



НАУЧЕН ОБЗОР

CRISPR и нанотехнологиите като иновативно решение за справяне с наболелия проблем антимикробна резистентност и преборване на мултирезистентните бактерии

Нарастващата употреба на антибиотици се обуславя от фактори като застаряване на населението, повишената поява на инфекции и по-високата заболяемост от хронични заболявания, които изискват антибиотично лечение. Прекомерната и ненужна употреба на антибиотици при хора и животни доведе до появата на бактерии, устойчиви на наличните понастоящем антимикробни средства, както и до селективното развитие на устойчиви микроорганизми, като по този начин се допринесе за широкото разпространение на гени за резистентност и в околната среда. В резултат на този наболял проблем, а именно антимикробна резистентност (АМР), все повече се правят опити за разработване на нови техники за борба с резистентните бактерии, сред които са редакция на гени или нанотехнологии. Използването на тези технологии, самостоятелно или в комбинация, е обещаващо за решение на проблема, пред който човечеството е изправено днес и което би могло да доведе до изключително сериозни последствия за хора, животни и околна среда: разпространение на патогенни бактерии, устойчиви на почти всеки клас антимикробни средства и фатален изход за хора и животни поради неефективно лечение.

От откриването им през 1929 г. насам антибиотиците са широко използвани в хуманната и ветеринарната медицина както за рутинно лечение, така и превантивно за предотвратяване на бактериални инфекции. Прекомерната употреба на антибиотици за превенция или лечение значително е увеличила нивото на бактериална резистентност в световен мащаб. Броят на смъртните случаи при хора е тревожен, достигайки 50,000 годишно в Съединените щати и Европа, като до 2050 г. се очакват 10 милиона смъртни случая годишно, което надвишава броя на смъртните случаи в момента, дължащи се на всички видове ракови заболявания (около 8.2 милиона).

Първият списък на резистентни към антибиотици патогени е публикуван от Световната здравна организация (СЗО) през 2017 г. Този списък показва, че от 12-те резистентни патогени, седем са били отбелязани, че са резистентни на бета-лактамни антибиотици. Следователно отново се поставя акцент върху производството на нови антибиотици, като се поставят цели за разработване на бъдещи стратегии в областта на научните изследвания (СЗО, 2017 г.).

Прекомерната употреба и злоупотребата с антибиотици при хората и животните са довели до селективна поява на бактерии, устойчиви на наличните понастоящем антибиотици, както и устойчива непатогенна микрофлора, което води до разпространение на гени за резистентност и в околната среда. Най-голяма загриженост относно способността на тези микроорганизми да развият резистентност към голяма част от класовете антимикробни средства (АМС) будят бактериалните видове:

Enterococcus spp., *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp., обединени с акронима ESKAPE.

Антимикробната резистентност се глобализира, като тя може да се прояви по различни начини в зависимост от придобитите и селективни генетични промени или въвеждане на външни гени, което води до несъществуващи до момента фенотипни прояви при бактериите. В последно време се **появиха няколко механизма за устойчивост**, включително промяна на таргетната цел при атакуване на клетката (чрез ДНК гираза), увеличаване на ефлукса (екскретиране на активното вещество извън микроорганизма), инактивиране на флуорохинолоните (чрез аминокликозид N-ацетилтрансфераза), потискане на 30S рибозомалната субединица (от аминокликозидите) и защита на целта от ДНК свързващите протеини (*Qnr family*). Някои от тези промени са вече добре известни, като например предизвиканото от бактериите изменение на химическата структура на антимикробните средства, намаляване на концентрацията на антимикробните средства в полето им на действие, изменение на целта на действие на конкретния клас АМС, и изменение на пропускливостта/пермеабилитета на мембраната на атакуваната клетка.

Съществуват механизми за намаляване на пропускливостта на мембраните (*при P. Aeruginosa*), които не включват екскреция на порин, а представляват по своята същност промени в областта на клетъчната обвивка, които са свързани с резистентност към полимиксини. В допълнение, антибиотиците, които атакуват клетъчната бактериална стена, като например пеницилини и гликопептиди, дейностите на други антимикробни средства, които действат върху бактериалните рибозоми, също могат да намалее поради промени в основната им цел. Това „явление“ засяга основно макролидите и тетрациклините. **Присъствието на тези механизми на резистентност е все по-често срещано в голям брой микроорганизми поради селективния натиск, упражняван и от антимикробните средства, което води до естествен подбор, който води до доминиране на определени групи резистентни бактерии и отмиране на чувствителни микроорганизми.**

В мета-анализ на *Bell et al.(2014)*, е направено заключението, че „Увеличаването на консумацията на антибиотици не само може да доведе до по-голяма устойчивост на равнището на отделните индивиди, но също така може да доведе до по-голяма устойчивост на ниво общност, страна и на регионално равнище, което може да навреди на отделни пациенти.“

Друго проучване от същата година е направило оценка на употребата на антибиотици в световен мащаб между 2000 г. и 2010 г. Установено е, че потреблението на антибиотици се е увеличило с около 36%, като държавите от групата БРИКС (Бразилия, Русия, Индия, Китай и Южна Африка) представляват приблизително 76% от увеличението (*Van Boeckel et al., 2014*).

Поради това данните отразяват тревожна тенденция по отношение на лечението на инфекциозни заболявания, тъй като не само тези лекарства се използват все по-често (*Van Boeckel et al., 2014*), но и тяхното използване е право пропорционално на увеличаването на показателите за резистентност (*Bell et al., 2014*). **При липсата на каквото и да било значително разработване и откриване на нови антимикробни средства за контрола на резистентни микроорганизми (*Hogberg et al., 2010*), съществува спешна необходимост от сериозно преразглеждане на взаимовръзката между популациите хора и животни, видовете инфекциозни заболявания и употребата на АМС.**

Проблемът, свързан с бактериалната резистентност, е проблем, който трябва спешно да бъде преразгледан, тъй като функционалните метагеномни анализи на почвените микроорганизми, показват наличието на широк набор от генетични

фактори, които придават резистентност към АМС (Forsberg et al., 2014). Следователно съществува належаща нужда от разработване и прилагане на ново поколение АМС, които да могат да „забавят“ разпространението на АМП и да запазят полезната микрофлора.

Сред възможностите за разрешаване на проблемите, свързани с бактериалната резистентност, са използването и внедряването на нанотехнологии, редактирането на гени, като напр. CRISPR-Cas9 и терапията с фагови частици, които могат да бъдат изтъкнати и като потенциални бъдещи стратегии за борба с АМП. Тези стратегии могат да бъдат използвани поотделно както и в съчетание.

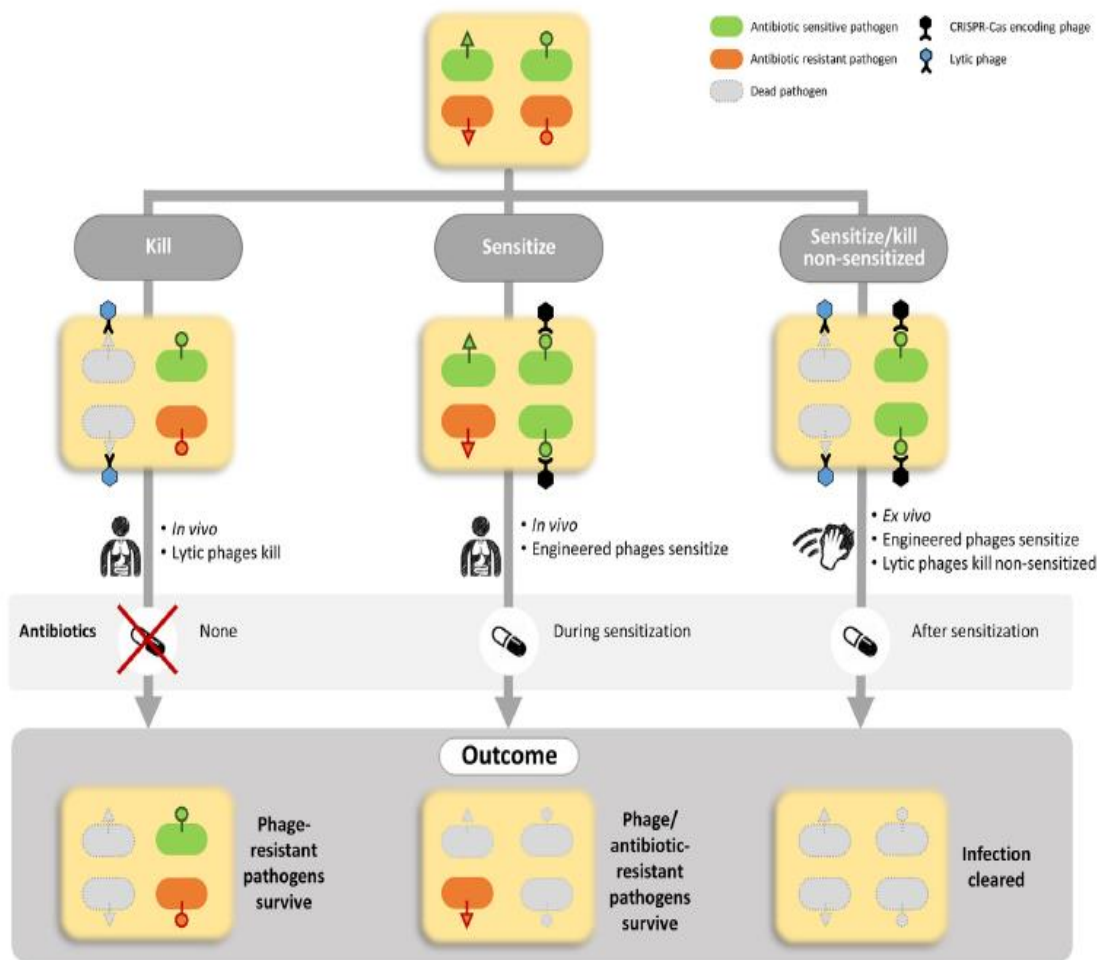
Научната общност посочва, че **няма перспективи за въвеждане на нови antimicrobни средства в клиничната практика в краткосрочен план.** Основният препоръчителен подход за момента е рационалното използване на класическите антибиотици, създадени през последните 50 години, заедно с техники, които подсилват действието им. Това може да се постигне чрез използване на вещества, които увеличават антибиотичната активност чрез намаляване или блокиране на съпротивителния механизъм на бактериите, като например бета-лактамаза, ефлуксна помпа, и инхибитори на чувствителността, както и бактериофаги и нови системи за транспорт на лекарствата, наред с други техники (Moo et al., 2019; Mulani et al., 2019; Pham et al., 2019; Vikesland et al., 2019).

