



Kandidaatintutkielma

Bakteriofagit bakteeri-infektioiden hoidossa

Salla Hyypä

Sisällysluettelo

Käytetyt lyhenteet

Sisällys

I KIRJALLISUUSTUTKIELMA

1. Johdanto.....	4
2. Bakteriofagit.....	4
2.1. Faagi-bakteeri-suhde	7
2.2. Faagien tuotto	9
3. Faagiterapia	11
3.1. Faagiterapian juuret, unohdus ja paluu.....	11
3.2. Faagiterapian synergia antibioottien kanssa	12
3.3. Biofilmit	13
3.4. Endolysiinit.....	13
3.5. Personoitu faagiterapia	14
3.6. Intraselulaariset patogeenit.....	15
3.7. Vahvuuksia	15
3.8. Haasteita	16
3.9. Faagien geenimuuntelu.....	18
4. Tulevaisuudennäkymät.....	21
5. Kirjallisuusviitteet	23

Käytetyt lyhenteet

Abi	”abortive infection”
AHL	asyyli homoseriini laktoni
CRISPR	“clustered regularly interspaced short palindromic repeats”
crRNA	CRISPR RNA
DNA	deoksiribonukleiinihappo
LES	”Liverpool epidemic strain” - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakteerikanta
MGE	liikkuva geneettinen elementti; “mobile genetic element”
MRSA	metisilliinille resistentti <i>Staphylococcus aureus</i>
PAI	patogeeninen saareke; ”pathogenicity island”
PEG	polyetylenei glykoli
R-M	”restriction modification”
RNA	ribonukleiinihappo

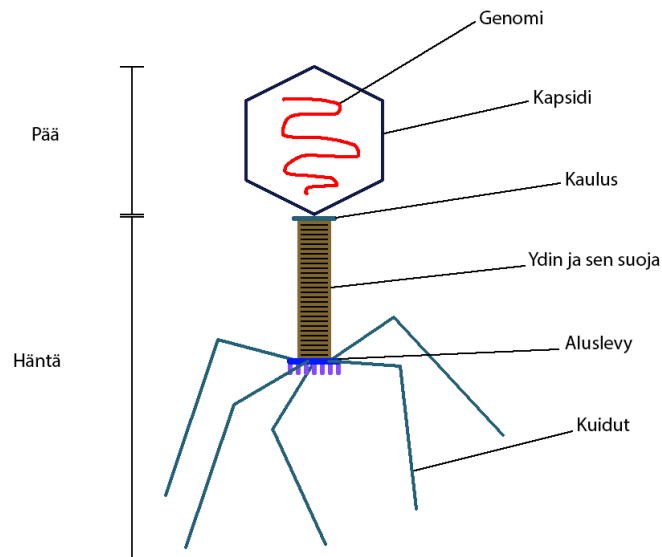
1. Johdanto

Uusia keinoja bakteeri-infektioiden hoitamiseen etsitään ahkerasti, sillä antibioottiresistenttien bakteerien aiheuttamien vaikeasti hoidettavien infektioiden määrä lisääntyy jatkuvasti. Yksi näistä keinoista ovat toisinaan uutisotsikoissakin esiintyvät bakteriofagit eli faagit. Faageissa on potentiaalia käytettäväksi sekä antibiootteja täydentävänä että korvaavana hoitomenetelmänä. Tässä tutkielmassa tarkastellaan bakteriofagien käyttöä bakteeri-infektioiden hoidossa, erityisesti faagiterapian muodossa.

2. Bakteriofagit

Bakteriofagit eli faagit tai fagit ovat pieniä viruksia, jotka kykenevät lisääntymään vain bakteerisoluisissa. Suurin osa tunnetuista faageista on bakteereita tartuttavia, mutta mukana on myös arkkeja tartuttavia faageja. Yleisin faagityyppi on hännällinen, mutta faagit voivat olla myös ikosahedronisia, filamenttisia tai pleomorfisia. Ryhmittely voidaan tehdä morfologian lisäksi myös faagin genomin, isäntäsolun, elinympäristön tai elämänsyklin perusteella (Wittebole ym. 2014).

Suurin osa tunnetuista faageista on hännällisiä. Hännällisen faagin rakenne jaetaan pää-osaan ja häntä-osaan. Pää-osaan kuuluu proteiineista koostuva kapsidi, jonka sisällä on DNA:sta tai RNA:sta koostuva genomi. Suurin osa faageista on kuitenkin DNA viruksia. Häntä-osaan kuuluvat kaulus, ydin, suoja, aluslevy ja hännän kuidut. Faageilla voi olla myös erilaisia ulokkeita päässään, kauluksessaan ja hännässään (Weinbauer 2004, Solunetti 2006). Hännällisen faagin rakenne on esitetty kuvassa 1 (Kuva 1).

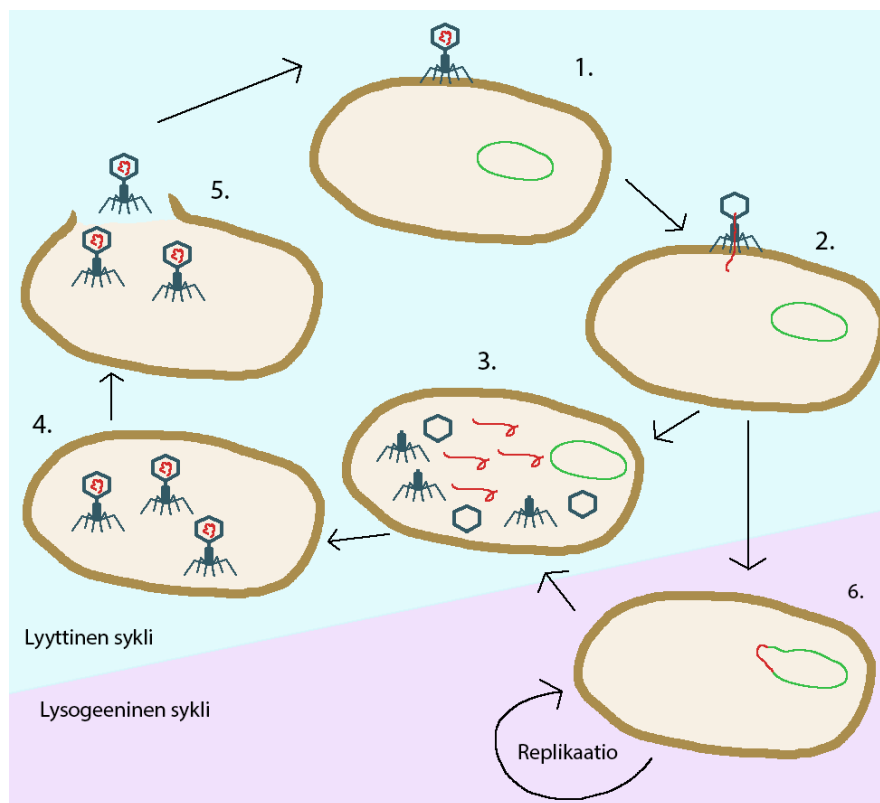


Kuva 1. Hännällisen bakteriofagin rakenne.

Faagit ovat maapallon kaikkein runsaimmin esiintyvä organismi. Vesiympäristössä faagien määrä on n. $10^4 - 10^8$ kappaletta millilitrassa (Weinbauer 2004). Yksittäisten faagipartikkeleiden kokonaismäärän maapallolla on arvioitu olevan 10^{31} kappaleen luokkaa (Comeau ym. 2008). Faageja on voitu eristää kaikista ympäristön lähteistä, joissa esiintyy bakteereita (Keen 2015). Faageja löytyy siis myös elimistöstä, ja ne ovat tärkeä osa ihmisen mikrobiomia (Manrique ym. 2017). Altistumme niille joka päivä mm. hengittäessämme ja syödessämme.

Faagin elinkaari voi olla lyyttinen, temperaatti eli lysogeeninen, pseudo-lysogeeninen tai kroonista infektiota aiheuttava. Lyyttiset faagit valtaavat bakteerin metabolian, ja tuottavat sen avulla itsestään kopioita, jotka lopuksi vapautetaan hajottamalla bakteeri lyyttisesti sisältä päin. Temperaatin faagin genomi yhdistetään bakteerin genomiin. Faagin genomi pysyy siellä inaktiivisena ja replikoituu isäntänsä mukana, kunnes se tietyn ärsykkeen seurauksena aktivoituu ja ryhtyy tuottamaan uusia faageja lyyttisen syklin tavoin. Siirtymisen lyyttiseen sykliin voi aktivoida esimerkiksi heikentynyt ympäristön ravinnetilanne, tai bakteeri-isännän DNA:n vaurioituminen. Faagi ikään kuin hylkää isäntänsä, kun isännän elinkelpoisuus laskee. Pseudo-lysogeenisessä infektiossa faagin genomi ei integroidu bakteerin genomiin, eikä myöskään aloita uusien faagien tuottoa, vaan genomi vain jää bakteerin sytosoliin odottamaan. Faagi ei bakteerin replikaation seurauksena mene kuin toiseen tytärsoluista, eli infektoitujen bakteerien määrä ei ajan myötä kasva. Uusien faagien tuoton voi indusoida elinympäristön heikkeneminen, kuten esimerkiksi suolapitoisuuden lasku. Kroonista infektiota aiheuttavat faagit eivät hajota isäntäbakteeria, vaan tuotetut uudet faagit vapautuvat kuroutumalla tai puristautumalla ulos. Faagiterapiassa keskitytään pääasiassa lyyttisiin faageihin (Weinbauer 2004, Wittebole ym. 2014).

