for treatment of cardiovascular disease. *Journal of cardiac surgery*, 17(6), 543-548. <https://doi.org/10.1046/j.1540-8191.2002.01011.x>
6. Barati, N., Razazan, A., Nicastro, J., Slavcev, R., Arab, A., Mosaffa, F., ... & Behravan, J. (2018). Immunogenicity and antitumor activity of the superlytic λ F7 phage nanoparticles displaying a HER2/neu-derived peptide AE37 in a tumor model of BALB/c mice. *Cancer letters*, 424, 109-116. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.03.030>
7. Bikard, D., & Barrangou, R. (2017). Using CRISPR-Cas systems as antimicrobials. *Current opinion in Microbiology*, 37, 155-160. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.08.005>
8. Bikard, D., Euler, C. W., Jiang, W., Nussenzweig, P. M., Goldberg, G. W., Duportet, X., ... & Marraffini, L. A. (2014). Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nature biotechnology*, 32(11), 1146-1150. <https://doi.org/10.1038/nbt.3043>
9. Brown, K. C. (2000). New approaches for cell-specific targeting: identification of cell-selective peptides from combinatorial libraries. *Current opinion in chemical biology*, 4(1), 16-21. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(99\)00045-9](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(99)00045-9)
10. Burnouf, T., & Radosevich, M. (2001). Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49(1-3), 575-586. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00221-4](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00221-4)
11. Carrera, M. R. A., Kaufmann, G. F., Mee, J. M., Meijler, M. M., Koob, G. F., & Janda, K. D. (2004). Treating cocaine addiction with viruses. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences*, 101(28), 10416-10421.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0403795101>
12. Castagnoli, L., Zucconi, A., Quondam, M., Rossi, M., Vaccaro, P., Panni, S., ... & Cesareni, G. (2001). Alternative bacteriophage display systems. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 4(2), 121-133.
<https://doi.org/10.2174/1386207013331174>
13. Citorik, R.J., Mimee, M., & Lu, T. K. (2014). Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature biotechnology*, 32(11), 1141-1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.3011>
14. Cochran, A. G. (2000). Antagonists of protein–protein interactions. *Chemistry & biology*, 7(4), R85-R94. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00106-X](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00106-X)
15. Corey, D.R., Shiau, A.K., Qing, Y., Janowski, B.A., & Craik, C.S. (1993). Trypsin display on the surface of bacteriophage. *Gene*, 128(1), 129-134.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90163-W](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90163-W)
16. Danner, S., & Belasco, J.G. (2001). T7 phage display: a novel genetic selection system for cloning RNA-binding proteins from cDNA libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 12954-12959.
<https://doi.org/10.1073/pnas.211439598>
17. de la Fuente-Núñez, C., & Lu, T.K. (2017). CRISPR-Cas9 technology: applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects. *Integrative Biology*, 9(2), 109-122.
<https://doi.org/10.1039/c6ib00140h>
18. Deng, X., Wang, L., You, X., Dai, P., & Zeng, Y. (2018). Advances in the T7 phage display system (Review). *Molecular Medicine Reports*, 17, 714-720.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7994>
19. Deocharan, B., Qing, X., Beger, E., & Putterman, C. (2002). Antigenic triggers and molecular targets for anti-double-stranded DNA antibodies. *Lupus*, 11(12), 865-871. <https://doi.org/10.1191/0961203302lu308rr>
20. Ditzel, H. J. (2000). Human antibodies in cancer and autoimmune disease. *Immunologic Research*, 21, 185-193. <https://doi.org/10.1385/IR:21:2-3:185>

21. Dowd, C.S., Zhang, W., Li, C., & Chaiken, I. M. (2001). From receptor recognition mechanisms to bioinspired mimetic antagonists in HIV-1/cell docking. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 753(2), 327-335. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(00\)00567-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00567-3)
22. Dunn, I.S. (1995). Assembly of functional bacteriophage lambda virions incorporating C-terminal peptide or protein fusions with the major tail protein. *Journal of molecular biology*, 248(3), 497-506. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0237>.
23. Dunn, I.S. (1996a). In vitro α -Complementation of β -Galactosidase on a Bacteriophage Surface. *European journal of biochemistry*, 242(3), 720-726. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0720r.x>
24. Dunn, I.S. (1996b). Total modification of the bacteriophage lambda tail tube major subunit protein with foreign peptides. *Gene*, 183(1-2), 15-21. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00400-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00400-3)
25. Dunn, J.J., & Studier, F. W. (1984). Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the location of T7 genetic elements. *J. Mol. Biol*, 175, 111-112.
26. Edwards, M. R., Collins, A. M., & Ward, R. L. (2001). The application of phage display in allergy research: characterization of IgE, identification of allergens and development of novel therapeutics. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2(3), 225-240. <https://doi.org/10.2174/1389201013378653>
27. Ehrlich, G. K., Berthold, W., & Bailon, P. (2000). Phage display technology: affinity selection by biopanning. *Affinity Chromatography: Methods and Protocols*, 195-208. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-261-2_18
28. Fage, C., Lemire, N., & Moineau, S. (2021). Delivery of CRISPR-Cas systems using phage-based vectors. *Current opinion in biotechnology*, 68, 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.11.012>.
29. Fagen, J. R., Collias, D., Singh, A. K., & Beisel, C. L. (2017). Advancing the design and delivery of CRISPR antimicrobials. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 4, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2017.10.001>

30. Falke, D., & Juliano, R. L. (2003). Selective gene regulation with designed transcription factors: implications for therapy. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 5(2), 161-166. PMID: 12772506.
31. Fang, J., Wang, G., Yang, Q., Song, J., Wang, Y., & Wang, L. (2005). The potential of phage display virions expressing malignant tumor specific antigen MAGE-A1 epitope in murine model. *Vaccine*, 23(40), 4860-4866. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.05.024>
32. Felici, F., Castagnoli, L., Musacchio, A., Jappelli, R., & Cesareni, G. (1991). Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *Journal of molecular biology*, 222(2), 301-310. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90213-P](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90213-P)
33. Forrer, P., Jung, S., & Plückthun, A. (1999). Beyond binding: using phage display to select for structure, folding and enzymatic activity in proteins. *Current opinion in structural biology*, 9(4), 514-520. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)80073-6](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)80073-6)
34. Frenkel, D., & Solomon, B. (2002). Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5675-5679. <https://doi.org/10.1073/pnas.072027199>
35. Fu, Y., & Li, J. (2016). A novel delivery platform based on Bacteriophage MS2 virus-like particles. *Virus Research*, 211, 9-16. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.022>
36. Gao, C., Mao, S., Lo, C. H. L., Wirsching, P., Lerner, R. A., & Janda, K. D. (1999). Making artificial antibodies: a format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6025-6030. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6025>
37. Gearhart, D. A., Toole, P. F., & Beach, J. W. (2002). Identification of brain proteins that interact with 2-methylnorharman: An analog of the parkinsonian-inducing toxin, MPP+. *Neuroscience research*, 44(3), 255-265. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(02\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(02)00133-5)

38. Gnanasekar, M., Rao, K.V., He, Y.X., Mishra, P.K., Nutman, T.B., Kaliraj, P., & Ramaswamy, K. (2004). Novel phage display-based subtractive screening to identify vaccine candidates of *Brugia malayi*. *Infection and immunity*, 72(8), 4707-4715. <https://doi.org/10.1128/iai.72.8.4707-4715.2004>
39. Graddis, T.J., Remmele Jr, R. L., & McGrew, J.T. (2002). Designing proteins that work using recombinant technologies. *Current pharmaceutical biotechnology*, 3(4), 285-297. <https://doi.org/10.2174/1389201023378148>
40. Greenwood, J., Willis, A.E., & Perham, R.N. (1991). Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage: peptides from *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein as antigens. *Journal of molecular biology*, 220(4), 821-827. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90354-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90354-9)
41. Guliy, O.I., Evstigneeva, S.S., Khanadeev, V.A., & Dykman, L.A. (2023). Antibody phage display technology for sensor-based virus detection: Current status and future prospects. *Biosensors*, 13(6), 640. <https://doi.org/10.3390/bios13060640>
42. Gupta, A., Onda, M., Pastan, I., Adhya, S., & Chaudhary, V.K. (2003). High-density functional display of proteins on bacteriophage lambda. *Journal of molecular biology*, 334(2), 241-254. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.033>
43. Gupta, S., Arora, K., Sampath, A., Khurana, S., Singh, S. S., Gupta, A., & Chaudhary, V. K. (1999). Simplified gene-fragment phage display system for epitope mapping. *Biotechniques*, 27(2), 328-334. <https://doi.org/10.2144/99272st04>
44. Hamzeh-Mivehroud, M., Alizadeh, A.A., Morris, M.B., Church, W.B., Dastmalchi, S. (2013). Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. *Drug discovery today*, 18(23-24), 1144-1157. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.09.001>.
45. He, B., Chai, G., Duan, Y., Yan, Z., Qiu, L., Zhang, H., ... & Huang, J. (2016). BDB: biopanning data bank. *Nucleic acids research*, 44(D1), D1127-D1132. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1100>

46. Hess, K. L., & Jewell, C. M. (2020). Phage display as a tool for vaccine and immunotherapy development. *Bioengineering & translational medicine*, 5(1), e10142. <https://doi.org/10.1002/btm2.10142>.
47. Hoess, R. H. (2002). Bacteriophage lambda as a vehicle for peptide and protein display. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 3(1), 23-28. <https://doi.org/10.2174/1389201023378481>
48. Hohn, B., & Murray, K. (1977). Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(8), 3259-3263. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.8.3259>
49. Hoogenboom, H. R. (2002). Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Antibody phage display: methods and protocols*, 1-37. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-240-6:001>
50. Hoogenboom, H. R., & Chames, P. (2000). Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunology today*, 21(8), 371-378. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01667-4](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01667-4)
51. Hosseini, Z. (2017). Phage-mediated gene therapy. *Current Gene Therapy*, 17(2), 120-126. <https://doi.org/10.2174/1566523217666170510151940>.
52. Houshmand, H., & Bergqvist, A. (2003). Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 phage display. *Biochemical and biophysical research communications*, 309(3), 695-701. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.054>
53. Iannolo, G., Minenkova, O., Petruzzelli, R., & Cesareni, G. (1995). Modifying filamentous phage capsid: limits in the size of the major capsid protein. *Journal of molecular biology*, 248(4), 835-844. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1995.0264>
54. Jacobsson, K., & Frykberg, L. (2001). Shotgun phage display cloning. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 4(2), 135-143. <https://doi.org/10.2174/1386207013331255>
55. Jaroszewicz, W., Morcinek-Orłowska, J., Pierzynowska, K., Gaffke, L., & Węgrzyn, G. (2022). Phage display and other peptide display technologies. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(2), fuab052. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab052>

56. Jespers, L. S., Messens, J. H., Keyser, A. D., Eeckhout, D., Brande, I. V. D., Gansemans, Y. G., ... & Stanssens, P. E. (1995). Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. *Bio/Technology*, *13*(4), 378-382. <https://doi.org/10.1038/nbt0495-378>
57. Jiang, J., Abu-Shilbayeh, L. A. R. A., & Rao, V. B. (1997). Display of a PorA peptide from *Neisseria meningitidis* on the bacteriophage T4 capsid surface. *Infection and immunity*, *65*(11), 4770-4777. <https://doi.org/10.1128/iai.65.11.4770-4777.1997>
58. Kallen, K. J., Grötzinger, J., & Rose-John, S. (2000). New perspectives on the design of cytokines and growth factors. *Trends in biotechnology*, *18*(11), 455-461. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01492-X](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01492-X)
59. Kang, H. T., Bang, W. K., & Yu, Y. G. (2004). Identification and characterization of a novel angiostatin-binding protein by the display cloning method. *BMB Reports*, *37*(2), 159-166. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2004.37.2.159>
60. Kashiwagi, A., & Yomo, T. (2011). Ongoing phenotypic and genomic changes in experimental coevolution of RNA bacteriophage Q β and *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, *7*(8), e1002188. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002188>.
61. Katsura, I. (1976). Isolation of λ prophage mutants defective in structural genes: Their use for the study of bacteriophage morphogenesis. *Molecular and General Genetics MGG*, *148*(1), 31-42. <https://doi.org/10.1007/BF00268543>
62. Katsura, I. (1981). Structure and function of the major tail protein of bacteriophage lambda: mutants having small major tail protein molecules in their virion. *Journal of molecular biology*, *146*(4), 493-512. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90044-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90044-9)
63. Kim, H. Y., Lee, J. H., Kim, M. J., Park, S. C., Choi, M., Lee, W., ... & Kim, S. I. (2021). Development of a SARS-CoV-2-specific biosensor for antigen detection using scFv-Fc fusion proteins. *Biosensors and bioelectronics*, *175*, 112868. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112868>

64. Kolonin, M., Pasqualini, R., & Arap, W. (2001). Molecular addresses in blood vessels as targets for therapy. *Current opinion in chemical biology*, 5(3), 308-313. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00207-6](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00207-6)
65. Krajcikova, D., & Hartley, R. W. (2004). A new member of the bacterial ribonuclease inhibitor family from *Saccharopolyspora erythraea*. *FEBS letters*, 557(1-3), 164-168. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01468-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01468-6)
66. Kramer, R. A., Cox, F., van der Horst, M., van den Oudenrijn, S., Bia, J., Logtenberg, T., & de Kruif, J. (2003). A novel helper phage that improves phage display selection efficiency by preventing the amplification of phages without recombinant protein. *Nucleic acids research*, 31(11), e59-e59. <https://doi.org/10.1093/nar/gng058>
67. Kretzschmar, T., & Von Rüden, T. (2002). Antibody discovery: phage display. *Current opinion in biotechnology*, 13(6), 598-602. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00380-4](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00380-4)
68. Kristensen, P., Ravn, P., Jensen, K. B., & Jensen, K. (2000). Applying phage display technology in aging research. *Biogerontology*, 1, 67-78. <https://doi.org/10.1023/A:1010021505334>
69. Kuwabara, I., Maruyama, H., Kamisue, S., Shima, M., Yoshioka, A., & Maruyama, I. N. (1999). Mapping of the minimal domain encoding a conformational epitope by λ phage surface display: factor VIII inhibitor antibodies from haemophilia A patients. *Journal of immunological methods*, 224(1-2), 89-99. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00012-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00012-5)
70. Kuwabara, I., Maruyama, H., Mikawa, Y. G., Zuberi, R. I., Liu, F. T., & Maruyama, I. N. (1997). Efficient epitope mapping by bacteriophage λ surface display. *Nature biotechnology*, 15(1), 74-78. <https://doi.org/10.1038/nbt0197-74>
71. Lambkin, I., & Pinilla, C. (2002). Targeting approaches to oral drug delivery. *Expert opinion on biological therapy*, 2(1), 67-73. <https://doi.org/10.1517/14712598.2.1.67>
72. Lennarz, W. J., & Lane, M. D. (2013). *Encyclopedia of biological chemistry*. Academic Press.

73. Li, Y., Yang, K.D., Duan, H.Y., Du, Y.N., & Ye, J.F. (2023). Phage-based peptides for pancreatic cancer diagnosis and treatment: Alternative approach. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1231503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1231503>
74. Lin, J.T., & Lis, J.T. (1999). Glycogen synthase phosphatase interacts with heat shock factor to activate CUP1 gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, *19*(5), 3237-3245. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.5.3237>
75. Lino, C.A., Caldeira, J.C., & Peabody, D.S. (2017). Display of single-chain variable fragments on bacteriophage MS2 virus-like particles. *Journal of nanobiotechnology*, *15*, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0240-7>.
76. Liu, D., Tang, L., Zhou, C., Tan, L. (2006). Immunotherapy of EGFR-positive tumor based on recombinant EGFR phage vaccine. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, *5*, 189-193. <https://doi.org/10.1007/s10330-006-0474-1>
77. Lohse, P.A., Wright, M.C. (2001). In vitro protein display in drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, *4*(2), 198-204. PMID: 11378959.
78. Lopes, R.S., Queiroz, M.A.F., Gomes, S.T.M., Vallinoto, A.C.R., Goulart, L.R., Ishak, R. (2018). Phage display: an important tool in the discovery of peptides with anti-HIV activity. *Biotechnology advances*, *36*(7), 1847-1854. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.07.003>
79. Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J., ... & Koonin, E.V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(2), 67-83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
80. Malys, N., Chang, D.Y., Baumann, R.G., Xie, D., Black, L.W. (2002). A bipartite bacteriophage T4 SOC and HOC randomized peptide display library: detection and analysis of phage T4 terminase (gp17) and late σ factor (gp55) interaction. *Journal of molecular biology*, *319*(2), 289-304. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00298-X)

81. Maruyama, I.N., Maruyama, H.I., Brenner, S. (1994). Lambda foo: a lambda phage vector for the expression of foreign proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(17), 8273-8277. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.17.8273>
82. Mertens, P., Walgraffe, D., Laurent, T., Deschrevel, N., Letesson, J.J., De Bolle, X. (2001). Selection of phage-displayed peptides recognised by monoclonal antibodies directed against the lipopolysaccharide of Brucella. *International reviews of immunology*, 20(2), 181-199. <https://doi.org/10.3109/08830180109043033>
83. Mikawa, Y. G., Maruyama, I. N., & Brenner, S. (1996). Surface display of proteins on bacteriophage λ heads. *Journal of molecular biology*, 262(1), 21-30. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0495>
84. Min Jou, W., Haegeman, G., Ysebaert, M., & Fiers, W. (1972) Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature*. 1972;237(5350):82-8. <https://doi.org/10.1038/237082a0>
85. Moe, G. R., Tan, S., & Granoff, D. M. (1999). Molecular mimetics of polysaccharide epitopes as vaccine candidates for prevention of Neisseria meningitidis serogroup B disease. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 26(3-4), 209-226. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1999.tb01392.x>
86. Monaci, P., Urbanelli, L., & Fontana, L. (2001). Phage as gene delivery vectors. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 3(2), 159-169. PMID: 11338929
87. Moriki, T., Kuwabara, I., Liu, F. T., & Maruyama, I. N. (1999). Protein domain mapping by λ phage display: The minimal lactose-binding domain of galectin-3. *Biochemical and biophysical research communications*, 265(2), 291-296. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1666>
88. Morse, M.L., Lederberg, E.M., Lederberg, J. (1956). Transduction in Escherichia coli K-12. *Genetics*, 41(1), 142. <https://doi.org/10.1093/genetics/41.1.142>
89. Mullaney, B.P., Pallavicini, M.G. (2001). Protein-protein interactions in hematology and phage display. *Experimental hematology*, 29(10), 1136-1146. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(01\)00693-2](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(01)00693-2)

90. Murray, N. E., Murray, K. (1974). Manipulation of restriction targets in phage λ to form receptor chromosomes for DNA fragments. *Nature*, *251*(5475), 476-481. <https://doi.org/10.1038/251476a0>
91. Nakanishi, M., Eguchi, A., Akuta, T., Nagoshi, E., Fujita, S., Okabe, J., ... & Hasegawa, M. (2003). Basic peptides as functional components of non-viral gene transfer vehicles. *Current Protein and Peptide Science*, *4*(2), 141-150. <https://doi.org/10.2174/1389203033487234>
92. Nath, A., Bhattacharjee, R., Nandi, A., Sinha, A., Kar, S., Manoharan, N., ... & Suar, M. (2022). Phage delivered CRISPR-Cas system to combat multidrug-resistant pathogens in gut microbiome. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *151*, 113122. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113122>.
93. Nchinda, G. W., Al-Atoom, N., Coats, M. T., Cameron, J. M., & Waffo, A. B. (2021). Uniqueness of RNA coliphage Q β Display system in directed evolutionary biotechnology. *Viruses*, *13*(4), 568. <https://doi.org/10.3390/v13040568>
94. Niwa, M., Maruyama, H., Fujimoto, T., Dohi, K., & Maruyama, I. N. (2000). Affinity selection of cDNA libraries by λ phage surface display. *Gene*, *256*(1-2), 229-236. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00348-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00348-6)
95. Palma, M. (2023). Aspects of phage-based vaccines for protein and epitope immunization. *Vaccines*, *11*(2), 436. <https://doi.org/10.3390/vaccines11020436>
96. Park, J. Y., Moon, B. Y., Park, J. W., Thornton, J. A., Park, Y. H., & Seo, K. S. (2017). Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, *7*(1), 44929. Park, J. Y., Moon, B. Y., Park, J. W., Thornton, J. A., Park, Y. H., & Seo, K. S. (2017). Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, *7*(1), 44929. <https://doi.org/10.1038/srep44929>
97. Peltomaa, R., Benito-Peña, E., Barderas, R., & Moreno-Bondi, M. C. (2019). Phage display in the quest for new selective recognition elements for biosensors. *Acs Omega*, *4*(7), 11569-11580. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01206>

98. Peng, H., & Chen, I.A. (2021). Phage engineering and the evolutionary arms race. *Current opinion in biotechnology*, 68, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.09.009>
99. Petrenko, V.A., & Vodyanoy, V.J. (2003). Phage display for detection of biological threat agents. *Journal of microbiological methods*, 53(2), 253-262. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00029-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00029-0)
100. Pham, D.G., Madico, G.E., Quinn, T.C., Enzler, M.J., Smith, T.F., Gaydos, C.A. (1998). Use of lambda phage DNA as a hybrid internal control in a PCR-enzyme immunoassay to detect *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*, 36(7), 1919-1922. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.7.1919-1922.1998>.
101. Pini, A., & Bracci, L. (2000). Phage display of antibody fragments. *Current Protein and Peptide Science*, 1(2), 155-169. <https://doi.org/10.2174/1389203003381397>
102. Qi, H., Lu, H., Qiu, H.J., Petrenko, V., Liu, A. (2012). Phagemid vectors for phage display: properties, characteristics and construction. *Journal of molecular biology*, 417(3), 129-143. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.038>
103. Qian, Y., Fan, T., Wang, P., Zhang, X., Luo, J., Zhou, F., ... & Gao, F. (2017). A novel label-free homogeneous electrochemical immunosensor based on proximity hybridization-triggered isothermal exponential amplification induced G-quadruplex formation. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 248, 187-194. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.03.152>.
104. Qiu, J., LUO, P., WASMUND, K., STEPLEWSKI, Z., & KIEBER-EMMONS, T.H.O. (1999). Towards the development of peptide mimotopes of carbohydrate antigens as cancer vaccines. *Hybridoma*, 18(1), 103-112. <https://doi.org/10.1089/hyb.1999.18.103>
105. Ragothaman, M., & Yoo, S. Y. (2023). Engineered phage-based cancer vaccines: current advances and future directions. *Vaccines*, 11(5), 919. <https://doi.org/10.3390/vaccines11050919>
106. Ren, S. X., Ren, Z. J., Zhao, M. Y., Wang, X. B., Zuo, S. G., & Yu, F. (2009). Antitumor activity of endogenous mFlt4 displayed on a T4 phage nanoparticle

- surface. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(5), 637-645.
<https://doi.org/10.1038/aps.2009.44>
107. Ren, S., Zuo, S., Zhao, M., Wang, X., Wang, X., Chen, Y., ... & Ren, Z. (2011). Inhibition of tumor angiogenesis in lung cancer by T4 phage surface displaying mVEGFR2 vaccine. *Vaccine*, 29(34), 5802-5811.
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.051>
108. Ren, Z. J., & Black, L. W. (1998). Phage T4 SOC and HOC display of biologically active, full-length proteins on the viral capsid. *Gene*, 215(2), 439-444.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(98\)00298-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(98)00298-4)
109. Ren, Z. J., Black, L. W., Lewis, G. K., Wingfield, P. T., Locke, E. G., & Steven, A. C. (1996). Phage display of intact domains at high copy number: a system based on SOC, the small outer capsid protein of bacteriophage T4. *Protein science*, 5(9), 1833-1843. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050909>
110. Rodi, D. J., Makowski, L., & Kay, B. K. (2002). One from column A and two from column B: the benefits of phage display in molecular-recognition studies. *Current opinion in chemical biology*, 6(1), 92-96. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(01\)00287-3](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(01)00287-3)
111. Rondot, S., Koch, J., Breitling, F., & Dübel, S. (2001). A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature biotechnology*, 19(1), 75-78. <https://doi.org/10.1038/83567>
112. Rosenberg, A., Griffin, K., Studier, F. W., McCormick, M., Berg, J., Novy, R., & Mierendorf, R. (1996). T7Select phage display system: a powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *Innovations*, 6, 1-6.
113. Russel, M. (1993). Protein-protein interactoins during filamentous phage assembly. *Journal of molecular biology*, 231(3), 689-697.
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1320>
114. Russel, M. (1995). Moving through the membrane with filamentous phages. *Trends in microbiology*, 3(6), 223-228. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88929-5](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88929-5).