Какво представлява редактирането на гени?

Редактирането на гени е набор от нови техники в генното инженерство с цел промяна на генетичния материал на растения, животни и микроорганизми, например патогенни бактерии, при които за разрязването на ДНК се използват „молекулярни ножници“, насочени към определено място/локус в ДНК на организма. След това изрязаната ДНК се поправя чрез собствения механизъм за възстановяване на клетката или чрез синтетична система. Всяка изкуствена манипулация, която навлиза в живи клетки с цел да промени генома по пряк начин, включително чрез редактиране на гени, представлява генно инженерство.

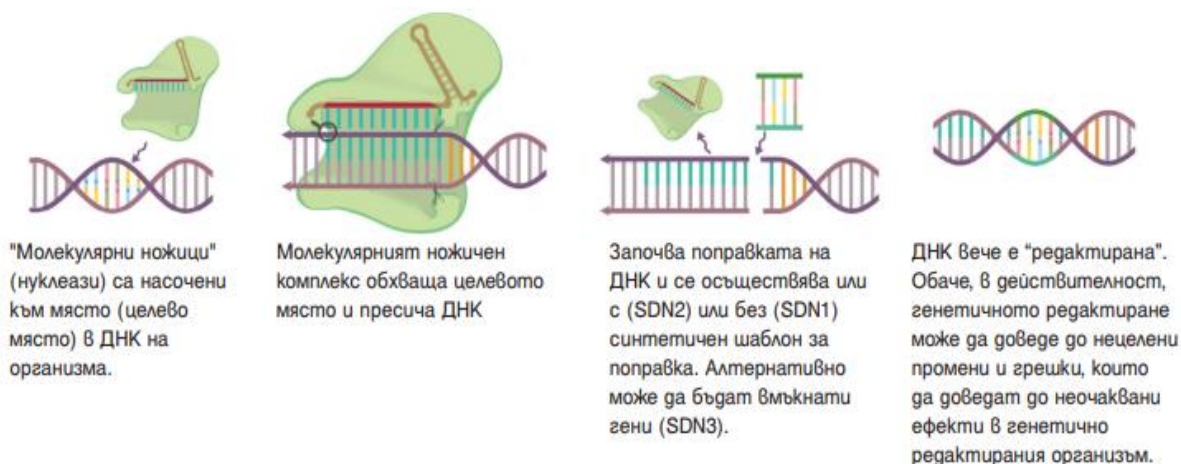
Една от най-популярните и най-нови технологии за редактиране на гени е CRISPR. Тя отрязва ДНК на определено място, използвайки молекулярни ножници, известни като насочена нуклеаза (SDN). След това определен ген се вмъква, изтрива или се променя по друг начин. **Въпреки че CRISPR се „рекламира“ с потенциала да бъде точен инструмент за генно инженерство, последните проучвания предупреждават, че използването на CRISPR може да има нежелани ефекти върху регулирането на ДНК и на гените и може да причини сериозни проблеми.**

За изменение на генома на цели популации се предлага т.нар. „генетично насочване“ (*gene drives*), което чрез CRISPR, изкуствено налага предаването на определена черта/белег/свойство през поколенията на даден вид, заобикаляйки хода на естествения подбор. Веднъж освободени, организмите подложени на генетично насочване не могат да бъдат изтеглени обратно и всички предизвикани от тях промени в генетичния състав на популацията по всяка вероятност са необратими (*фигура 1*). Следователно генетичните промени в популацията вероятно ще се запазят в продължение на много дълго време или дори вероятно за постоянно. **Това може да доведе до дълбоки и непредсказуеми последици за обществото и околната среда.** Предложените приложения на генетичното насочване са все още в етап на „доказване на концепцията“.



Фигура 1

Най-обсъжданата техника за редактиране на гени CRISPR, в зависимост от това как се постига редакцията, е три различни вида: със или без синтетичен шаблон за ремонт и чрез вмъкване на (един или повече) гени. Тази изрязана ДНК след това се ремонтира от собствения механизъм за ремонт на клетката. Начинът на ремонта е ключов за класифицирането на организмите с редактирани гени. Принципната разлика между „стандартното“ генно инженерство и редактирането на гени е, че не е задължително генът да се вмъква в организма, за да се получи нов фенотип, въпреки че молекулярните ножници трябва да бъдат въведени в организма. Полученият генетично модифициран организъм би могъл да произведе или да не произведе нов протеин като част от новата характеристика.



Фигура 2: Принцип на генно редактиране

Различни видове редактиране на гени:

Техниките за редактиране на гени като CRISPR, TALEN, ZFN и мегануклеаза насочват молекулярни ножици (известни като сайт-насочена нуклеаза, SDN) към мястото на генома, където е планирано да се извърши промяната на ДНК. В зависимост от техниката тези насочени молекулярни ножици са под формата на синтетични протеини или синтетични РНК-протеинови комбинации. Молекулярната ножица отрязва ДНК, която след това се подлага на поправка чрез собствения механизъм на клетката. Често се използва синтетичен ДНК шаблон за насочване на ремонта по такъв начин, че да се постигне определена промяна в ДНК. Това води до различни видове генно редактиране:

1) Не се използва шаблон за ремонт (SDN тип 1 или SDN1)

2) Използва се шаблон за ремонт (SDN тип 2 или SDN2)

3) Въмъкват се гени по време на процеса на редактиране, които обикновено придават определена черта на организма, който се получава. Ако гените са от други видове, генното редактиране произвежда трансгенен организъм. (SDN тип 3 или SDN3).

Най-често срещаният тип молекулярна ножица, използвана с CRISPR, се нарича "Cas9", поради което често се говори за системата CRISPR-Cas9, но са възможни и други видове молекулярни ножици, напр. Cpf1. Освен това в процес на разработка е и нова стратегия за CRISPR, наречена базова редакция. **Базовата редакция** използва молекулярни ножици, които не прерязват ДНК, а я „разплитат“, което позволява да се извърши малка промяна в ДНК (на единична базова двойка). **Въпреки това, опасенията относно генетичните грешки, създадени по време на процеса на редактиране на гени, важи и за базовата редакция.** Технологията за редактиране на гени, известна като насочена мутагенеза чрез олигонуклеотид (ODM), не използва насочени молекулярни ножици, а вместо това въвежда кратка верига от ДНК, която се прикрепя на определено място към ДНК на таргетния организъм и предизвиква промяна в тази ДНК.

Приложения за редактиране на гени в процес на разработка:

Редактирането на гени има широк спектър приложения, както за растенията, така и за животните. **Примери за генна редакция при животните** е „селекция“ на порода свине с резистентност към някои болести и „двойно замускулени“ говеда, които поражда етични опасения, тъй като прекалено развитите мускули могат да причинят затруднения с дишането и други здравни проблеми. Също така има изследвания върху генно редактирани насекоми, които не могат да се размножават или не дават жизнено поколение, с цел борба с векторно-преносимите заболявания.

При растенията в процес на разработка са генно редактирани черти като поносимост към суша за царевицата, устойчивост на заболявания по краставиците, променено време на цъфтеж на домати и променен състав на соята, устойчивост на хербициди.

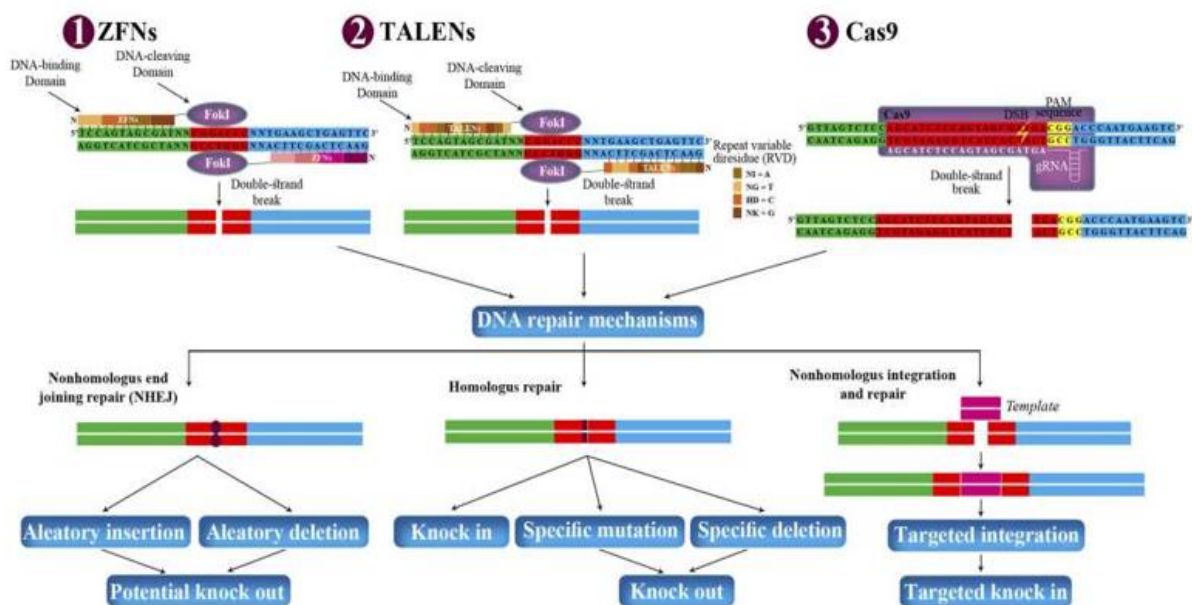
Генна редакция се използва и при патогенните микроорганизми с цел неутрализиране гените за резистентност към почти всички класове АМС или промяна на таргетната цел или пък потискане на генната експресия на резистентни гени.

CRISPRs - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - групирани равномерно разположени кратки палиндромни повтори



CRISPRs (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) са адаптивни имунни системи, които се получават от бактерии и археи. Системите CRISPR-Cas използват РНК за разпознаване на прицелната ДНК секвенция и на Cas ензими за последващо разграждане/разрязване на нуклеинови киселини, така че те изискват само един протеин за свързване и отделяне.