Lyyttisten faagien replikaatiosykli (Kuva 2) alkaa virionin tunnistamisella ja kiinnittymällä spesifisesti reseptoriin bakteerin pinnalla. Tunnistus ja kiinnittyminen tapahtuvat hännän kuitujen avulla. Reseptorina voivat toimia monet erilaiset molekyylit, kuten esimerkiksi erilaiset kalvoproteiinit, sekä bakteerin pinnan polysakkaridit (Weinbauer 2004, Rakhuba ym. 2010). Faagi tekee bakteerin soluseinään reiän, minkä jälkeen faagin genomi voidaan injektoida reiästä bakteeriin. Sytosolissa tapahtuu genomien replikaatio ja geenien ekspressio. Geenituotteista ja genomien kopioista kootaan uusia kokonaisia faageja, jotka vapautuvat bakteerisolun lyysin yhteydessä ympäröivään tilaan. Hännällisillä faageilla lyysiin kuuluvat endolysiinit, jotka hajottavat soluseinän mureiini-osia, sekä holiinit, jotka mahdollistavat endolysiinien toiminnan hajottamalla bakteerin solukalvoa (Weinbauer 2004).



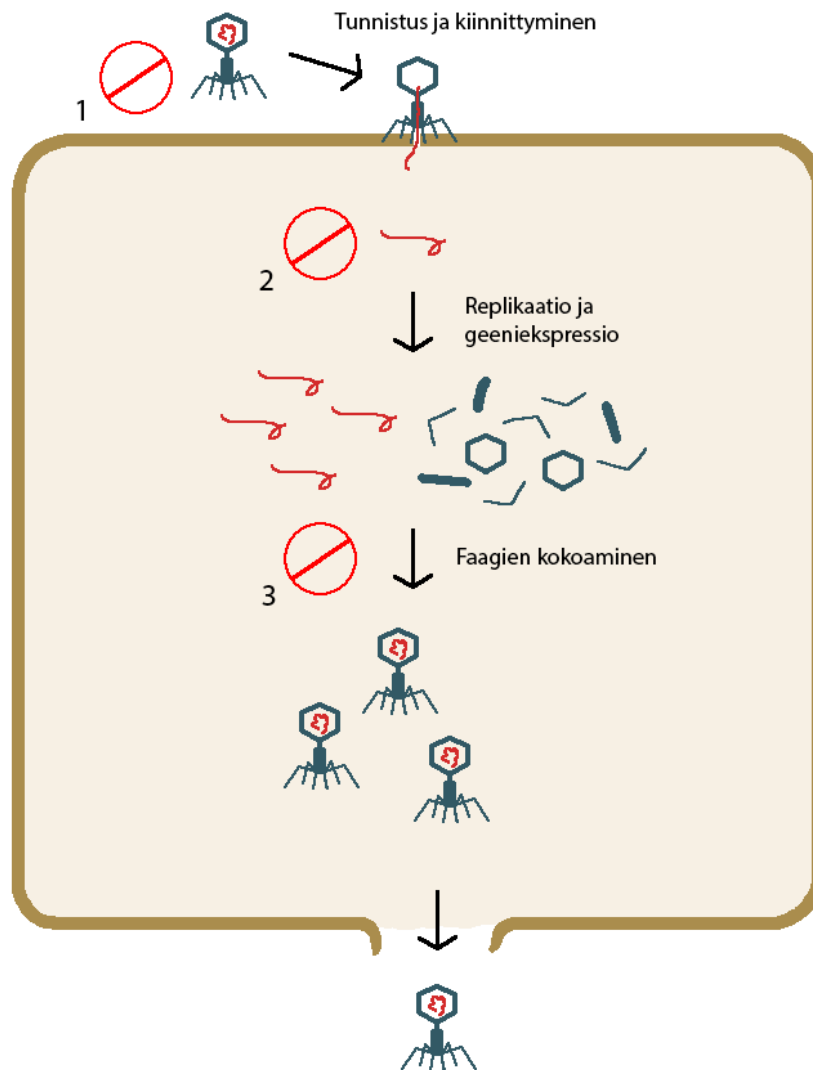
Kuva 2. Lyyttinen ja lysogeeninen replikaatiosykli. 1. Faagi tunnistaa bakteerin ja kiinnittyy sen pintaan. 2. Faagi tekee reiän bakteerin soluseinään, ja faagin genomi injektoidaan reiästä bakteerin sisään. 3. Genomi replikoituu ja sen mukaan tuotetaan faagin proteiineja. 4. Faagien proteiinit virioneiksi, joihin myös genomit pakataan. 5. Bakteeri hajotetaan sisältä käsin holiinien ja endolysiinien avulla, jolloin uudet faagit vapautuvat ja voivat infektoida uusia bakteerisoluja. 6. Lysogeenisessä syklissä faagin genomi integroituu bakteerin genomiin, ja pysyy siellä inaktiivisena. Faagin genomi replikoituu bakteerin genomien kanssa bakteerin jakautuessa, ja leviää näin piilevänä uusiin bakteereihin. Ärsyksen seurauksena faagin genomi aktivoituu ja alkaa tuottamaan lyyttisen syklin tavoin uusia faageja. Lysogeeninen sykli jatkuu tästä eteenpäin samoin kuin lyyttisessä syklissä.

2.1. Faagi-bakteeri-suhde

Bakteerien ja bakteriofagien välillä on menossa jatkuva evoluutiokilpailu. Bakteerit yrittävät parantaa immunitettiaan faageja vastaan, ja faagit puolestaan pyrkivät pääsemään bakteerin immunitetin ohi. Bakteri voi esimerkiksi estää faagin tarttumisen muuttamalla tai piilottamalla faagin käyttämän kalvoreseptorin. Sisälle päässyt faagin genomi voidaan hajottaa R-M systeemin, eli restriktio endonukleaasin ja metyyli transferaasin yhteistyöllä. Metyyli transferaasi metyloi bakteerin oman DNA:n, ja endonukleaasi hajottaa metyloimatonta, faageista peräisin olevaa DNA:ta pieniksi palasiksi. Tätä systeemiä vastaan faagin genomista on voinut pistemutaation seurauksena poistua endonukleaasin tunnustuskohta (Shabbir ym. 2016).

Joillakin bakteereilla on suoja mekanismina ”Abortive infection” (Abi) -systeemiksi kutsuttu menetelmä. Siinä infektion seurauksena bakteri etenee apoptoosiin, jolloin faagi ei voi tuottaa itsestään kopioita, vaan sen geenilinja katkeaa bakteerin mukana, jolloin mahdolliset muut ympäristön bakteerit säilyvät infektoitumattomina (Shabbir ym. 2016).

Uuden virionin muodostumista voivat häiritä bakteerin genomien erityiset faagi-indusoituvat kromosomaaliset saarekkeet. Saareke voi aktivoitua faagi-infektion aikana, jolloin se itse alkaa replikoitumaan. Saareke siis kilpailee resursseista tunkeutuja-faagin kanssa, ja saarekkeesta replikoitu DNA voidaan pakata faagin DNA:n sijaan kapsidiin. Se voi myös ohjata tunkeutuja-faagin kapsidin rakennusta tuottamaan pienempiä kapsideja, jolloin faagi itse ei enää mahdu sinne, vaan kapsidiin pakataankin saarekkeen DNA:ta. (Shabbir ym. 2016). Bakteerien suoja mekanismeja on tiivistetty kuvassa 3 (Kuva 3).



Kuva 3. Faagin replikaatiosyklin vaihteita, joihin bakteerin synnynnäinen puolustusmekanismi voi iskeä. Kohdat osoitettu kieltomerkeillä. 1. Faagin tunnistus ja kiinnittyminen estetään muuttamalla tai piilottamalla bakteerin reseptori. 2. Sisään päässyt faagin genomi hajotetaan. 3. Faagien kokoaminen ja genomien pakkaus estetään.

“Clustered regularly interspaced short palindromic repeats” (CRISPR) lokuksen ja Cas-proteiinien yhteistyö on ainoa tunnettu hankitun immunitetin systeemi prokaryooteilla. CRISPR lokus voi olla kromosomaalisessa DNA:ssa tai plasmidissa, ja sitä esiintyy bakteerien lisäksi myös arkeilla. CRISPR-Cas systeemin avulla bakteeri voi puolustautua faagilajia vastaan, jolle se on jo aiemmin altistunut. Bakteerin genomien CRISPR lokus sisältää lyhyitä toistojaksoja, joiden väleissä on mm. faageista saatuja sekvenssejä. Cas proteiinit puolestaan leikkaavat näistä toistojaksoista tuotetun crRNA:n ohjaamana infektoivan faagin DNA:ta (tai RNA:ta) (Hale ym. 2009, Rath ym. 2015, Shabbir ym. 2016).