115. Russel, M., Linderoth, N. A., & Šali, A. (1997). Filamentous phage assembly: variation on a protein export theme. *Gene*, *192*(1), 23-32. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(96\)00801-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00801-3)
116. Sachdeva, P., Nath, G., & Jain, U. (2024). Phage based biosensors: Enhancing early detection of emerging pathogens in diagnostics. *Talanta Open*, *10*, 100345. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2024.100345>
117. Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., ... & Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *nature*, *265*(5596), 687-695. <https://doi.org/10.1038/265687a0>.
118. Santini, C., Brennan, D., Mennuni, C., Hoess, R. H., Nicosia, A., Cortese, R., & Luzzago, A. (1998). Efficient display of an HCV cDNA expression library as C-terminal fusion to the capsid protein D of bacteriophage lambda. *Journal of molecular biology*, *282*(1), 125-135. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1986>
119. Sheets, M. D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindqvist, E., Schier, R., ... & Marks, J. D. (1998). Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(11), 6157-6162. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6157>
120. Sidhu, S.S. (2001). Engineering M13 for phage display. *Biomolecular engineering*, *18*(2), 57-63. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(01\)00087-9](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(01)00087-9)
121. Sidhu, S.S., Weiss, G.A., & Wells, J.A. (2000). High copy display of large proteins on phage for functional selections. *Journal of molecular biology*, *296*(2), 487-495. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3465>
122. Sioud, M., Hansen, M., & Dybwad, A. (2000). Profiling the immune responses in patient sera with peptide and cDNA display libraries. *International journal of molecular medicine*, *6*(2), 123-131. <https://doi.org/10.3892/ijmm.6.2.123>
123. Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, *228*(4705), 1315-1317. <https://doi.org/10.1126/science.4001944>

124. Smith, G. P., & Scott, J. K. (1993). [15] Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. In *Methods in enzymology* (Vol. 217, pp. 228-257). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(93\)17065-D](https://doi.org/10.1016/0076-6879(93)17065-D)
125. Soderlind, E., Carlsson, R., Borrebaeck, C. A., & Ohlin, M. (2001). The immune diversity in a test tube-non-immunised antibody libraries and functional variability in defined protein scaffolds. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 4(5), 409-416. <https://doi.org/10.2174/1386207013330968>
126. Spingola, M., & Peabody, D. S. (1997). MS2 coat protein mutants which bind Q β RNA. *Nucleic acids research*, 25(14), 2808-2815. <https://doi.org/10.1093/nar/25.14.2808>
127. Sternberg, N., & Hoess, R. H. (1995). Display of peptides and proteins on the surface of bacteriophage lambda. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(5), 1609-1613. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1609>
128. Stolz, J., Ludwig, A., Stadler, R., Biesgen, C., Hagemann, K., & Sauer, N. (1999). Structural analysis of a plant sucrose carrier using monoclonal antibodies and bacteriophage lambda surface display. *FEBS letters*, 453(3), 375-379. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00756-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00756-5)
129. Turnbough Jr, C.L. (2003). Discovery of phage display peptide ligands for species-specific detection of Bacillus spores. *Journal of microbiological methods*, 53(2), 263-271. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(03\)00030-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(03)00030-7)
130. Vaughan, T.J., Osbourn, J.K., & Tempest, P.R. (1998). Human antibodies by design. *Nature biotechnology*, 16(6), 535-539. <https://doi.org/10.1038/nbt0698-535>
131. Voorberg, J., & van den Brink, E.N. (2000). Phage display technology: a tool to explore the diversity of inhibitors to blood coagulation factor VIII. In *Seminars in thrombosis and hemostasis* (Vol. 26, No. 2, pp. 143-150). <https://doi.org/10.1055/s-2000-9816>
132. Vrancianu, C.O., Popa, L.I., Bleotu, C., & Chifiriuc, M.C. (2020). Targeting plasmids to limit acquisition and transmission of antimicrobial resistance. *Frontiers in microbiology*, 11, 761. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00761>

133. Waldor, M.K., Friedman, D.I., & Sankar Lal Adhya. (2005). Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology. 2005. Washington (DC): ASM Press.
134. Walker, J.M., & Wilson, K. (Eds.). (2010). *Principles and Techniques of biochemistry and molecular biology*. Cambridge university press.
135. Wang, H., Yang, Y., Xu, Y., Chen, Y., Zhang, W., Liu, T., ... & Wang, K. (2024). Phage-based delivery systems: Engineering, applications, and challenges in nanomedicines. *Journal of Nanobiotechnology*, 22(1), 365. <https://doi.org/10.1186/s12951-024-02576-4>
136. Weetman, A.P. (2003). Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. *European Journal of Endocrinology*, 148(1), 1-9. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1480001>
137. Wimmer, F., & Beisel, C.L. (2020). CRISPR-Cas systems and the paradox of self-targeting spacers. *Frontiers in microbiology*, 10, 3078. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03078>
138. Wolfe, S.A., Nekludova, L., & Pabo, C.O. (2000). DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 29(1), 183-212. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.183>
139. Yang, T., Zhang, Q., Miao, Y., Lyu, Y., Xu, Y., Yang, M., & Mao, C. (2024). Tumor-Homing Phage Nanofibers for Nanozyme-Enhanced Targeted Breast Cancer Therapy. *Advanced Materials*, 2403756. <https://doi.org/10.1002/adma.202403756>
140. Yin, Z., Wu, X., Kaczanowska, K., Sungsuwan, S., Comellas Aragones, M., Pett, C., ... & Huang, X. (2018). Antitumor humoral and T cell responses by mucin-1 conjugates of bacteriophage Q β in wild-type mice. *ACS chemical biology*, 13(6), 1668-1676. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00313>
141. Yosef, I., Manor, M., Kiro, R., & Qimron, U. (2015). Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proceedings of the national academy of sciences*, 112(23), 7267-7272. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500107112>

142. Zhang, J., Li, D., Zhang, R., Peng, R., & Li, J. (2021). Delivery of microRNA-21-sponge and pre-microRNA-122 by MS2 virus-like particles to therapeutically target hepatocellular carcinoma cells. *Experimental biology and medicine*, 246(23), 2463-2472. <https://doi.org/10.1177/15353702211035689>
143. Zhang, Y., Pak, J. W., Maruyama, I. N., & Machida, M. (2000). Affinity Selection of DNA-Binding Proteins Displayed on Bacteriophage λ . *The journal of biochemistry*, 127(6), 1057-1063. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022698>
144. Zheng, Y., Li, J., Wang, B., Han, J., Hao, Y., Wang, S., ... & Peng, W. (2020). Endogenous type I CRISPR-Cas: from foreign DNA defense to prokaryotic engineering. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 62. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00062>
145. Zinder, N. D., & Lederberg, J. (1952). Genetic exchange in Salmonella. *Journal of bacteriology*, 64(5), 679-699. <https://doi.org/10.1128/jb.64.5.679-699.1952>

РОЗДІЛ 4. ІНШІ СФЕРИ ЗАСТОСУВАННЯ БАКТЕРІОФАГІВ

4.1. Підходи до застосування фагів у харчовій промисловості

Інфекційні захворювання у сільському господарстві, аквакультури та тваринництві є важливою проблемою харчової промисловості, де бактеріальні хвороби призводять до втрат врожаю, проблем зі здоров'ям у тварин, появи шкідливих харчових відходів, забруднення води та ґрунту антимікробними препаратами (Garvey, 2020). В процесі виробництва харчових продуктів також присутні ризики появи нових бактеріальних інфекцій, що можуть стати причиною зоонозів (Rohr et al., 2019). Бактеріальне забруднення харчових продуктів викликає спалахи, що призводять до високої захворюваності і смертності у всьому світі, ускладнюючи контроль безпеки харчових продуктів. У поєднанні з проблемою резистентності до антибіотиків, харчові інфекційні захворювання стають ще більшим економічним тягарем і ризиком для здоров'я населення. Незалежно від розвитку сучасних технологій, виробничих практик, контролю якості та гігієни, змін у тваринництві, агрономічних процесах, а також у харчових або сільськогосподарських технологіях, безпека харчових продуктів постійно зазнає виклику через зміни способу життя та потреб споживачів, а також розширення міжнародної торгівлі. Найефективнішими засобами боротьби з бактеріальною контамінацією є належна виробнича гігієна, раціональна робота технологічної лінії та добре сплановане використання біоцидів і дезінфікуючих засобів (Maukonen et al., 2003). Однак, навіть якщо застосовуються всі превентивні процедури, бактерії все ще можуть бути виявленими в харчових продуктах і на поверхнях, що контактують з ними (Holah et al., 2002). Контамінація харчових продуктів можлива на всіх етапах виробничого ланцюга: від вирощування і збирання до кінцевого споживання. Окрім цього, здатність бактерій прикріплюватись до живих і інертних поверхонь, де вони створюють бактеріальні біоплівки і стають високотолерантними до різноманітних

антимікробних агентів, також сприяє поширенню патогенів у харчових продуктах і на поверхнях, що контактують з ними (Lewis, 2008). Сучасні методи контролю патогенів у рослинництві зазвичай включають використання антимікробних агентів, таких як дезінфікуючі засоби, антибіотики, фунгіциди та пестициди, проте ці підходи не вважаються екологічно стійкими. Застосування консервантів, як методу боротьби з мікробним псуванням продукції, також може негативно вплинути на органолептичні та харчові якості їжі. Забруднення суходолу та води такими сполуками створює тиск на організми та екосистеми. Ті ж пестициди все частіше підлягають регулятивним обмеженням із заохоченням фермерів переходити до екологічно безпечних альтернатив агрохімікатам (Fenibo et al., 2021). Загрозливою є ситуація і у тваринництві, де антибіотики використовуються у великих масштабах, здебільшого в цілях профілактики. Необдумане та надмірне використання антибіотиків у цьому секторі загрожує їхній ефективності для контролю патогенів через появу та поширення *мультирезистентності* у бактерій (стійкості певного бактеріального штаму до більшості антибіотиків окрім одного або декількох). Антибіотикорезистентні бактерії є причиною понад 4,5 мільйонів смертей у всьому світі щороку, і якщо тенденції резистентності та відсутність розробки нових антибіотиків збережуться, це число за очікуваннями зросте до 10 мільйонів до 2050 року. У світлі цього бактеріофаги та їх похідні все частіше визнаються ефективним та безпечним методом обробки харчових продуктів на різних етапах виробничого процесу.

Фаги містяться майже в усіх харчових продуктах і були виділені з сирого м'яса (Atterbury et al., 2003; Hsu et al., 2002), обробленої їжі (Kennedy et al., 1986), ферментованих, кисломолочних (Suárez et al., 2002) та морепродуктів (Crosi et al., 2000; Kennedy et al., 1986). Це підтверджує той факт, що фаги завжди можуть бути виділені з того ж середовища, де живе їхній бактеріальний хазяїн.

Бактеріофаги та фагові коктейлі (суміш з декількох літичних бактеріофагів) відповідають усім критеріям екологічно чистого та безпечного методу боротьби

з патогенними бактеріями харчового походження. В контексті харчової промисловості, застосування фагів має ряд переваг:

- Бактеріофаги є високоспецифічними і зазвичай можуть інфікувати лише один вид бактерій. Таким чином, мікробіота в шлунково-кишковому тракті людини і тварин не руйнується;
- Під час обробки бактеріофагами не спостерігається негативного впливу на еукаріотичні клітини;
- Бактеріофаги всюдишні та присутні в багатьох продуктах харчування та різних типах ґрунтів і джерел води;
- Фаги не впливають на товарний вигляд та смак продуктів;
- Більшість бактеріофагів мають стійкість до стресових умов, що можуть виникати під час обробки їжі (Gilmore, 2012; Kazi & Annapure, 2016).

Використання фагів може здійснюватися на чотирьох різних етапах виробничого ланцюга або ж етапах «від ферми – до виделки» (рис. 4.1). **Терапія** — це стратегія, якої дотримуються у первинному виробництві безпосередньо перед забоєм або під час росту тварин, перед посадкою і під час росту рослин, щоб усунути ймовірність захворювання до збору врожаю чи отримання тваринного продукту. Фаги можна вводити перорально, ректально (наприклад, для контролю *E. coli* у жуйних), додавати в питну воду або їжу у випадку тварин, або обробляти насіння, воду, ґрунт та рослини під час посадки та росту. **Біоконтроль** — запобігання зараженню мікроорганізмами харчових продуктів під час промислової обробки та пакування. Цього можна досягти шляхом нанесення фагів безпосередньо на харчові поверхні; наприклад, при обробці м'яса, свіжих продуктів і готових харчових продуктів, або навіть змішувати їх із сирим молоком. У цих випадках можна досягти ефективних результатів, застосовуючи високі титри фагів для контролю патогенів за допомогою «лізису ззовні». Це механізм, за якого кількість адсорбованих фагових частинок настільки велика, що це призводить до передчасного руйнування клітинної стінки і при такому типі лізису нові фаги не виділяються (Goode et al., 2003).



Рис. 4.1 – Способи застосування бактеріофагів у харчовому ланцюгу від первинного виробництва до столу споживача

Під час **санітарної обробки** або **біосанації** фаги застосовуються для запобігання утворення біоплівки. Біоплівки можуть утворюватись на поверхнях обладнання, яке використовується, наприклад, для зберігання або обробки харчових продуктів, особливо в місцях, які важко очистити або продезінфікувати. Фаги вже демонстрували успіх проти біоплівки *in vitro* (за ідеальних умов). Для **біоконсервації** бактеріофаги безпосередньо додають до харчових продуктів для продовження терміну придатності (Gilmore, 2012; Kazi & Annappure, 2016). Повідомляється, що фаги можуть лізувати хазяїв за низьких температур до 1°C (Greer, 1982, 1988), лімітуючи ріст контамінуючих бактерій і на охолоджених продуктах (у випадку психротрофних бактерій).

На сьогоднішній день проведено безліч досліджень щодо використання фагів для біоконтролю та терапії у харчовій індустрії. В цьому розділі пропонується огляд результатів таких досліджень та перспективи використання фагів у рослинництві, тваринництві та при обробці продуктів.

4.2. Застосування бактеріофагів у рослинництві

Фітопатогени, які уражають сільськогосподарські культури, спричиняють захворювання рослин, втрати врожаїв та значні економічні збитки по всьому світу. Очікується, що людська популяція досягне 9,6 мільярда до 2050 року, що призведе до зростання попиту на їжу. Приблизно 70% світового продовольчого запасу може знадобитися для задоволення цих потреб. Для досягнення такого зростання передбачається, що постачання сільськогосподарської продукції може збільшитися на 80-110%. Для досягнення таких врожаїв потрібно мінімізувати втрати, спричинені поширенням збудників хвороб. Підраховано, що в усьому світі від рослинних хвороб щорічно втрачається 20-30% врожаю (He et al., 2016). Основні патогени рослин — паразитичні рослини, ооміцети, нематоди, віруси, гриби і бактерії. Серед фітопатогенів налічується понад 200 видів бактерій (Buttimer et al., 2017). Бактеріальні збудники інфекцій у сільськогосподарських рослин включають такі види, як *Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Erwinia spp.*, *Ralstonia spp.*, *Agrobacterium spp.*, *Xylella spp.*, *Pectobacterium spp.* і *Dickeya spp.* (Sieiro et al., 2020). Вони спричиняють величезні втрати під час вирощування, зберігання та транспортування врожаю. Хоча для боротьби з цими фітопатогенами застосовувалися різні стратегії, вони залишаються проблемою для сільськогосподарських виробництв.

Вирощування сільськогосподарських рослинних культур забирає величезний обсяг економічних та людських ресурсів. При цьому приблизно третина того, що вирощується, потрапляє на звалище. Певна частина гние на складах під час зберігання та на полицях магазинів під час продажу; іншу викидають на смітник споживачі, але суттєву частину відходів складає врожай, втрачений через шкідників, в тому числі фітопатогенних бактерій.

Бактеріальні хвороби є проблемою для багатьох агрокультур по всьому світу, зокрема для томатів, картоплі, перцю, арахісу, тютюну тощо. Їх збудниками виступають бактерії, які так само швидко набувають стійкості до пестицидів, як патогени людини – до антибіотиків. Тому, виникає негайна потреба використання

природних «ворогів» бактерій – бактеріофагів. Фаговий біоконтроль має переваги перед хімічним контролем, оскільки спеціально виготовлені фагові коктейлі можуть бути чутливі до певних бактерій, що викликають захворювання. На відміну від хімічних заходів контролю, фагові суміші можна легко адаптувати до стійкості бактерій, яка може розвиватися з часом.

4.2.1. Бактеріофаги як альтернатива агрохімікатам в боротьбі проти фітопатогенних бактерій

У 80-ті роки ХХ століття антибіотики почали використовувати в рослинництві для ліквідації хвороб, спричинених бактеріями фруктових, овочевих і навіть декоративних культур. Стрептоміцин та окситетрациклін використовували для лікування бактеріальних інфекцій фруктових культур, касугаміцин та валідоміцин — для боротьби з грибковими хворобами рису, при цьому обробці піддавалися величезні території. У 1995 році в США для обробки фруктових дерев використовували понад 11 т стрептоміцину та 6 т окситетрацикліну, обробляли 20% насаджень дерев яблук, 35–40% — дерев персиків, 4% — дерев груш.

Протягом тривалого часу найпоширенішими стратегіями контролю збудників бактеріозів рослин є використання антибіотиків (наприклад, стрептоміцин і сполук на основі міді. Проте широке використання цих сполук зумовило селекцію резистентних штамів багатьох фітопатогенів (Sundin & Wang, 2018; Torre et al., 2018). Стійкість до стрептоміцину спостерігається у родів *Erwinia*, *Pseudomonas* і *Xanthomonas spp.* (Hyun et al., 2012; Lee et al., 2005; Tancos & Cox, 2016; Xu et al., 2013).

І хоча антибіотики в рослинництві використовуються не так широко, як у медицині та ветеринарії, поява стійких бактеріальних патогенів є серйозною проблемою через зниження ними росту та продуктивності рослин та згубного впливу на довкілля і здоров'я людини. Сьогодні увага дослідників зосереджена на розробці альтернативної стратегії лікування бактеріальних захворювань рослин.

Найоптимальнішою формою застосування фагів є так звані *фагові коктейлі* – суміш різних бактеріофагів до одного або більше видів бактерій. Коктейлі використовуються для запобігання розвитку фагорезистентних бактерій. Постійна гонка озброєнь між бактеріофагами та бактеріями призвела до розвитку множинних механізмів резистентності до бактеріофагів у бактерій, таких як пригнічення адсорбції фагів, абортівна інфекція, імунна система CRISPR/Cas та системи рестрикції-модифікації (van Houte et al., 2016). Наприклад, стійкість до бактеріофагів у *Ralstonia solanacearum* стала очевидною приблизно через 30 годин після додавання бактеріофага в культуру (Fujiwara et al., 2011). Використовуючи більше ніж один тип бактеріофагу, чутливі бактерії не розвивали стійкість до всіх бактеріофагів одночасно. Існують багато досліджень, які підтверджують ефективність фагових коктейлів проти фітобактерій в лабораторних або контрольованих умовах, наприклад *Erwinia spp.* (викликає бактеріальну м'яку гниль і опіки яблуні та груші; один з відомих фагів - Y2), *Xanthomonas spp.* (спричиняє бактеріальну плямистість томатів, персиків і цитрусових, опіки волоського горіха, опіки листя цибулі та рак цитрусових; специфічні до фагів F8, ФХаасА1, СР2, ФХас2005-1, ссФ13, ФХ44), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (викликає галофтороз квасолі; лізується фагами Ph1, Ph2), *R. solanacearum* (викликає бактеріальне в'янення томатів і тютюну; відомий специфічний фаг – RSL1) і багато інших (Balogh et al., 2010; Vorn et al., 2015; Fujiwara et al., 2011).

Для подолання стійкості бактерій до бактеріофагів також було розроблено і запатентовано технологію, яка включає приготування суміші мутантних бактеріофагів (h-) зі зміненими діапазонами хазяїв. Н-мутантні бактеріофаги демонстрували широкий внутрішньовидовий діапазон, включаючи штами бактерій, які стійкі до батьківських бактеріофагів і зберігали специфічність щодо бактерій дикого типу. Суміш з п'яти мутантних бактеріофагів була створена для боротьби з бактеріальним опіком у герані, спричиненим *X. campestris* pv. *pelargonii*. Ці h-мутанти лізували всі 21 тестовані штами *X. campestris* pv. *pelargonii* (Flaherty et al., 2000). Крім того, щоденне застосування суміші

бактеріофагів ефективно пригнічувало поширення збудника бактеріального опіку герані в тепличних умовах. Також, подібну стратегію було використано для позакореневого внесення у якості біологічного контролю бактеріальної плямистості, спричиненої *X. campestris* pv. *vesicatoria* у томатів (Flaherty et al., 2001). Застосування бактеріофагів стабільно знижувало ступінь вираженості симптомів хвороби. Крім того рослини, оброблені бактеріофагами, також давали значно вищі врожаї, ніж необроблені рослини або рослини, оброблені бактерицидом міді/манкоцебу.

Комбінація бактеріофагів з іншими антимікробними засобами, що сприяють зниженню захворюваності рослин, такими як індуктори системної набутої резистентності рослин (SAR) та антибіотики, показала позитивні результати. У 2005 році дослідники оцінювали вплив комбінації індукторів SAR з іншими агентами біоконтролю на бактеріальну хворобу томатів, спричинену *X. campestris* pv. *vesicatoria* в тепличних умовах. Застосування бактеріофагів у поєднанні з ацибензолар-S-метилом пригнічує видиму гіперчутливість, викликану ацибензолар-S-метилом, і забезпечує високу ефективність контролю захворювання (Obradovic et al., 2005). Подібний підхід був також застосований для боротьби з бактеріальним опіком цибулі, спричиненим *X. axonopodis* pv. *allii* в польових умовах. Лікування сумішшю бактеріофагів разом з ацибензолар-S-метилом зменшувало прояви захворювання на 50%, порівняно з 31% при лікуванні гідроксидом міді та манкоцебом (Lang et al., 2007). В тепличних умовах інтеграція бактеріофага КФ1 і гідроксиду міді значно зменшила кількість уражень на листях перцю, викликаних *X. euvesicatoria* (81%:90%:88% для трьох окремих випробувань) (Gašić et al., 2018).

Незважаючи на те, що багато лабораторних звітів свідчать про значний потенціал бактеріофагів як засобів для біоконтролю, застосування бактеріофагів для боротьби з хворобами рослин у польових умовах все ще потребує досліджень для вдосконалення технологій та подолання певних обмежень.

