
Streszczenie

Efektywność działania litycznego bakteriofagów środowiskowych wobec szczepów *Pseudomonas aeruginosa* izolowanych od chorych z mukowiscydozą

Problem chronicznych infekcji płuc pacjentów z mukowiscydozą, których czynnikiem etiologicznym jest *P. aeruginosa*, znany jest nauce już od lat 60-tych. Rozwój tego typu infekcji przebiega wedle znanego schematu niemal u każdego pacjenta, a u podłoża tego procesu leży naturalna zdolność adaptacyjna *P. aeruginosa*. Skuteczność antybiotykoterapii ogranicza się zazwyczaj do zwalczania zakażeń sporadycznych, występujących w wieku dziecięcym. Niestety, wraz z wiekiem pacjenta rośnie również antybiooporność szczepu i stopień jego dostosowania do przetrwania w drogach oddechowych. Dlatego też współczesna nauka i medycyna stoją przed wyzwaniem opracowania nowej, alternatywnej wobec antybiotyków, terapii antybakteryjnej. Jednym z obiecujących nurtów jest wykorzystanie naturalnych wrogów bakterii – bakteriofagów oraz rekombinowanych białek fagowych.

Głównym celem niniejszej rozprawy była ocena możliwości zastosowania bakteriofagów litycznych w leczeniu przewlekłych infekcji płuc u pacjentów z mukowiscydozą. W pierwszej kolejności przeanalizowano wrażliwość 121 szczepów *P. aeruginosa*, izolowanych od pacjentów z mukowiscydozą na aktywność lityczną 28 bakteriofagów z kolekcji Instytutu Genetyki i Mikrobiologii UW. Odnotowano, że 93,6% przebadanych izolatów cechuje się podatnością na infekcję fagową. Jednocześnie zaobserwowano klonalną zmienność wrażliwości na bakteriofagi w obrębie stabilnych genetycznie szczepów.

Z pełnej puli fagów wyselekcjonowano dwa (φKT 28 i PA5oct) o najszerszym zakresie aktywności i poddano je dokładnej charakterystyce genetycznej i morfologicznej. Oba bakteriofagi zaklasyfikowano do rodziny *Myoviridae*, przy czym fag PA5oct okazał się największym, wyizolowanym dotąd, wirusem specyficznym względem *P. aeruginosa*.

W dalszej części prac skupiono się na określeniu zmienności szczepów *P. aeruginosa* izolowanych od pacjentów z mukowiscydozą. W tym celu wyselekcjonowano cztery różniące się fenotypowo szczepy CF oraz dwa szczepy non-CF. Analizie poddano biologię szczepów w zakresie intensywności produkcji biofilmu, ekspresji fimbrii typu IV i mukoidalności. Ponadto, wykorzystując spektroskopię ATR-FTIR, wykonano profile biochemiczne badanych szczepów. Zbadano również wrażliwość wybranych szczepów na bakteriofagi φKT 28 i PA5oct (*in vitro* oraz *in vivo*, na modelu

Galleria mellonella). Heterogenność klonalna szczepów CF została potwierdzona zarówno w zakresie profilu biochemicznego, jak i wrażliwości na bakteriofagi. Wyniki doświadczeń nie wykazały, jednak, korelacji pomiędzy biologią i biochemią badanych szczepów, a aktywnością lityczną fagów. Terapia fagowa larw *G. mellonella*, poza jednym wyjątkiem, odzwierciedlała rezultaty typowania *in vitro*. Szczególnie dobre rezultaty odnotowano dla preparatów fagowych złożonych z dwóch bakteriofagów (tzw. koktajli).

Podjęto również próbę określenia receptorów adhezji, jakich używają bakteriofagi w trakcie infekcji komórek *P. aeruginosa*. W tym celu zbadano aktywność lityczną ośmiu fagów (LUZ 7, LUZ 19, LBL 3, ϕ KZ, ϕ KT28, ϕ KTN4, ϕ KTN6 oraz PA5oct) względem 11 mutantów szczepu PA01. Zaobserwowano, że objęte badaniem bakteriofagi, do poprawnej adhezji wymagają obecności LPS lub fimbrii typu IV na powierzchni komórek gospodarza.