CRISPR-Cas systeemin toimintamekanismi on seuraavanlainen: Faagi-infektion jälkeen faagin DNA:sta otetaan palanen, "spacer", joka liitetään bakteerin CRISPR lokukseen kahden toistojakson väliin. CRISPR lokus ekspressoituu pre-crRNA:ksi, jonka Cas-proteiini leikkaa erillisiksi crRNA-paloiksi, jotka jokainen sisältävät yhden "spacer" alueen. Cas-proteiinin ja crRNA:n muodostama kompleksi on valmis iskuryhmä faagia vastaan. Jos saman faagilajin edustaja injektioi genominsa bakteeriin, crRNA voi sen komplementaarisenä juosteena sitoutua faagin genomiin, minkä jälkeen Cas-proteiini leikkaa genomia poikki (Rath ym. 2015, Shabbir ym. 2016).

Faageilla on keino kiertää tämäkin bakteerien suojausmekanismi. *P. aeruginosa* bakteerin faagit koodaavat proteiineja, jotka pystyvät inhiboimaan bakteerin CRISPR-Cas systeemiä. Näitä proteiineja koodaavia geenejä kutsutaan anti-CRISPR geeneiksi (Bondy-Denomy ym. 2013).

Faagien aiheuttamalla selektiivinen paine muuttaa ekosysteemin bakteeripopulaatioiden määrää ja laatua, samalla kun bakteerien kehittämät suojausmekanismit muuttavat faagien määrää ja laatua. Faagien ja bakteerien välillä vallitsee peto-saalis-suhteen dynaaminen tasapaino (Shabbir ym. 2016).

2.2. Faagien tuotto

Faageja esiintyy kaikissa niissä ympäristöissä, missä bakteereitakin esiintyy. Uusia faageja voidaan siis etsiä ja eristää lähes kaikista mahdollisista olosuhteista. Faagit ovat levittäytyneet ympäristöön epätasaisesti. Sairaaloiden välitön läheisyys on tärkein lähde faageille, jotka tehoavat ihmisissä esiintyviin bakteereihin. Muita yleisiä lähteitä ovat mm. jäte- ja jokivesi, sekä karjan uloste. Paras lähde kaikkein tehokkaimmille terapeuttisille faageille on infektiosta parantuneista potilaista saatava materiaali (Weber-Dąbrowska ym. 2016).

Faagit kasvavat parhaiten isännän ollessa optimaalisen kasvun vaiheessa ja hyvässä ravitsemustilassa. Jotkin faagit voivat kyllä lisääntyä myös huonossa ravitsemustilassa olevassa ja jopa vastikään kuolleessa bakteerisolussa (Anderson 1948, Weinbauer 2004). Lisääntyminen laboratorio-olosuhteissa ei useinkaan kuvasta faagin lisääntymiskykyä *in vivo* (Weld ym. 2004). Kahden hyvin samankaltaisesti laboratoriossa tehokkaan faagin ominaisuudet terapeuttisessa käytössä voivat erota suuresti. Siksi olisikin tärkeää valita terapeuttiseen käyttöön vain ne jotka, selviävät parhaiten *in vitro*, ja tutkia niiden todennäköistä tehokkuutta *in vivo* mahdollisimman samankaltaisessa ympäristössä, kuin missä niitä hoidossa tulisi käyttää (Weber-Dąbrowska ym. 2016).

Eristettyä uutta faagia tutkittaessa selvitetään mm. faagin tyyppi, spesifisyys reseptoriin, morfologia, lyyttinen spektri, isäntävalikoima, transduktio taipumus, sekä stabiilisuus varastoinnin aikana. Faagin spesifisyys reseptoriin on hyvin tärkeä ominaisuus terapian kannalta, minkä vuoksi sen tutkiminen ennen faagin käyttöönottoa on hyvin tärkeää. Karakterisointi tehdään yleensä kuoppalevyllä, koska se on yksinkertaista, nopeaa ja se antaa yleiskuvan bakteerin herkkyydestä tiettyä faagia kohtaan. Terapiaan tarkoitettun faagin genomi tulisi aina sekvensoida turvallisuussyistä. Terapiakäyttöön soveltuvuuden toteamisen jälkeen, faagituotteen steriiliys, puhtaus ja toksisuus on vielä tarkistettava ennen kuin sen käyttö faagihoidossa on mahdollista (Weber-Dąbrowska ym. 2016).

Faagituotteiden valmistus luonnosta eristetyistä faageista ei kuitenkaan aina onnistu. Faagipopulaatiot ovat eri paikoissa erilaisia, tai faagiterapialle voi olla hyvin akuutti tarve. Etukäteen valmistetuille faagituotteille tulisi siis olla faagin stabiiliisuuden ja aktiivisuuden säilyttävä varastointikeino. Samaan faagiperheeseen kuuluvien faagien ominaisuudet ympäristön olosuhteiden sietämiseen voivat olla hyvin erilaiset. Edes läheinen rakenteellinen samankaltaisuus ei välttämättä tarkoita, että ne säilyvät samanlaisissa olosuhteissa (Jończyk ym. 2011). Lämpötila on merkittävä tekijä bakteriofaagin selviämisen kannalta. Faagin optimilämpötilaa alhaisemmassa lämpötilassa sen infektointikyky heikkenee. Toiset faagilajit sietävät hyvinkin korkeita lämpötiloja ja selviävät kylmissäkin olosuhteissa, kun taas toiset ovat herkkiä lämpötilanmuutoksille. +4°C on suositeltu lämpötila lyhyeen säilytykseen, mutta jotkut sietävät sitä hyvin pidempiäkin aikoja. Joillekin faageille -80°C on parempi säilytyslämpötila. -20°C:ssa säilytystä ei suositella mahdollisten jääkiteiden takia. Kiteiden muodostuminen pakkasessa voidaan ehkäistä glyserolin avulla. Yksi mahdollisuus on myös pakastaa faageilla infektoituja soluja ja säilöä ne (Jończyk ym. 2011, Weber-Dąbrowska ym. 2016).

Toinen tärkeä ympäristötekijä faagin säilyvyyden kannalta on happamuus. Faagien optimi pH sekä kyky sietää eri happamuuksia vaihtelevat paljon eri lajien välillä. Useimmille optimi pH on neutraalin tienoilla, tai hieman happamassa. Toiset faagit inaktivoituvat täysin jo pH 5:n kohdalla, kun taas toiset selviävät jopa pH 2:ssa. Lämpötilalla on vaikutusta epäoptimaalisen pH:n vaikutuksiin faageissa. Faagit ovat herkempiä korkeille lämpötiloille kuin matalille lämpötiloille (Jończyk ym. 2011).

3. Faagiterapia

Faagiterapiaa on bakteeri-infektioiden hoito ja ehkäisy bakteriofagien avulla (Viertel ym. 2014). Faagiterapiassa käytettävät valmisteet voivat joko sisältää vain yhtä faagia, tai olla kahta tai useampaa eri faagia sisältäviä faagisekoituksia. Faagiterapian kohteena ovat erityisesti antibioottiresistetit bakteerit, sillä joitakin resistenttejä bakteerikantoja vastaan on saatavilla vain vähän tehokkaita antibiootteja. Faageja on käytetty onnistuneesti ihmisillä useiden erilaisten bakteeri-infektioiden hoidossa (Weber-Dąbrowska ym. 2016). Lukuisat tutkimukset ja hoitokokeilut 1921 luvulta lähtien osoittavat faagien kykenevän tappamaan tehokkaasti myös sairaalaympäristössä esiintyviä ja infektoita aiheuttavia metisilliinille resistenttejä *Staphylococcus aureus* (MRSA) kantoja (Kazmierczak ym. 2014).

Faageja voidaan viedä kehoon mm. pistoksena, suihkeena tai tablettina (Cisek ym. 2017). Vaikka faagit eivät voi replikoitua eukaryoottisoluissa, ne pääsevät hyvin kudosten läpi joka puolelle elimistöä. Pitkäaikaiset havainnot osoittavat faageja esiintyvän mm. veressä, imusuonissa, maksassa, munuaisissa ja aivoissa (Barr 2017). Tutkimuksessa (Nguyen ym. 2017) tarkasteltiin, kun epiteelisolut ottivat transsytoosin avulla sisäänsä faageja, kuljettivat ne lävitsensä ja vapauttivat toiselta puoleltaan faagien säilyttäessä aktiivisuutensa kuljetuksen ajan. Faagit pääsivät myös sytosoliin. Tulosten perusteella pääteltiin, että ihmiskeho absorboi jatkuvasti faageja suolistosta ja kuljettaa niitä ympäri kehoa.

3.1. Faagiterapian juuret, unohdus ja paluu

Faagit löydettiin ensimmäisen kerran vuonna 1915, eli jo yli sata vuotta sitten. Tuolloin ei vielä oltu löydetty ensimmäisiä antibioottejakaan. Löydön tekivät itsenäisesti Frederick Twort ja kaksi vuotta myöhemmin myös Félix d'Herelle. Jälkimmäistä pidetään faagien ja faagiterapian keksijänä (Wittebole ym. 2014, Bárdy ym. 2016).