4.2.2. Фаги у філосфері

У літературі наведено різноманітні методи застосування бактеріофагів для вивчення їхньої ефективності як засобів контролю фітопатогенів. Бактеріофаги в основному вносили безпосередньо в ризосферу шляхом поливання ґрунту або розпилювали на філосферу рослин. Фаги можуть потрапляти в філосферу різними шляхами. Один із шляхів – природний, коли фаги поширюються від кореневої системи рослини вгору до листя через судинну систему. Також комахи, які живляться на рослинах, можуть служити векторами для фагів, переносячи їх від однієї частини рослини до іншої або навіть між різними рослинами.

Для бактеріофагів філосфера є досить агресивним середовищем, в якому відбувається різке скорочення щільності їхньої популяції (Balogh et al., 2010). Багато досліджень у польових і лабораторних умовах продемонстрували, що бактеріофаги легко інактивуються під впливом високої температури, опромінення сонячним світлом (особливо спектру UV-A та UV-B), високого та низького значень рН (Fernández et al., 2018). УФ-випромінювання від сонця може швидко інактивувати фаги, пошкоджуючи їхню ДНК і перешкоджаючи реплікації та транскрипції. Це особливо важливо враховувати під час розробки і застосування фагів для біоконтролю в аграрному секторі. Так показано, що в умовах відкритого ґрунту спостерігалось швидке зниження чисельності популяцій фагів аж до повної їхньої інактивації через 36-48 год після обприскування (Tewfike & Desoky, 2015). Короткочасна витривалість бактеріофагів на поверхні листової пластинки є основним обмеженням їхнього застосування у філосфері. Було досліджено кілька підходів для підвищення ефективності їхньої ефективності. Препарати бактеріофагів з певними домішками, таким як кукурудзяне борошно, знежирене молоко, казеїн, сахароза, конго-червоний і лігнін (Arthurs et al., 2006; Balogh, 2002; Behle et al., 1996; Ignoffo et al., 1997); використання бактерій-хазяїв для розмноження бактеріофагів у поживному середовищі (Boulé et al., 2011; Tanaka et al., 1990), або використання рано вранці або ввечері (Iriarte et al., 2007) показали позитивні результати щодо стійкості бактеріофагів та ефективності лікування

бактеріофагами. На ефективність обробки бактеріофагами також можуть впливати багато інших факторів: бактеріальна флора, щільність популяції бактеріофагів, швидкість інактивування віріонів, терміни використання (лікування) та умови навколишнього середовища (J. Gill & Abedon, 2003).

Додатковою проблемою біологічного контролю з використанням бактеріофагів у сільському господарстві є низька кореляція між характеристиками бактеріофагів *in vitro*, такими як спектр хазяїв, характеристика негативних колоній, а також літична активність *in vitro* та фактична ефективність контролю в польових умовах (Bae et al., 2012; Bhunchoth et al., 2015).

Необхідно зауважити, що дані лабораторних досліджень не завжди збігаються з результатами польових випробувань. Наприклад, незважаючи на те, що біопроби *in vitro* продемонстрували стійкість бактеріофагів до різних факторів довкілля та зниження симптомів хвороби на листках цибулі-порей, спричиненої *P. syringae* pv. *porri*, у польових умовах істотних відмінностей між обробленими та необробленими рослинами не було виявлено (Rombouts et al., 2016). Використання бактеріофагу ΦRSL1, який повільно лізував клітини *in vitro*, порівняно з іншими ізольованими літичними бактеріофагами, показало ефективний результат на бактерії *R. solanacearum* (Fujiwara et al., 2011). Крім того, його активність проти *R. solanacearum* зберігалася протягом 4 місяців, тоді як інші високолітичні бактеріофаги не спричиняли подібних захисних ефектів на рослині (Ahmad et al., 2014). Дослідження фаготерапевтичного ефекту на рослинах, уражених *Xanthomonas*, проводилися протягом багатьох років (Balogh et al., 2008; Zaccardelli et al., 1992). Завдяки цим досліддам, вчені досягли важливих висновків: 1) доза фага для обробки має бути високою для досягнення кращого ефекту; 2) превентивна обробка або застосування на ранній стадії захворювання матиме кращі результати, аніж на більш пізніх етапах інфекції. До прикладу, дослідники обробляли одну групу листя персика фагом, специфічним до *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* за годину до бактеріальної інокуляції, а іншу групу – за 24 години. Результати показали наступне: у контрольній групі, яка не піддавалася обробці фагом, 58% листків були інфіковані; у групі, обробленій фагом за годину

до інокуляції, інфікованими були 22% листків; а у групі, обробленій фагом за 24 години, симптоми демонстрували 29% листків.

Інші дослідники провели експеримент, обробивши нектарини, уражені *X. campestris* pv. *pruni*, фагом F8. Вони дослідили ефективність цієї обробки як у контрольованих кліматичних умовах, так і у відкритому саду. Результати показали, що у 92% випадків за контрольованих умов хвороба не розвивалася після обробки фаговою суспензією. Вони також виявили, що зниження титрів фагів у садах було в 10^4 рази більшим, ніж у контрольованій камері (Zaccardelli et al., 1992). Потенційною причиною такого значного зменшення популяції фагів у природному середовищі була висока температура, зневоднення та УФ-випромінювання. Одним із методів запобігання інактивації фагів у відкритому просторі є суспензія фагів у 0,75% сухому знежиреному молоці та суміші кукурудзяного борошна з желатином, що містить 0,5% сахарози. Обидві формули підвищують стійкість фагів, послаблюючи вплив УФ-випромінювання та забезпечуючи стійкість до дощу. Дослідники також повідомили, що на активність фагів впливає час їх застосування. Ранній ранок або пізній вечір зазвичай вважаються найкращим часом для застосування фагів через зменшення інтенсивності ультрафіолетового опромінення (Balogh et al., 2008).

Серед інших субстанцій для підтримки активності фагів випробовували також натуральні екстракти червоного перцю, моркви, буряка, казеїн, соєвий пептон у розчині, Tween 80, астаксантин та ароматичні амінокислоти. Хоча результати випробувань *in vitro* щодо використання вищеописаних факторів захисту фагів у природному середовищі були багатообіцяючими, необхідно перевірити їх дію *in vivo* під час тривалого впливу природного УФ-випромінювання (Born et al., 2015). У випадку свіжих фруктів було продемонстровано, що рН фруктів впливає на стабільність і активність фагів (Leverentz et al., 2001). На розрізаних плодах дині перевірили ефективність фагів, специфічних для *Salmonella spp.* Концентрація бактерій зменшилася на 2,5 log при 20 °C і на 3,5 log при 10°C. Втім той самий коктейль бактеріофагів не викликав

жодного зменшення титрів бактерій у випадку яблук. Дослідники прийшли до висновку про пригнічення даних фагів низьким рН яблук.

Для впровадження фагоконтролю захворювань рослин у сучасне сільськогосподарське виробництво дуже важливо мати чітке розуміння, у яких агротехнічних ситуаціях застосування бактеріофагів може бути найефективнішим. Найбільший успіх фаготерапії досягається у закритих біологічних системах із контрольованими фізичними умовами. За польового землеробства таких ідеалізованих умов досягти майже неможливо, що не виключає успішного застосування фагопрепаратів і в цьому випадку (J. J. Gill & Numan, 2010; Goodridge, 2004).

Ефективне застосування фагів залежить від їх стабільності. Температура є найбільш вагомим фактором, що впливає на стабільність фагів, оскільки вона впливає на проліферацію, дію та збереження фагів (Kering et al., 2020). Інші фактори, що впливають на стабільність фагів, які використовуються для виготовлення фагових композицій — речовини та компоненти, які вони містять, форми, в яких вони використовуються, умови зберігання та методи застосування (Jończyk-Matysiak et al., 2019). Проблему нестабільності фагів при зберіганні можна вирішити, зберігаючи фаги при певній температурі (+4°C) та захищеному від світла місці. Таким чином, фагові коктейлі можуть зберігатися місяцями/роками без значної втрати титру (біологічної активності). Також, залежно від характеристики бактеріофага, вони можуть бути заморожені з бактерією-хазяєм або без неї (Balogh et al., 2010).

Альтернативний підхід до вирішення проблеми нестабільності фагів через неналежні умови зберігання передбачає отримання стабільної біорецептури, що супроводжується перетворенням препарату фага з рідкого стану в порошкоподібний. Такий спосіб приготування дозволяє фаговим препаратам витримувати різні умови навколишнього середовища протягом тривалого часу (Zhang et al., 2018). Авторами Leung et al., (2018) було проведено дослідження, для оцінки стабільності бактеріофагів у формі порошку та зберіганні при температурі навколишнього середовища. Згідно з результатами дослідження, порошок на

основі бактеріофага, може ефективно зберігатися до одного року у вакуумній упаковці при температурі +4°C та +20°C (Leung et al., 2018). Для вивчення стабільності зберігання фагів у вигляді порошку за умов навколишнього середовища було проведено ще одне подібне дослідження. Висушені препарати фагів були фізично та біологічно стійкі при тривалому зберіганні при температурі навколишнього середовища (R. Y. K. Chang et al., 2019).

Отже, численні дослідження щодо застосування бактеріофагів для боротьби з бактеріальними захворюваннями показали позитивні результати. Проте успішне застосування бактеріофагів проводилося в лабораторних умовах, в той час як сільськогосподарське виробництво в основному здійснюється на відкритих полях, де чинники навколишнього середовища постійно мінливі та неконтрольовані. Тому, для повної картини ефективності бактеріофагів у відкритих умовах, необхідно проводити більше польових досліджень.

4.2.3. Біоконтроль в рослинництві

Протягом останніх десятиліть було опубліковано чимало результатів досліджень, та незважаючи на це, існує небагато комерційних продуктів на основі бактеріофагів, які вийшли на ринок для боротьби з бактеріальними хворобами рослин (Buttimer et al., 2017).

У 2005 році FDA схвалило продукт на основі бактеріофагів Agriphage™ від компанії OmniLytics Inc. для лікування бактеріальної плямистості на культурах (Połaska & Sokołowska, 2019). Препарат призначений для боротьби з бактеріальною плямистістю або плямистістю томатів і перцю (є специфічними для *X. campestris* pv. *vesicatoria*, та *P. syringae* pv. *tomato*) (Reber, 2006). Угорська компанія Enviroinvest стала другою компанією, яка отримала реєстрацію на свій біопестицид під назвою ErwiPhage для боротьби з бактеріальним опіком яблунь (є специфічним для *Erwinia amylovora*). Пізніше став доступним препарат Biolyse™ шотландської компанії APS biocontrol, який використовують у боротьбі зі збудниками м'якої гнилі (*Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pseudomonas*) під час

зберігання рослинних продуктів. Даний препарат використовується для зберігання продукції мережею супермаркетів Tesco.

У деяких регіонах світу існують законодавчі проблеми, вирішення яких дозволило б ширше використання фагів для боротьби з бактеріальними хворобами рослин. Проблема бактеріофаг-опосередкованого біоконтролю полягає в тому, що фагові суміші/коктейлі необхідно постійно оновлювати. Це дозволяє адаптувати фаговий коктейль до відповідних патогенних бактеріальних штамів у певній ситуації, а також полегшує протидію будь-якому розвитку фагової резистентності під час застосування бактеріофагу. Попри успіх на ринку, існують законодавчі перешкоди, особливо в ЄС, де зміни в складі фагових коктейлів потребують повторної реєстрації, що призводить до затримок і додаткових витрат. Така ситуація вимагає більш гнучкого законодавства для підтримки застосування фагових продуктів як біопестицидів, враховуючи їхню здатність адаптуватися до нових штамів бактерій та протистояти розвитку резистентності (Doffkay et al., 2015).

Також розробка стандартних критеріїв відбору бактеріофагів потребує більшої уваги для подальшого розвитку фаготерапії. Багато досліджень продемонстрували, що поточні критерії можуть бути ефективними не у всіх випадках використання бактеріофагів (Ahmad et al., 2014; Rombouts et al., 2016).

Нині для боротьби з хворобами рослин використовуються лише літичні бактеріофаги, але все ще залишається питання щодо потенціалу та ризику помірних бактеріофагів. Хоча помірні бактеріофаги не розглядаються, як агенти для боротьби з хворобами рослин через їхній цикл реплікації, вони можуть бути модифіковані, щоб стати вірулентними або служити як спосіб доставки генетичних елементів для відновлення антимікробної чутливості чи порушення фактора вірулентності (Balogh et al., 2010). Більше того, у випадку виявлення патогенів на основі бактеріофагів, сконструйовані бактеріофаги мають на меті ввести маркерний ген у цільовий бактеріальний геном. Тому, незалежно від того, чи є бактеріофаги літичними або лізогенними, вони все одно потенційно діють на бактеріальний патоген (U. Farooq et al., 2018).

Отже, хоча агрохімікати, такі як антибіотики та мідь, все ще використовуються в основному для боротьби з бактеріальними хворобами рослин у польових умовах, існує значний потенціал використання бактеріофагів для зменшення кількості агрохімікатів або їх заміни для боротьби з бактеріальними хворобами рослин. Фаги є ефективним методом обробки головним чином при введенні суміші вірусів через короткий проміжок часу після зараження або на ранній стадії захворювання. Фагові коктейлі можна вносити в зрошувальні системи, обприскувати у вечірній час або превентивно замочувати насіння важливих сільськогосподарських культур перед посадкою. Подальші дослідження бактеріофагів та їх впливу на фітопатогенні бактерії є необхідними для пошуку більш ефективних та безпечних аналогів у боротьбі з патогенними бактеріями.

4.2.4. Потенційні проблеми використання фагів у біоконтролі

Основною перешкодою для застосування фагів є їхня специфічна дія лише на певні бактерії, що ускладнює створення універсального біоциду, ефективного проти всіх представників певного виду або роду бактерій. Використання фагових коктейлів може допомогти подолати цю проблему, але потрібно бути обережним, щоб не нашкодити корисним бактеріям, які можуть відігравати роль у підтримці продуктивності сільськогосподарських культур. Існує певна ймовірність, що використання фагів з широким спектром дії може призвести до зниження врожайності через інфекцію «корисних» бактерій. Також існують докази того, що фаги можуть інтегрувати свою ДНК у геноми рослин, що може мати невідомі наслідки для їх еволюції і взаємодії з мікробним середовищем.

4.2.5. Застосування фагів для оптимального біоконтролю на рослинах

Фаги – природні організми тієї ж екологічної ніші, як і бактерії, відповідно їх використання не впливає на стан великих екологічних систем. Їхня селекція та

застосування порівняно прості та недорогі. Сільськогосподарську «фаготерапію» можна поєднувати з більшістю інших методів хімічного та біологічного контролю, при цьому вона безпечна як для самих рослин, так і для людини та тварин.

Проте фаговий фітоконтроль – не панацея проти рослинних патогенів. Для ефективного застосування фаготерапії, зокрема у рослинництві, необхідно глибоко розуміти біологію та геноми бактеріофагів і цільових мікроорганізмів, досліджувати їх взаємодію та проводити ретельний відбір відповідних фагів. Зважаючи на вищесказане постає питання про перспективи у сільськогосподарської фаготерапії.

Загалом, фаги можуть бути важливим рішенням у сільському господарстві для мінімізації збитків внаслідок розвитку інфекцій рослин (Ioannou et al., 2023; Pereira et al., 2021). Вперше задокументовані експерименти з контролю та лікування бактеріальних хвороб рослин були проведені в Університеті штату Мічиган (США). У 1924 році виявлено, що фільтрат із тканин капусти, ураженої *Xanthomonas campestris*, здатний пригнічувати розвиток бактерії в лабораторних умовах. В 1926 р. було застосовано бактеріофаги для біоконтролю фітопатогенної бактерії *Erwinia carotovora subsp. atroseptica* (*Pectobacterium carotova subsp. atroseptica*), що викликає гниль бульб картоплі (Villalpando-Aguilar et al., 2022). Фаги, специфічні проти збудника чорної ніжки картоплі, виділяли безпосередньо з ґрунту. При нанесенні на бульби картоплі та коренеплоди моркви одночасно бактеріофагу та збудника цієї хвороби – бактерії *E. carotovora* (*P. carotovorum subsp. carotovorum*), прояви гниття спостерігались лише у тих пробах, де були відсутні бактеріофаги.

У 1934 р. англійський дослідник Р. Мессі дав пояснення інтригуючому факту, що частота та інтенсивність розвитку хвороби бавовнику – так званого «бактеріального опіку», викликаного бактерією *Xanthomonas malvacearum*, була меншою на території, яка затоплювалася водами Нілу. Він припустив, що основною причиною зниження інтенсивності хвороби є фаги, які заносяться

річковими водами, і наступного року довів свою гіпотезу, виявивши фаги в ґрунті тих ділянок, що затоплювались.

Нещодавні дослідження біоконтролю фагами на сільськогосподарських культурах виявили їхній значний потенціал у лікуванні різноманітних рослинних захворювань. На культурах, таких як картопля та томати, було зосереджено особливо багато досліджень. Наприклад, фаги продемонстрували високу ефективність проти патогенів, які спричинюють м'яку гниль картоплі, зокрема *Dickeya solani*, знижуючи ушкодження тканин бульб до 10% у лабораторних та польових умовах. Окрім картоплі та томатів, фаговий біоконтроль показав обнадійливі результати у лікуванні інших захворювань, таких як коричнева плямистість у грибів і бактеріальний опік у цибулі. Ці дослідження підкреслюють важливість фагів у забезпеченні ефективного біоконтролю, який може бути адаптований до різних патогенів і сільськогосподарських умов.

Прагнучи підвищити ефективність обробки бактеріофагами для боротьби з бактеріальною плямистістю рослин, було розроблено три препарати для захисту (Balogh et al., 2003). Розроблений склад препарату, який поєднує сахарозу, Cascrete NH-400 (водорозчинний казеїновий білковий полімер), прежелатинізоване кукурудзяне борошно та/або знежирене молоко, підвищував ефективність фагів проти *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* в тепличних та польових умовах. В дослідженні Ibrahim et al. препарат на основі бактеріофагів містив знежирене молоко та сахарозу в поєднанні з ацибензолар-S-метилом (ASM, фунгіцид), який застосовували проти *Xanthomonas citri subsp. citri*. Дослідження проводили на листках мексиканського лайма (*Citrus aurantifolia*) як у тепличних, так і польових умовах. Результати, отримані на основі даного фагу з використанням ASM, була вищою, ніж з використанням бактерицидів на основі міді (Ibrahim et al., 2017). Ще одне дослідження показало позитивні результати при використанні бактеріофагів у суміші з ASM при лікуванні бактеріальної інфекції *X. axonopodis pv. allii*, на листі цибулі (Lang et al., 2007).

Використовуючи композицію зі знежиреним молоком і сахарозою, вдалося збільшити терміни збереження фагів у дослідженнях *ex vivo*. Фаги проявляли

інфекційну активність щонайменше 7 днів на поверхні листя рослин перцю в тепличних умовах, демонструючи здатність зберігатися на поверхні рослині без присутності бактерії-хазяя. Також використовувалась композиція фагів та знежиреного молока для боротьби з *X. axonopodis* pv. *punicae* – фітопатогена, що інфікує гранатові дерева. Суміш фагів зменшила інтенсивність розвитку бактеріозу, коли рослини одночасно обробляли готовими препаратами фагів в знежиреному молоці. При цьому спостерігали також активацію росту рослин (Karn et al., 2022).

Даних щодо ефективності фагів у боротьбі з хворобами рослин небагато, але поступово ця сфера розвивається. Так, китайські вчені проводили оцінку можливості використання фаготерапії проти бактеріальних опіків, викликаних *R. solanacearum*, у томатів. Результати виявились цілком позитивними, а ефект фагів мав три складові. Для випробування як в умовах теплиці, так і у відкритому ґрунті було створено коктейль із чотирьох бактеріофагів, які показали найбільшу ефективність проти *R. solanacearum*. В обох умовах фаготерапія забезпечила зниження кількості фітопатогенів і, відповідно, зменшення захворюваності на томатах на 80% (перша складова фаготерапії). Бактерії, які не були знищені, тобто набули стійкості до використаних бактеріофагів, стали занадто повільно розмножуватися і не могли сформувати популяцію, достатню для розвитку захворювання рослин (друга складова фаготерапії). Крім того, різке зменшення у ґрунті популяції *R. solanacearum*, як у практичному значенні, так і в екологічному, звільнило простір для різноманітних корисних бактерій. Розмноження у ґрунті таких бактерій, які часто мають механізми активного протистояння фітопатогенним «родичам», є ще одним фактором захисту рослин від хвороб (третя складова фаготерапії) (Wang et al., 2019). Фаг PE204, специфічний до *R. solanacearum*, був використаний для біоконтролю бактеріального в'янення томатів. Результати свідчать про те, що можна застосувати фаг із поверхнево-активною речовиною шляхом обробки ґрунту навколо рослини для зменшення бактеріального зараження культур (Ває et al., 2012). Була доведена ефективність фагів у боротьбі зі збудниками м'якої гнилі на картоплі (Sieiro et al., 2020), з

Sarcoptes scabies на редьці, *Xanthomonas axonopodis* на листі цибулі, *Pectobacterium carotovorum* у салаті, а також бактеріальною плямистістю та в'яненням томатів. Фаги були активними навіть проти *Pseudomonas tolaasii*, що викликає бактеріози грибів (Nguyen et al., 2012). В таблиці 1 узагальнені результати робіт, в яких досліджувалась ефективність фагів проти фітопатогенів.