Видове ензими използвани за гена редакция:

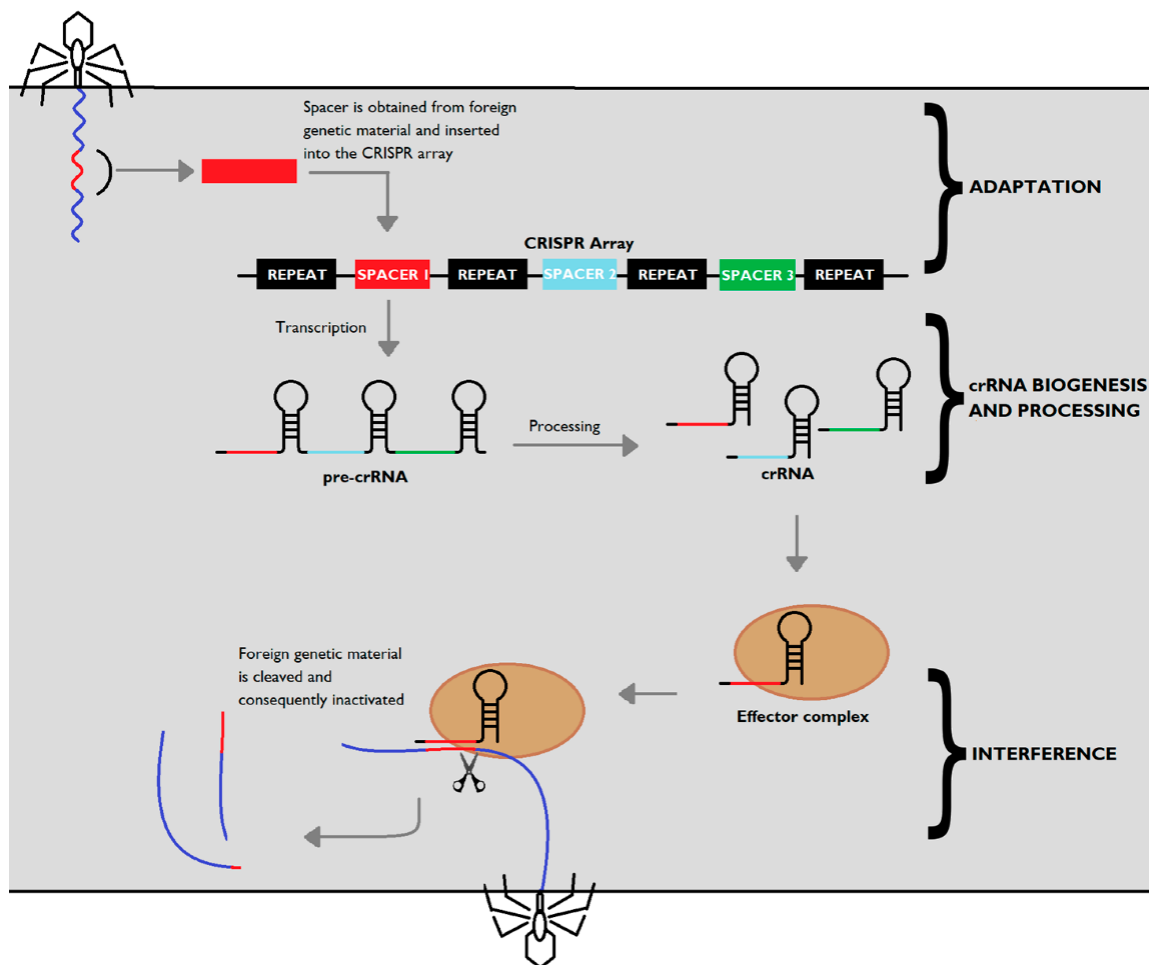


Фигура 3: Потенциално манипулиране на генома чрез използване на ZFNs (zinc finger nucleases (ZFNs)), TALEN (Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)) и Cas9 (dual RNA-guided DNA endonuclease enzyme). ZFNs, TALEN и Cas9 могат да бъдат проектирани така, че да са насочени към всеки ген в генома на прокариотни и еукариотни клетки. Всеки ZFNs и TALEN не съдържа домейн „FokI“, и област, която има задължителен характер. Всяка ДНК свързваща област на ZFNs и TALEN разпознава съответно 3-4 и 1 ДНК секвенция. Всяко повторение на TALEN е с дължина 33—35 аминокиселини, като две са RVD (NI = A, NG = T, HD = C и NK = G). Спейсърните региони между мономерите в TALEN и ZFNs са съответно с 6-40bp и 5-7bp дължина. В Cas9, иРНК (gRNA) разпознават и се свързват с целевата последователност, а Cas9 реже двойноверижната ДНК 3bp нагоре по PAM веригата (NGG). Двухверижното срязване на веригите ДНК може да стимулира естествените ДНК коригиращи механизми на клетката, последвани от възможност за генен knock-out или knock-in.

Принцип на системата CRISPR-Cas9:

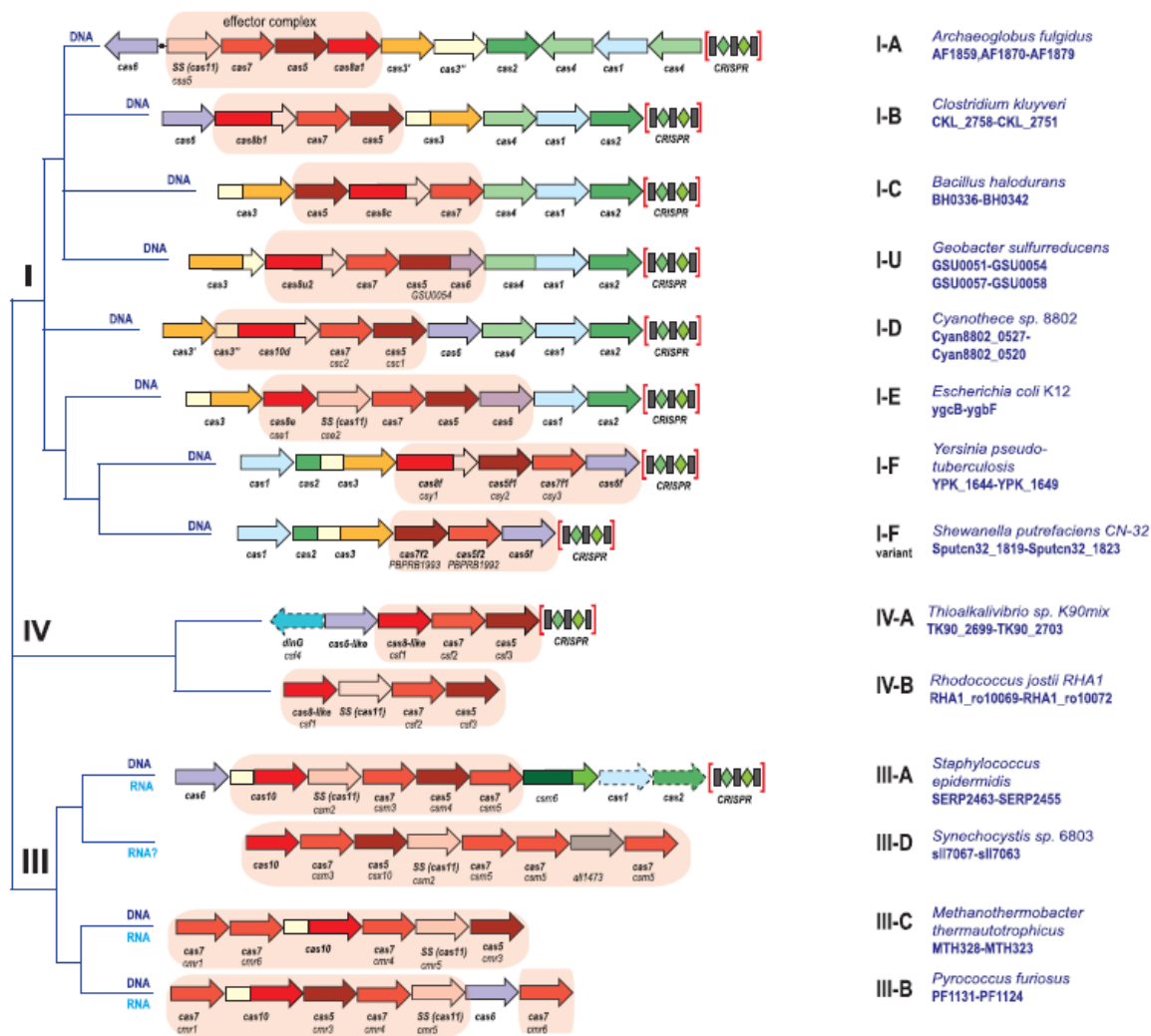
Механизмът на CRISPR системите е подобен на РНК интерференцията (RNAi) в еукариотните клетки, които използват малки РНК последователности (sRNA), за да

идентифицират и неутрализират специфични локуси от постъпващи ДНК, включително фаги, транспозони и плазмиди. Механизмът на действие на системите CRISPR-Cas е обобщен в три етапа, а именно: адаптация, експресия и интерференция/намеса.