Aluksi faagit olivat hyvin kiistanalainen aihe sekä kansalaisten mielessä, että lääketieteellisessä yhteisössä. Silloiset tutkimukset olivat huonosti toistettavia ja tuottivat vaihtelevia tuloksia, koska faagien biologiaa ei tuolloin vielä tunnettu. Tuolloin kun ei vielä oltu ratkaistu DNA:n rakennettakaan. Tästä syystä faagien terapeuttisen merkityksen pidettiin epäuskottavana ja epäluotettavana. Ensimmäisten antibioottien löytäminen vähensi entisestään kiinnostusta faagiterapiaa kohtaan länsimaissa, missä sen tutkiminen ja käyttö lopulta lopetettiin. Vain Puolassa, sekä joillakin Intian ja entisen USSR:n alueilla, kuten Georgiassa, faagiterapian

tutkiminen ja hyödyntäminen hoitomuotona jäivät aktiivisiksi (Wittebole ym. 2014, Bárdy ym. 2016).

Englanninkielinen kirjallisuus löysi faagiterapian uudestaan 1980-luvulla. Ensimmäiset ihmiskokeet aloitettiin 2000-luvulla, ja ensimmäinen faasin I satunnaistettu koe julkaistiin Yhdysvalloissa vuonna 2009. Kyseisessä tutkimuksessa (Rhoads ym. 2009) selvitettiin faagiterapian turvallisuutta. Tulosten perusteella faagien käytöllä ei havaittu mitään haittavaikutuksia (Wittebole ym. 2014). Molekyylibiologian ja geenitekniikan kehittymisen myötä faagien tutkiminen ja hyödyntäminen ovat nyt huomattavasti helpompia tehtäviä kuin sata vuotta sitten. Georgiassa avattiin vuonna 2005 Euroopan Unionin ensimmäinen faagiterapiaa käyttävä yksikkö (Weber-Dąbrowska ym. 2016).

Nykyään markkinoilla on useita faagiterapiaan tarkoitettuja faagituotteita sekä länsimaissa, että niiden ulkopuolella. Eniten varsinaista faagiterapiaa tarjoavia klinikoita vaikuttaisi olevan Georgiassa, mutta tutkimus ja tuotekehitys -vaiheessa on useita yrityksiä ainakin Euroopassa ja Yhdysvalloissa (Bárdy ym. 2016, Abedon 2017).

3.2. Faagiterapian synergia antibioottien kanssa

Tuoreessa tutkimuksessa (Oechslin ym. 2017) selvitettiin faagien ja siprofloksasiini antibiootin yhteisvaikutusta *Pseudomonas aeruginosa* infektion hoidossa rottamalla käyttäen. Winstar naarasrotilla mallinnettiin sydämen sisäkalvon tulehdus eli endokardiitti *P. aeruginosa* CHA-kantaa käyttäen. Kyseinen bakteerikanta on kystiseen fibroosiin liittyvä erittäin virulentti *P. aeruginosa* isolaatti (Sall ym. 2014). Faagiterapian ja antibioottien tehoa selvitettiin myös yksin käytettynä. Yhteiskäytössä faagit ja antibiootti lisättiin kerta-annoksena, kuten myös pelkkää antibioottia käytettäessä. Pelkkää faagia sisältävä hoito lisättiin toisille rotille nopeana kerta-annoksena, ja toisille jatkuvana syöttönä rotan yläonttolaskimoon. Pelkästään faageja tai antibioottia käytettäessä hoidon tehokkuus oli jotakuinkin yhtä suuri, ja bakteerien määrä laski. Kumpikaan ei kuitenkaan yksinään poistanut infektiota vielä 6 h kuluessa. Faagiterapian ja antibiootin yhteiskäyttö puolestaan poisti vegetatiiviset bakteerit 7/11 rotasta 6 h kuluessa hoidon aloituksesta, ja oli siis hyvin synerginen (Oechslin ym. 2017).

3.3. Biofilmit

Polysakkarideista, proteiineista ja lipideistä koostuvan biofilmin muodostaminen on yksi bakteerien selviytymisstrategioista. Se suojaa bakteereita ulkoisilta haitoilta, kuten lääkkeitä ja desinfiointiaineilta. Faagit voivat infektoida myös biofilmin suojissa olevia bakteereita. Biofilmissä elävät bakteerit parantavat faagien lisääntymistehokkuutta, sillä runsaasti lähekkäin eläviä bakteereja ovat faageille helppo kohde. Useilla faageilla on genomissaan biofilmiä hajottavien entsyymien geenejä (Harper ym. 2014, Bárdy ym. 2016).

Faagien biofilminhajotuskykyä on hyödynnetty *Pseudomonas aeruginosa* bakteerin aiheuttamiin komplikaatioihin mm. palovammapotilailla, ja potilailla, joilla on kystinen fibroosi (Pires ym. 2011). Faageille, joilla ei ennestään ole biofilmiä hajottavaa entsyymiä, sellainen voidaan lisätä. Collins (2007) työryhmineen lisäsi T7 faagiin *Actinobacillus actinomycetemcomitans* bakteerista peräisin oleva biofilmiä hajottavan entsyymin geeni *dspB*, joka koodaa dispersiini B polysakkaridi depolymeraasia. Käsittely geenimuunnellulla faagilla poisti biofilmin lähes kokonaan.

Faageilla voidaan myös ehkäistä biofilmien muodostumista. Tutkimuksessa (Pei & Lamas-Samanamud 2014) T7 faagiin lisättiin bakteerien välistä viestintää häiritsevän entsyymin geeni, AHL (asyyli homoseriini laktoni) laktonaasi *aiiA* geeni, jonka geenituote laktonaasi hajottaa asyyli homoseriini laktoneita, eli biofilmin muodostamisen tärkeitä viestimolekyylejä. Geenimuunnellun T7 faagin havaittiin tutkimuksessa ehkäisevän merkittävästi biofilmien muodostumista (Pei & Lamas-Samanamud 2014).

3.4. Endolysiinit

Faageista voidaan eristää niiden lyyttisiä entsyymejä, endolysiinejä, ja käyttää niitä bakteeri-infektoiden hoidossa. Endolysiinit ovat kokonaisia faageja helpommin karakterisoitavissa, mikä nostaa niiden kaupallisesti potentiaalia. Geenimuuntelun avulla voidaan tuottaa myös rekombinantteja endolysiinejä (Bárdy ym. 2016).

Kimeeristä endolysiiniä on testattu jo mm. silmän infektoihin *in vivo* (Singh ym. 2014). Tutkimuksessa käytetty *Staphylococcus aureus* kanta ei kehittänyt resistenssiä endolysiiniä vastaan kymmenenkään sukupolven jälkeen. Juuri tämä resistenssin muodostumisen epätodennäköisyys on tehnyt endolysiineistä mielenkiintoisen tutkimuskohteen (García ym. 2008).

3.5. Personoitu faagiterapia

Faagiterapiaa varten on mahdollista joko valmistaa etukäteen standardoituja faagisekoituksia ja säilöä ne myöhempää käyttöä varten, tai valmistaa vasta infektion ilmennyttyä uusi sekoitus juuri tiettyä bakteeria vastaan. Jälkimmäistä menetelmää kutsutaan personoiduksi faagiterapiaksi. Faagisekoitus voidaan koostaa etukäteen eristetyistä yksittäisistä faageista, tai vasta tarpeen tullessa ympäristöstä eritettävistä faageista (Mattila ym. 2015).

Acinetobacter baumannii infektion saanutta potilasta hoidettiin personoidulla faagiterapialla (Schooley ym. 2017). Kyseessä oli monille antibiooteille resistentti kanta, johon antibioottikuurit eivät tehonneet. Bakteeria vastaan valmistettiin personoitu faagisekoitus etukäteen eristettyjä faageja käyttäen. Potilas oli ennen faagiterapian alkua hyvin heikossa kunnossa ja vaipunut koomaan. Faagiterapian alkamisen jälkeen potilaan tila alkoi parantua. Hoidon aikana havaittiin, että bakteerikanta olisikin altis antibiootille minosykliini, ja neljäntenä päivänä faagiterapian alkamisesta aloitettiin myös minosykliinin käyttö. Potilas toipui lopulta täysin (Schooley ym. 2017).