Таблиця 4.1 – Результати фаготерапевтичних досліджень на важливих рослинних культурах харчового сектора

Рослина, захворювання	Збудник	Метод обробки	Результат
Картопля, м'яка гниль	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	Обробка механічно пошкоджених бульб картоплі	Коктейль із шести фагів інфікував 93% протестованих штамів і досяг успіху в біоконтролі, зменшивши захворюваність (61%) і тяжкість захворювання (64%) (Carstens et al., 2019)
Картопля, м'яка гниль	<i>P. atrosepticum</i>	Обробка цілих бульб сумішшю фагів	Середня вага гнилої тканини значно зменшилася з 5,39 г в інфікованих рослинах до 0,31 г в оброблених бульбах (Buttimer et al., 2018)
Картопля, м'яка гниль	<i>P. atrosepticum</i> і <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	Ін'єкція зразків бульб бактерією і фагом	Бактеріофаги пригнічували ріст окремих бактеріальних ізолятів і суміші бактерій (Zaczek-Moczydłowska, Young, Trudgett, Plahe, et al., 2020)
Картопля, м'яка гниль	<i>Dickeya solani</i>	Механічно пошкоджені бульби спочатку омивали в фагових розчинах, потім інокульовані бактерією	Коктейль зміг знизити захворюваність заражених бульб з 93,3% до 48,9% і зменшити кількість хворих тканин на 75,3% (Carstens et al., 2018)
Картопля, м'яка гниль	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Превентивна обробка дорослих рослин спреєм з фагами	Обробка забрудненого ґрунту фагом також зменшила присутність цієї патогенної бактерії більш ніж у 5 разів порівняно з контролем через тиждень після обприскування фагом (Wei et al., 2017)
Томати, в'янення	<i>R. solanacearum</i>	Обробка ґрунту бактерією та фагами	Попередня обробка фагом не була ефективною, але обробка вже уражених рослин фагом PE204 сповільнила розвиток бактеріального в'янення (Bae et al., 2012)

Томати, в'янення	<i>R.solanacearum</i>	Полив рослин фаговими суспензіями	Коктейлі фагів показали високу ефективність зі зменшенням популяції бактерій на кілька порядків всього за кілька годин (Álvarez et al., 2019)
Томати, в'янення	<i>R.solanacearum</i>	Полив рослин фаговими суспензіями	Застосування фагів знизило частоту захворювань до 80% у тепличних і польових експериментах протягом одного сезону (Wang et al., 2019)
Томати, в'янення	<i>Pseudomonas syringae</i>	Додавання фагів до саджанців томатів в пробірках перед висадженням	Передобробка допомогала зменшити кінцеву концентрацію бактерій (Hernandez et al., 2020)
Вишня, бактеріальний рак	<i>P.syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>P.syringae</i> pv. <i>orsprunorum</i>	Оприскування фагами листя вишні	Обробка фагами призвела до уповільнення прогресування захворювання та зменшення концентрації <i>P. syringae</i> на 15–40% (Rabiey et al., 2020)
Цибуля, м'яка гниль	<i>Pectobacterium</i> sp.	У польових випробуваннях використовували два способи застосування (занурення та розпилення) фагового коктейлю	Збільшення кількості здорових рослин серед врожаю у порівнянні з контролем, зменшення симптомів м'якої гнилі (Zaczek-Moczydłowska, Young, Trudgett, Fleming, et al., 2020)
Капуста кольрабі, чорна гниль	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Обприскування надземної вегетативної частини суспензіями фага і бактерії в різний час і концентрації	Фаг зменшив симптоми хвороби чорної гнилі до 45% (Papaïanni et al., 2020)
Диня, плямистість плодів	<i>Acidovorax citrulli</i>	Замочування насіння у фаговій суспензії	У дослідній групі 27% рослин демонстрували симптоми проти 80% у контрольній, крім того, фаг був виявлений за допомогою ПЛР у тканинах листя через 8 годин після додавання фага в ґрунт (Rahimi-Midani & Choi, 2020)
Виноград, хвороба Пірса	<i>Xylella fastidiosa</i> subsp. <i>fastidiosa</i>	Ін'єкція виноградної лози	Фаговий коктейль значно знизив рівень <i>X. fastidiosa</i> у виноградних лозах і запобіг розвитку симптомів (Das et al., 2015)
Апельсин, бактеріальна плямистість	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citrumelo</i>	Обробка спреєм	У комерційному та експериментальному розплідниках цитрусових застосування фагів значно зменшило прогресування хвороби на валенсійських апельсинах (Balogh et al., 2008)

Груші та яблуневі дерева, бактеріальний опік плодових	<i>Erwinia amylovora</i>	Обробка спреєм	Фаги ФЕа1337-26 і ФЕа2345-6 зменшили бактеріальну інфекцію на 84% і 96% відповідно; Фаг ФЕа2345-6 у поєднанні з Eh21-5 зменшив інфекцію на квітках яблуні з ефективністю, порівнянною з ефективністю антибіотика стрептоміцину (Boulé et al., 2011)
---	--------------------------	----------------	---

4.2.6. Інші застосування фагів у минулому та майбутньому

Раніше фаготипування використовували для епідеміологічних досліджень фітопатогенів, дозволяючи ідентифікувати конкретні штами видів на основі їхньої чутливості до певних фагів. Однак, цей метод мав обмеження, такі як генерація хибнопозитивних та хибнонегативних результатів і потреба в ізоляції чистих культур для ідентифікації. Сучасні дослідження фітопатогенів переходять до використання удосконалених молекулярних технік. Розроблені фагові детекційні системи, спочатку призначені для діагностики патогенів у людей і тварин, тепер використовуються для виявлення фітопатогенів. Наприклад, фагова детекція *R. solanacearum* з використанням кількісної ПЛР (qPCR).

Ефективний контроль захворювань рослин вимагає інтегрованого підходу. Фаговий біоконтроль — це перспективний, але ще не поширений метод, який може доповнити існуючі засоби контролю. Фаги є природними агентами, ідеально підходять для органічного землеробства, мають можливість адаптації до нових штамів бактерій і можуть бути інтегровані з іншими методами біо- та хімічного контролю. Хоча вони чутливі до УФ-випромінювання та деяких ґрунтових умов, це можна подолати за допомогою захисних субстанцій та правильного часу застосування. Фаги також мають потенціал у фаговій діагностиці з високою чутливістю (Buttimer et al., 2017).

Важливе значення також має співіснування рослин та бактерій. Так, доведено, що бактеріофаги здатні виживати у ґрунті завдяки ризосфері. Крім того, існування бактеріофагів в подібних умовах забезпечує їм можливість уражувати

нових хазяїв – бактерій, що знаходяться біля кореневої зони. Дослідження показують, що в деяких випадках виділити фаги із ґрунту простіше, ніж з інфікованих бактеріями верхніх частин рослини – пагонів, листя, стебел. Зокрема, це доведено для фагів бактерії *Erwinia amylovora*. Проте рослини також можуть впливати на бактеріофаги. Так, для деяких рослин доведена активація лізогенії. Можливо рослина використовує це задля звільнення від фітопатогенних бактерій. Подібний ефект доведений експериментально: екстракт листя шовковиці здатен індукувати лізогенію у фагів *Pseudomonas syringae* (J. Gill & Abedon, 2003).

Використовуючи фагову терапію вдалося побороти декілька бактеріальних захворювань рослин. Найбільш релевантні фітопатогенні бактерії, які викликають ураження сільськогосподарських культур і впливають на продукти харчування виробництва в усьому світі – це *Pseudomonas spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Pectobacterium spp.*, *Ralstonia spp.*, *Burkholderia spp.*, *Dickeya spp.*, *Clavibacter ichiganensis* та *Agrobacterium tumefaciens* (Villalpando-Aguilar et al., 2022). Для боротьби з цими фітопатогенами використовували ізоляти фагів з хвостовим відростком (переважно подоподібні та міоподібні бактеріофаги) (Korniienko et al., 2022).

Багато досліджень проводиться із залученням фагів для боротьби з фітопатогенними бактеріями на різних видах рослин і, залежно від характеристик насаджень і бактеріальних захворювань, різні стратегії використання фагів знаходяться під пильною увагою. Оскільки фаги націлені виключно на певних бактеріальних хазяїв, вони ідеальні для використання у сільському господарстві, оскільки використання літичних фагів не впливає на захисну бактеріальну флору рослин (Laglaguano & Cordova, 2019).

Зараз фаги застосовують у польових умовах, включаючи замочування (насіння рослин або розсаду перед посадкою занурюють у розчин фагового коктейлю), інфільтрацію (фаголізати безпосередньо вводять у тканини рослин (ксилему) за допомогою ін'єкційного шприца), обприскування (бактеріофаги наносять місцево на філосферу), полив ґрунту (внесення бактеріофагів до ризосфери) (Baliyan et al., 2022).

Серйозну загрозу для виноробної промисловості Європи становлять гамма-протеобактерії *Xylella fastidiosa subsp. fastidiosa*, які викликають хворобу Пірса (виноградних лоз). Підібраний коктейль із чотирьох літичних фагів виявився ефективним терапевтичним агентом для біоконтролю *X. fastidiosa*, а також синдромів швидкого гниття оливи та опіку листя олеандру, мигдалю чи кави (Ahern et al., 2014). І якщо виноробство викликає інтерес не у всіх, то картоплярство — це стратегічна галузь. Застосування препарату у формі коктейлю, що включає шість ізолятів фагів, може нейтралізувати до 98% бактерій *R. solanacearum*, які є збудниками бактеріального в'янення картоплі та томатів (Wang et al., 2019).

Фаги є ефективними агентами зниження частоти захворювань бактеріальної фітофтори цибулі-порей, спричиненої *P. syringae pv. porri*, чорної гнилі броколі, спричиненої *X. campestris pv. campestris*, бактеріальної плямистості перцю, викликаной *X. euvesicatoria* та інших (T. Faroog et al., 2022).

Отже, бактеріофаги можуть бути корисними в біологічному контролі бактеріальних захворювань рослин, але все ще існують значні проблеми, які необхідно подолати. Система використання фагів для сільського господарства мають різні процеси, протоколи та виклики, такі як:

- відбір і виявлення специфічного бактеріофагу;
- терапевтичне підтвердження концепції;
- розвиток технології;
- визначення ринку;
- передача технологій;
- комерційне розширення;
- процедури регулювання/реєстрації;
- адаптація технології для кінцевого користувача (Svircev et al., 2018).

Незважаючи на незліченні переваги біоконтролю на основі фагів, все ще існують труднощі та проблеми, які необхідно вирішити, включаючи наступне:

- діапазон хазяїв фагів може бути занадто вузький, оскільки, хоча вузька специфічність має переваги, специфічність серотипу може обмежувати ефективність фага;
- необхідність захисту від несприятливих умов навколишнього середовища;
- безпечне розмноження фагів, специфічних до фітопатогенних штамів;
- стандартизована очистка фагів, придатних для бактеріального біоконтролю;
- конкретні правила та закони щодо використання фагів (Doffkay et al., 2015).

Дія фітопатогенних бактерій завдає значної шкоди світовому сільському господарству. Боротися з такими інфекціями завжди непросто. Як правило, сільськогосподарські рослини вирощуються на великих площах, і в цьому випадку індивідуальний моніторинг і обробка кожної рослини – процес дуже трудомісткий і дорогий, якщо взагалі можливий. У рослинництві боротьба з бур'янами, шкідливими комахами та грибами здійснюється шляхом суцільної обробки полів препаратами відповідних гербіцидів, пестицидів та фунгіцидів.

Використання фагів для боротьби з бактеріальними хворобами є на сьогодні найбільш широко розвиненим напрямком в області захисту рослин. Зокрема, потенціал даного напрямку росте у зв'язку перспективою замінити хімічні заходи контролю, що на даний момент є дуже поширеними. Фаги можуть бути ефективно використані в рамках комплексних стратегій контролю за бактеріальними захворюваннями рослин. Відносна простота підготовки фагопрепаратів та низька вартість виробництва цих препаратів робить їх перспективними кандидатами для широкого використання в країнах, що розвиваються. Проте ефективність фагів багато в чому залежить від факторів навколишнього середовища, а також від сприйнятливості організму-мішені. Також, необхідно звертати увагу на появу резистентних штамів бактерій. Контроль бактеріальних хвороб за допомогою фагів являє собою динамічний процес з необхідністю безперервного регулювання фагових препаратів для подолання потенційної адаптації патогенних бактерій (Jones et al., 2007).

У сучасних умовах демографічного приросту, підвищення попиту на продукти харчування, посилення інтенсивності та індустріалізації рослинництва виникають як нові можливості, так і нові загрози для безпеки. Використання фаготерапії в боротьбі з бактеріальними інфекціями безумовно відкриває нові горизонти і дозволяє досягти практично значних результатів. Звичайно, є певні нюанси у виробництві та застосуванні фагових препаратів:

- дотримання технології виробництва: відповідності процесу вимогам GMP, ретельної очистки препаратів, зберігання їх у холодильнику та інші;
- необхідність у створенні досить великої фагової колекції з можливістю заміни в препаратах «старих» фагів на «нові» для підбору ефективних фагових коктейлів та боротьби з резистентністю бактерій.

Для ефективного товарного виробництва, а особливо для вирощування якісного насіннєвого матеріалу, ключовим стає використання тепличного рослинництва на стабільному субстраті, що поєднується з краплинним зрошенням та гідропонними технологіями. У цих випадках своєчасне застосування фагових препаратів проти патогенних бактерій повністю виправдане і може застосовуватися з високим шансом на успіх.

Для успішного впровадження бактеріофагів з метою контролю та лікування бактеріальних захворювань у промислове рослинництво принципів перешкод немає. Необхідно зробити низку кроків швидше технологічного та методологічного плану, щоб цей перспективний підхід став невід'ємною частиною «зелених агротехнологій».

4.3. Застосування бактеріофагів у тваринництві

Поряд зі збільшенням кількості публікацій, присвячених багатьом потенційним терапевтичним застосуванням фагів для лікування бактеріальних захворювань людини, зростає кількість документованої літератури про використання бактеріофагів у ветеринарії, особливо для худоби (особливо

великої рогатої худоби) та птиці. Порівняно менше досліджень було проведено на тваринах-компаньйонах, незважаючи на зростаюче занепокоєння щодо антимікробної стійкості певних патогенів, що вражають домашніх тварин і, потенційно, їхніх власників. Антибіотики є ефективним засобом боротьби з бактеріальними інфекціями у сільськогосподарських тварин, але використання антибіотиків як стимуляторів росту або як терапевтичних засобів для бактеріальних захворювань у сільському господарстві значною мірою сприяє глобальній проблемі охорони здоров'я протимікробної стійкості (Bianchessi et al., 2024).

Слід відмітити, що ЕМА (European Medicines Agency — Європейське агентство з лікарських засобів) було розроблено «Настанову щодо якості, безпеки та ефективності ветеринарних лікарських засобів, спеціально розроблених для фаготерапії», яка набрала чинності на території Європейського союзу з 2023 року (*Focus Group Meeting on Bacteriophages as Veterinary Medicines / European Medicines Agency (EMA), 2023*). Метою цього керівництва є встановлення регуляторних/технічних і наукових вимог, що застосовуються до ветеринарних лікарських засобів, які спеціально призначені для фагової терапії та складаються із бактеріофагів. Фаготерапія визначена як новий вид терапії згідно з Регламентом ЄС 2019/6. Крім того, Регламент ЄС 2021/805, що вносить зміни до Додатку II Регламенту ЄС 2019/6, включає загальні та спеціальні вимоги, що застосовуються до нової терапії, а також спеціальні положення щодо фаготерапії (*Quality, Safety and Efficacy of Bacteriophages as Veterinary Medicines - Scientific Guideline / European Medicines Agency (EMA), 2023*).

Багато ранніх експериментів з фаготерапією на тваринах були спрямовані або на демонстрацію ефективності цього підходу для безпосереднього лікування хвороб тварин (наприклад, тифу у птахів), або на використання тварин як моделей людських захворювань (наприклад, чуми, менінгіту, дизентерії), з різним ступенем успіху. Більшість недавніх випробувань фаготерапії на тваринах були зосереджені на сільськогосподарських тваринах, а не на домашніх

улюбленцях, переважно через економічні, регуляторні та логістичні причини (Atterbury & Barrow, 2019).

Інфекційні хвороби тварин можна поділити на ті, що мають переважно економічні наслідки, та ті, що є зоонозними, тобто можуть передаватися від тварин до людей. Найбільші економічні втрати відбуваються у секторі тваринництва і можуть включати прямі витрати на заходи контролю та профілактики, заборони на експорт, зниження якості продукції, судові позови, порушення ринку (наприклад, страх споживачів і дефіцит поставок), а також вплив за межами тваринницької галузі (наприклад, на дику природу і туризм). Найбільшу загрозу становлять такі бактерії як *E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella* та *Listeria*. Ці бактерії є поширеними патогенами жуйних тварин, птиці та свиней і зазвичай переносяться в їх шлунково-кишковому тракті безсимптомно. Станом на сьогодні свійських тварин зазвичай утримують у великій кількості, часто в замкнених умовах, що сприяє поширенню збудників інфекційних захворювань серед худоби. Через це багато тварин стають резервуарами для різних зоонозних бактеріальних патогенів, які потрапляють у харчовий ланцюг, що в результаті призводить до захворювань і смертей людей. У літературі є дослідження ефективності фаготерапії, перевірені в основному на чотирьох моделях тварин: свійська птиця, велика рогата худоба, вівці та свині.

4.3.1. Свійська птиця

Фермерські птахи є найбільш часто використовуваною моделлю в дослідженнях фаготерапії. Двома основними патогенами, пов'язаними з птицею, є *Campylobacter* і *Salmonella*. *Campylobacter jejuni* є зоонозним бактеріальним збудником, який зустрічається у великій кількості в цьому секторі (Ushanov et al., 2020). *C. jejuni* є частиною мікробіому пташиного кишечника і не завдає шкоди птахам. Під час забою птахів бактерія виділяється з кишечника і контамінує м'ясо. Перехресно заражені харчові продукти, оброблені паралельно з м'ясом, викликають у людей діарею, а в окремих випадках можуть викликати

постінфекційні ускладнення, такі як артрит і параліч периферичних нервів. Кількість захворювань, викликаних *C. jejuni*, зростає по всьому світу. У той же час *C. jejuni* набула стійкості до важливих антибіотиків, що ще більше ускладнює терапію. Втім за останні роки з'явилося достатньо досліджень з фаготерапії інфекцій, викликаних цією бактерією. Їх зазвичай проводять на 25-денних курчатах-бройлерах. В одному з таких досліджень після обробки фагами кількість бактерій у сліпій кишці курчат зменшилася на 0,5–5,0 log КУО/г у порівнянні з групою без обробки (Lос Carrillo et al., 2005). В іншій роботі суміш фагів вводили курчатам через зонд превентивно і як терапію, що дозволило знизити інтенсивність росту бактерій на 3,0 log через кілька днів, але кінцева концентрація *C. jejuni* виявилась лише на 1 log меншою, ніж у необробленій контрольній групі курей (Wagenaar et al., 2005). Однак дослідники зазначили важливий факт: на відміну від антибіотиків широкого спектру, які негативно впливають на мікробіом кишечника, після фаготерапії склад мікрофлори курчат залишався незмінним (Richards et al., 2019).

Salmonella – рід грам-негативних факультативних бактерій; вважається однією з основних причин зоонозних захворювань. Серовари сальмонел можуть розмножуватись та зберігатися в шлунково-кишковому тракті, тому сальмонельоз людини зазвичай пов'язаний із споживанням заражених харчових продуктів тваринного походження. Наявність сальмонел на птахофабриках і бійнях пов'язана з фінансовими витратами на лікування і серйозним ризиком для здоров'я людини. Інфекції сальмонелою коштують системі охорони здоров'я ЄС майже 3 мільйони євро на рік (*USDA ERS - Cost Estimates of Foodborne Illnesses*, 2021). Сальмонела також є причиною псування оброблених харчових продуктів. Потрапивши всередину організму людини, цей мікроорганізм може викликати лихоманку, діарею, спазми в животі (Barbara et al., 2000). Серед багатьох підходів до зниження колонізації бройлерів *Salmonella* spp., бактеріофаги мають кілька переваг. Численні експериментальні дослідження вказують на ефективність використання бактеріофагів для боротьби із даним патогеном. В одному з них курчат-бройлерів інфікували *S. Enteritidis* в день вилуплення. Після бактеріальної

інокуляції вони отримували як ранню (6–10 днів), так і пізню (31–35 днів) обробку фагом. В той час як обидва випробування *in vivo* продемонстрували значне зниження концентрації бактерій у кишечнику порівняно з контрольною групою, кращі результати спостерігали у групі з пізньою обробкою, де концентрація бактерії знизилась на 1,08 log КУО/г від початкової концентрації $\sim 4,44 \log_{10}$ КУО/г. Автори зазначають, що багаторазові обробки можуть підвищити загальну здатність фагового коктейлю контролювати ріст *S. Enteritidis* в кишечнику птахів (Vaz et al., 2020). У ще одному дослідженні на фермах використали фаготерапію проти серовару Kentucky у курей. Два специфічних фага змогли знизити смертність до 0% у оброблених курчат в порівнянні з 30% в контрольній інфікованій групі, а найбільш низькі титри бактерій у сліпій кишці, серці та печінці було отримано на 23-й день (Sorour et al., 2020). Отримані результати Bardina C. et al., показують, що часте лікування курей бактеріофагами, особливо перед колонізацією кишечника *Salmonella*, є необхідним для досягнення ефективного зменшення кількості бактерій з часом (Bardina et al., 2012). Atterbury Robert Joseph та колеги досліджували можливість використання бактеріофагів для обробки шкіри курей. Рівні зниження *Salmonella spp.* після фаготерапії становили 1,38 log₁₀ MPN (для Enteritidis) та 1,83 log₁₀ MPN (для Typhimurium) на кожній ділянці шкіри. Зниження після обробки фагом було статистично значущим у порівнянні з кількістю *Salmonella*, виділеною з контрольних ділянок шкіри, що була обробленою буфером ($p < 0,0001$). Крім того, було зафіксовано значне зниження інтенсивності світіння протягом 1 хвилини після розпилення фага Tφ11 на шкіру, що була контамінована біолоюмінесцентним рекомбінантним штамом *Salmonella*, у порівнянні з контролями, обробленими буфером ($p < 0,01$). Це свідчить про те, що лізис *Salmonella* відбувався на поверхні шкіри (Atterbury et al., 2020). Проти сальмонел розроблений та зареєстрований фаговий препарат SalmoFREE®, який успішно довів ефективність на бройлерах протягом всього виробничого циклу (Clavijo et al., 2019).

Свійські птахи також чутливі до патогенних штамів *E.coli*, які можуть викликати у них смертельну респіраторну інфекцію. Було використано декілька підходів фаготерапії курчат-бройлерів, найефективнішими з яких виявились розпилення аерозолію та внутрішньом'язеві ін'єкції фагів, специфічних до *E.coli* (W. Huff et al., 2002; W. E. Huff et al., 2002). Втім у цьому випадку додавання фагів до питної води виявилось неефективним у захисті птахів від даної інфекції, тому питання пошуку ефективного способу введення фагів лишається відкритим.

4.3.2. Велика рогата худоба

Серотип *E.coli* O157:H7 або шигатоксин-продукуючий варіант *E.coli* є добре відомим збудником харчових отруєнь. Його основним резервуаром є жуйні тварини, і, якщо не вжити належного догляду під час забою, вміст кишечника, фекальний матеріал або пил на шкірі можуть забруднити м'ясо (Kaper, 1998). Найпоширенішим шляхом передачі *E.coli* O157:H7 людині є недоварена заражена їжа або вода та сире молоко, які можуть забруднитись через прямий або непрямий контакт із фекаліями. Intralytics Inc., одна з провідних компаній, що бере участь у комерціалізації фагових препаратів для використання проти основних харчових патогенів, у тому числі *Salmonella*, *E.coli*, *Listeria* та *Shigella*, випустила у продаж Ecolicide PX™, який спрямований на *E. coli* O157:H7 і значно знижує контамінацію шкір тварин (Vikram et al., 2021). Під час оцінки ефективності іншого комерційного прототипу від Passport Food Safety Solutions, Inc., (США) на шкірі великої рогатої худоби виявили, що коктейль знижував концентрацію *E.coli* O157:H7 на 0,4-0,7 log₁₀ КУО/см², але не всі штами і варіанти цієї бактерії виявились чутливими до фагів в коктейлі (Tolen et al., 2018).

Отже, для більшої ефективності таких препаратів необхідно постійно розширювати і доповнювати спектр фагів у складі. Обробка спреєм туш корів на підприємствах з переробки яловичини перед забоєм не допомогла суттєво знизити кількість *E.coli* O157:H7, отже в даному випадку має сенс шукати інший метод обробки (Arthur et al., 2017).

Хоча деякі вчені описували успішні результати фаготерапії у жуйних тварин з використанням пероральної фаготерапії (шляхом прямого введення або додавання до питної води та/або корму), більшість нещодавно опублікованих робіт свідчать про те, що такий спосіб неефективний проти *E.coli*. Основними причинами неефективності перорального лікування є: 1) неспецифічне зв'язування фагів з частинками їжі та іншим сміттям у рубці та шлунково-кишковому тракті (Goodridge & Bisha, 2011); 2) інактивація фага при контакті з кислими умовами сичуга (Smith et al., 1987); 3) невелика кількість фагів досягають шлунково-кишкового тракту як наслідок перших двох пунктів (Hagens & Loessner, 2007). Підхід до зниження рівня інактивації коліфагів був описаний Стенфордом та його колегами в 2010 році. Автори успішно інкапсулювали фаги в полімерні матриці, стійкій до кислих умов *in vitro*. У результаті, інкапсульовані фаги мали змогу ефективніше пригнічувати ріст *E.coli* навіть за умови перорального введення бичкам (Stanford et al., 2010).