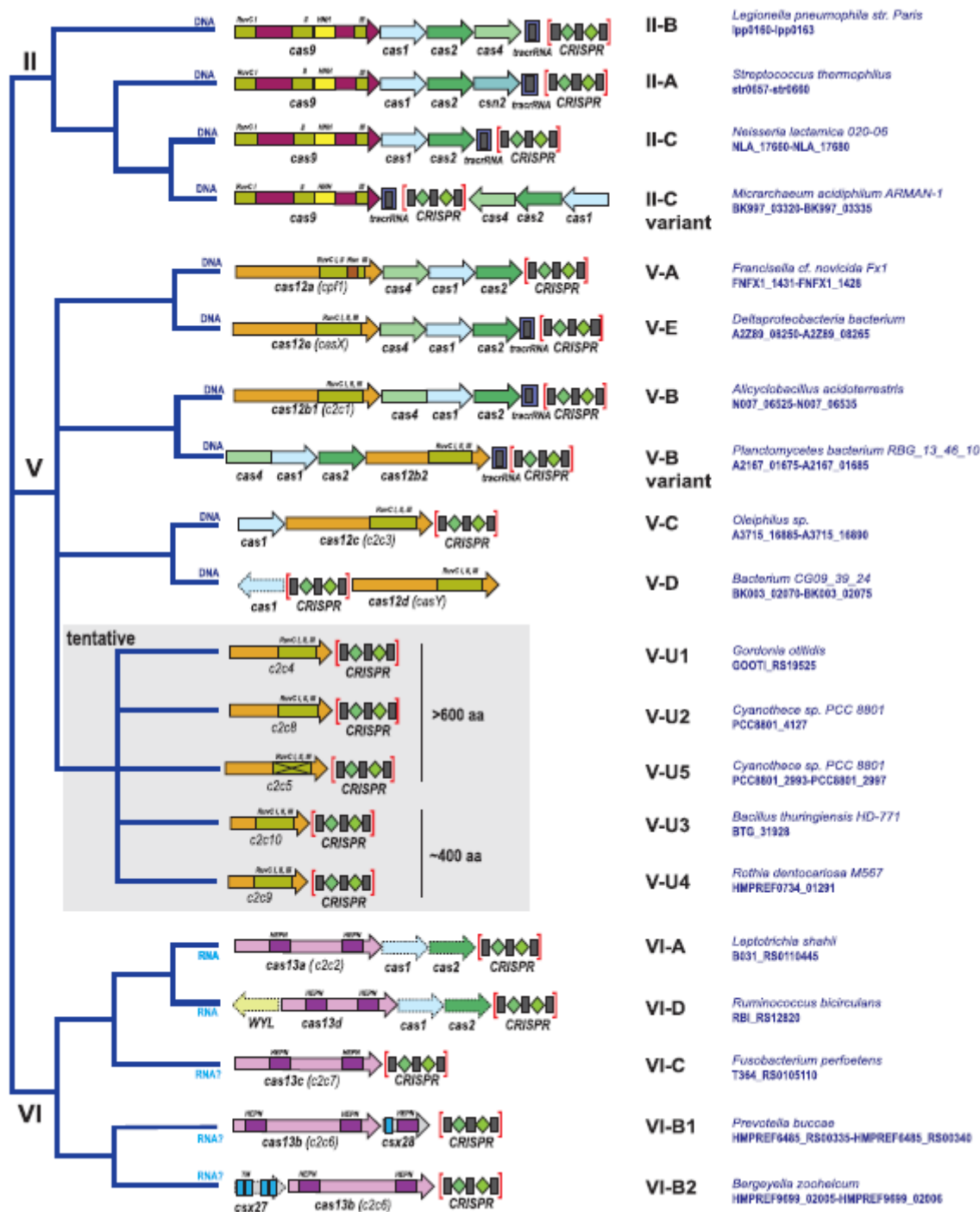
Фигура 4: Схематично представена системата CRISPR-Cas с трите си етапа

По време на етапа на адаптация, приблизително 30bp сегмент от хомоложни постъпващи чужди ДНК се интегрира в лидерната страна на CRISPR локуса и съседните мотиви на протоспейсърното пространство (*protospacer adjacent motifs - PAMs*) са избрани от спейсърните последователности на гостоприемниковия геном. По време на етапа на експресия, РНК се транскрибира от спейсърите на CRISPR локуса (*pre-crRNA*) и се преобразува в *crRNA*. В крайна сметка, в етапа на интерференция, *crRNA* заедно с Cas протеините специфично откриват инвазиращата/постъпващата чужда ДНК, разцепват я и генерират двуверижно скъсване. Има шест типа CRISPR-Cas системи, които са дефинирани въз основа на тяхното сходство на последователността, филогенетичен анализ, анализ и сравнение на съседство, отделни характеристики на компонентите и експериментални данни включително отличителни черти на биохимията и молекулярния механизъм. Въз основа на настоящата класификация (*Makarova et al*), има два класа системи CRISPR-Cas, които включват шест типа (I – VI) и 33 подтипа. В тази класификация Клас 1 включва типове I, III и IV, заедно с 16 подтипа, които съдържат множество Cas протеини като ефекторни модули, които образуват *crRNA*-свързващи комплекси и посредничат заедно в *pre-crRNA* обработката и интерференцията.



Фигура 5: Систематизиран изглед на клас 1 Cas системи

Клас 2 включва типове II, V и VI, заедно със 17 подтипа, които съдържат единичен, голям, многодоменен crRNA-свързващ протеин (Cas9 във тип II, Cas12 във тип V и Cas13 във тип III), който участва във всички дейности, необходими за интерференцията (във всички варианти) и при обработката на pre-crRNA (в някои варианти). Системите от тип I и II се нуждаят от два критични фактора за ефективно насочване на ДНК: 1) специфичен за PAM към всяка система CRISPR-Cas, фланкираща протоспейсърното пространство, и 2) комплементарност между целевата последователност протоспейсърното пространство и разделителя CRISPR PНК.



Фигура 6: Систематизиран изглед на клас 2 Cas системи

Ефективно насочване може да възникне дори при множество несъответствия между протоспейсърното пространство и CRISPR РНК. В системите от тип III се изискват подобни фактори за насочване на ДНК, където тези системи оценяват базовото сдвояване между региона, фланкиращ протоспейсърното пространство и целевата последователност.

Системите от тип IV изискват нуклеази за интерференцията и обикновено нямат адаптационни модули. Други видове от клас 2 (т.е. V и VI) съдържат големи протеини като ефекторни модули, които ясно диференцират тяхната доменна структура. Големите ефекторни протеини от тип VI и подтип VA системи също съдържат РНКаза активност на pre-crRNA обработката, докато тази обработваща активност при тип II и няколко подтипа от тип V обикновено се прехвърля към РНКаза III (RNase III), не-Cas ензим. След този процес, комплексът crRNA:tracrRNA, като подготвен направляващ РНК

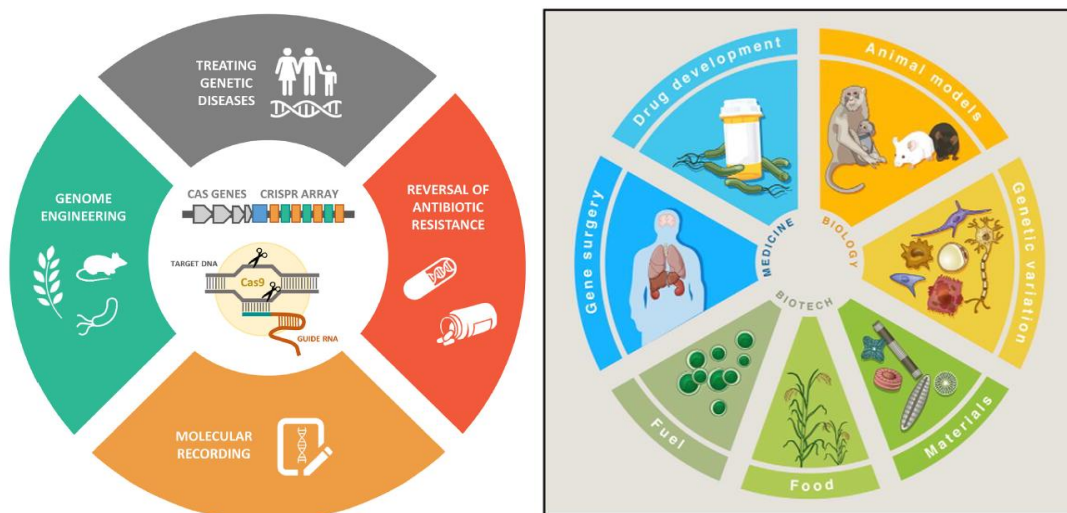
комплекс, дава възможност за специфична ДНК интерференция през останалата стабилна връзка с ефекторите.

Signature genes and their putative functions for the major and minor CRISPR-cas types.

| Class | Cas type | Signature protein | Function |
|-------|----------|---|--|
| 1 | I | Cas3 | Single-stranded DNA nuclease (HD domain) and ATP-dependent helicase |
| | IA | Cas8a, Cas5 | Cas8 is a Subunit of the interference module that is important in targeting of invading DNA by recognizing the PAM sequence. Cas5 is required for processing and stability of crRNAs |
| | IB | Cas8b | |
| | IC | Cas8c | |
| | ID | Cas10d | |
| | IE | Cse1, Cse2 | contains a domain homologous to the palm domain of nucleic acid polymerases and nucleotide cyclases |
| | IF | Csy1, Csy2, Csy3 | Not determined |
| | IU | GSU0054 | |
| | III | Cas10 | Homolog of Cas10d and Cse1. Binds CRISPR target RNA and promotes stability of the interference complex |
| | IIIA | Csm2 | Not Determined |
| | IIIB | Cmr5 | Not Determined |
| | IIIC | Cas10 or Csx11 | |
| | IIID | Csx10 | |
| | IV | Csf1 | |
| 2 | II | Cas9 | Nucleases RuvC and HNH together produce DSBs, and separately can produce single-strand breaks. Ensures the acquisition of functional spacers during adaptation. |
| | IIA | Csn2 | Ring-shaped DNA-binding protein. Involved in primed adaptation in Type II CRISPR system. |
| | IIIB | Cas4 | Endonuclease that works with cas1 and cas2 to generate spacer sequences |
| | IIC | | Characterized by the absence of either Csn2 or Cas4 |
| | V | Cas12a (Cpf1), Cas12b (C2c1), Cas12c (C2c3) | Nuclease RuvC. Lacks HNH. |
| | VI | Cas13a (previously known as C2c2), Cas13b, Cas13c, Cas13d | RNA-guided RNase |

Табл. 1: Таблично представени всички видове и класове Cas системи заедно с тяхната конкретна функция

Приложение на CRISPR-Cas:



Фигура 7

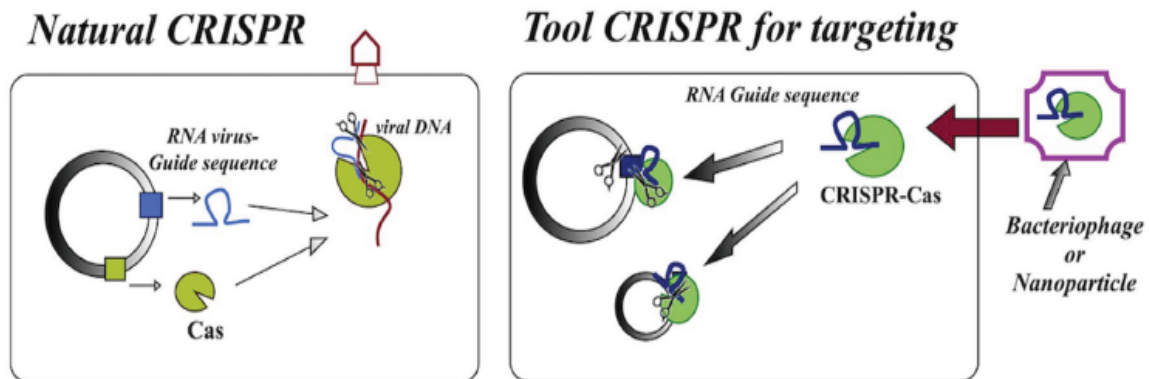
Тези нови техники на генното инженерство се предлагат за широк спектър от приложения: от фармацевтични продукти до генетична терапия за хора, както и в селското стопанство. Поради тази простота на методиката изследователите са разработили нов молекулярен инструмент, основан на естествени CRISPRs (фиг. 7). Този инструмент има различни приложения, като един от тях е възможността за **антимикробно действие**, тъй като това са цитотоксични системи, които могат да бъдат насочени/програмирани да убиват патогенните бактерии, имунизирайки ги срещу устойчиви плаزمиди (Sodek et al., 2013; Bikard et al., 2014; HSU et al., 2014).

За **медицински цели**, системите CRISPR–Cas, могат да дадат възможност за селективно и специфично отстраняване на патогенните микроорганизми. Въпреки че съществуват други антимикробни подходи, те предлагат само частични решения, докато системите CRISPR са програмируеми стратегии (Gomaa et al., 2014), които могат да се използват за избирателно и количествено отстраняване на отделни бактериални вериги,

основани само на информация за геномните секвенции, като така се създава **възможност за третиране на мултирезистентни инфекции.**

Много проучвания за употребата на тези системи като антимикуробни средства (*Gomaa et al. (2014)*) свидетелстват, че и двете хетероложни и ендеогенни системи биха могли да неутрализират бактериалните патогени и щамове. В тези проучвания е показано, че всички таргетни последователности от генома могат да доведат до клетъчна смърт, което предполага, че на теория всеки генен локус би могъл да бъде различна цел за антимикуробните средства, която се основава на CRISPRs.

Друга възможност на тази CRISPRs технология е използването ѝ като антимикуробно средство посредством РНК насочени нуклеази (RGNs), прицелени към специфични гени за резистентност или нежелани полиморфизми, като се дава възможност за програмируемо моделиране на микробиома (*Citorik et al., 2014*).



Фигура 8: Схематично представяне на CRISPR-Cas системата, показваща естествения CRISPR-Cas, съдържаща се в бактерии, която функционира като „имунна система“ срещу вируси, и CRISPR-Cas инструмент, изкуствено синтезиран.

В проучване на *Fuente-Núñez and Lu (2017)*, отнасящо се до **CRISPR-Cas системата, тя е проектирана да работи като прецизно антимикуробно средство.** Все повече доказателства има, че тези системи имат потенциала да елиминират и неутрализират патогенните мултирезистентни микроорганизми посредством селективен подбор на гени, отговорни за антибиотичната резистентност. Въпреки че проучванията показват, че CRISPR-Cas системите са ефективни, все още има нерешени пречки по отношение на ефективния пренос на тази система до таргетната цел, за да може тези системи да бъдат използвани като ефективни антимикуробни средства (*Beisel et al., 2014*). Съсредоточавайки се върху проблема с преноса и доставката на CRISPR системата, *Pan et al. (2017)* са определили осем деполимерази в мултигостоприемниковия бактериофаг K64-1, който заедно с K64dep (S2-5), дава общо девет капсулни деполимерази. Понастоящем използването на бактериофаги като носители на CRISPRs продължава да бъде предизвикателство. *Shen et al. (2018)* описва положителни резултати в проучванията си с геномно редактиран *Klebsiella* бактериофаг, което е предложено като възможност за използване на целеви CRISPR системи. Един от вариантите е да се използват нанотехнологии за доставяне до клетките на CRISPRs, които да предизвикат повърхностни модификации, обезпечавайки желаната специфичност (*Yan et al., 2015*).

Както е посочено в проучване на *Pursey et al., (2018)* все още има много неща, които трябва да бъдат открити, предвидени и изчистени във връзка с използването на CRISPR-Cas в борбата срещу резистентните бактерии, с допълнителни изследвания, особено необходими във връзка с нейната безопасна употреба.

Съществува и друг повод за безпокойство, който е свързан с възможността бактериите да бъдат устойчиви на CRISPR- Cas, тъй като в тях са заложени

първоначалните механизми на действие на тази система. В проучване на *Chen et al.(2019)* с мултирезистентна *Shigella*, е показано, че бактериите, които имат гени за резистентност, също така показват намаление на активността на естествените CRISPR–Cas.

Различни проучвания показват, че **бактериите имат склонност да съхраняват различни гени, които обезпечава приспособимостта им.** Проучване, проведено от *Oliveira Santos et al.(2018)*, където е показана възможната приспособимост на гена КРС-2 към различни мобилни елементи, пример за това е необходимостта да се разгледат различни възможности за прилагането на CRISPR–Cas. По отношение на появата на карбапенемаза-резистентен *K. pneumoniae*, скорошна публикация показва въвеждането на две нови системи за редактиране на ДНК. Едната е плазмидът pCasKP-pSGKP, а другият е плазмидната система pBECKP, като и двете системи са показали ефективност при редактирането на генома, което ще улесни по-нататъшните научни изследвания върху резистентността към карбапеними (*Wang et al., 2018 г.*).

Въпреки че CRISPR-Cas инструментът предлага нова възможност за борба с мултирезистентните бактерии, някои проучвания показват, че те не са ефективни при някои щамове. За този проблем свидетелства проучване с *Enterococcus faecalis* на *Hullahali et al.(2017, 2018)*, определящо генетичната база на фенотиповете, свързани с изследване на толерантността на CRISPR-Cas системата.

Става все по-ясно, че е важно да има по-добро и задълбочено познание на реакцията на организмите и на възможните стратегии за справяне с проблеми, предизвикани от използването на CRISPRs, което може да доведе до толерантни към този инструмент фенотипове. Поради това тези проучвания показват, че познанията за генома и метаболитните пътища на различните резистентни и мултирезистентни бактерии следва да бъдат проучени, за да няма проблеми с резистентността в бъдеще във връзка с нови стратегии, използвани за борба с резистентните бактерии.

Разглеждайки различните възможности на операторите на CRISPR–Cas, можем да се стигне до заключението, че е налице необходимост от междудисциплинарни проучвания, при които се осъществява сътрудничество между учени от различни сфери.

Неочаквани ефекти при редактиране на гени

Въпреки че техниките за редактиране на гени често се описват като „прецизни“ в сравнение със стандартното генно инженерство, тези техники, също като стандартното генно инженерство, могат да причинят неволни промени в генетичния материал. Такива неволни промени или генетични грешки могат да доведат до неочаквани ефекти. Освен това, дори когато възникне предвидената промяна, е възможно да се появят и неочаквани ефекти, тъй като организмите, които са генно редактирани, могат да се държат в естествена среда по начин, различен от очакваното според лабораторните експерименти. **За съжаление напълно липсват проучвания относно възможните последствия за безопасността на храните и околната среда от неочакваните ефекти, произтичащи от процеса на редактиране на гени и/или от инженерно внесените черти.**

Неочаквани ефекти извън поставената цел

Един от основните начини, по които редактирането на гени може предизвика неточности и генетични грешки, е произвеждането на „нецелеви“ ефекти – промени в други гени, които не са умишлено предизвикани. Нецелевите ефекти могат

непреднамерено да изменят важни гени, което води до промени в химическия им състав или в производството на протеини. Нецелевите ефекти възникват вследствие на процеса на генно редактиране и настъпват на едно или повече непредвидени места с подобни ДНК последователности като целевият локус. По този начин генното редактиране причинява непреднамерена промяна на ДНК на непредвидено (нецелево) място. Честотата на появяване на нецелевите ефекти зависи от използваната техника и точния протокол за генно редактиране, но системата CRISPR-Cas9 изглежда е особено податлива на нецелеви ефекти. Такива нежелани ефекти са открити от много проучвания върху генно редактирани растения, например ориз, соя и пшеница. Нецелевите ефекти също така са причина за безпокойство при генно редактираните селскостопански животни като прасета и едър рогат добитък, а такива ефекти са открити също и при генно редактирани клетки на мишки и хора. Въпреки това някои проучвания съобщават за липса на забележими нецелеви ефекти при генно редактираните животни. Възможно е това да се дължи на факта, че въпреки че нецелевите ефекти може да са налице, е трудно те да бъдат разграничени от естествените генетични вариации.

За да се оценят всички потенциални рискове, свързани с което и да е генно редактирано растение, животно, клетка или микроорганизъм, е важно всички нецелеви ефекти да бъдат напълно оценени, за да се определи дали са причинили някакви промени в химическия състав или в производството на протеини.

Неочаквани ефекти „в целта“

В допълнение към нецелевите ефекти редактирането на гени може да даде различен от очаквания резултат, дори когато планираната промяна се извършва на желаното целево място. Едно дребно вмъкване или заличаване в ДНК на даден ген, дори попаднало в целта, може да предизвика нежелани промени в начина, по който генът се „чете“ и преработва до протеини. Проучванията показват, че е възможно CRISPR неволно да предизвиква обширно заличаване и сложни реорганизации на ДНК. Зачиването и пренареждането на ДНК, причинени от CRISPR, могат да доведат до пропускане на важни части от гена (отговорни за кодирането при производството на протеини) при „прочитането“ на ДНК. Тази грешка в прочитането на ДНК има потенциала да произведе изменени протеини. Пример за подобни грешно прочетени протеини биха могли да са някои хранителни алергени, които по своята същност са протеини. Едно от важните опасения относно алергенността на протеините отдавна е в сила за ГМО, създадени чрез стандартните техники на генното инженерство. Например в САЩ генетично модифицираната царевица *Starlink* е одобрена само за храна на животни, а не за хора, поради опасения, че вмъкнатия ген за устойчивост на насекоми (Bt Cry9C) е потенциално алергенен.