Tutkimuksessa (Mattila ym. 2015) pyrittiin selvittämään, minkälaiset mahdollisuudet ja todennäköisyydet on eristää jätevedestä faageja haluttua bakteeria vastaan. Tutkimuksessa käytettiin yleisimpiä sairaalassa esiintyviä antibioottiresistenttejä bakteereita, jotka oli myös luokiteltu korkeaan uhkaluokitukseen Yhdysvalloissa vuonna 2013. Tulosten perusteella faagien eristyksen ja tuoton onnistuminen personalisoitua faagiterapiaa varten oli riippuvainen bakteerilajista. Lähes kaikista isolaatioista löytyi faageja *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Escherichia coli* ja *Klebsiella pneumoniae* -bakteerilajeja vastaan. Onnistumisprosentti *Enterococcus* ja *Acinetobacter baumannii* -bakteerilajeja vastaan oli 30%-40%. MRSA:ta vastaan ei löytynyt lainkaan faageja alkuperäisestä lähteestä. Sen kohdalla tutkijat päättivätkin kokeilla vielä muita lähteitä, kuten vesilukkoa ja karjatilaa, mutta sieltäkään ei löytynyt kuin yhtä *Staphylococcus aureus* -lajia (SA10) vastaan tehoavia faageja. Joillekin bakteerilajeille löytyi siis hyvin helposti spesifisiä faageja, mutta toisille, kuten MRSA:lle oli hyvin vaikea löytää hyvää faagia, vaikka niitä etsittiin useista eri lähteistä ja useina eri vuodenaikoina. Menetelmä ei siis sovi kaikille bakteereille. Tulosten johdosta olisikin tärkeää, että tiettyjä bakteereita, kuten MRSA vastaan olisi käytössä valmiita faagisekoituksia, mieluummin vielä suhteellisen laajalla isäntävalikoimalla (Mattila ym. 2015).

3.6. Intraselulaariset patogeenit

Burkholderia pseudomallei on gram-negatiivinen bakteeri, joka aiheuttaa melioidoosia eli valeräkätautia. Bakteerit ovat intraselulaarisia, minkä vuoksi niitä on vaikea hoitaa antibiooteilla. Tutkimuksessa (Guang-Han ym. 2016) tutkittiin faagien käyttömahdollisuuksia *B. pseudomallei* infektion hoidossa solukulttuurissa ja hiirillä. Solukulttuurissa faageja ennen bakteeri-infektiota saaneiden solujen selviytymisprosentti oli huomattavasti korkeampi kuin kontrollisolulla. Hiirillä faagihoido sai kolmasosan hiiristä selviämään infektiosta, riippumatta siitä, annettiinkö faageja ennen vai jälkeen infektiota. Kontrollihiiristä yksikään ei selvinnyt. Soluviljelyssä solujen selviytymisprosentti ryhmän, joka sai faageja vain ennen infektiota ja ryhmän, joka sai faageja sekä ennen että jälkeen infektiota, ei eronnut suuresti. Tästä tutkijat päättelivät, että *B. pseudomallei* infektiota vähentäisi faagien ottoa infektoituihin soluihin. DNA-siru-teknologialla tehty geenien ilmentymisanalyysi tuki ajatusta, koska siinä havaittiin endosytoosi- ja fagosytoosi-reittien komponenttien transkription vähentyneen *B. pseudomallei* infektoituissa soluissa (Guang-Han ym. 2016).

3.7. Vahvuuksia

Faagit ovat vain bakteereita tartuttava virusryhmä. Ne eivät replikoidu eläinsolulinjoissa, mistä syystä niillä ei ole juuri havaittu haittavaikutuksia (Wittebole ym. 2014). Faagit ovat tärkeä osa ihmisen mikrobiomia, minkä vuoksi ne ovat hyvin siedettyjä faagiterapiassa. Faagit myös lisääntyvät kehossa niille spesifisissä bakteereissa (Weber-Dąbrowska ym. 2016), jolloin kehossa muodostuu lisää ”lääkettä” hoidon aikana.

Faagien ja bakteerien ollessa jo pitkän aikaa dynaamisessa peto-saalis-suhteessa, bakteriofageille on kehittynyt monia erilaisia keinoja päästä bakteerien puolustusmekanismien, kuten immunitetin läpi. Faagiterapian kannalta on tärkeää, että faageilla on monia erilaisia ominaisuuksia bakteerien suojausmekanismien ohittamiseen (Shabbir ym. 2016).

Tilanteessa, jossa faagin käyttämän reseptorin on tärkeä osa bakteerin infektiokykyä tai yleistä elinkelpoisuutta, reseptorin poistamisella saavutettu faagiresistenssi voi olla bakteerille hyvinkin haitallinen. Faagiresistenttien bakteerien infektiokyky onkin usein heikentynyt (Capparelli ym. 2010). Heikentynyt infektiokyky voisi olla ihan tervetullut ominaisuus ihmisiä sairastuttavissa bakteereissa. Tällaisia heikennettyjä faagiresistenttejä bakteereita on kaavailtu myös käytettäväksi rokotteissa (Capparelli ym. 2010). Reseptorin ollessa jotakin tärkeää ravintoainetta

kuljettava kalvoreseptori, sen poistaminen voi heikentää bakteerin elinkelpoisuutta ja kilpailukykyä muihin bakteereihin verrattuna (Weinbauer 2004).

Faagit ovat aktiivisia sekä gram-positiivisia, että gram-negatiivisia bakteereita vastaan. Faagit ovat tyypillisesti hyvin spesifisiä kohteestaan, minkä vuoksi faagiterapia voidaan kohdistaa tarkasti tiettyä bakteerilajia tai kantaa vastaan. Näin voidaan jättää muut, terveyden kannalta hyödylliset bakteerit rauhaan. Kehon hyödyllisten bakteerikantojen säilymisen ansiosta voidaan ehkäistä myös sekundääristen patogeenien leviämistä kehossa hoidon seurauksena (Wittebole ym. 2014). Tästä esimerkkinä elimistön normaalin hiivakasvuston liikakasvu hiivatulehduksen puhjetessa, kun antibiootit ovat vähentäneet hyödyllisiä bakteerikantoja.

Taloudellisesta näkökulmasta faagiterapia vaikuttaisi olevan antibiootteja huokeampi vaihtoehto, ainakin MRSA-bakteereita vastaan, jolloin on käytettävä kaikkein vahvimpia ja kalleimpia antibiootteja (Miedzybrodzki ym. 2007).

3.8. Haasteita

Yksi faagiterapian haasteista on epävarmuus sen turvallisuudesta. Vaikka faagien genomit voidaan nykyään analysoida nopeasti, yksityiskohtainen ymmärrys geenituotteiden toimintamekanismeista ei ole lisääntynyt yhtä nopeasti. Kaikkia faagien geenituotteita ei vielä tunneta, ja vaikka geenin koodaama proteiini tunnettaisiin, sen tarkka toimintamekanismi ei välttämättä ole vielä selvillä. Näin ollen infektion mekanismia bakteerin sisällä voidaan kuvailla vasta yleisellä tasolla. Lisäksi toisinaan genomiltaan hyvin samankaltaiset faagit voivat toimia hyvin eri tavoin, millä voi olla merkittävä vaikutus hoidon turvallisuuteen ja tehokkuuteen (Krylov ym. 2015).

Faagisekoituksen lyyttisen aktiivisuuden tehostaminen tapahtuu tyypillisesti lisäämällä siihen luonnosta eristettyjä faageja, joita on kasvatettu faagiresistenttien bakteerien kanssa. Tällä menetelmällä on riskinä saada mukaan temperaatteja faageja, joita pidetään soveltumattomina faagiterapiaan, koska ne osallistuvat bakteerien patogeenisten saarekkeiden muodostumiseen (Krylov ym. 2015). Patogeeniset saarekkeet (PAI, "pathogenicity islands") ovat yksi bakteerien liikkuvien geneettisten elementtien (MGEs, "mobile genetic elements") alaryhmä. Patogeeniset saarekkeet sisältävät yhden tai useamman virulenssitekijän, ja ne ovat siis keskeinen tekijä bakteerin virulenssin kannalta. Tällainen saareke voi syntyä temperaatin faagin integroitua bakteerin genomiin. Hyvin mobiili saareke voi myös siirtyä bakteerista toiseen esimerkiksi plasmidina (Schmidt & Hensel 2004).

Transposoituvan temperaatin faagin integroituminen konjugoituvaa plasmidiin tekee siitä helposti bakteerista toiseen siirtyvän, jolloin se voi levitä nopeasti eri bakteeripopulaatioiden välillä kuljettaen mukanaan virulenssitekijöitä. Tästä voi seurata uuden, vaarallisen bakteerikannan kehittyminen (Krylov ym. 2015). Esimerkkinä tästä on "Liverpool epidemic strain":ksi (LES) nimetty *Pseudomonas aeruginosa* bakteerikanta. Kyseinen bakteerikanta on muita *P. aeruginosa* kantoja ärhäkämpi. LES genomista on löydetty viiden indusoituvan profaagin genomit, joita ei löydy muista kannoista. Profaagien geenien sekvenssejä muuntamalla bakteerien kasvun ja kestävyuden on havaittu laskevan (Winstanley ym. 2009, James ym. 2012). Kyseisten temperaattien faagien integroitumisen bakteerin genomiin ajatellaan siis kehittäneen bakteerikannasta voimakkaamman ja samalla ihmiselle vaarallisemman. Tämän vuoksi temperaattien faagien luonnollisten lyyttisten rinnakkaismuotojen käyttö terapiassa ei välttämättä ole turvallista (Krylov ym. 2015). Huolimaton faagien käyttö voi johtaa jopa uusien bakteerilajien kehittymiseen, jolloin ongelmaa ratkaistaessa saadaan aikaan uusi ongelma.