4.3.3. Свині, вівці

Була досліджена здатність фагового коктейлю зменшувати популяцію *Salmonella enterica* Typhimurium у свиней під час транспортування та утримання перед забоєм. Коктейль бактеріофагів застосовували через ротовий зонд. Такий підхід виявився успішним: контамінація сліпої кишки сероваром *S. Typhimurium* виявилася на 95% нижчою, тоді як контамінація клубової кишки була нижчою на 90% порівняно з контрольною групою, яка отримувала плацебо (Wall et al., 2010). Інкапсуляція фагів також успішно зарекомендувала себе у випадку терапії свиней. Фаги іммобілізували в сухому знежиреному молоці і поміщали в капсули, що складаються з пальмітинової і стеаринової кислот. Бактеріофаги у складі капсули виявилися більш стійкими до рН 2,15, ніж некапсульовані бактеріофаги (Murthy & Engelhardt, 2008). Деякі дослідники прямо вказують на необхідність інкапсуляції фагів, які призначені для перорального введення свиням. В одному з досліджень свині отримували інкапсульовані фаги через корм та зонд, і в обох

випадках спостерігали суттєві зниження концентрацій *S. Typhimurium* та досить великі кінцеві титри фагів в клубовій та сліпій кишці (Saez et al., 2011). Окремо було перевірено потенціал фагів у зниженні концентрацій сальмонел, присутніх в свинячому гною – добриві, широке використання якого на ґрунті або перед збиранням продовольчих культур підвищує ризик перенесення шкідливих мікроорганізмів. Було виявлено, що фаг sall_v01 знижує кількість *S. enteritidis* у гної на 3,8 log КУО/мл (від початкової концентрації ~5,55 Log КУО/мл) (Grygorsewicz et al., 2017).

Вівчарям часто доводиться стикатися з проблемою інфікування вівць *E.coli*. Тому було проведено декілька досліджень з фагами, специфічними до серовара *E. coli O157:H7*. В одному з таких в день 0 вівці з дослідної групи були заражені чотирма штамми *E. coli*. Коктейль бактеріофагів, що складається з трьох вірусів (P5, P8 і P11, титр 10^{10}), застосовували перорально в дні -2, -1, 0, 6 та на 7 день. Спостерігалось значне зниження *E. coli O157:H7* у зразках фекалій ($P < 0.05$). Втім дослідники знову наголошують на необхідності захисту фагів від умов ШКТ тварин, а отже інкапсуляції (Vach et al., 2009). Деякі з успішних результатів випробувань фагів у тваринництві перелічені у таблиці 2. У підсумку варто зазначити, що у фаготерапії свійських тварин є великий потенціал за умови грамотного підходу до доставки фагів у місце локалізації збудників та правильної вихідної концентрації вірусу. Фагові коктейлі, специфічні до різних штамів одного виду або серовару матимуть більшу ефективність, аніж використання монопрепарату.

Таблиця 4.2 – Результати фаготерапевтичних досліджень у тваринництві

Тварина	Збудник	Метод обробки	Результат
Птиця (курчата бройлери)	<i>E. coli</i> O157 : H7	Внутрішньом’язева ін’єкція	Високі титри фагів (10^8) знижували смертність (W. E. Huff et al., 2006)
Вівці	<i>E. coli</i> O157 : H7	Пероральний	2 log КУО зниження протягом 2 днів (Raya et al., 2006)
ВРХ	<i>E. coli</i> O157 : H7	Перорально/ректально (через питну воду)	Комбіноване пероральне/ректальне лікування зменшувало

			концентрацію бактерії, але не повністю (Sheng et al., 2006)
Птиця	<i>E. coli</i> O157 : H7	Перорально і спрей	Значне зниження смертності у великомасштабних експериментах на тваринах (A. Oliveira et al., 2010)
ВРХ	<i>E. coli</i> O157 : H7	Перорально	Швидке зниження КУО протягом 24–48 годин, але без зниження рівня виділення калу (Rivas et al., 2010)
Вівці	<i>E. coli</i> O157 : H7	Перорально	Коктейль ліквідував (>99,9%) патоген і є більш ефективним, ніж CEV1 окремо (Raya et al., 2011)
Птиця (курчата бройлери)	<i>Campylobacter coli</i> , <i>C. jejuni</i>	Перорально через зонд і корм	Зниження рівнів <i>E. coli</i> та <i>C. jejuni</i> у фекаліях на 2 log КУО на грам при пероральному введенні через зонд та з кормом (Carvalho et al., 2010)
Вівці	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Пряме введення	Зменшення біомаси біоплівки на слизовій синусів (Fong et al., 2019)
ВРХ	<i>Staphylococcus aureus</i>	Інтрамамарні інфузії	Вилікувано 3/18 корів проти 0/20 контрольної групи (J. J. Gill, Pagan, et al., 2006)
Свині	<i>S. enterica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> and <i>Clostridium prefringens</i>	Коктейль фагів, орально	Порівняно з пробіотиками, фаги мали кращі результати як стимулятори росту, покращуючи засвоюваність, добовий приріст ваги та приріст за годування (K. H. Kim et al., 2014)
Свині	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Нанесення термогеля на уражену шкіру	Зменшення кількості бактерій на 90% через 4 години після обробки (Yan et al., 2021)
Кури	<i>Salmonella Gallinarum</i>	Перорально через корм	Фаг запобіг горизонтальній передачі інфекції шеститижневим інфікованим курчатам (Lim et al., 2011)
Свині	<i>Salmonella Typhimurium</i>	Перорально	Зменшення колонізації на 99,0-99,9% у мигдаликах, клубовій кишці та сліпій кишці (Wall et al., 2010)

Слід зазначити, що в світі вже є зареєстровані фагові препарати з доведеною ефективністю проти всіх вище згаданих збудників. Це препарати ListShield™,

EcoShield™, SalmoFresh™, ShigaShield™, Ecolicide™, SalmoLyse™, ListPhage™ та Ecolicide PX™ від Intralytix Inc. (США); Finalyse™ від Elanco Food Solutions (США); PhageGuardListex™, PhageGuard S Salmonalex™ та Staphfect™ (ендолізін) від Microcos Food Safety (Нідерланди); Biolyse™ від APS Biocontrol Ltd. (Велика Британія); BAFASAL® та BAFADOR® від Proteon Pharmaceuticals SA (Польща); Secure Shield E1 від FINK TEC GmbH (Німеччина).

4.4. Фаготерапія в аквакультури

Аквакультура та виробництво рибних кормів є активно зростаючими галузями харчової промисловості у світі. За даними Продовольчої та сільськогосподарської організації ООН, світове виробництво риби досягло 179 мільйонів тонн у 2018 році, причому за останні 30 років виробництво корму для риби зросло на 500% (Żaczek et al., 2020). Риба та морепродукти також схильні до інфекційних захворювань та псування, не дивлячись на інтенсивне використання антибіотиків. Через легкість передачі патогенів у водному середовищі між дикою та вирощеною рибою варіанти контролю та лікування широкого спектру збудників риб, включаючи вакцини та антибіотики, часто недостатні та неефективні (Sudheesh et al., 2012). Оцінюється, що 34% інфекцій в аквакультури мають бактеріальне походження (Kowalska et al., 2020). Вібриоз, едвардсіельоз, мікобактеріоз, геморагічна септицемія, виразкова хвороба та флавобактеріоз є основними бактеріальними захворюваннями в рибних господарствах (Ramesh et al., 2021). Бактерії роду *Vibrio* (особливо *V.harveyi*), часто демонструють мультирезистентність та є відповідальними за спалахи захворювань з 98,5–100% смертності в розплідниках риб і креветок (Choudhury et al., 2019).

Застосування фагів як засобів біоконтролю в аквакультури виявилось ефективним при їх безпосередньому введенні у воду, додаванні до корму або ін'єкціях (Ramesh et al., 2021). Більшість експериментальних досліджень *in vivo* з використання бактеріофагів зосереджені на видах *Vibrio*, *Aeromonas*,

Pseudomonas, *Acetobacter* та *Flavobacterium*. В одному з досліджень інфікованих пуголовків обробляли різними дозами фагів і оцінювали їх ефективність у різний час після застосування. Результати показали, що обрані літичні фаги (A3S і Vpms1) знижували рівень смертності, спричиненої *V. parahaemolyticus*. У випадку обох фагів більш ефективною виявилось рання обробка (через 6 годин після зараження) (Lomelí-Ortega & Martínez-Díaz, 2014). Фаги змогли успішно подолати бактерію *Lactococcus garvieae* (збудник лактококозу жовтохвоста *Seriola quinqueradiata*) при пероральному та внутрішньочеревному введенні, а використання фага PPrW-4 через корм для риб допомогло у боротьбі з бактеріальним геморагічним асцитом у риб айю (*Plecoglossus altivelis*), викликаним *Pseudomonas plecoglossicida* (Sieiro et al., 2020). *Flavobacterium psychrophilum* – грам-негативна бактерія, яка є збудником бактеріальної холодноводної хвороби, смертельної інфекційної хвороби кількох видів лососевих (Sundell et al., 2020), що вирощуються на фермах, і є стійкою до більшості антибіотиків та біоцидів (Sundell et al., 2020). Дослідження демонструють ефективність фага PSV-D22 та подібних фагів для лікування *F. psychrophilum*, присутнього в живій рибацькій ікрі або мальках. Застосування фагів при лікуванні мальків *Penaeus monodon*, інфікованих *V. harveyi*, призвело до 85% виживання порівняно з 65–68% виживанням після лікування антибіотиками (Sieiro et al., 2020). Коктейль фагів, який містив сім бактеріофагів (три проти *A. hydrophila* і чотири проти *P. fluorescens*), було протестовано на європейському вугрі (*Anguilla anguilla*) та райдужній форелі (*Oncorhynchus mykiss*), що призвело до зменшення смертності риб, які стикалися зі штамми цих двох видів бактерій (Ramos-Vivas et al., 2021). Компанія Proteon Pharmaceuticals розробила комерційний фаговий продукт BAFADORR для усунення інфекцій *Pseudomonas* і *Aeromonas* в аквакультурі (Garvey, 2020).

Використання фагів в аквакультурі викликає певні труднощі через спосіб їх введення та вплив факторів навколишнього середовища. На активність фагів у воді можуть впливати такі чинники, як рівень рН, солоність, температура, органічне забруднення, ультрафіолет та взаємодія з вирощуваними видами

(Choudhury et al., 2019). Для успішного лікування важливо забезпечити контакт фага зі збудником захворювання, тому вибір способу введення має ключове значення. Щоб збільшити ефективність фагів, дослідники розробили їстівні антимікробні покриття на основі бактеріофагів, які наносяться на рибний корм. Це покриття підвищує стабільність фагів на гранулах корму та покращує їх виживання під час зберігання (Połaska & Sokołowska, 2019). Такий підхід вже був досліджений на прикладі фагів, специфічних для *E.coli* та *Vibrio spp.*, які вносили всередині покриттів викликала більшу загибель бактерій *in vitro* (Połaska & Sokołowska, 2019). Випробування показали, що покриття з сироваткового білку зменшили вивільнення фагів у солоній воді більш ніж на 1 log БУО на гранулу корму порівняно з контрольними покриттями. До складу покриття було додано фаги, специфічні для *E. coli* та *Vibrio spp.*, що призвело до значного зниження кількості цих бактерій (на 3,0–5,0 log) (Huang & Nitin, 2019). Ще один фаговий коктейль був доданий до води і ефективно контролював вібриоз, викликаний бактерією *Vibrio sp. Va-F3* у креветок виду *Litopenaeus vannamei*. Завдяки фаготерапії рівень виживання креветок зріс з 20% (у групі без лікування) до 91,4% (у групі, обробленій фагом). Ефективність лікування була на рівні з результатами антибіотикотерапії (Chen et al., 2019).

4.5. Перспективи застосування бактеріофагів у бджолярстві

Окремо варто згадати фаготерапію інфекцій, викликаних *Paenibacillus larvae*. Ця спороутворююча бактерія уражує личинок медоносних бджіл, викликаючи американський гнилець, який є найбільш поширеним і руйнівним захворюванням медоносних бджіл, здатним знищити цілу колонію лише за три тижні. Проблеми, пов'язані з контролем та лікуванням заражених колоній, призводять до значного зменшення популяції медоносних бджіл, бджільництва та, як наслідок, сільськогосподарського виробництва в усьому світі. Джерелом фагів проти *P. larvae* можуть бути: лізогенізовані бактерії, вода, ґрунт з вулика, мазки з поверхонь вуликів, матеріали вуликів (Beims et al., 2020), віск, личинки,

дорослі робочі особини та навіть косметичні засоби, що містять мед як інгредієнт (Merrill et al., 2014; Stamereilers et al., 2016). Були ізольовані як літичні (Yost et al., 2016), так і помірні фаги. Поки що дослідники не визначились, чи більшість фагів *P. larvae* є літичними *in vitro* (Stamereilers et al., 2018), чи все-таки вони є помірними і літична активність є наслідком індукції профагів. Незважаючи на це, дослідження фагової терапії, як *in vitro*, так і у вуликах, показали вищий рівень виживаності у груп, які пройшли лікування, а також підтвердили профілактичний ефект цього підходу. Відсутність успіху в деяких випадках пояснювали лізогенною природою фагів (Tsourkas, 2020). Втім, станом на 2020 рік кількість секвенованих геномів фагів *P. larvae* вже досягла 48 і поступово зростає. В опублікованих на сьогодні дослідженнях описані експерименти, де інфікованих або здорових личинок годували фагами або обприскували елементи вулика. Рібейро та ін. досліджували *in vivo* здатність активного фага проникати в личинки після перорального введення у дорослих медоносних бджіл. Застосування суспензії фага T7 у 50%-ій сахарозі з наступною оцінкою біорозподілу фага у дорослих бджіл і личинок підтвердило потрапляння фагів через їжу до епітелію середньої кишки личинок. Цей факт свідчить про те, що фаги могли бути активними в місці зараження *P. larvae*. На жаль, фаги у цьому випадку мають здатність знищувати лише вегетативні форми *P. larvae*, вони не здатні знищувати інфекційні спори. У цьому напрямку великі надії покладають на застосування ендолізинів.

4.6. Біосанація та біоконсервація з використанням бактеріофагів

Готові харчові продукти є багатим на поживні речовини середовищем, яке може сприяти виживанню та росту багатьох бактеріальних патогенів. Було випробувано та задокументовано багато методів та способів використання фагів під час реалізації та зберігання продукції (Vikram et al., 2021). Наприклад, розпилення бактеріофагів на харчову поверхню або поєднання бактеріофагів з

пакувальними матеріалами для харчових продуктів (Choi et al., 2021). На даний момент відомо про обробку фагами свіжих фруктів, овочів, м'яса та інших продуктів. Фаги також використовуються на контактній поверхні харчового обладнання, такого як скло або нержавіюча сталь, оскільки на них можуть утворюватись стійкі до антибіотиків біоплівки.

4.6.1. Бактеріофаги і біоплівки

Утворення мікробних біоплівок на поверхнях обладнання є однією з головних проблем підприємств харчової промисловості. Бактеріальні біоплівки – це складні шари бактеріальних клітин, що утворюють позаклітинну матрицю і можуть прикріплюватись до біотичних або абіотичних поверхонь (Schmelcher & Loessner, 2016). Бактеріальні клітини, що утворюють біоплівки, характеризуються високою стійкістю до несприятливих умов навколишнього середовища, антибіотиків і дезінфікуючих засобів. У харчовій промисловості біоплівки найчастіше утворюються бактеріями *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *E. coli* або *C. jejuni*. Ці патогени здатні прикріплюватись до рослинних тканин, де вони можуть рости, утворюючи біоплівки (Beuchat, 2002; Gutiérrez et al., 2016). Обробка фруктів чи овочів дезінфектантами при цьому ускладнена їх внутрішньою структурою, тому постає необхідність інших методів обробки.

L. monocytogenes здатна утворювати біоплівку на поверхнях конвеєрних стрічок, підлоги, обладнання з нержавіючої сталі та стелажів для зберігання або транспортування продуктів. Ефективність комерційно доступного фага P100 перевіряли на біоплівці, утвореної *L. monocytogenes* на поверхні зразка з нержавіючої сталі. Фаг P100 має широкий діапазон хазяїв серед штамів *L. monocytogenes* і ефективно знижує утворення біоплівок незалежно від серотипу (Soni et al., 2010).

Ворсинки бактерій роду *Salmonella* полегшують прикріплення, а синтез целюлози посилює утворення біоплівки на певних абіотичних поверхнях (Jain &

Chen, 2007). Проте фаги змогли знизити концентрацію сальмонел навіть у таких умовах. В одному з досліджень автори показали, що бактеріофаги зменшили вміст сальмонели в біоплівках вже через дві години обробки на 3 і 2 log КУО/см² на нержавіючій сталі та гумі відповідно (Sukumaran et al., 2015). Інші група дослідників показала, що коктейль із шести фагів зміг зменшити на 84,2% популяцію *Salmonella* на черевиках робітників в місцях переробки м'яса, що важливо для запобігання повторному зараженню продуктів. Більшого ефекту вдалось досягти в поєднанні з гіпохлоритом натрію (92,9%) і скрабуванням (93,2%) (Gong et al., 2017).

Бактерії роду *Pseudomonas* також доволі часто висіваються під час санітарних перевірок обладнання та робочих приміщень. Вони здатні витримувати умови, які є проблематичними для інших бактерій, і успішно розмножуються на поверхнях машин, підлоги, стічних труб або сталевих конструкцій (Møretrø & Langsrud, 2017). Проти цього збудника були протестовані фаги 14.1 та LUZ7. Ними обробляли біоплівки, утворені штамами *P. aeruginosa* PAO1 та D1. Результати показали, що фагова обробка призвела до зменшення на 1,7 log КУО/см² бактерій у біоплівках на нержавіючій сталі порівняно з необробленими поверхнями (Magin et al., 2019).

Окрім бактеріофагів найбільший потенціал для боротьби з бактеріальними біоплівками демонструють ферменти, що виробляються фагами – *деполімерази* та *ендолізени*. Фагові деполімерази розщеплюють структурні та капсульні полісахариди, а також екзополісахариди біоплівок, сприяючи ефективній адгезії бактеріофагів до клітин. З моменту відкриття та першого опису фагових деполімераз у 1929 р. було описано активність 160 передбачуваних деполімераз, у тому числі фагів, специфічних до *E.coli*, *E.amylovora*, *Azotobacter vinelandii*, *Vibrio cholerae O139* та *Pseudomonas agglomerans*. Ці ферменти можуть з'явитися у формі розчинних білків, що виділяються під час лізису клітин-хазяїв. Активність деполімераз визначається по площі ореолів, що оточують фагові зони лізису. Ефект ореолу є результатом надмірної секреції деполімераз, які

дифундують в середовище і впливають на розмноження бактерій під час стаціонарної фази їх росту.

Описано антимікробну активність деполімерази, що продукується фагом SF153b, проти біоплівки, утвореної фітопатогеном *Enterobacter agglomerans*. Біоплівку бактерій обробляли сумішшю специфічної для *E. agglomerans* фага та деполімерази протягом 180 хвилин. Наприкінці обробки в біоплівці спостерігалось зниження бактеріальної концентрації у 1992 рази. Обробка лише деполімеразою призвела до 120-кратного зменшення життєздатних клітин біоплівки (Hughes et al., 1998). Інше дослідження продемонструвало синергічний ефект застосування фагової деполімерази та діоксиду хлору на руйнування біоплівки. За допомогою фагів із обладнання, що використовувалося в цеху, було виділено ізолят *Klebsiella sp.*, який характеризується здатністю до утворення біоплівок. Чотиригодинна обробка біоплівки фаговою деполімеразою призвела до зменшення кількості бактеріальних клітин у біоплівці на 80%. Дослідники також помітили, що обробка біоплівки деполімеразою протягом 4 годин з подальшою 30-хвилинною обробкою діоксидом хлору призвела до інактивації 92% клітин (Chai et al., 2014).

Ендолізини виробляються бактеріофагами під час кінцевої стадії їхнього літичного циклу і дозволяють вивільняти потомство віріонів через деградацію бактеріального пептидоглікану. Вони також можуть застосовуватися екзогенно для знищення грампозитивних бактеріальних клітин; грамнегативні бактерії мають зовнішню мембрану, яка захищає їх від активності ендолізину. Для досягнення високої ефективності ендолізину проти грамнегативних бактерій потрібен додатковий фактор, який руйнує зовнішню мембрану шляхом дії на оболонку бактерії (H. Oliveira et al., 2014). Дослідження показали, що лимонна або яблучна кислоти в комбінації з лізином Lys68 призводило до зниження концентрації біоплівки *S. Typhimurium* на 3,0–5,0 log після двох годин обробки (Obeso et al., 2008). Також доведено синергічний вплив ендолізину LysK і деполімерази DA7 на біоплівку стафілокока. Навіть дуже низькі концентрації нано- та мікромолярних сумішей цих двох ферментів були ефективними для

видалення біоплівки з полістиролу та скляних поверхонь. Нещодавні успіхи у вивченні бактерицидної дії ендолізинів були продемонстровані на прикладі кількох харчових продуктів, зокрема на листі салату. Так, ендолізін LysWL59 використали в поєднанні з агентом, що підвищує проникність зовнішньої мембрани (EDTA (0,5 ммоль/л), це призвело до 93% зниження концентрації *S. Typhimurium* на салаті. Незважаючи на перспективність отриманих результатів, необхідно знайти способи забезпечити роботу цього ферменту без використання дестабілізаторів зовнішньої мембрани (Liu et al., 2019). Автори іншого дослідження оцінили комбінований контроль із застосуванням ендолізину та високого тиску для інактивації *L. monocytogenes* у готових до вживання харчових продуктах, включаючи м'який сир і копчену рибу. Результати продемонстрували зниження на 5,5 log КУО порівняно зі зниженням на 0,2–0,3 log при окремому застосуванні ендолізину або тиску. Автори прийшли до висновку, що ендолізینی суттєво підвищують бактерицидну дію високого тиску, дозволяючи інактивувати бактеріальні клітини при значно нижчих рівнях тиску (van Nassau et al., 2017). Ще один тип синергії було досліджено на прикладі ендолізину LysSA97 та карвакролової олії для біоконтролю *S. aureus* у молоці та яловичині. Виявили, що при застосуванні суміші цих сполук спостерігалось зниження концентрації *S. aureus* у досліджуваних харчових продуктах у середньому на $4,5 \pm 0,2$ log КУО/мл. Автори відзначили, що спостережувана синергетична активність може залежати від вмісту ліпідів у продуктах (Y.-Y. Chang et al., 2017). У останні роки, поряд з ендолізинами, зростає інтерес до віріон-асоційованих пептидоглікангідролаз (VAPGH), також відомих як ектолізини, які вже продемонстрували свій потенціал як ефективні засоби для біоконтролю. (Gutiérrez et al., 2018).

4.6.2. Бактеріофаги та готові продукти

Навіть за умови дотримання всіх санітарно-епідеміологічних вимог на виробництві, завжди є ймовірність контамінації вже готових продуктів на складах, в магазинах або на останньому етапі реалізації. Для запобігання цьому

було проведено ряд досліджень, в яких такі продукти оброблялись превентивно для недопущення подальшої контамінації або в якості дезінфектанта.

М'ясо. Сире та оброблене м'ясо є надзвичайно сприятливим середовищем для росту бактерій. Зазвичай спеціальне пакування, дотримання стерильності та низьких температур зберігання допомагають уникнути контамінації, втім багато патогенів адаптувались до таких умов.