Ostatnią część badań poświęcono określeniu aktywności litycznej ośmiu (wspomnianych powyżej) bakteriofagów względem 43 szczepów *P. aeruginosa* z międzynarodowego panelu BCCM/LMG. 86% szczepów wyizolowanych w różnych ośrodkach na świecie, wykazała wrażliwość na co najmniej jednego z zastosowanych bakteriofagów.

Uzyskane w trakcie badań wyniki wskazują, że zastosowanie bakteriofagów litycznych w zwalczaniu infekcji płuc, wywołanych przez *P. aeruginosa*, może stać się w przyszłości realną alternatywą dla terapii antybiotykowej. Niemniej jednak, preparaty fagowe wciąż wymagają dodatkowych badań, wykluczających wszelkie negatywne aspekty związane z wprowadzeniem funkcjonalnych cząstek wirusowych do wnętrza wyjątkowo skomplikowanego organizmu ludzkiego.

Tomasz Olsew

Abstract

The effectiveness of environmental bacteriophage against *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis

Issue of chronic lung infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis is broadly known since the 60's. Infections of that kind usually develop according to a certain scheme in each patient and depends on natural adaptability of *P. aeruginosa*. The effectiveness of antibiotic therapy is usually limited to combating intermittent infections occurring in childhood. Unfortunately, the subsequent treatments, contributes to the development of antibiotic resistance. Therefore, modern science faces the challenge of developing new antibacterial therapy, alternative to antibiotics. One of the promising ideas is the use of natural enemies of bacteria - bacteriophages and phage recombinant proteins.

The main objective of this dissertation was evaluation the applicability of lytic bacteriophages in the treatment of chronic lung infections in patients with cystic fibrosis. The first examined issue was the sensitivity of 121 strains of *P. aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis to lytic activity of 28 bacteriophages from Institute of Genetics and Microbiology collection. It has been reported that 93.6% of tested CF isolates were susceptible to phage infection. At the same time we observed the phenomenon of strong clonal variation of sensitivity to bacteriophages within genetically stable strains.

From the set of 28 bacteriophages, we selected two (ϕ KT 28 and PA5oct) with the broadest range of activity and have characterized them in terms of genetics and morphology. Both phages were classified into the *Myoviridae* family, wherein the phage PA5oct was the biggest, so far isolated virus, specific for *P. aeruginosa*.

The next stage of work was focused on the determination of variability of strains of *P. aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. For this purpose, we selected four CF strains (phenotypically different) and two non-CF strains. We analysed the biology of the strains in terms of the intensity of biofilm production, expression of type IV fimbriae and mucosity. Furthermore, using ATR-FTIR spectroscopy the biochemical profile of the tested strains was also performed. Sensitivity of selected strains to bacteriophages PA5oct ϕ KT 28 has been tested both *in vitro* (phage typing) and *in vivo* (on *Galleria mellonella* larvae model). The clonal heterogeneity of CF strains was confirmed both in biochemical profile and sensitivity to bacteriophages. The results of experiments have shown no

correlation between biology and biochemical profile of the tested strains, and the activity of the lytic phage. Phage therapy of *Galleria mellonella* larvae, with one exception, reflected the results of *in vitro* phage typing. Particularly good results were reported for phage preparations composed of two phages.

An attempt to determine the adhesion receptors, essential for phage adhesion to *P. aeruginosa* cells was also taken. We examined the activity of eight lytic phages (LUZ 7, LUZ 19, LBL 3, ϕ KZ, ϕ KT28, ϕ KTN4, PA5oct and ϕ KTN6) against 11 deletion mutants of PAO1 strain. It was observed that the correct bacteriophage adhesion requires the presence of LPS or type IV fimbriae on the host cells surface.

In the last part of the work we determined the lytic activity of eight (mentioned above) bacteriophages against 43 *P. aeruginosa* strains from BCCM / LMG international panel. 86% of the strains isolated around the world, showed sensitivity to at least one of the used bacteriophages.

The obtained results indicate that the use of lytic bacteriophages in the *P. aeruginosa* lung infections treatment may become a viable alternative to antibiotic therapy in the future. However, the phage preparations still require additional testing to exclude any negative aspects associated with the introduction of functional virus particles to the interior of the human body.

Tomáš Olšák