Varmin tapa kehittää turvallinen faagiterapia, on käyttää vain hyvin tutkittuja faageja. Pelkkä genomien tunteminen ei riitä, vaan faagien toimintamekanismeja tulisi verrata toisiinsa saman lajin faageihin (Krylov ym. 2015). Näin esimerkiksi temperaattit ”rinnakkaismuodot” kävisivät ilmi.

Immuunijärjestelmän suhtautuminen faageihin voi myös haitata faagiterapian onnistumista. Tutkimuksessa (Hodyra-Stefaniak ym. 2015) tarkasteltiin hiirimallilla bakteeri-infektion vaikutusta immuunijärjestelmän suhtautumiseen faageja kohtaan. Koejärjestely suoritettiin niin, että hiiressä aiheutettiin tulehdusreaktio bakteeriperäisillä ärsykkeillä ilman varsinaisia bakteereita, jotta faagien määrä ei kasvaisi bakteereissa kesken kokeen ja häiritsisi mittausta. Faagien määrää eri elimissä verrattiin kontrollihiireen, eli hiireen ilman tulehdusreaktiota, faagien määriin. Merkittävä ero havaittiin pernan faagikonsentraatiossa, jossa faagien määrä laski merkittävästi tulehdusreaktion seurauksena. Muissa elimissä eroa ei havaittu. Tulosten perusteella faagikonsentraatioon ja sitä kautta myös faagiterapian tehokkuuteen vaikuttaa immuunijärjestelmän aktiivisuus. Bakteerien aiheuttama tehostus siis lisää immuunijärjestelmän aktiivisuutta, jolloin faagien määrä vähenee. Tämä epätoivottu vaikutus voitaisiin torjua suunnittelemalla faagiannoksen määrä ja lisäyshetki (Hodyra-Stefaniak ym. 2015). Tutkimus siis osoitti aktivoituneen immuunijärjestelmän hajottavan paljon faageja, mutta on hyvä muistaa, että faagien määrä lisääntyy sopivien bakteerien läsnä ollessa.

Faagit ovat kehon mikrobiomin tärkeä ja runsaslukuinen osa (Manrique ym. 2017). Immuunijärjestelmän reaktio kehoon lisättyihin faageihin riippuu siitä, missä bakteeri-infektio on, ja

minne terapeuttiset faagit lisätään. Paikallisesti käytettynä faagien käytöllä ei ole havaittu sivuvaikutuksia (Wright ym. 2009). Myöskään suun kautta otettavien faagien ei ole havaittua aiheuttavan immunologisia komplikaatioita suurinakaan määrinä (Sarker ym. 2012). Infektion aikana herkistynyt immuunijärjestelmä vaikuttaisi kuitenkin aktiivisesti tuhoavan faageja elimistöstä (Hodyra-Stefaniak ym. 2015). Faagien lisäys verenkiertoon aiheuttaa faagien nopean poiston syöjäsolujen avulla myös ilman infektiota varsinkin, jos veressä ei ole faagien spesifisiä isäntäbakteereita, joissa ne voisivat lisääntyä (Cisek ym. 2017).

Kehon alkuperäisen mikrobiomin säilyvyyttä on tutkittu antamalla terveille aikuisille faageja juomaveden mukana. Faagien käytöstä ei havaittu haitallisia vaikutuksia keholle tai mikrobiomille (Bruttin & Brüssow 2005, Sarker ym. 2012). Rottamallilla tehdyssä tutkimuksessa (Tetz ym. 2017) faagikäsittelyn havaittiin muuttavan mikrobiomin koostumusta monimuotoisemmaksi. Tätä tosin pidetään yhtenä vuotavan suolen tuntomerkkinä ja suoliston tulehduksen ominaisuutena. Faagikäsittely voi siis lisätä suolen läpäisevyyttä, mikä voi suoliston tulehduksen kautta aiheuttaa erilaisia sairauksia. Artikkelissa mainittiin kroonisen tulehduksen yhteys mm. sydän- ja verisuonitauteihin sekä syöpään. Kyseessä oli ensimmäinen tutkimus, jossa tällainen yhteys on voitu osoittaa, joten jatkotutkimuksia asiaan liittyen kaivataan (Tetz ym. 2017).

Lyyttisten faagien käytön haasteena ovat myös gram-negatiivisten bakteerien lyysissä vapautuvat elimistölle haitalliset bakteerin soluseinän komponentit, endotoksiinit, jotka aiheuttavat tulehdusreaktioita. Samoja endotoksiineja vapautuu myös antibiootteja käytäessä. (Nobrega ym. 2015). Ratkaisuksi on esitetty mm. geenimuunneltujen faagien käyttöä, joiden lyysiin osallistuvan proteiinin geeni on korvattu bakteerille haitallisen endonukleaasin geenillä (Hagens ym. 2004). Faagi siis hajottaisi bakteerin genomin, mutta ei sen soluseinää, jolloin vapautuvien endotoksiinien määrä minimoitaisiin.

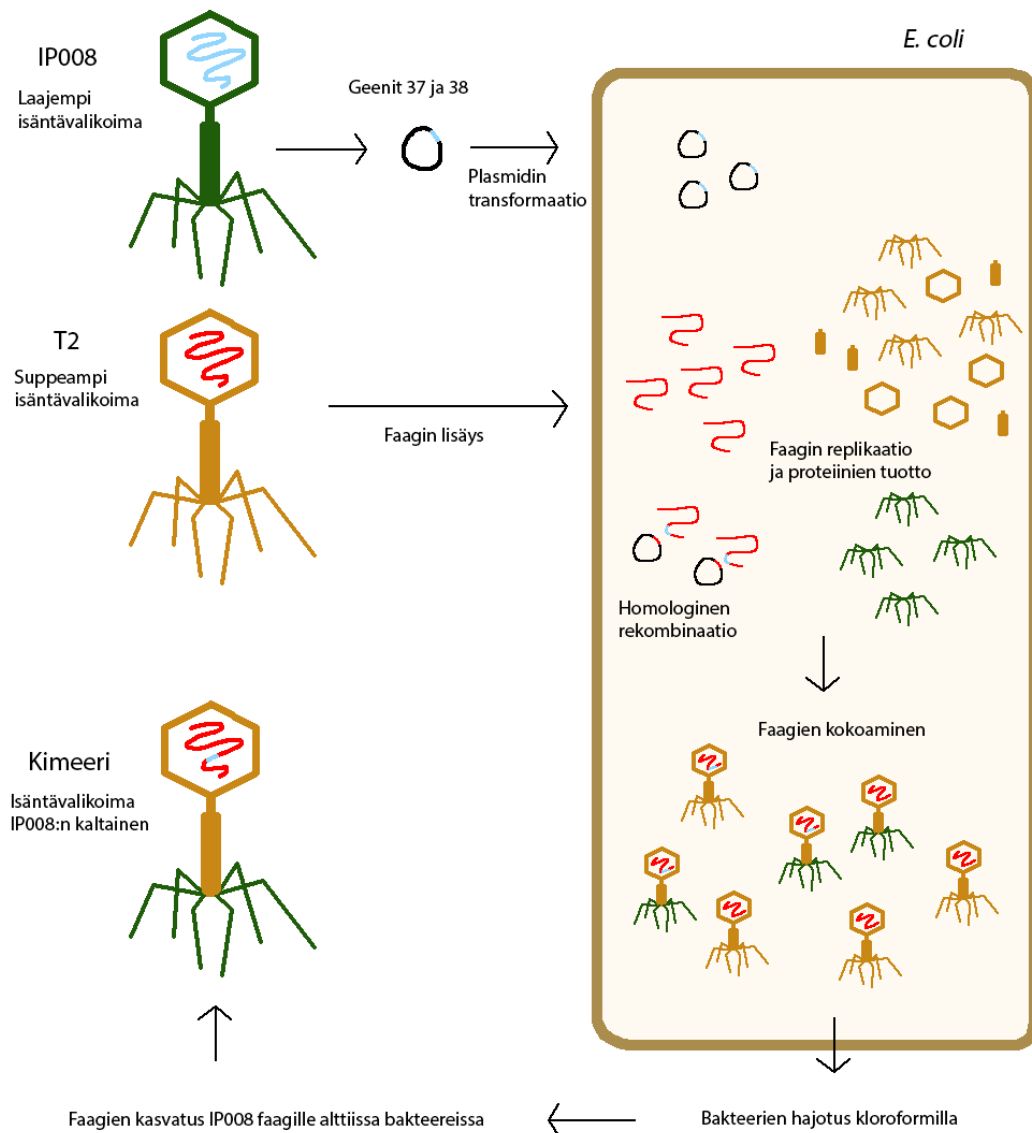
3.9. Faagien geenimuuntelu

Faageja voidaan muokata monin eri tavoin soveltumaan paremmin bakteeri-infektioiden hoitamiseen. Esimerkiksi faagin isäntävalikoimaa voidaan laajentaa tai faagin kiertoaikaa verenkierrossa voidaan pidentää. Faagiin voidaan myös lisätä biofilmiä hajottavan entsyymin geeni, mikäli sillä ei sitä vielä ennestään ollut (Bárdy ym. 2016).