У готових зразках яловичини, де концентрація *E. coli* становила 1–10 КУО/10 г, після обробки фагами спостерігалось зниження кількості збудника на $\geq 80\%$ (Vikram et al., 2021). В іншому дослідженні вчені оцінили ефективність чотирьох фагів *Salmonella*, активних проти сероварів Enteritidis, Typhimurium, Paratyphi A, San Diego і Typhi в курячих грудках. В експериментах з інокуляцією фагами при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ концентрація бактерій суттєво зменшилась ($p < 0,05$), що в цілому вказує на хороший антибактеріальний потенціал цих фагів (J. H. Kim et al., 2020). В схожому дослідженні використовували коктейль з п'яти фагів за температури $+8^{\circ}\text{C}$; як результат, спостерігали статистично значне зниження ($p < 0,05$) кількості життєздатних клітин *S. Enteritidis* та *S. Typhimurium* на 1,41 та 1,86 log КУО на зразок м'яса, відповідно (Duc et al., 2018). Ці результати дуже добре порівнюються з результатами, отриманими за допомогою комерційного препарату SalmoFresh™ (виробництва Intralytix Inc.), де спостерігалось зниження кількості сальмонел до 1,5 log після нанесення на контаміновані курячі грудки (Sukumaran et al., 2015). У дослідженні на яловичині оцінювали ефективність фагового коктейлю проти двох шига-токсигенних штамів *E. coli* та одного ентеропатогенного. В цьому випадку також відмічали позитивний вплив фагового коктейлю та порівнювали отримані дані з подібними пробами у бульйоні та стерильному молоці. Відзначається, що результати виявилися значно кращими за температур $+24^{\circ}\text{C}$ і $+37^{\circ}\text{C}$ порівняно з $+4^{\circ}\text{C}$. (Tomat et al., 2014). Схожі результати були отримані також проти *C. jejuni* (куряче м'ясо, $+5^{\circ}\text{C}$) (Zampara et al., 2017) та *L. monocytogenes* (яловичина, $+4^{\circ}\text{C}$), причому у другому випадку м'ясо, оброблене фагами, зберігалось 15 днів і

автори фіксували зменшення концентрації бактерії на 2,3 log. Крім того, бактеріофаги не мали негативного впливу на колір і рН зразків яловичини.

Ідентифікація та знищення *L. monocytogenes* має вирішальне значення для гарантування безпеки ланцюга виготовлення «готової до споживання їжі», оскільки ця бактерія успішно росте за низьких температур +2...+8°C – тобто таких, що використовується для зберігання багатьох харчових продуктів. Деякі комерційні фаги виявились ефективними у зниженні концентрації *L. monocytogenes* у нарізаній шинці (Selle et al., 2020). Той же самий монофаговий препарат показав ефективність у зменшенні *L. monocytogenes* на поверхні шматочків ростбіфу та готової індички за температур +4 та +10°C. Фаг не лише пригнічував ріст бактерії, але і покращував ефективність інших протимікробних препаратів у поєднанні з лактатом калію або діацетатом натрію (Chibeu et al., 2013).

Компанія Microcos Food Safety розробила бренд Phageguard S на основі фагів Felix-O1a та S16 проти *Salmonella enterica*. Phageguard S може зменшити популяцію бактерій на 1–3 log КУО/мл, не впливаючи на смак, запах або текстуру продукту. Цей засіб ефективний за температурного діапазону від 0 до 35 °C і рекомендований для використання у формі спрею або шляхом занурення продуктів безпосередньо в розчин фага. Після нанесення цього препарату вміст сальмонели в яловичому та свинячому фарші знизився на 1 та 0,8 log₁₀ КУО/г відповідно; в курячому та індиччому фарші вміст сальмонели зменшився на 1,1 та 0,9 log₁₀ КУО/г відповідно (Yeh et al., 2017). Загалом розпилення або навіть безпосереднє занурення м'яса у фаговий розчин є найкращою стратегією (Sukumaran et al., 2015). Phageguard S також добре показав себе на нежирній свинині, беконі та свинячій обрізці. Нанесення препарату зменшило популяцію *Salmonella* на 0,8–1,7 log КУО/см² за концентрації фага 5 × 10⁷ БУО/см² (Silk et al., 2012).

Фаг SE07, специфічний до *S. Enteritidis*, виділений із зразків роздрібного м'яса, наносили на різні продукти (фруктовий сік, свіжі яйця, яловичина та курка), інфіковані цим сероваром. Після інкубації при 4°C протягом 48 год

кількість *S. Enteritidis* у фруктовому соку та свіжих яйцях значно зменшилася (приблизно на 2 log), і в той же час кількість бактерій у зразках яловичини та курки, оброблених фагом, зменшилася на 2,1 і 2,0 log, відповідно (Thung et al., 2017). Фаг проявив ефективність проти сальмонел навіть у перші години зберігання курятини за температури -20°C (Abhisingha et al., 2020).

Загалом, для обробки м'яса все частіше використовуються вже зареєстровані фагові препарати, оскільки вони показують доволі успішні результати і є більш доступними, ніж отримання індивідуальних фагів. Більше того, останнім часом існує тенденція до використання бактеріофагів для посилення ефекту пробіотиків. До прикладу, компанія Intralytix Inc. розробила нову лінію продуктів SuperBiotix™, яка базується на використанні літичних бактеріофагів для специфічного впливу на «проблемні» види бактерій, та традиційні пробіотичні культури на основі бактерій (*Bacteriophage Probiotics - Intralytix, Inc.*, 2009).

Фрукти, овочі. На вже зібраних овочах та фруктах можуть розмножуватись бактерії родів *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia* та інші. Втім нанесення фагів у вигляді спрею на поверхню цих продуктів може знизити ймовірність контамінації або ж знизити концентрацію вже наявних збудників. Було апробовано фаги на листі салату (Liu et al., 2020), дині (Wong et al., 2020), томатів, шпинату (Abuladze et al., 2008), яблук (Leverentz et al., 2003). Проти *L. monocytogenes* успішно застосовують препарат ListShield™; даний фаговий коктейль продемонстрував зниження бактеріальної концентрації на 0,7–1,1 log на таких різних продуктах, як листя салату, шматочки яблук, твердий сир (Perera et al., 2015). Фаги проти *E. coli O157:H7* значно знизили (до 4 log) кількість бактерії на листках шпинату та скибочках зеленого перцю (Tomat et al., 2014), але як і в більшості вище згаданих досліджень, автори наголошують на використанні препаратів з двох, трьох або і більше фагів для кращого результату та уникнення вторинного бактеріального росту.

Оброблені харчові продукти. На даний момент вже задокументовано спроби обробки фагами готових оброблених продуктів. Наприклад, фаг SH3-3, активний проти *L. monocytogenes*, виявився ефективним у пригніченні росту

цього збудника на м'ясі лосося та в апельсиновому соці (Zhou et al., 2020). В іншому дослідженні, додавання фагів до рідких харчових продуктів, таких як шоколадне молоко та розсіл сиру моцарелла призводила до зниження кількості бактеріальних клітин нижче рівня прямої детекції (за температури 6°C). На твердій їжі (хот-доги, нарізане м'ясо індички, копчений лосось, морепродукти, нарізана капуста та листя салату) фаги зменшували кількість *L. monocytogenes* до 5 log. Варіювання експериментальних умов (тривале зберігання протягом 13 днів або зберігання при 20°C) дало аналогічні результати. Втім в цій самій роботі автори наголошують на важливому нюансі: фаги зберігали свої інфекційні властивості під час зберігання в харчових продуктах тваринного походження, тоді як рослинний матеріал викликав інактивацію вірусів більш ніж на 1 log₁₀ (Guenther et al., 2009). Це ще одне свідчення того, що при обробці рослинного матеріалу необхідно враховувати його вплив на фаги, незалежно від етапу виробництва.

Препарат LISTEX™P100 (Microcos Food Safety, Нідерланди), що складається з бактеріофага P100, специфічного проти *L. monocytogenes*, було протестовано на різних продуктах. В одному з експериментів сири на початку періоду дозрівання були інокульовані *L. monocytogenes*, а фаги наносили на поверхню під час промивання шкірки. В залежності від часу нанесення та доз препарату, вийшло отримати значне зниження (~3,5 log) або повне знищення життєздатних клітин *Listeria* (Carlton et al., 2005). Суттєві зниження кількості бактерій після обробки даним препаратом спостерігали на свіжому філе сома (зниження бактеріальної концентрації від 1,4 до 2,0 log КУО/г при 4°C, 10°C і 22°C) (Soni et al., 2010), сиromу лососі (зниження на 1,8, 2,5 і 3,5 log КУО/г від початкового бактеріального навантаження 2, 3 та 4,5 log КУО/г відповідно при 4°C та 22°C) (Soni & Nannapaneni, 2010), а також на м'якому сири. Втім, в останньому випадку спостерігали початкове зниження кількості мікробних клітин (на 2–4 log КУО/см² при 4°C) з наступним відновленням росту бактерій (Soni et al., 2012). У 2017 році дію цього продукту перевірили на суші. Початкова концентрація бактерії в зразках становила 6 log КУО/г при температурі 22 °C; за допомогою даних фагів

вдалось досягти зниження концентрації бактерій (на 4,44 log КУО/г). В цьому дослідженні фаги інокулювали безпосередньо всередину готових суші (Miguéis et al., 2017). LISTEX™P100 також випробували на м'яких сирах, де він забезпечив зменшення концентрації бактерій більш ніж на 2 log КУО/мл. (Silva et al., 2014). Нещодавно з цим же фагом P100 було проведено експеримент, де цей фаг був задіяний в обробці молока одночасно з бактерицидним білком педіоцином PA-1 і високим гідростатичним тиском. В групі, де концентрація суспензії *L. monocytogenes* становила 10^7 КУО/мл, спостерігався синергічний ефект між фагом P100, педіоцином PA-1 із застосуванням тиску 300 МПа; бактерія була повністю інактивована при 4°C (температура, за якої зберігалось молоко) (Komora et al., 2020).

Говорячи про чистоту молока, не можна оминати увагою *Staphylococcus aureus*. Ця грампозитивна бактерія є найпоширенішим збудником маститу у дійних корів (Le Loir et al., 2003). Джерела контамінації харчових продуктів *S. aureus* можуть бути як тваринного, так і людського походження: через інфікування худоби або працівників ферми, а також безпосередньо від людини під час обробки продуктів. (Spanu et al., 2012). Дослідження фагів у цьому напрямку було зосереджено на лікуванні маститу у корів та контролю у молочних продуктах. Втім, на сьогоднішній день невідомо про успішні результати фаготерапії корів або інактивації стафілококів в сирому молоці або сироватці, оскільки в цьому випадку рН середовища, в яке додаються фаги, відіграє велику роль в їх інактивації, а за окремими даними молочна сироватка перешкоджає фагам досягати поверхні клітин-хазяїв внаслідок аглютинації клітин *S. aureus* (J. J. Gill, Sabour, et al., 2006; O'Flaherty et al., 2005). В той же час при додаванні фагів у процесі виробництва сиру, віруси лишаються стабільними та активними під час ферментації, а це знову вказує на те, що рН є найважливішим фактором інактивації. У даній роботі стабільність вірусів могла бути обумовлена їхнім «молочним» походженням: вони були отримані шляхом випадкової делеції ДНК із ізольованих з молока помірних фагів ФН5 і ФА72 (García et al., 2007).

Експерименти з пастеризованим молоком показали, що використання комбінованої обробки фагами з нізином (поліциклічний антибактеріальний пептид, що виробляється бактеріями виду *Lactococcus lactis*) і високим гідростатичним тиском має синергічний ефект проти стафілококів у порівнянні з окремим застосуванням цих компонентів (Martínez et al., 2008; Tabla et al., 2012). Тим не менш, дослідники наголошують про обережність щодо комбінованого застосування фагу з нізином, оскільки бактеріальні штами, адаптовані до нізину, можуть серйозно вплинути на активність фага. Втім успішні спроби використання фагів під час виробництва твердих сирів з подальшою інактивацією стафілококів на всіх етапах дозрівання вказують на потенціал фаготерапії у молочній продукції, а отже необхідно далі досліджувати варіанти комбінування фагів з іншими хімічними або біологічними речовинами для регулювання їхньої стійкості.

4.6.3. Проблема бактеріофагів у молочному секторі

Незважаючи на потенційну користь фагів у боротьбі з патогенами, що можуть забруднювати молочні продукти, вони становлять певну загрозу для цієї галузі. Через те, що фаги присутні в усіх можливих середовищах, де є їхні специфічні бактерії-хазяї, вони є небажаними в молочному виробництві. Бактеріофаги порушують процес бродіння шляхом лізису молочнокислих бактерій. Найпоширенішими бактеріями, чії закваски використовуються в молочній промисловості, є *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc sp.* і *Lactobacillus sp.* Фаги можуть контамінувати як сире молоко, так і суху сироватку (Atamer et al., 2013; Garneau & Moineau, 2011). Сире молоко є природним резервуаром молочнокислих бактерій, а отже може містити специфічні бактеріофаги. Джерелом зараження бактеріофагами можуть бути також стартові закваски. Помірні фаги інтегрують свій генетичний матеріал в геном хазяїна, який може пасивно передаватись клітинам-нащадкам бактерій під

час реплікації бактеріальних клітин. Стрес, пов'язаний з обробкою їжі, може активувати профаг і запускати літичний цикл, що призводить до загибелі бактеріальних клітин під час ферментації. В межах одного експерименту, тридцять комерційних штамів молочнокислих бактерій і штами, виділені з молочних продуктів (*Lactobacillus casei*, *L. paracasei* та *L. rhamnosus*), були перевірені на наявність профагів у геномі. Ці дослідження виявили профаги у геномі двадцяти п'яти штамів (Mercanti et al., 2011). В теперішній час більшість комерційно доступних заквасок перевіряють на наявність фагів, перш ніж вони потраплять до споживачів.

Іншими джерелами зараження бактеріофагами є повітря та різні поверхні на молокопереробних підприємствах. Це є основною проблемою на сироварнях, тому що відшарування сироватки часто призводить до появи фагів у повітрі і як наслідок до забруднення середовища на підприємстві. Для знезараження фагів сироваткові білки, які використовуються для переробки в сири, піддаються УФ-опромінюванню, термічній обробці та мембранній фільтрації.

Через всюдищу природу бактеріофагів, які інфікують закваски молочнокислих бактерій у виробничому середовищі, важко повністю усунути потенційну інфекцію та запобігти збою ферментації. Однак ризики зриву виробництва можна зменшити за допомогою наступних підходів:

- Використання ефективних дезінфікуючих засобів — надоцтова кислота та гіпохлорит натрію є одними з найефективніших біоцидів, перевірених на специфічних до молочнокислих бактерій фагах;
- Старий метод, який все ще використовується на виробничих підприємствах (переважно сироварні), — це ротація стартерної культури;
- Генна інженерія: конструювання стійких до бактеріофагів штамів молочнокислих бактерій.

4.6.4. Методи фагової детекції в молочних продуктах

Для виявлення фагів використовуються такі методи як спот-тест або моніторинг кислотності. Ці методи є кількісними та чутливими, але займають порівняно багато часу. Для виявлення бактеріофагів у сирому молоці можливе використання молекулярно-біологічних методів, зокрема класичної ПЛР та ПЛР у реальному часі. У класичній ПЛР повний аналіз займає кілька годин, а найнижчий рівень фагового забруднення, який можна виявити цим методом, становить 10^3 БУО/мл. На відміну від класичної ПЛР, метод ПЛР в реальному часі дозволяє контролювати кількість продукту реакції протягом його життєвого циклу. Додатковим методом, який можна використовувати для виявлення фагів у молочній промисловості, є проточна цитометрія. Цей метод ефективно застосовувався для культур зі знежиреним молоком, інфікованих бактеріофагами. Для отримання реального результату необхідно видалити часточки жиру, які можуть заблокувати цитометр перед дослідженням. У цьому методі відстежують зміну маси та переривання поділу клітин як наслідок масової загибелі клітин від лізису (Singh et al., 2013).

Отже, застосування бактеріофагів у харчовій промисловості має як беззаперечні переваги, так і деякі недоліки. З одного боку, бактеріофаги та їх ферменти можуть безпечно та ефективно пригнічувати бактерії, при цьому не впливаючи на якість продуктів. З іншого боку, необхідно пам'ятати про потенційні ризики застосування фагів. Лізогенія та трансдукція бактеріофагів можуть змінити фенотип хазяїна і навіть посилити патогенність або вірулентність бактерій. Тому при їхньому застосуванні рекомендується уникати використання помірних бактеріофагів. Також залишається велика потреба в дослідженні вже існуючих та нових методів стабілізації фагів задля уникнення проблеми їх інактивації в різних несприятливих середовищах, починаючи з шкірки овочів і закінчуючи шлунково-кишковим трактом свійських тварин. Синергія фагів з іншими антисептичними методами має особливий потенціал,

оскільки так можна вирішити як проблему фагорезистентності конкретних штамів, так і впливати на стійкість до антибіотиків у бактерій.

Використані джерела:

1. Abhisingha, M., Dumnil, J., & Pitaksutheepong, C. (2020). Efficiency of phage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium on chicken meat during low temperature storage. *LWT*, *129*, 109580. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109580>
2. Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M. Y., Dean, T., Senecal, A., & Sulakvelidze, A. (2008). Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(20), 6230–6238. <https://doi.org/10.1128/AEM.01465-08>
3. Ahern, S. J., Das, M., Bhowmick, T. S., Young, R., & Gonzalez, C. F. (2014). Characterization of Novel Virulent Broad-Host-Range Phages of *Xylella fastidiosa* and *Xanthomonas*. *Journal of Bacteriology*, *196*(2), 459. <https://doi.org/10.1128/JB.01080-13>
4. Ahmad, A. A., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2014). The filamentous phage XacF1 causes loss of virulence in *Xanthomonas axonopodis* pv. Citri, the causative agent of citrus canker disease. *Frontiers in Microbiology*, *5*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00321>
5. Álvarez, B., López, M. M., & Biosca, E. G. (2019). Biocontrol of the Major Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* in Irrigation Water and Host Plants by Novel Waterborne Lytic Bacteriophages. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 2813. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02813>
6. Arthur, T. M., Kalchayanand, N., Agga, G. E., Wheeler, T. L., & Koohmaraie, M. (2017). Evaluation of Bacteriophage Application to Cattle in Lairage at Beef Processing Plants to Reduce *Escherichia coli* O157:H7 Prevalence on Hides and

- Carcasses. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(1), 17–22.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2189>
7. Arthurs, S. P., Lacey, L. A., & Behle, R. W. (2006). Evaluation of spray-dried lignin-based formulations and adjuvants as solar protectants for the granulovirus of the codling moth, *Cydia pomonella* (L). *Journal of Invertebrate Pathology*, 93(2), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.04.008>
 8. Atamer, Z., Samtlebe, M., Neve, H., J Heller, K., & Hinrichs, J. (2013). Review: Elimination of bacteriophages in whey and whey products. *Frontiers in Microbiology*, 4, 191. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00191>
 9. Atterbury, R. J., & Barrow, P. A. (2019). The Use of Bacteriophages in Veterinary Therapy. In D. R. Harper, S. T. Abedon, B. H. Burrowes, & M. L. McConville (Eds.), *Bacteriophages: Biology, Technology, Therapy* (pp. 1–36). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40598-8_32-1
 10. Atterbury, R. J., Connerton, P. L., Dodd, C. E. R., Rees, C. E. D., & Connerton, I. F. (2003). Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 6302–6306. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.6302-6306.2003>
 11. Atterbury, R. J., Gigante, A. M., Rubio Lozano, M. de la S., Méndez Medina, R. D., Robinson, G., Alloush, H., Barrow, P. A., & Allen, V. M. (2020). Reduction of *Salmonella* contamination on the surface of chicken skin using bacteriophage. *Virology Journal*, 17(1), 98. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01368-0>
 12. Bach, S. J., Johnson, R. P., Stanford, K., & McAllister, T. A. (2009). Bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157:H7 levels in experimentally inoculated sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 89(2), 285–293. <https://doi.org/10.4141/CJAS08083>
 13. *Bacteriophage Probiotics—Intralytix, Inc.* (2009). <https://www.intralytix.com/probiotics>
 14. Bae, J. Y., Wu, J., Lee, H. J., Jo, E. J., Murugaiyan, S., Chung, E., & Lee, S.-W. (2012). Biocontrol potential of a lytic bacteriophage PE204 against bacterial wilt

- of tomato. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1613–1620.
<https://doi.org/10.4014/jmb.1208.08072>
15. Baliyan, N., Dhiman, S., Dheeman, S., Vishnoi, V. K., Kumar, S., & Maheshwari, D. K. (2022). Bacteriophage cocktails as antibacterial agents in crop protection. *Environmental Sustainability*, 5(3), 305–311. <https://doi.org/10.1007/s42398-022-00237-6>
16. Balogh, B. (2002). STRATEGIES FOR IMPROVING THE EFFICACY OF BACTERIOPHAGES FOR CONTROLLING BACTERIAL SPOT OF TOMATO. *Undefined*. <https://www.semanticscholar.org/paper/STRATEGIES-FOR-IMPROVING-THE-EFFICACY-OF-FOR-SPOT-Balogh/d7b7d61676ec687e46fdabb70f197213a109a5c9>
17. Balogh, B., Canteros, B. I., Stall, R. E., & Jones, J. B. (2008). Control of Citrus Canker and Citrus Bacterial Spot with Bacteriophages. *Plant Disease*, 92(7), 1048–1052. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1048>
18. Balogh, B., Jones, J. B., Iriarte, F. B., & Momol, M. T. (2010). Phage therapy for plant disease control. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11(1), 48–57. <https://doi.org/10.2174/138920110790725302>
19. Balogh, B., Jones, J. B., Momol, M. T., Olson, S. M., Obradovic, A., King, P., & Jackson, L. E. (2003). Improved Efficacy of Newly Formulated Bacteriophages for Management of Bacterial Spot on Tomato. *Plant Disease*, 87(8), 949–954. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.8.949>
20. Barbara, Stanghellini, Berti-Ceroni, Giorgio, D., Salvioli, Corradi, Cremon, & Corinaldesi. (2000). Role of antibiotic therapy on long-term germ excretion in faeces and digestive symptoms after Salmonella infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 14(9), 1127–1131. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2000.00818.x>
21. Bardina, C., Spricigo, D. A., Cortés, P., & Llagostera, M. (2012). Significance of the bacteriophage treatment schedule in reducing Salmonella colonization of poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(18), 6600–6607. <https://doi.org/10.1128/AEM.01257-12>

22. Behle, R. W., McGuire, M. R., & Shasha, B. S. (1996). Extending the Residual Toxicity of *Bacillus thuringiensis* with Casein-Based Formulations. *Journal of Economic Entomology*, *89*(6), 1399–1405. <https://doi.org/10.1093/jee/89.6.1399>
23. Beims, H., Bunk, B., Erler, S., Mohr, K. I., Spröer, C., Pradella, S., Günther, G., Rohde, M., von der Ohe, W., & Steinert, M. (2020). Discovery of *Paenibacillus larvae* ERIC V: Phenotypic and genomic comparison to genotypes ERIC I-IV reveal different inventories of virulence factors which correlate with epidemiological prevalences of American Foulbrood. *International Journal of Medical Microbiology*, *310*(2), 151394. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2020.151394>
24. Beuchat, L. R. (2002). Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, *4*(4), 413–423. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(02\)01555-1](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(02)01555-1)
25. Bhunchoth, A., Phironrit, N., Leksomboon, C., Chatchawankanphanich, O., Kotera, S., Narulita, E., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2015). Isolation of *Ralstonia solanacearum*-infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents. *Journal of Applied Microbiology*, *118*(4), 1023–1033. <https://doi.org/10.1111/jam.12763>
26. Bianchessi, L., De Bernardi, G., Vigorelli, M., Dall’Ara, P., & Turin, L. (2024). Bacteriophage Therapy in Companion and Farm Animals. *Antibiotics*, *13*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13040294>
27. Born, Y., Bosshard, L., Duffy, B., Loessner, M. J., & Fieseler, L. (2015). Protection of *Erwinia amylovora* bacteriophage Y2 from UV-induced damage by natural compounds. *Bacteriophage*, *5*(4), e1074330. <https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1074330>
28. Boulé, J., Sholberg, P. L., Lehman, S. M., O’gorman, D. T., & Svircev, A. M. (2011). Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting *Erwinia amylovora* and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, *33*(3), 308–317. <https://doi.org/10.1080/07060661.2011.588250>