Неправилното „прочитане“ на ДНК в генно редактирано растение, животно или микроорганизъм може да повлияе и върху биоразнообразието. Например, ако химическият състав на генно редактираният организъм бъде променен от погрешно прочитане на ДНК, то може да бъде произведено съединение, което е токсично. Подобни опасения по отношение на човешката, животинската и екологичната безопасност подсказват, че генно редактираните организми трябва да бъдат анализирани в търсене на всички ефекти „в целта“, а последиците от тях трябва да бъдат внимателно оценени.

Смущения в регулацията на гените

Освен че може да изменя ДНК на организма, редактирането на гени може да има **нежелано въздействие върху способността на организма да изразява или потиска други гени.** Гените в даден организъм се включват (експресират / *knock in*) и се

изключват (*knock out*) в различни части на организма и в различно време, съобразно и факторите на околната среда. Освен това гените взаимодействат един с друг като потискат или подсилват изражението си. Организирането на работата на гените в организма е част от сложна регулаторна мрежа. Но точният начин, по който работи тази регулаторна мрежа, е сложен и все още слабо разбран, както се вижда от последните постижения в познанията за това как се регулира генната експресия. В продължение на няколко десетилетия, например, преобладаващата теория в молекулярната биология бе, че всеки ген има една-единствена функция (т.е. произвежда един протеин), но сега вече е известно, че гените могат да имат по няколко функции и да си взаимодействат помежду си. По същия начин ДНК, която не произвежда протеини, се смяташе за „излишна“, но сега се смята, че голяма част от тази „излишна“ ДНК е важна за контролиране на генната експресия в геномите на микроорганизми, растения, животни и хора. **Вече се съобщава за неочакван отговор от клетъчната регулаторна мрежа по време на редактирането на гени.** Поради липсващи познания относно начина на регулиране на геномите не е възможно да се предскажат естеството и последиците от всички взаимодействия между (умишлено или неволно) изменения генетичен материал и други (нередигирани) гени в организма. Това означава, че редактирането на гени в ДНК може неволно да повлияе на функционирането на регулаторната мрежа на организма. Възможно е вследствие на това собствените (нередигирани) гени на организма да не се експресират така, както би трябвало, например в неподходящо количество, с погрешен състав или в неправилното време.

Както е видно от тези примери, разбирането на учените за генетиката и за това как се регулират гените е все още твърде условно. Дори генното редактиране да е „прецизно“, резултатите не винаги са точни. **Точно както всички генетично модифицирани организми, генно редактираните организми могат да проявяват неочаквани и непредвидими ефекти в резултат на непредвидени взаимодействия между променения генетичен материал, собствените (нередигирани) гени на организма и неговата регулаторна мрежа.** Всяко неочаквано и непредсказуемо въздействие може да доведе до промени в биохимичните пътища или в състава на протеините, които на свой ред засягат безопасността на храните, околната среда и човешкото и животинското здраве.

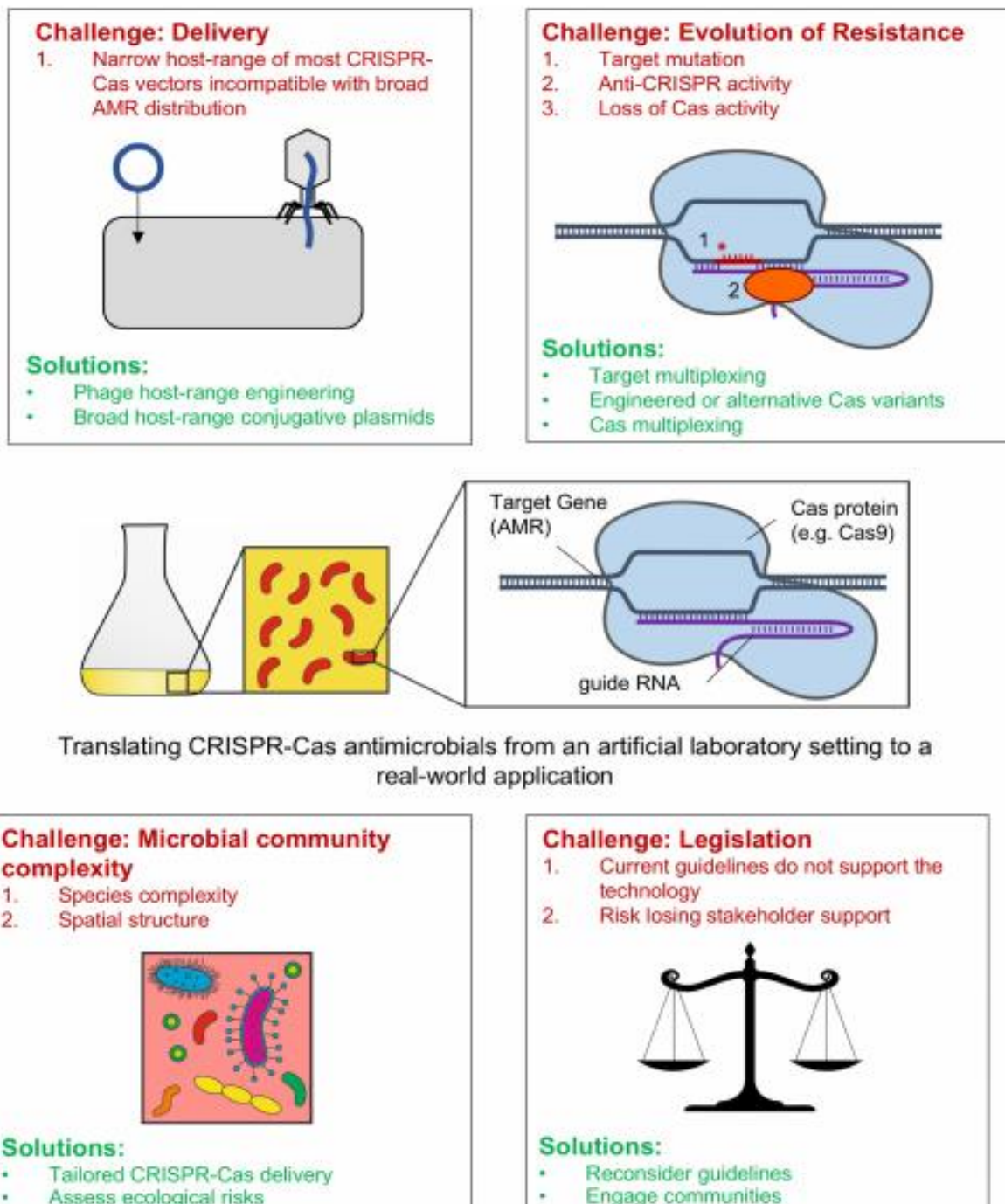
Планирано и непреднамерено вмъкване на ДНК:

В процес на разработка са много разновидности на редактирането на гени. Но, неизбежно, не всички вмъкнати ДНК могат да бъдат премахнати. Въпреки това не съществуват процедури (за безопасност или други) за оценка на тази възможност. В някои генно редактирани растения например ДНК касетата на CRISPR се вкарва в клетката на организма и извършва редактирането на гена без да се интегрира в генома на организма. Въпреки това въведените ДНК може непланирано да се интегрират на случаен принцип в генома на организма. Възможно е вмъкването на ДНК в генома на организма да е неточно. Независимо дали ДНК се добавя умишлено или не, множество копия и допълнителни фрагменти от ДНК касетата могат да бъдат въведени в генома на организма. Вмъкването на ДНК също така може да предизвика пренареждане на части от собствената ДНК на организма, както често се случва при стандартните генетично модифицирани култури. Въпреки че вмъкнатата ДНК може впоследствие да бъде отстранена, възможно е части от нея да останат незабелязани и така пренареждането на собствената ДНК на организма да продължи да съществува. Допълнителните фрагменти и пренарежданията на ДНК биха могли да доведат до неочаквани ефекти в генно редактираните организми, давайки повод за същите опасения като настоящите при ГМО. **Възможно е например редактирането на гени да има последици за безопасността на храните и околната среда, ако променя химическия състав (следователно**

токсичността) или протеиновия състав (следователно алергенността) на организма.

Потенциални ефекти на генетично редактираните организми върху биоразнообразието и околната среда:

Има много публикации за доказване на ефекта от генното редактиране, но нито един от потенциалните продукти от редактирането на гени не е изследван от гледна точка на значението на техните модифицирани характеристики (или неочакваните им ефекти) за околната среда и биологичното разнообразие. В научното познание по тези въпроси има големи пропуски.



Фигура 9: Систематизирани проблемите и потенциалните решения, свързани с използването на технологията CRISPR-Cas

Допълнителна информация за видовете бактерии, които са претърпели CRISPR-Cas генна редакция или друг вид такава би могла да бъде достъпена в сравнително новата база данни за CRISPR геномни редакции: <https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/crispr/> (фигура 10).

The screenshot shows the CRISPRdb website interface. At the top, it displays the logo for Université Paris-Sud XI and the I2BC logo. The main header includes the CRISPRdb logo and the date Wednesday September 23rd 2020. A navigation menu contains links for Home, About CRISPRs, News, FAQs, Help, Contact Us, Examples, and IGM. Below the navigation, there are several sections: 'Navigation' with links to Home page, CRISPRs database, Browse CRISPRs, BLAST CRISPRs, FlankAlign, CRISPRs utilities, My CRISPRs DB, CRISPRs finder, and CRISPRs comparison; 'Other Tools' with links to CRISPRcompar, CRISPRtionary, and CRISPRfinder; and 'GPMS Links' with links to GPMS Team, Tandem Repeats DB, and MLVA Web Service. A central text block provides a note about the RefSeq assembly accession starting from December 2016. Below this is a table with the following data:

| | Strains analyzed | CRISPRs found | Strains with convincing CRISPR(s) | Strains devoid of detectable CRISPRs |
|----------|------------------|---------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Archea | 232 | 870 | 202 | 30 |
| Bacteria | 6782 | 8069 | 3059 | 2065 |
| Total | 7014 | 8939 | 3261 | 2095 |

Below the table is a button that says 'Click on strain name to get more information.' Underneath, there is a section for 'Bacteria' with search filters and a list of results, including 'Deinococcus solis' Cha et al. 2014 GCF_001007995, 'Nostoc azollae' 0708 (1 CRISPR, 3 questionable structures), Acaryochloris marina MBIC11017 (1 CRISPR, 2 questionable structures), and Acetobacter acetii GCF_002005445.