PEGyalaatioksi kutsutaan polyetyleni glykolin (PEG) liittämistä aminohappoon. Kim tutkimusryhmineen lisäsi tutkimuksessa (2008) faagin pinnan aminohappoihin monometoksi-polyetyleni glykolia (Kim ym. 2008). Lisäyksen havaittiin hidastavan immuunijärjestelmän

reagointia faagin läsnäoloon, kun faagi tuotiin elimistöön ensimmäisen kerran, minkä seurauksena faagin kiertoaika verenkierrossa kasvoi. Kiertoaika ei enää pidentynyt seuraavalla käyttökerralla, ja runsaan PEGylaation havaittiin vähentävän faagin infektiokykyä. PEGylaatio voisi siis lisätä faagin tehokkuutta ainakin sen ensimmäisellä käyttökerralla (Kim ym. 2008).

Faagien isäntävalikoiman laajentamista on tutkittu monin eri keinoin. Esimerkiksi tutkimuksessa (Mahichi ym. 2009) yhdistettiin IP008 faagin laaja isäntävalikoima ja T2 faagin lyhytisyys. Menetelmä esitetty tiivistetysti kuvassa 4 (Kuva 4). Yhdistys tapahtui siirtämällä bakteeriin plasmidi, joka sisälsi IP008:n hännän kuituja koodaava geenit 37 ja 38. Bakteerien siirrettyä eksponentiaaliseen kasvuun, bakteerien sekaan lisättiin T2 faageja. Faagin replikoituessa plasmidia sisältävässä bakteerissa faagin genomin ja IP008-plasmidi yhdistyivät homologisen rekombinaation avulla. Bakteerissa tuotettiin sekä IP008 että T2 faagin häntäkuituja, mutta vain T2 faagin muita osia. Faageja pakatessa muodostui erilaisia faagiyhdistelmiä, joista osalla oli sekä rekombinantti genomi, että IP008 häntäkuidut. Näiden faagien eristämiseksi bakteerit ensin hajotettiin kloroformilla, ja lymaattiin vapautuneet faagit laitettiin IP008:lle alttiiden bakteerien sekaan. Faagipesäkkeet poimittiin ja faagit puhdistettiin. Tuloksena saatiin kimeerisiä faageja, joiden replikaatiosykli oli homologinen T2 faagin kanssa, ja joilla oli IP008 faagin häntäkuitujen geenit genomissa. T2 faagien alkuperäinen, pieni isäntävalikoima oli siis korvautunut IP008:n laajemmalla isäntävalikoimalla.



Kuva 4. Faagin isäntävalikoiman laajennus. IP008 faagin geenit 37 & 38 sisältävä plasmidi transformoidaan *E. coli* bakteeriin. Eksponentiaalisen kasvun alussa bakteeriviljelmään lisätään T2 faageja. Bakteerissa tapahtuu homologista rekombinaatiota plasmidin ja T2 faagin genomien välillä. Bakteerissa tuotetaan sekä IP008 että T2 faagin häntäkuituja, mutta vain T2 faagin muita osia. Faagien kokoamisessa osaan faageista tulee rekombinantti genomi ja joihinkin alkuperäinen T2 genomi, ja osa faageista saa IP008 faagin häntäkuidut. Bakteerit hajotetaan kloroformilla, ja niistä vapautuvia faageja kasvatetaan IP008 faageille alttiissa bakteerissa. Näin rikastetaan niitä faageja, jotka sisältävät rekombinantin genomien, joka tuottaa IP008:n häntäkuituja.

4. Tulevaisuudennäkymät

Faagiterapian kehittämiseen bakteeri-infektioiden hoitamiseen on suuri tarve, sillä antibioottiresistenttien bakteerien määrä kasvaa jatkuvasti. Erityisesti useammalle antibiootille resistenssin kehittäneitä bakteerikantoja vastaan kaivattaisiin tehokkaita hoitokeinoja. Faagiterapian vahvuuksia ovat mm. se, että faagit ovat bakteerien luonnollisia vihollisia, ja että ne ovat luonnollinen ja tärkeä osa ihmisen omaa mikrobiomia (Manrique ym. 2017). Niiden käytöllä ei ole juuri havaittu haittavaikutuksiakaan (Wittebole ym. 2014).

Bakteerien ja faagien välinen jatkuva evoluutiokilpailu on antanut faageille useita keinoja läpäistä bakteerin puolustusmekanismit. Bakteerit voivat kehittää resistenssin myös faageja vastaan, mutta faagit voivat toisaalta oppia kiertämään tämän kasvurajoitteen. Toisaalta faagiresistenssin kehittyessä voi käydä esimerkiksi niin, että faagin käyttämä tunnistusreseptori bakteerin pinnalla on tärkeä bakteerin infektiokyvyn kannalta, jolloin faagiresistenssin saavuttamiseksi bakteeri muuntuu siten vaarattommaksi ihmiselle. Tällaisia kantoja onkin esitetty käytettäväksi rokotteena (Capparelli ym. 2010). Siinä on tietenkin olemassa riski, että faagien poistuessa ympäristöstä bakteeri voisi luopua resistenssistään ja ottaisi reseptorinsa takaisin käyttöön, minkä seurauksena siitä tulisi taas infektiota aiheuttava haitallinen bakteeri.

Faagiresistenssin sattuessa voitaisiin myös yksinkertaisesti eristää luonnosta uusi faagikanta, jolle bakteerilla ei ole resistenssiä. Toisin sanoen evoluution voidaan antaa ratkaista ongelma. Toisaalta uuden faagin löytäminen ja eristäminen ei välttämättä aina onnistu. Tällöin on tarvetta voida muokata jo eristettyjä faageja geeniteknologisin keinoin siten, että ne toimivat haluttua bakteeria vastaan. Geeniteknologialla voidaan esimerkiksi muuttaa faagin isäntävalikoimaa (Mahichi ym. 2009). Faagien spesifisyys kohteestaan on toisaalta hyvä, sillä elimistön kannalta hyvät bakteerit jäävät silloin rauhaan, mutta toisaalta huono, sillä infektiota aiheuttava bakteeri pitää tunnistaa tarkasti. Isäntävalikoimaa on kuitenkin onnistuttu laajentamaan.

Faagien käytölle on tarvetta sekä antibioottien korvaajina, että täydentäjinä. Faagien ja antibioottien yhteiskäytön synergia on osoittautunut tehokkaammaksi keinoksi hoitaa bakteeri-infektiota, kuin pelkästään antibiootin tai faagien käyttö (Oechslin ym. 2017). Toimivien antibioottien ollessa vielä käytettävissä, yhteiskäyttö voisi tarjota pelkkää faagiterapiaa tehokkaamman ratkaisun. Bakteerien tuottamat biofilmit heikentävät antibioottien tehoa estämällä niitä pääsemästä bakteerin pinnalle. Faagien avulla biofilmejä voidaan hajottaa ja niiden kasvua voidaan ehkäistä, mikä antaisi antibiooteille paremman mahdollisuuden tehdä tehtävänsä (Lu & Collins 2007, Pei & Lamas-

Samanamud 2014). Faageja voitaisiin käyttää myös ennaltaehkäisevästi esimerkiksi leikkaushaavoissa Tilanteessa, jossa antibioottia ei enää voida käyttää esimerkiksi resistenssin vuoksi, pelkkä faagiterapiakin tuottaa tulosta (Wittebole ym. 2014). Lisäksi jos antibioottien käyttöä voitaisiin vähentää käyttämällä niiden sijaan faageja, teoriassa bakteeripopulaatioiden antibioottiresistenssiä antavat geenit voisivat jossakin vaiheessa käydä bakteereille tarpeettomiksi ja siten harvinaistua, minkä seurauksena vanhoista antibiooteista tulisi jälleen tehokkaita.

Faagiterapiassa pyritään välttämään temperaatteja faageja mm. siksi, että ne saattavat integroiduttuaan faagin genomiin vain jäädä sinne inaktiivisena sen sijaan, että ne etenisivät lyyttiseen sykliin ja tappaisivat bakteerin. Temperaattien faagien osallistuminen bakteereiden patogeenisten saarekkeiden muodostumiseen vähentää entisestään innostusta niiden käytöstä. Vaikka temperaatteja faageja ei suoranaisesti valita käytettäväksi, niitä voi päätyä faagisekoitukseen muiden faagien mukana uutta faagisekoitusta luonnosta eristettäessä. Temperaatti faagi voi pysyä lysogeenisessä syklissä tai edetä lyyttiseen sykliin olosuhteista riippuen. *In vitro* tutkimuksissa lyyttiseltä vaikuttava faagi voikin olla lysogeeninen, joka laboratorio-olosuhteissa ei jääkään genomiin odottamaan, vaan eteneekin saman tien lyyttiseen vaiheeseen. Jos tällaista faagia käyttää hoidossa, se saattaa elimistön olosuhteissa jäädäkin bakteerin genomiin lyyttisen syklin sijaan, jolloin faagiterapian hoitoteho jää alhaiseksi. Temperaattien faagien aiheuttaman riskin kiertämiseksi hoidossa voisi käyttää faageista eristettäviä lyyttisiä entsyymejä, endolysiinejä, jolloin hoidossa ei tarvitsisi käyttää kokonaisia faageja.