29. Buttimer, C., Hendrix, H., Lucid, A., Neve, H., Noben, J.-P., Franz, C., O'Mahony, J., Lavigne, R., & Coffey, A. (2018). Novel N4-Like Bacteriophages of *Pectobacterium atrosepticum*. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, *11*(2), 45. <https://doi.org/10.3390/ph11020045>
30. Buttimer, C., McAuliffe, O., Ross, R. P., Hill, C., O'Mahony, J., & Coffey, A. (2017). Bacteriophages and Bacterial Plant Diseases. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00034>
31. Carlton, R. M., Noordman, W. H., Biswas, B., de Meester, E. D., & Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, *43*(3), 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2005.08.005>
32. Carstens, A. B., Djurhuus, A. M., Kot, W., & Hansen, L. H. (2019). A novel six-phage cocktail reduces *Pectobacterium atrosepticum* soft rot infection in potato tubers under simulated storage conditions. *FEMS Microbiology Letters*, *366*(9), fnz101. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz101>
33. Carstens, A. B., Djurhuus, A. M., Kot, W., Jacobs-Sera, D., Hatfull, G. F., & Hansen, L. H. (2018). Unlocking the Potential of 46 New Bacteriophages for Biocontrol of *Dickeya Solani*. *Viruses*, *10*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/v10110621>
34. Carvalho, C. M., Gannon, B. W., Halfhide, D. E., Santos, S. B., Hayes, C. M., Roe, J. M., & Azeredo, J. (2010). The in vivo efficacy of two administration routes of a phage cocktail to reduce numbers of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* in chickens. *BMC Microbiology*, *10*, 232. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-232>
35. Chai, Z., Wang, J., Tao, S., & Mou, H. (2014). Application of bacteriophage-borne enzyme combined with chlorine dioxide on controlling bacterial biofilm. *LWT - Food Science and Technology*, *59*(2, Part 1), 1159–1165. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.033>

36. Chang, R. Y. K., Wallin, M., Kutter, E., Morales, S., Britton, W., Li, J., & Chan, H.-K. (2019). Storage stability of inhalable phage powders containing lactose at ambient conditions. *International Journal of Pharmaceutics*, 560, 11. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.050>
37. Chang, Y.-Y., Floch, E. L., Juneau, S., Cunha, E. da, Salvato, M., Civano, F., Marchesi, S., Ilbert, O., Toba, Y., Lim, C.-F., Tang, J.-J., Wang, W.-H., Ferraro, N., Urry, M. C., Griffiths, R. E., & Kartaltepe, J. S. (2017). Infrared Selection of Obscured Active Galactic Nuclei in the COSMOS Field. *The Astrophysical Journal Supplement Series*, 233(2), 19. <https://doi.org/10.3847/1538-4365/aa97da>
38. Chen, L., Fan, J., Yan, T., Liu, Q., Yuan, S., Zhang, H., Yang, J., Deng, D., Huang, S., & Ma, Y. (2019). Isolation and Characterization of Specific Phages to Prepare a Cocktail Preventing *Vibrio* sp. Va-F3 Infections in Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02337>
39. Chibeu, A., Agius, L., Gao, A., Sabour, P. M., Kropinski, A. M., & Balamurugan, S. (2013). Efficacy of bacteriophage LISTEXTMP100 combined with chemical antimicrobials in reducing *Listeria monocytogenes* in cooked turkey and roast beef. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 208–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.018>
40. Choi, I., Yoo, D. S., Chang, Y., Kim, S. Y., & Han, J. (2021). Polycaprolactone film functionalized with bacteriophage T4 promotes antibacterial activity of food packaging toward *Escherichia coli*. *Food Chemistry*, 346, 128883. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128883>
41. Choudhury, T. G., Maiti, B., Venugopal, M. N., & Karunasagar, I. (2019). Influence of some environmental variables and addition of r-lysozyme on efficacy of *Vibrio harveyi* phage for therapy. *Journal of Biosciences*, 44(1), 8. <https://doi.org/10.1007/s12038-018-9830-x>
42. Clavijo, V., Baquero, D., Hernandez, S., Farfan, J. C., Arias, J., Arévalo, A., Donado-Godoy, P., & Vives-Flores, M. (2019). Phage cocktail SalmoFREE®

- reduces *Salmonella* on a commercial broiler farm. *Poultry Science*, 98(10), 5054–5063. <https://doi.org/10.3382/ps/pez251>
43. Croci, L., De Medici, D., Scalfaro, C., Fiore, A., Divizia, M., Donia, D., Cosentino, A. M., Moretti, P., & Costantini, G. (2000). Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in Adriatic Sea mussels. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 293–298. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00966.x>
44. Das, M., Bhowmick, T. S., Ahern, S. J., Young, R., & Gonzalez, C. F. (2015). Control of Pierce's Disease by Phage. *PLOS ONE*, 10(6), e0128902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128902>
45. Doffkay, Z., Dömötör, D., Kovács, T., & Rákhely, G. (2015). *Bacteriophage therapy against plant, animal and human pathogens*. 59, 291–302.
46. Duc, H., Hoang, S., Honjoh, K., & Miyamoto, T. (2018). Isolation and application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination in raw chicken meat. *LWT- Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.072>
47. Farooq, T., Hussain, M. D., Shakeel, M. T., Tariqjaveed, M., Aslam, M. N., Naqvi, S. A. H., Amjad, R., Tang, Y., She, X., & He, Z. (2022). Deploying Viruses against Phytobacteria: Potential Use of Phage Cocktails as a Multifaceted Approach to Combat Resistant Bacterial Plant Pathogens. *Viruses*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/v14020171>
48. Farooq, U., Yang, Q., Ullah, M. W., & Wang, S. (2018). Bacterial biosensing: Recent advances in phage-based bioassays and biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*, 118, 204–216. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.07.058>
49. Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., & Matambo, T. (2021). Biopesticides in Sustainable Agriculture: A Critical Sustainable Development Driver Governed by Green Chemistry Principles. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.619058>
50. Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., & García, P. (2018). Application of Bacteriophages in the Agro-Food Sector: A Long Way Toward Approval. *Frontiers*

- in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 296.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00296>
51. Flaherty, J. E., Harbaugh, B. K., Jones, J. B., Somodi, G. C., & Jackson, L. E. (2001). *H-mutant Bacteriophages as a Potential Biocontrol of Bacterial Blight of Geranium*. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.36.1.98>
52. Flaherty, J. E., Somodi, G. C., Jones, J. B., Harbaugh, B. K., & Jackson, L. E. (2000). *Control of Bacterial Spot on Tomato in the Greenhouse and Field with H-mutant Bacteriophages*. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.35.5.882>
53. *Focus group meeting on bacteriophages as veterinary medicines | European Medicines Agency (EMA)*. (2023, May 11). <https://www.ema.europa.eu/en/events/focus-group-meeting-bacteriophages-veterinary-medicines>
54. Fong, S. A., Drilling, A. J., Ooi, M. L., Paramasivan, S., Finnie, J. W., Morales, S., Psaltis, A. J., Vreugde, S., & Wormald, P.-J. (2019). Safety and efficacy of a bacteriophage cocktail in an in vivo model of *Pseudomonas aeruginosa* sinusitis. *Translational Research*, 206, 41–56. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.12.002>
55. Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by Treatment with Lytic Bacteriophages ☐. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4155–4162. <https://doi.org/10.1128/AEM.02847-10>
56. García, P., Madera, C., Martínez, B., & Rodríguez, A. (2007). Biocontrol of *Staphylococcus aureus* in curd manufacturing processes using bacteriophages. *International Dairy Journal*, 17(10), 1232–1239. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.03.014>
57. Garneau, J. E., & Moineau, S. (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations. *Microbial Cell Factories*, 10 Suppl 1(Suppl 1), S20. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S20>
58. Garvey, M. (2020). A comprehensive review of current environmental pollutants of pharmaceutical, agricultural and industrial origin. *European Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.36648/2248-9215.10.2.102>

59. Gašić, K., Kuzmanović, N., Ivanović, M., Prokić, A., Šević, M., & Obradović, A. (2018). Complete Genome of the *Xanthomonas euvesicatoria* Specific Bacteriophage KΦ1, Its Survival and Potential in Control of Pepper Bacterial Spot. *Frontiers in Microbiology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02021>
60. Gill, J., & Abedon, S. (2003). Bacteriophage Ecology and Plants. *APSnet Feature Articles*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2003-1103>
61. Gill, J. J., & Hyman, P. (2010). Phage choice, isolation, and preparation for phage therapy. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *11*(1), 2–14. <https://doi.org/10.2174/138920110790725311>
62. Gill, J. J., Pacan, J. C., Carson, M. E., Leslie, K. E., Griffiths, M. W., & Sabour, P. M. (2006). Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(9), 2912–2918. <https://doi.org/10.1128/AAC.01630-05>
63. Gill, J. J., Sabour, P. M., Leslie, K. E., & Griffiths, M. W. (2006). Bovine whey proteins inhibit the interaction of *Staphylococcus aureus* and bacteriophage K. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(2), 377–386. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02918.x>
64. Gilmore, B. F. (2012). Bacteriophages as anti-infective agents: Recent developments and regulatory challenges. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, *10*(5), 533–535. <https://doi.org/10.1586/eri.12.30>
65. Gong, C., Jiang, X., & Wang, J. (2017). Application of bacteriophages to reduce *Salmonella* contamination on workers' boots in rendering-processing environment. *Poultry Science*, *96*(10), 3700–3708. <https://doi.org/10.3382/ps/pex070>
66. Goode, D., Allen, V. M., & Barrow, P. A. (2003). Reduction of Experimental *Salmonella* and *Campylobacter* Contamination of Chicken Skin by Application of Lytic Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(8), 5032–5036. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5032-5036.2003>

67. Goodridge, L. D. (2004). Bacteriophage biocontrol of plant pathogens: Fact or fiction? *Trends in Biotechnology*, 22(8), 384–385. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.05.007>
68. Goodridge, L. D., & Bisha, B. (2011). Phage-based biocontrol strategies to reduce foodborne pathogens in foods. *Bacteriophage*, 1(3), 130–137. <https://doi.org/10.4161/bact.1.3.17629>
69. Greer, G. G. (1982). Psychrotrophic Bacteriophages for Beef Spoilage Pseudomonads 1. *Journal of Food Protection*, 45(14), 1318–1325. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-45.14.1318>
70. Greer, G. G. (1988). Effects of Phage Concentration, Bacterial Density, and Temperature on Phage Control of Beef Spoilage. *Journal of Food Science*, 53(4), 1226–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1988.tb13570.x>
71. Grygorcewicz, B., Grudziński, M., Wasak, A., Augustyniak, A., Pietruszka, A., & Nawrotek, P. (2017). Bacteriophage-mediated reduction of *Salmonella* Enteritidis in swine slurry. *Applied Soil Ecology*, 119, 179–182. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.020>
72. Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., & Loessner, M. J. (2009). Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 93–100. <https://doi.org/10.1128/AEM.01711-08>
73. Gutiérrez, D., Fernández, L., Rodríguez, A., & García, P. (2018). Are Phage Lytic Proteins the Secret Weapon To Kill *Staphylococcus aureus*? *mBio*, 9(1), 10.1128/mbio.01923-17. <https://doi.org/10.1128/mbio.01923-17>
74. Gutiérrez, D., Rodríguez-Rubio, L., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2016). Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. *Frontiers in Microbiology*, 7, 825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825>
75. Hagens, S., & Loessner, M. J. (2007). Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3), 513–519. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1031-8>

76. He, D.-C., Zhan, J., & Lian-Hui, X. (2016). Problems, challenges and future of plant disease management: From an ecological point of view. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 60345–60352. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61300-4](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61300-4)
77. Hernandez, C. A., Salazar, A. J., & Koskella, B. (2020). Bacteriophage-Mediated Reduction of Bacterial Speck on Tomato Seedlings. *PHAGE (New Rochelle, N.Y.)*, 1(4), 205–212. <https://doi.org/10.1089/phage.2020.0027>
78. Holah, J. T., Taylor, J. H., Dawson, D. J., & Hall, K. E. (2002). Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 92(s1), 111S-120S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.18.x>
79. Hsu, F. C., Shieh, Y. S. C., & Sobsey, M. D. (2002). Enteric bacteriophages as potential fecal indicators in ground beef and poultry meat. *Journal of Food Protection*, 65(1), 93–99. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.1.93>
80. Huang, K., & Nitin, N. (2019). Edible bacteriophage based antimicrobial coating on fish feed for enhanced treatment of bacterial infections in aquaculture industry. *Aquaculture*, 502, 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.026>
81. Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., Balog, J. M., Xie, H., Moore, P. A., & Donoghue, A. M. (2002). Prevention of *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens with bacteriophage (SPR02). *Poultry Science*, 81(4), 437–441. <https://doi.org/10.1093/ps/81.4.437>
82. Huff, W. E., Huff, G. R., Rath, N. C., & Donoghue, A. M. (2006). Evaluation of the influence of bacteriophage titer on the treatment of colibacillosis in broiler chickens. *Poultry Science*, 85(8), 1373–1377. <https://doi.org/10.1093/ps/85.8.1373>
83. Huff, W., Huff, G., Rath, N., Balog, J., & Donoghue, A. (2002). Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. *Poultry Science*, 81(10), 1486–1491. <https://doi.org/10.1093/ps/81.10.1486>
84. Hughes, K. A., Sutherland, I. W., & Jones, M. V. (1998). Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: The role of phage-borne polysaccharide depolymerase.

- Microbiology (Reading, England)*, 144 (Pt 11), 3039–3047.
<https://doi.org/10.1099/00221287-144-11-3039>
85. Hyun, J.-W., Kim, H.-J., Yi, P.-H., Hwang, R.-Y., & Park, E. (2012). Mode of Action of Streptomycin Resistance in the Citrus Canker Pathogen (*Xanthomonas smithii* subsp. Citri) in Jeju Island. *The Plant Pathology Journal*, 28. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2012.28.2.207>
86. Ibrahim, Y. E., Saleh, A. A., & Al-Saleh, M. A. (2017). Management of Asiatic Citrus Canker Under Field Conditions in Saudi Arabia Using Bacteriophages and Acibenzolar-S-Methyl. *Plant Disease*, 101(5), 761–765. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1213-RE>
87. Ignoffo, C. M., Garcia, C., & Saathoff, S. G. (1997). Sunlight Stability and Rain-Fastness of Formulations of Baculovirus heliothis. *Environmental Entomology*, 26(6), 1470–1474. <https://doi.org/10.1093/ee/26.6.1470>
88. Ioannou, P., Baliou, S., & Samonis, G. (2023). Bacteriophages in Infectious Diseases and Beyond—A Narrative Review. *Antibiotics*, 12(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061012>
89. Iriarte, F. B., Balogh, B., Momol, M. T., Smith, L. M., Wilson, M., & Jones, J. B. (2007). Factors affecting survival of bacteriophage on tomato leaf surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1704–1711. <https://doi.org/10.1128/AEM.02118-06>
90. Jain, S., & Chen, J. (2007). Attachment and biofilm formation by various serotypes of Salmonella as influenced by cellulose production and thin aggregative fimbriae biosynthesis. *Journal of Food Protection*, 70(11), 2473–2479. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.11.2473>
91. Jończyk-Matysiak, E., Łodej, N., Kula, D., Owczarek, B., Orwat, F., Międzybrodzki, R., Neuberg, J., Bagińska, N., Weber-Dąbrowska, B., & Górski, A. (2019). Factors determining phage stability/activity: Challenges in practical phage application. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 17(8), 583–606. <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1646126>

92. Jones, J., Jackson, L., Balogh, B., Obradovic, A., Iriarte, F., & Momol, M. (2007). Bacteriophages for Plant Disease Control *. *Annual Review of Phytopathology*, *45*, 245–262. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094411>
93. Kaper, J. B. (1998). Enterohemorrhagic Escherichia coli. *Current Opinion in Microbiology*, *1*(1), 103–108. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(98\)80149-5](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(98)80149-5)
94. Karn, M., Sharma, S. K., Handa, A., Sharma, A., Sharma, S., & Sharma, U. (2022). Lytic bacteriophages in preventing the bacterial blight of pomegranate caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *Punicae*. *Vegetos*, *36*. <https://doi.org/10.1007/s42535-022-00451-x>
95. Kazi, M., & Annapure, U. S. (2016). Bacteriophage biocontrol of foodborne pathogens. *Journal of Food Science and Technology*, *53*(3), 1355–1362. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1996-8>
96. Kennedy, J. E., Wei, C. I., & Oblinger, J. L. (1986). Distribution of Coliphages in Various Foods. *Journal of Food Protection*, *49*(12), 944–951. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-49.12.944>
97. Kering, K. K., Zhang, X., Nyaruaba, R., Yu, J., & Wei, H. (2020). Application of Adaptive Evolution to Improve the Stability of Bacteriophages during Storage. *Viruses*, *12*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/v12040423>
98. Kim, J. H., Kim, H. J., Jung, S. J., Mizan, M. F. R., Park, S. H., & Ha, S.-D. (2020). Characterization of Salmonella spp.-specific bacteriophages and their biocontrol application in chicken breast meat. *Journal of Food Science*, *85*(3), 526–534. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15042>
99. Kim, K. H., Ingale, S. L., Kim, J. S., Lee, S. H., Lee, J. H., Kwon, I. K., & Chae, B. J. (2014). Bacteriophage and probiotics both enhance the performance of growing pigs but bacteriophage are more effective. *Animal Feed Science and Technology*, *196*, 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.06.012>
100. Komora, N., Maciel, C., Pinto, C. A., Ferreira, V., Brandão, T. R. S., Saraiva, J. M. A., Castro, S. M., & Teixeira, P. (2020). Non-thermal approach to *Listeria monocytogenes* inactivation in milk: The combined effect of high pressure,

- pediocin PA-1 and bacteriophage P100. *Food Microbiology*, 86, 103315. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103315>
101. Korniienko, N., Kharina, A., Budzanivska, I., Burketová, L., & Kalachova, T. (2022). Phages of phytopathogenic bacteria: High potential, but challenging application. *Plant Protection Science*, 58 (2022)(No. 2), 81–91. <https://doi.org/10.17221/147/2021-PPS>
102. Kowalska, J. D., Kazimierczak, J., Sowińska, P. M., Wójcik, E. A., Siwicki, A. K., & Dastyk, J. (2020). Growing Trend of Fighting Infections in Aquaculture Environment-Opportunities and Challenges of Phage Therapy. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(6), 301. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060301>
103. Laglaguano, J., & Cordova, V. (2019). *Bacteriophages applications in agriculture*. 02. <https://doi.org/10.21931/RB/CS/2019.02.01.24>
104. Lang, J. M., Gent, D. H., & Schwartz, H. F. (2007). Management of Xanthomonas Leaf Blight of Onion with Bacteriophages and a Plant Activator. *Plant Disease*, 91(7), 871–878. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-7-0871>
105. Le Loir, Y., Baron, F., & Gautier, M. (2003). Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2(1), 63–76.
106. Lee, J.-H., Kim, J.-H., Kim, G.-H., Jung, J.-S., Hur, J.-S., & Koh, Y.-J. (2005). Comparative Analysis of Korean and Japanese Strains of Pseudomonas syringae pv. Actinidiae Causing Bacterial Canker of Kiwifruit. *The Plant Pathology Journal*, 21(2), 119–126. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2005.21.2.119>
107. Leung, S. S., Parumasivam, T., Nguyen, A., Gengenbach, T., Carter, E. A., Carrigy, N. B., Wang, H., Vehring, R., Finlay, W. H., Morales, S., Britton, W. J., Kutter, E., & Chan, H.-K. (2018). Effect of Storage Temperature on the Stability of Spray Dried Bacteriophage Powders. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics : Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, 127, 213. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.033>
108. Leverentz, B., Conway, W. S., Alavidze, Z., Janisiewicz, W. J., Fuchs, Y., Camp, M. J., Chighladze, E., & Sulakvelidze, A. (2001). Examination of bacteriophage as a biocontrol method for salmonella on fresh-cut fruit: A model study. *Journal*

- of Food Protection*, 64(8), 1116–1121. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.8.1116>
109. Leverentz, B., Conway, W. S., Camp, M. J., Janisiewicz, W. J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., & Sulakvelidze, A. (2003). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8), 4519–4526. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4519-4526.2003>
110. Lewis, K. (2008). Multidrug Tolerance of Biofilms and Persister Cells. In T. Romeo (Ed.), *Bacterial Biofilms* (pp. 107–131). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_6
111. Lim, T.-H., Lee, D.-H., Lee, Y.-N., Park, J.-K., Youn, H.-N., Kim, M.-S., Lee, H.-J., Yang, S.-Y., Cho, Y.-W., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Choi, I.-S., & Song, C.-S. (2011). Efficacy of bacteriophage therapy on horizontal transmission of *Salmonella gallinarum* on commercial layer chickens. *Avian Diseases*, 55(3), 435–438. <https://doi.org/10.1637/9599-111210-Reg.1>
112. Liu, A., Liu, Y., Peng, L., Cai, X., Shen, L., Duan, M., Ning, Y., Liu, S., Li, C., Liu, Y., Chen, H., Wu, W., Wang, X., Hu, B., & Li, C. (2020). Characterization of the narrow-spectrum bacteriophage LSE7621 towards *Salmonella* Enteritidis and its biocontrol potential on lettuce and tofu. *LWT*, 118, 108791. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108791>
113. Liu, A., Wang, Y., Cai, X., Jiang, S., Cai, X., Shen, L., Liu, Y., Han, G., Chen, S., Wang, J., Wu, W., Li, C., Liu, S., & Wang, X. (2019). Characterization of endolysins from bacteriophage LPST10 and evaluation of their potential for controlling *Salmonella* Typhimurium on lettuce. *LWT*, 114, 108372. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108372>
114. Loc Carrillo, C., Atterbury, R. J., el-Shibiny, A., Connerton, P. L., Dillon, E., Scott, A., & Connerton, I. F. (2005). Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6554–6563. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6554-6563.2005>

115. Lomelí-Ortega, C. O., & Martínez-Díaz, S. F. (2014). Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. *Aquaculture*, *434*, 208–211. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.018>
116. Magin, V., Garrec, N., & Andrés, Y. (2019). Selection of Bacteriophages to Control In Vitro 24 h Old Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Drinking and Thermal Water. *Viruses*, *11*(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/v11080749>
117. Martínez, B., Obeso, J. M., Rodríguez, A., & García, P. (2008). Nisin-bacteriophage crossresistance in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, *122*(3), 253–258. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.011>
118. Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *30*(6), 327–356. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0056-y>
119. Mercanti, D. J., Carminati, D., Reinheimer, J. A., & Quiberoni, A. (2011). Widely distributed lysogeny in probiotic lactobacilli represents a potentially high risk for the fermentative dairy industry. *International Journal of Food Microbiology*, *144*(3), 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.009>
120. Merrill, B. D., Grose, J. H., Breakwell, D. P., & Burnett, S. H. (2014). Characterization of *Paenibacillus* larvae bacteriophages and their genomic relationships to firmicute bacteriophages. *BMC Genomics*, *15*(1), 745. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-745>
121. Miguéis, S., Saraiva, C., & Esteves, A. (2017). Efficacy of LISTEX P100 at Different Concentrations for Reduction of *Listeria monocytogenes* Inoculated in Sashimi. *Journal of Food Protection*, *80*(12), 2094–2098. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-098>