Фигура 10 – Изглед на база данни за CRISPR геномни редакции

Нанотехнологиите в борбата с резистентните бактерии:

Съществуват и други видове методи за борба с антимикробната резистентност, както например нанотехнологиите, които все повече изместват фокуса от микро на нано ниво. С развитието на нанотехнологиите са извършени много проучвания относно **прилагането на наночастиците като антимикробни средства**. Тези наноматериали представляват различни по диаметър наночастици, наноструктури с различни начини на действие. Някои от тях са постигнали добри резултати, които показват, че нанотехнологията също може да се използва като една от стратегиите за борба срещу мултирезистентните бактерии в бъдеще.

Нанотехнологиите, приложени в синтеза на нови антибиотици, са важен подход, тъй като използването на материали с наноразмер може да доведе до по-плътен контакт между съединението и бактериите с подобрена бионаличност, увеличаване на абсорбцията, по-бързо преминаване на лекарството в клетката и по-добро прилепване.

Съществува също така възможност за създаване на **системи за контролирано освобождаване за прицелната доставка на капсулни или адсорбиращи се АМС** (Zaidi et al., 2017; Jamil, Imran, 2018). Сравнително нов подход е използването на наночастици от метал, като например сребро, които могат да повлияят на бактериалната дихателна система, предизвиквайки генериране на реактивни кислородни видове (ROS). Този подход може да се използва синергично с антимикробни средства, с ефекти като потискане и промяна на синтеза на клетъчната стена, както и разрушаване (Shahverdi et al., 2007; Kumar et al., 2018).

Едно от опасенията, свързани с използването на наночастици, е свързано с **резистентността**, която бактериите могат да проявят, или възможността за стимулиране на преноса на мултирезистентните гени (MDR). Пример за това е проучването на Ansari et al. (2014), където са използвани наночастици на „Al₂O₃“, за да се стимулира

горизонталното прехвърляне на MDR гените, като по този начин се повишава резистентността към антибиотици.

Използването на наночастици за елиминиране на микроорганизмите може да доведе до микробицидни или микростатични ефекти. Във втория случай растежът на бактериите се прекъсва и метаболитните дейности се преустановяват, като тогава микробиалното отмиране се предизвиква от имунните клетки на гостоприемника.

Нанотехнологията може също така да разреши проблеми, свързани с разтворимостта на АМС, тъй като изолирането може да подобри пропускливостта на мембраната, да увеличи времето за циркулация и да повиши ефективността, като същевременно има възможност за насочване на лекарството към желаня обект на действие в организма (*Rodzinski et al., 2016*).

Използването на наночастици има потенциал за лечение на инфекциозни заболявания, особено като се има предвид, че наночастиците могат да достигнат/достигнат места, където присъстват патогени. Съществуват обаче редица проблеми, като недостига на данни за токсичността, малко съществуващи предклинични изпитвания и необходимостта от законово регламентиране (*Zaidi et al., 2017*).

Полимерни наночастици и нанокристали

Употребата на полимерни наночастици като носители на АМС или употребата на лекарства от нанокристали, които са стабилни по време на преноса до таргетната цел, може успешно да се приложи към голям набор от широко използваните лекарства.

Полилактид-ко-гликолид (PLGA) е особено полезно вещество, което може да бъде използвано за нанотехнологична доставка на лекарства (*Kallipure et al., 2014; Hemeg, 2017; Boya et al., 2017; Shaaban et al., 2017*).

Hong et al. (2017) използва бацитрацин А (ВА), модифициран с PLGA за синтез на наноВА, водещ до структура на обвивката със среден диаметър от 150 nm. Установено е, че наночастиците са се увеличили значително по отношение на антибактериалната активност, отколкото свободните ВА, с ефективно потискане на растежа на различни видове бактерии - Грам+ и Грам-. Формулацията е осигурила подобро зарастване на раните при плъхове.

YU et al. (2016) отчита разработването на мултифункционална система за освобождаване с капсулиране на гентамицин сулфат/циркониев бис (моноксидроген ортофосфат) (a-ZrP) с хитозан (CHI). Формулировката (a-ZrP CHI) подобрява освобождаването на медикамента, отколкото ако нямаше капсулирана a-ZrP. Методологията осигурява модел за бъдещото развитие на нови преносни средства за доставка на активното вещество до таргетната цел.

Shaaban et al. (2017) отчита, че наноантибиотици, произведени чрез инкорпориране на имипенем в PLGA или PCL нанокапсули, дават по-добри резултати, отколкото класическият имипенем. Формулациите нанокапсули проявяват антибактериални и антиадхерентни свойства при изпитванията, като се използват клинични изолати на резистентни към имипенем бактериални щамове.

Други видове наночастици са липидните наночастици (липозоми) (*Derberi et al., 2019*) и нанокерамичните продукти, използвани при ортодонтски хирургични интервенции (*Kumar u Madhumathi, 2016*).

Gaspar et al. (2017) докладва за използването на твърди липиди, съдържащи рифабутин (RFB) за лечение на туберкулоза. Наночастиците са увеличили активността на лекарството срещу *M. tuberculosis*, което предполага, че RFB-твърдите липиди (SLN) биха могли да бъдат обещаващ подход за лечение на туберкулозата. Основното

предимство на капсулирането е, че той осигурява устойчиво отделяне на лекарството, което води до по-голяма ефективност на лечението, както и до по-лесно усвояване, което дава възможност да се постигнат задоволителни резултати с по-малко количество от активното вещество.

Въпреки че използването на наночастици може да бъде полезно, някои проучвания показват, че микросредата, в която те се освобождават, може да промени създаването на комплекса наночастици-патоген поради образуването на обвивка/нанослой около наночастицата. *Siemer et al. (2019)* доказват в проучванията си, че откритите наночастици се подлагат на различни бактерии и показват, че формирането на комплекс наночастица-патоген е благоприятствано от малкия му размер, но наличието на обвивка в значителна степен възпрепятства формирането на комплекса. Поради тези причини, в допълнение към *in vitro* анализите, са необходими нови проучвания, които анализират микросредата, в която наночастиците ще бъдат освободени и ще упражняват действието си.

Метални наночастици

Използването на метални наночастици може да бъде добър вариант в борбата с резистентните бактерии. Проучвания са правени с различни съединения като нанометали, метални оксиди, метални халогениди и материали от биметали, показващи антимикробна активност. Наночастици са синтезирани от Ag, Au, Zn, Cu, Ti и Mg, наред с други метали (*Zakharova et al., 2015; Hajipour et al., 2012; Sunitha et al., 2013; Dizaj et al., 2014; He et al., 2016; Senarathna et al., 2017; Eymard-Vernain et al., 2018*). Въпреки това, следва да се обърне внимание на потенциалната им токсичност (*Lima et al., 2012; Dakal et al., 2016; Duran et al., 2016a*).

В проучвания на *Eydmard-Vernain et al. (2018)* е посочено, че наночастиците, съдържащи MgO, проявяват бактерицидно действие, което засяга основно експресията на гени, свързани с оксидативния стрес, заедно с изменение на мембраните.

Verma et al. (2018) отчитат отлично антибактериално действие на наночастиците с ZnO, чието действие е пряко зависещо от размера им.

Други проучвания са изследвали бактерицидния потенциал на въглеродните нанотръбички за подпомагане на транспорта и транслокацията на антибиотици (*Cong et al., 2016; Mocan et al., 2017*).

Наночастиците са най-изучаваните материали относно антимикробната им активност, като ефективността им е призната от Администрацията по храните и лекарствата на САЩ (FDA) от 1920 г. насам. Механизмите за действие на сребърните наночастици (Ag наночастици) относно бактериите са предмет на изчерпателно разследване. Съществува консенсус, че адхезията на наночастиците към клетъчната мембрана може да доведе до електростатични промени, изменение на поръзността, разрушаване, изтичане на цитоплазмено съдържимо, смущения в бактериалните процеси на дишането, блокиране на ензимната активност и унищожаване на ДНК (*Choi & Hu, 2008; Duran et al., 2010; Pbhu & Pouloss, 2012; RAI et al., 2012; Kon & Rai, 2013; Yuan et al., 2017*).

Адхезията на наночастиците към бактериалните мембрани се извършва главно поради присъствието на протеоглигани (*Kim et al., 2017*) и води до разкъсване или до повишена поръзност на мембраната. Това дава възможност за лесен достъп на наночастиците в клетката, където могат да взаимодействат с ензими и ДНК (*Grigeva et al., 2013; Kasihevar et al., 2017*). Ag-наночастиците може също така да взаимодействат с мембранните протеини, което води до натоварване на клетките и стрес или могат да взаимодействат с липидната част на мембраната, като по това се отразява на тяхната флуидност (*Morones et al., 2005; Chwalibates et al., 2010*). Някои проучвания сочат, че наблюдаваните ефекти действително са причинени от сребърни йони, освободени от Ag-

наночастиците (*Jung et al., 2008; Xiu et al., 2011; Xiu et al., 2012; Chernousova & Eppa, 2013*). Съответно, Ag-наночастиците действат само като средство за предаване на йони, които причиняват неблагоприятни последици за дихателната верига и за синтеза на протеини, както и ДНК изменения (*Chen et al., 2011; LI et al., 2014*).

Биогенният синтез на сребърни наночастици е получил все по-голямо внимание през последните години. Тези наночастици демонстрират положителни характеристики по отношение на подобрената си стабилност и дисперсия, които се дължат на покритието, създадено по време на синтеза. Биогенният синтез се счита за прост, евтин и подходящ за производство на голямо количество наночастици метод (*Lima et al., 2012; Kasihevar et al., 2017*).