Molekyylibiologian ja geenitekniikan kehittymisen myötä faagien hyödyntäminen on tullut mahdolliseksi erilaisilla lääketieteellisillä ja bioteknologisilla alueilla. Faageja voidaan hyödyntää syövän diagnosoinnissa, lääkkeiden kuljetuksessa, sekä nanomateriaalien synteesissä. Modifioituja faageja voidaan käyttää biosensoreina elintarviketeollisuudessa bakteerien havaitsemiseen, sekä ruokamyrkytystä aiheuttavien patogeenien kasvun hillitsemiseen (Bárdy ym. 2016).

Faagiterapialla on hyvin lupaavat tulevaisuudennäkymät toimivana ja tehokkaana bakteeri-infektioiden hoitomenetelmänä. Sillä on potentiaalia täydentää ja jopa korvata antibioottien käytön.

5. Kirjallisuusviitteet

- Abedon ST (2017). Phage Companies. <http://companies.phage.org/>.
- Anderson TF (1948). The Growth of T2 Virus on Ultraviolet-killed Host Cells. *Journal of Bacteriology* 56(4): 403-410.
- Bárdy P, Pantůček R, Benešík M & Doškař J (2016). Genetically modified bacteriophages in applied microbiology. *Journal of applied microbiology* 121(3): 618-633.
- Barr JJ (2017). A bacteriophages journey through the human body. *Immunological reviews* 279(1): 106-122.
- Bondy-Denomy J, Pawluk A, Maxwell KL & Davidson AR (2013). Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. *Nature* 493(7432): 429-432.
- Bruttin A & Brüssow H (2005). Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: A safety test of phage therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(7): 2874-2878.
- Capparelli R, Nocerino N, Lannaccone M, Ercolini D, Parlato M, Chiara M ym. (2010). Bacteriophage therapy of Salmonella enterica: A fresh appraisal of bacteriophage therapy. *Journal of Infectious Diseases* 201(1): 52-61.
- Cisek AA, Dąbrowska I, Gregorczyk KP & Wyżewski Z (2017). Phage Therapy in Bacterial Infections Treatment: One Hundred Years After the Discovery of Bacteriophages. *Current microbiology* 74(2): 277-283.
- Comeau AM, Hatfull GF, Krisch HM, Lindell D, Mann NH & Prangishvili D (2008). Exploring the prokaryotic virosphere. *Research in microbiology* 159(5): 306-313.
- García P, Martínez B, Obeso JM & Rodríguez A (2008). Bacteriophages and their application in food safety. *Letters in Applied Microbiology* 47(6): 479-485.
- Guang-Han O, Leang-Chung C, Vellasamy KM, Mariappan V, Li-Yen C & Vadivelu J (2016). Experimental phage therapy for Burkholderia pseudomallei infection. *PLoS ONE* 11(7).
- Hagens S, Habel A, Von Ahsen U, Von Gabain A & Bläsi U (2004). Therapy of experimental Pseudomonas infections with a nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(10): 3817-3822.
- Hale CR, Zhao P, Olson S, Duff MO, Graveley BR, Wells L ym. (2009). RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell* 139(5): 945-956.
- Harper DR, Parracho HMRT, Walker J, Sharp R, Hughes G, Werthén M ym. (2014). Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics* 3(3): 270-284.
- Hodyra-Stefaniak K, Miernikiewicz P, Drapała J, Drab M, Jończyk-Matysiak E, Lecion D ym. (2015). Mammalian Host-Versus-Phage immune response determines phage fate in vivo. *Scientific reports* 5: 14802.
- James CE, Fothergill JL, Kalwij H, Hall AJ, Cottell J, Brockhurst MA ym. (2012). Differential infection properties of three inducible prophages from an epidemic strain of Pseudomonas aeruginosa. *BMC Microbiology* 12.
- Jończyk E, Kłak M, Międzybrodzki R & Górski A (2011). The influence of external factors on bacteriophages—review. *Folia Microbiologica* 56(3): 191-200.

- Kaźmierczak Z, Górski A & Dąbrowska K (2014). Facing antibiotic resistance: Staphylococcus aureus phages as a medical tool. *Viruses* 6(7): 2551-2570.
- Keen EC (2015). A century of phage research: Bacteriophages and the shaping of modern biology. *BioEssays* 37(1): 6-9.
- Kim KP, Cha JD, Jang EH, Klumpp J, Hagens S, Hardt WD ym. (2008). PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immune response. *Microbial Biotechnology* 1(3): 247-257.
- Krylov V, Shaburova O, Pleteneva E, Krylov S, Kaplan A, Burkaltseva M ym. (2015). Selection of phages and conditions for the safe phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Virologica Sinica* 30(1): 33-44.
- Lu TK & Collins JJ (2007). Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(27): 11197-11202.
- Mahichi F, Synnott AJ, Yamamichi K, Osada T & Tanji Y (2009). Site-specific recombination of T2 phage using IP008 long tail fiber genes provides a targeted method for expanding host range while retaining lytic activity. *FEMS microbiology letters* 295(2): 211-217.
- Manrique P, Dills M & Young MJ (2017). The human gut phage community and its implications for health and disease. *Viruses* 9(6).
- Mattila S, Ruotsalainen P & Jalasvuori M (2015). On-Demand Isolation of Bacteriophages Against Drug-Resistant Bacteria for Personalized Phage Therapy. *Frontiers in microbiology* 6: 1271.
- Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dabrowska B & Górski A (2007). Phage therapy of staphylococcal infections (including MRSA) may be less expensive than antibiotic treatment. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)* 61: 461-465.
- Nguyen S, Baker K, Padman BS, Patwa R, Dunstan RA, Weston TA ym. (2017). Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers. *mBio* 8(6).
- Nobrega FL, Costa AR, Kluskens LD & Azeredo J (2015). Revisiting phage therapy: New applications for old resources. *Trends in microbiology* 23(4): 185-191.
- Oechslein F, Piccardi P, Mancini S, Gabard J, Moreillon P, Entenza JM ym. (2017). Synergistic interaction between phage therapy and antibiotics clears *Pseudomonas Aeruginosa* infection in endocarditis and reduces virulence. *Journal of Infectious Diseases* 215(5): 703-712.
- Pei R & Lamas-Samanamud GR (2014). Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* 80(17): 5340-5348.
- Pires D, Sillankorva S, Faustino A & Azeredo J (2011). Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. *Research in microbiology* 162(8): 798-806.
- Rakhuba DV, Kolomiets EI, Dey ES & Novik GI (2010). Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell. *Polish Journal of Microbiology* 59(3): 145-155.
- Rath D, Amlinger L, Rath A & Lundgren M (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie* 117: 119-128.

- Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS & Sulakvelidze A (2009). Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *Journal of wound care* 18(6): 243.
- Sall KM, Casabona MG, Bordi C, Huber P, de Bentzmann S, Attrée I ym. (2014) A *gacS* Deletion in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Isolate CHA Shapes Its Virulence. *PLoS ONE* 9(4): e95936
- Sarker SA, McCallin S, Barretto C, Berger B, Pittet A, Sultana S ym. (2012). Oral T4-like phage cocktail application to healthy adult volunteers from Bangladesh. *Virology* 434(2): 222-232.
- Schmidt H & Hensel M (2004). Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. *Clinical microbiology reviews* 17(1): 14-56.
- Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L ym. (2017). Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(10).
- Shabbir MAB, Hao H, Shabbir MZ, Wu Q, Sattar A & Yuan Z (2016). Bacteria vs. Bacteriophages: Parallel Evolution of Immune Arsenals. *Frontiers in microbiology* 7: 1292.
- Singh PK, Donovan DM & Kumar A (2014). Intravitreal injection of the chimeric phage endolysin Ply187 protects mice from *Staphylococcus aureus* endophthalmitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(8): 4621-4629.
- Solunetti (2006). Solunetti. <http://www.solunetti.fi/fi/>.
- Tetz GV, Ruggles KV, Zhou H, Heguy A, Tsirigos A & Tetz V (2017). Bacteriophages as potential new mammalian pathogens. *Scientific Reports* 7(1).
- Viertel TM, Ritter K & Horz H (2014). Viruses versus bacteria—novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69(9): 2326-2336.
- Weber-Dąbrowska B, Jończyk-Matysiak E, Żaczek M, Łobocka M, Łusiak-Szelachowska M & Górski A (2016). Bacteriophage Procurement for Therapeutic Purposes. *Frontiers in microbiology* 7: 1177.
- Weinbauer MG (2004). Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS microbiology reviews* 28(2): 127-181.
- Weld RJ, Butts C & Heinemann JA (2004). Models of phage growth and their applicability to phage therapy. *Journal of theoretical biology* 227(1): 1-11.
- Winstanley C, Langille MGI, Fothergill JL, Kukavica-Ibrulj I, Paradis-Bleau C, Sanschagrin F ym. (2009). Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the liverpool epidemic strain of *pseudomonas aeruginosa*. *Genome research* 19(1): 12-23.
- Wittebole X, De Roock S & Opal SM (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 5(1): 226-235.
- Wright A, Hawkins CH, Anggård EE & Harper DR (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.