122. Møretro, T., & Langsrud, S. (2017). Residential Bacteria on Surfaces in the Food Industry and Their Implications for Food Safety and Quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1022–1041. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>
123. Murthy, K., & Engelhardt, R. (2008). *Encapsulated Bacteriophage Formulation* (United States Patent US20080318311A1). <https://patents.google.com/patent/US20080318311A1/en>
124. Nguyen, H. T. D., Yoon, S., Kim, M.-H., Kim, Y.-K., Yoon, M.-Y., Cho, Y.-H., Lim, Y., Shin, S. H., & Kim, D.-E. (2012). Characterization of bacteriophage ϕ Pto-bp6g, a novel phage that lyses *Pseudomonas tolaasii* causing brown blotch disease in mushrooms. *Journal of Microbiological Methods*, 91(3), 514–519. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.09.032>
125. Obeso, J. M., Martínez, B., Rodríguez, A., & García, P. (2008). Lytic activity of the recombinant staphylococcal bacteriophage PhiH5 endolysin active against *Staphylococcus aureus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 128(2), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.010>
126. Obradovic, A., Jones, J., Momol, M., Olson, S., Jackson, L., Balogh, B., Guven, K., & Iriarte, F. (2005). Integration of Biological Control Agents and Systemic Acquired Resistance Inducers Against Bacterial Spot on Tomato. *Plant Disease - PLANT DIS*, 89, 712–716. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0712>
127. O’Flaherty, S., Coffey, A., Meaney, W. J., Fitzgerald, G. F., & Ross, R. P. (2005). Inhibition of bacteriophage K proliferation on *Staphylococcus aureus* in raw bovine milk. *Letters in Applied Microbiology*, 41(3), 274–279. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01762.x>
128. Oliveira, A., Sereno, R., & Azeredo, J. (2010). In vivo efficiency evaluation of a phage cocktail in controlling severe colibacillosis in confined conditions and experimental poultry houses. *Veterinary Microbiology*, 146(3–4), 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.015>
129. Oliveira, H., Thiagarajan, V., Walmagh, M., Sillankorva, S., Lavigne, R., Neves-Petersen, M. T., Kluskens, L. D., & Azeredo, J. (2014). A thermostable *Salmonella*

- phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids. *PloS One*, 9(10), e108376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108376>
130. Papianni, M., Paris, D., Woo, S. L., Fulgione, A., Rigano, M. M., Parrilli, E., Tutino, M. L., Marra, R., Manganiello, G., Casillo, A., Limone, A., Zoina, A., Motta, A., Lorito, M., & Capparelli, R. (2020). Plant Dynamic Metabolic Response to Bacteriophage Treatment After *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* Infection. *Frontiers in Microbiology*, 11, 732. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00732>
131. Pereira, C., Costa, P., Pinheiro, L., Balcão, V. M., & Almeida, A. (2021). Kiwifruit bacterial canker: An integrative view focused on biocontrol strategies. *Planta*, 253(2), 49. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03549-1>
132. Perera, M. N., Abuladze, T., Li, M., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2015). Bacteriophage cocktail significantly reduces or eliminates *Listeria monocytogenes* contamination on lettuce, apples, cheese, smoked salmon and frozen foods. *Food Microbiology*, 52, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.06.006>
133. Połaska, M., & Sokołowska, B. (2019). Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry. *AIMS Microbiology*, 5(4), 324–346. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2019.4.324>
134. *Quality, safety and efficacy of bacteriophages as veterinary medicines—Scientific guideline | European Medicines Agency (EMA)*. (2023, January 27). <https://www.ema.europa.eu/en/quality-safety-and-efficacy-bacteriophages-veterinary-medicines-scientific-guideline>
135. Rabiey, M., Roy, S. R., Holtappels, D., Franceschetti, L., Quilty, B. J., Creeth, R., Sundin, G. W., Wagemans, J., Lavigne, R., & Jackson, R. W. (2020). Phage biocontrol to combat *Pseudomonas syringae* pathogens causing disease in cherry. *Microbial Biotechnology*, 13(5), 1428–1445. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13585>

136. Rahimi-Midani, A., & Choi, T.-J. (2020). Transport of Phage in Melon Plants and Inhibition of Progression of Bacterial Fruit Blotch. *Viruses*, 12(4), 477. <https://doi.org/10.3390/v12040477>
137. Ramesh, N., Madurantakam Royam, M., Manohar, P., & Leptihn, S. (2021). Application of Bacteriophages and Endolysins in Aquaculture as a Biocontrol Measure. *Biological Control*, 104678. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104678>
138. Ramos-Vivas, J., Superio, J., Galindo-Villegas, J., & Acosta, F. (2021). Phage Therapy as a Focused Management Strategy in Aquaculture. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms221910436>
139. Raya, R. R., Oot, R. A., Moore-Maley, B., Wieland, S., Callaway, T. R., Kutter, E. M., & Brabban, A. D. (2011). Naturally resident and exogenously applied T4-like and T5-like bacteriophages can reduce Escherichia coli O157:H7 levels in sheep guts. *Bacteriophage*, 1(1), 15–24. <https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14175>
140. Raya, R. R., Varey, P., Oot, R. A., Dyen, M. R., Callaway, T. R., Edrington, T. S., Kutter, E. M., & Brabban, A. D. (2006). Isolation and Characterization of a New T-Even Bacteriophage, CEV1, and Determination of Its Potential To Reduce Escherichia coli O157:H7 Levels in Sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6405–6410. <https://doi.org/10.1128/AEM.03011-05>
141. Reber, J. (2006). *OmniLytics' bacteriophage controls plant diseases*. 28, 3–4.
142. Richards, P. J., Connerton, P. L., & Connerton, I. F. (2019). Phage Biocontrol of Campylobacter jejuni in Chickens Does Not Produce Collateral Effects on the Gut Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00476>
143. Rivas, L., Coffey, B., McAuliffe, O., McDonnell, M. J., Burgess, C. M., Coffey, A., Ross, R. P., & Duffy, G. (2010). In vivo and ex vivo evaluations of bacteriophages e11/2 and e4/1c for use in the control of Escherichia coli O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 7210–7216. <https://doi.org/10.1128/AEM.01530-10>

144. Rohr, J. R., Barrett, C. B., Civitello, D. J., Craft, M. E., Delius, B., DeLeo, G. A., Hudson, P. J., Jouanard, N., Nguyen, K. H., Ostfeld, R. S., Remais, J. V., Riveau, G., Sokolow, S. H., & Tilman, D. (2019). Emerging human infectious diseases and the links to global food production. *Nature Sustainability*, 2(6), 445–456. <https://doi.org/10.1038/s41893-019-0293-3>
145. Rombouts, S., Volckaert, A., Venneman, S., Declercq, B., Vandenneuvel, D., Allonsius, C. N., Van Malderghem, C., Jang, H. B., Briers, Y., Noben, J. P., Klumpp, J., Van Vaerenbergh, J., Maes, M., & Lavigne, R. (2016). Characterization of Novel Bacteriophages for Biocontrol of Bacterial Blight in Leek Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *Porri*. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00279>
146. Saez, A. C., Zhang, J., Rostagno, M. H., & Ebner, P. D. (2011). Direct feeding of microencapsulated bacteriophages to reduce *Salmonella* colonization in pigs. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(12), 1269–1274. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0905>
147. Schmelcher, M., & Loessner, M. J. (2016). Bacteriophage endolysins: Applications for food safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.005>
148. Selle, K., Fletcher, J. R., Tuson, H., Schmitt, D. S., McMillan, L., Vridhambal, G. S., Rivera, A. J., Montgomery, S. A., Fortier, L.-C., Barrangou, R., Theriot, C. M., & Ousterout, D. G. (2020). In Vivo Targeting of *Clostridioides difficile* Using Phage-Delivered CRISPR-Cas3 Antimicrobials. *mBio*, 11(2), e00019-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00019-20>
149. Sheng, H., Knecht, H. J., Kudva, I. T., & Hovde, C. J. (2006). Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(8), 5359–5366. <https://doi.org/10.1128/AEM.00099-06>
150. Sieiro, C., Areal-Hermida, L., Pichardo-Gallardo, Á., Almuiña-González, R., de Miguel, T., Sánchez, S., Sánchez-Pérez, Á., & Villa, T. G. (2020). A Hundred Years of Bacteriophages: Can Phages Replace Antibiotics in Agriculture and

- Aquaculture? *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 9(8), 493.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9080493>
151. Silk, B. J., Date, K. A., Jackson, K. A., Pouillot, R., Holt, K. G., Graves, L. M., Ong, K. L., Hurd, S., Meyer, R., Marcus, R., Shiferaw, B., Norton, D. M., Medus, C., Zansky, S. M., Cronquist, A. B., Henao, O. L., Jones, T. F., Vugia, D. J., Farley, M. M., & Mahon, B. E. (2012). Invasive Listeriosis in the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004–2009: Further Targeted Prevention Needed for Higher-Risk Groups. *Clinical Infectious Diseases*, 54(suppl_5), S396–S404. <https://doi.org/10.1093/cid/cis268>
152. Silva, E. N. G., Figueiredo, A. C. L., Miranda, F. A., & Almeida, R. C. de C. (2014). Control of *Listeria monocytogenes* growth in soft cheeses by bacteriophage P100. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 11–16. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100003>
153. Singh, A., Poshtiban, S., & Evoy, S. (2013). Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 13(2), 1763–1786. <https://doi.org/10.3390/s130201763>
154. Smith, H. W., Huggins, M. B., & Shaw, K. M. (1987). Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. *Journal of General Microbiology*, 133(5), 1127–1135. <https://doi.org/10.1099/00221287-133-5-1127>
155. Soni, K. A., Desai, M., Oladunjoye, A., Skrobot, F., & Nannapaneni, R. (2012). Reduction of *Listeria monocytogenes* in queso fresco cheese by a combination of listericidal and listeristatic GRAS antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, 155(1–2), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.010>
156. Soni, K. A., & Nannapaneni, R. (2010). Bacteriophage Significantly Reduces *Listeria monocytogenes* on Raw Salmon Fillet Tissue†. *Journal of Food Protection*, 73(1), 32–38. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.1.32>
157. Soni, K. A., Nannapaneni, R., & Hagens, S. (2010). Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish fillets by bacteriophage

- Listex P100. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(4), 427–434.
<https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0432>
158. Sorour, H. K., Gaber, A. F., & Hosny, R. A. (2020). Evaluation of the efficiency of using Salmonella Kentucky and Escherichia coli O119 bacteriophages in the treatment and prevention of salmonellosis and colibacillosis in broiler chickens. *Letters in Applied Microbiology*, 71(4), 345–350. <https://doi.org/10.1111/lam.13347>
159. Spanu, V., Spanu, C., Viridis, S., Cossu, F., Scarano, C., & De Santis, E. P. L. (2012). Virulence factors and genetic variability of Staphylococcus aureus strains isolated from raw sheep's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153(1–2), 53–57.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.015>
160. Stamereilers, C., Fajardo, C. P., Walker, J. K., Mendez, K. N., Castro-Nallar, E., Grose, J. H., Hope, S., & Tsourkas, P. K. (2018). Genomic Analysis of 48 Paenibacillus larvae Bacteriophages. *Viruses*, 10(7), Article 7.
<https://doi.org/10.3390/v10070377>
161. Stamereilers, C., LeBlanc, L., Yost, D., Amy, P. S., & Tsourkas, P. K. (2016). Comparative genomics of 9 novel Paenibacillus larvae bacteriophages. *Bacteriophage*, 6(3), e1220349.
<https://doi.org/10.1080/21597081.2016.1220349>
162. Stanford, K., McAllister, T. A., Niu, Y. D., Stephens, T. P., Mazzocco, A., Waddell, T. E., & Johnson, R. P. (2010). Oral delivery systems for encapsulated bacteriophages targeted at Escherichia coli O157:H7 in feedlot cattle. *Journal of Food Protection*, 73(7), 1304–1312. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-73.7.1304>
163. Suárez, V. B., Quiberoni, A., Binetti, A. G., & Reinheimer, J. A. (2002). Thermophilic lactic acid bacteria phages isolated from Argentinian dairy industries. *Journal of Food Protection*, 65(10), 1597–1604.
<https://doi.org/10.4315/0362-028x-65.10.1597>

164. Sudheesh, P. S., Al-Ghabshi, A., Al-Mazrooei, N., & Al-Habsi, S. (2012). Comparative Pathogenomics of Bacteria Causing Infectious Diseases in Fish. *International Journal of Evolutionary Biology*, 2012(1), 457264. <https://doi.org/10.1155/2012/457264>
165. Sukumaran, A. T., Nannapaneni, R., Kiess, A., & Sharma, C. S. (2015). Reduction of Salmonella on chicken meat and chicken skin by combined or sequential application of lytic bacteriophage with chemical antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, 207, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.025>
166. Sundell, K., Landor, L., Castillo, D., Middelboe, M., & Wiklund, T. (2020). Bacteriophages as Biocontrol Agents for *Flavobacterium psychrophilum* Biofilms and Rainbow Trout Infections. *PHAGE (New Rochelle, N.Y.)*, 1(4), 198–204. <https://doi.org/10.1089/phage.2020.0021>
167. Sundin, G. W., & Wang, N. (2018). Antibiotic Resistance in Plant-Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 56, 161–180. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080417-045946>
168. Svircev, A., Roach, D., & Castle, A. (2018). Framing the Future with Bacteriophages in Agriculture. *Viruses*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/v10050218>
169. Tabla, R., Martínez, B., Rebollo, J. E., González, J., Ramírez, M. R., Roa, I., Rodríguez, A., & García, P. (2012). Bacteriophage performance against *Staphylococcus aureus* in milk is improved by high hydrostatic pressure treatments. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), 209–213. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.023>
170. Tanaka, H., Negishi, H., & Maeda, H. (1990). Control of Tobacco Bacterial Wilt by an Avirulent Strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and Its Bacteriophage. *Japanese Journal of Phytopathology*, 56(2), 243–246. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.56.243>
171. Tancos, K. A., & Cox, K. D. (2016). Exploring Diversity and Origins of Streptomycin-Resistant *Erwinia amylovora* Isolates in New York Through

- CRISPR Spacer Arrays. *Plant Disease*, 100(7), 1307–1313.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0088-RE>
172. Tewfike, T., & Desoky, S. (2015). *Biocontrol of Xanthomonas axonopodis causing bacterial spot by application of formulated phage*. 53, 1110–1419.
173. Thung, T. Y., Krishanthi Jayarukshi Kumari Premarathne, J. M., San Chang, W., Loo, Y. Y., Chin, Y. Z., Kuan, C. H., Tan, C. W., Basri, D. F., Jasimah Wan Mohamed Radzi, C. W., & Radu, S. (2017). Use of a lytic bacteriophage to control *Salmonella* Enteritidis in retail food. *LWT*, 78, 222–225.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.12.044>
174. Tolen, T. N., Xie, Y., Hairgrove, T. B., Gill, J. J., & Taylor, T. M. (2018). Evaluation of Commercial Prototype Bacteriophage Intervention Designed for Reducing O157 and Non-O157 Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* (STEC) on Beef Cattle Hide. *Foods*, 7(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/foods7070114>
175. Tomat, D., Quiberoni, A., Mercanti, D., & Balagué, C. (2014). Hard Surfaces Decontamination of Enteropathogenic and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* using Bacteriophages. *Food Research International*, 57.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.013>
176. Torre, A. L., Iovino, V., & Caradonia, F. (2018). Copper in plant protection: Current situation and prospects. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(2), Article 2.
https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-23407
177. Tsourkas, P. K. (2020). Paenibacillus larvae bacteriophages: Obscure past, promising future. *Microbial Genomics*, 6(2), e000329.
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000329>
178. *USDA ERS - Cost Estimates of Foodborne Illnesses*. (2021).
<https://www.ers.usda.gov/data-products/cost-estimates-of-foodborne-illnesses/>
179. Ushanov, L., Lasareishvili, B., Janashia, I., & Zautner, A. E. (2020). Application of *Campylobacter jejuni* Phages: Challenges and Perspectives. *Animals*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ani10020279>
180. van Houte, S., Buckling, A., & Westra, E. R. (2016). Evolutionary Ecology of Prokaryotic Immune Mechanisms. *Microbiology and Molecular*

- Biology Reviews: MMBR*, 80(3), 745–763.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00011-16>
181. van Nassau, T. J., Lenz, C. A., Scherzinger, A. S., & Vogel, R. F. (2017). Combination of endolysins and high pressure to inactivate *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 68, 81–88.
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.005>
182. Vaz, C. S. L., Voss-Rech, D., Alves, L., Coldebella, A., Brentano, L., & Trevisol, I. M. (2020). Effect of time of therapy with wild-type lytic bacteriophages on the reduction of *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens. *Veterinary Microbiology*, 240, 108527.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108527>
183. Vikram, A., Woolston, J., & Sulakvelidze, A. (2021). Phage Biocontrol Applications in Food Production and Processing. *Current Issues in Molecular Biology*, 40(1), Article 1. <https://doi.org/10.21775/cimb.040.267>
184. Villalpando-Aguilar, J. L., Matos-Pech, G., López-Rosas, I., Castelán-Sánchez, H. G., & Alatorre-Cobos, F. (2022). Phage Therapy for Crops: Concepts, Experimental and Bioinformatics Approaches to Direct Its Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 325.
<https://doi.org/10.3390/ijms24010325>
185. Wagenaar, J. A., Van Bergen, M. A. P., Mueller, M. A., Wassenaar, T. M., & Carlton, R. M. (2005). Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. *Veterinary Microbiology*, 109(3–4), 275–283.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.06.002>
186. Wall, S. K., Zhang, J., Rostagno, M. H., & Ebner, P. D. (2010). Phage therapy to reduce preprocessing *Salmonella* infections in market-weight swine. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 48–53.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00785-09>
187. Wang, X., Wei, Z., Yang, K., Wang, J., Jousset, A., Xu, Y., Shen, Q., & Friman, V.-P. (2019). Phage combination therapies for bacterial wilt disease in

- tomato. *Nature Biotechnology*, 37(12), Article 12.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0328-3>
188. Wei, C., Liu, J., Maina, A. N., Mwaura, F. B., Yu, J., Yan, C., Zhang, R., & Wei, H. (2017). Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt. *Virologica Sinica*, 32(6), 476–484.
<https://doi.org/10.1007/s12250-017-3987-6>
189. Wong, C. W. Y., Delaquis, P., Goodridge, L., Lévesque, R. C., Fong, K., & Wang, S. (2020). Inactivation of *Salmonella enterica* on post-harvest cantaloupe and lettuce by a lytic bacteriophage cocktail. *Current Research in Food Science*, 2, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2019.11.004>
190. Xu, Y., Luo, Q., & Zhou, M. (2013). Identification and Characterization of Integron-Mediated Antibiotic Resistance in the Phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *PLOS ONE*, 8(2), e55962.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055962>
191. Yan, W., Banerjee, P., Liu, Y., Mi, Z., Bai, C., Hu, H., To, K. K. W., Duong, H. T. T., & Leung, S. S. Y. (2021). Development of thermosensitive hydrogel wound dressing containing *Acinetobacter baumannii* phage against wound infections. *International Journal of Pharmaceutics*, 602, 120508.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120508>
192. Yeh, Y., Purushothaman, P., Gupta, N., Ragnone, M., Verma, S. C., & de Mello, A. S. (2017). Bacteriophage application on red meats and poultry: Effects on *Salmonella* population in final ground products. *Meat Science*, 127, 30–34.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.01.001>
193. Yost, D. G., Tsourkas, P., & Amy, P. S. (2016). Experimental bacteriophage treatment of honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood Disease. *Bacteriophage*, 6(1), e1122698.
<https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1122698>
194. Zaccardelli, M., Saccardi, A., Gambin, E., & Mazzucchi, U. (1992). *Xanthomonas campestris* pv. *Pruni* bacteriophages on peach trees and their

- potential use for biological control. *Phytopathologia Mediterranea*, 31(3), 133–140.
195. Żaczek, M., Weber-Dąbrowska, B., & Górski, A. (2020). Phages as a Cohesive Prophylactic and Therapeutic Approach in Aquaculture Systems. *Antibiotics*, 9(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090564>
196. Żaczek-Moczydłowska, M. A., Young, G. K., Trudgett, J., Fleming, C. C., Campbell, K., & O'Hanlon, R. (2020). Genomic Characterization, Formulation and Efficacy in Planta of a Siphoviridae and Podoviridae Protection Cocktail against the Bacterial Plant Pathogens *Pectobacterium* spp. *Viruses*, 12(2), 150. <https://doi.org/10.3390/v12020150>
197. Żaczek-Moczydłowska, M. A., Young, G. K., Trudgett, J., Plahe, C., Fleming, C. C., Campbell, K., & Hanlon, R. O. (2020). Phage cocktail containing Podoviridae and Myoviridae bacteriophages inhibits the growth of *Pectobacterium* spp. Under in vitro and in vivo conditions. *PLOS ONE*, 15(4), e0230842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230842>
198. Zampara, A., Sørensen, M. C. H., Elsser-Gravesen, A., & Brøndsted, L. (2017). Significance of phage-host interactions for biocontrol of *Campylobacter jejuni* in food. *Food Control*, 73, 1169–1175. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.033>
199. Zhang, Y., Peng, X., Zhang, H., Watts, A. B., & Ghosh, D. (2018). Manufacturing and ambient stability of shelf freeze dried bacteriophage powder formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 542(1–2), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.02.023>
200. Zhou, C., Zhu, M., Wang, Y., Yang, Z., Ye, M., Wu, L., Bao, H., Pang, M., Zhou, Y., Wang, R., Sun, L., Wang, H., Zheng, C., & Zhang, H. (2020). Broad host range phage vB-LmoM-SH3-3 reduces the risk of *Listeria* contamination in two types of ready-to-eat food. *Food Control*, 108, 106830. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106830>

- **Інтестіфаг®**



Препарат містить бактеріофаги, які знищують патогенні та умовно-патогенні бактерії в кишечнику. Препарат містить бактеріофаги, які специфічно вражають такі бактерії як:

- *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*

- **Піофаг®**



Препарат містить бактеріофаги, які специфічно знищують таких збудників гнійно-запальних і кишкових захворювань як:

- Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*

Наукове видання

**Харіна А.В., Корнієнко Н.О., Понятовський В.А.,
Пожилов І.М., Широбоков В.П., Андрійчук О.М.,
Будзанівська І.Г., Снігур Г.О., Шевченко О.В.**

БАКТЕРІОФАГИ: ТЕОРІЯ І ПРАКТИКА

Монографія

Видавець ФОП Ямчинський О.В.

03150, Київ, вул. Васильківська, 32

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру
суб'єкта видавничої справи ДК № 6554 від 26.12.2018 р.

Формат 60×84/16. Наклад 100 пр. Ум. друк. арк. 18,5. Зам. № 126.

Виготовлювач ТОВ «ЦП «КОМПРИНТ»

03150, Київ, вул. Васильківська, 32

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру
суб'єкта видавничої справи ДК № 4131 від 04.08.2011 р.