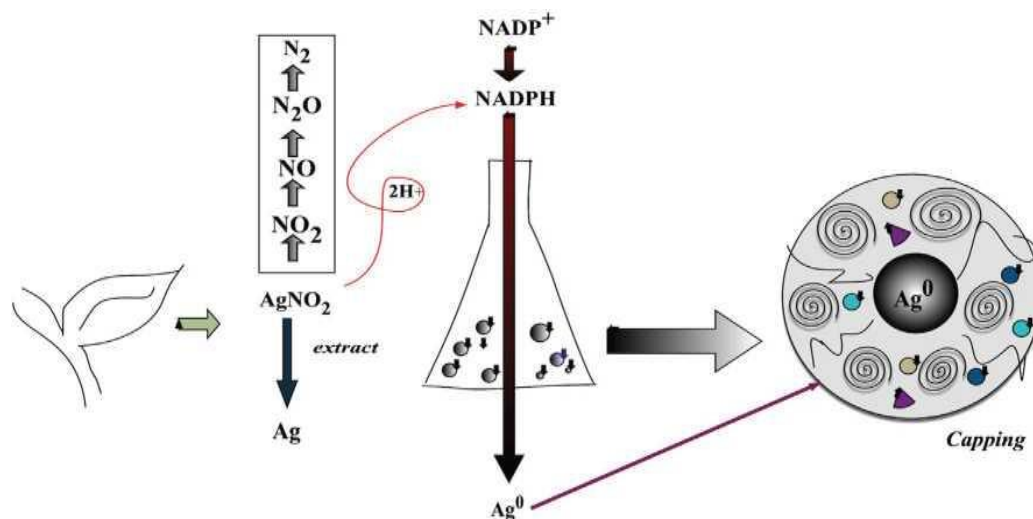
Установено е, че биогенните наночастици проявяват по-ниска токсичност, като същевременно осигуряват ефективно бактерицидно действие както срещу Грам–, така и срещу Грам+ бактерии (*Duran et al., 2016b; Kasihevar et al., 2017*). Тези наночастици също са показали потенциал на фунгицидно действие (*Balashanmgam & Kalastelchvan, 2015; Ahmad et al., 2016; Guilger et al., 2017*).

Наноклетки/Нанотръбички (*Nanocages*)

Наноклетките са кухи и поръзни наноструктури, които могат да бъдат използвани за транспортиране и доставяне на антибиотици. Те могат да бъдат синтезирани от различни вещества, включително метали, протеини и полимери, и са изследвани от гледна точка на потенциала им за борба с мултирезистентните бактерии. Докладваните предимства на тези структури са, че те осигуряват по-добра адхезия и задържане на мястото на прикрепване, както и увеличаване на проводимостта и добра биосъвместимост (*Wang et al., 2016; Mekeer et al., 2018*).

Wang et al. (2018) синтезира в проучванията си Au-наноклетки, които са с мембранна обвивка от макрофаги, предварително обработени със *S. aureus*. Клиничните проучвания, проведени с инжектиране локално или на системно ниво на този експериментален продукт, показват, че системата осигурява повишено бактерицидно действие.

Ruozi et al. (2017) са синтезирали апоферитин-базирани наночастици, които са използвани за капсуловане на стрептомицин. Системата е обещаваща за транспорт и доставяне на антимикробни средства, въпреки че все още се изискват допълнителни характеристики, биологична съвместимост и изследвания за ефикасност. Проучване на *Wu et al. (2019)*, използващи силиций, сребро и злато в наносферите, показва, че Au–Ag@SiO₂ системата има високо бактерицидно действие. Тази наносистема може да се използва за антибиотичен транспорт, както и за терапия с инфрачервена индукционна хипертермия за лечение на бактериална инфекция.



Фигура 11: Схема, илюстрираща синтеза на биогенните наночастици:

Бактериофаги

Бактериофагите (или фаги за краткост) са вируси, които инвазират само бактериалните клетки. Те са сред най-разпространените биологични единици с общо около 1,030 вида (*Chibani-Chennoufi и др., 2004*). Бактериофагите са потенциална алтернатива на антибиотичното лечение, като и се използват за допълване действието на настоящите антибиотици поради своите уникални способности да инвазират и убиват бактериите, особено тези, резистентни към антибиотици (*Hagens and Loessner, 2010; Human and Abedon, 2010; Summers, 2012*). Взаимодействието между бактериофагите и бактериите се осъществява посредством специфични рецептори, намиращи се във външните бактериални мембрани. Въпреки големия потенциал на фагите за лечение и/или контрол на инфекциите, причинени от резистентни към антибиотици бактерии, само няколко клинични изпитвания са проведени върху хора и са приети от органите в областта на общественото здраве, като FDA и Европейската агенция по лекарствата (EMA) (*Rios et al., 2016*).

Фагите са разпространени естествено в околната среда и са изключително специфични за определени бактериални видове, като действат като естествени хищници. Те лесно преодоляват клетъчната мембрана на бактериите и не влияят върху полезната чревна микрофлора (така че не насърчават вторични инфекции). Техният експоненциален растеж и изключително високи концентрации се наблюдават при наличие на бактериален гостоприемник. За максимален ефект при лечение с бактериофаги е от изключително важно значение първоначалното идентифициране и изолиране на патогенния бактериален причинител на инфекции, както и охарактеризиране и типизиране. При този алтернативен метод на справяне с резистентните бактерии, се наблюдават проблеми, свързани с това, че бактериофагите могат да бъдат разпознати от имунната система като чужди и да бъдат атакувани, което води до драстично намаляване на терапевтичната им ефикасност (*Chan & Abedon, 2012; Wittebole et al., 2013*).

Друг проблем при фаговата терапия е свързан с бактериалната устойчивост поради десорбцията, наличието на бактериална мембрана и унищожаването на вирусния генетичен материал чрез рестриктивните ендонуклеази (*Wittebole et al., 2013*).

След прилагане орално или по интравенозен път, тези препарати, съдържащи фагови частици, могат да засегнат основните системи на тялото, а именно сърдечносъдовата, храносмилателната, имунната и нервната система (*Moutinho et al., 2012*). Освен това поради своето естество на протеините фагите са податливи на

денатуриране чрез съответстващи промени, които могат да бъдат обратими или необратими, или да бъдат унищожени от имунната система. Едно от възможните решения на този проблем е капсулирането на фаговите частици в наноструктури (Rios et al., 2018), които са неразградими от ензимните и имунните системи на гостоприемниците или чрез свързването им в неразрушими системи (Balcao et al., 2013; Balco et al., 2014). Комбинацията от тези стратегии може да създаде бактериофаги, структурно и функционално стабилни (Balco u Vila, 2015), които да бъдат потенциално използвани за изкореняването на резистентни към антибиотици бактерии.

Няколко проучвания са описали техники, основаващи се на фагови частици като преносители на CRISPR-Cas системите, за предотвратяване на бактериална резистентност към лекарства (Barrangou, 2015; Bikard and Barrangou, 2017; Doss et al., 2017; Hatoum-Aslan, 2018; Pursey et al., 2018). При този подход, бактериофаги са проектирани да носят и доставят CRISPR-Cas на бактериите с цел борба срещу мултирезистентните бактерии. Такива системи се разработват от биотехнологични компании като *Locus Biosciences* (Morrisville, NC, USA) и *Eligo Bioscience* (Paris, France) (Reardon, 2017). Ето защо неотдашните биотехнологични нововъведения дават възможност за адаптиране на фаговите частици с цел подобряване на техните характеристики, включително и 1) повишаване на способността на фагите да проникват през бактериалните мембрани; 2) увеличаване на ефикасността на фагите; 3) разширяване на спектъра от действие, свързани с фаготипизиране, към инфекции, причинени от различни бактерии; 4) повишаване на стабилността и спецификата на фагите (Maura u Debarbieux, 2011; Rios et al., 2016; Harada et al., 2018).

В заключение, към настоящия момент, поради увеличаването на резистентността на бактериите към антибиотици, заедно с неефективността на антибиотичите в рамките на няколко години, съществува спешна необходимост от разработване на нови антимикробни стратегии. Това е нова ера, в която появата на нови решения и открития ще бъде от решаващо значение.

Бъдещи тенденции и възможни решения:

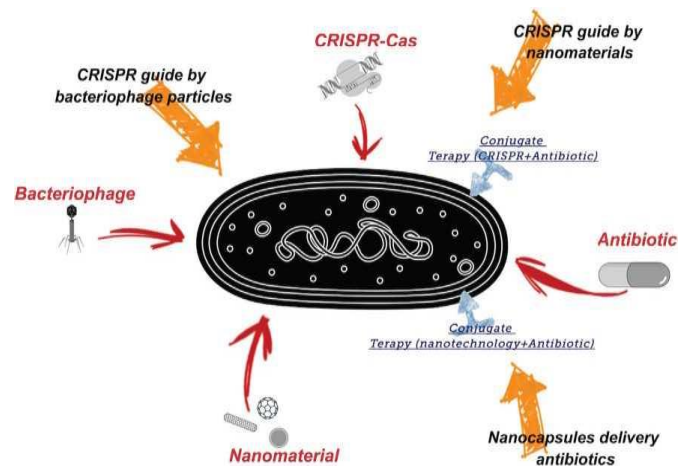
Използването на нови технологии за борба с мултирезистентните бактерии е още по-наложително, тъй като, въпреки че все още има ефикасни антибиотици, резистентността срещу тях непрекъснато се увеличава. Изложените в настоящия документ стратегии могат да осигурят нови начини за борба с мултирезистентните бактерии. Това би могло да включва комбинации между различните стратегии, както и използването им в съчетание с антибиотици, за да се противодейства на този критичен бързо растящ проблем.

Използването на сравнително **новата технология CRISPR** може да бъде едно от наличните решения. В съчетание с методите, основаващи се на нанотехнологиите биха могли да бъдат ефективно и работещо средство за борба с AMP. Нанотехнологиите самостоятелно са обещаващи също като стратегия в борбата с мултирезистентните бактерии. Биха могли да бъдат приложени и чрез синтеза на нанокапсули, които могат да бъдат програмирани за улеснение транспорта на CRISPRs.

Наночастици от биогенни метали, като сребърни наночастици, могат да бъдат вариант в конюгираните лечения за борба с мултирезистентните бактерии (MDR - multidrug resistant bacteria). Тези наночастици предлагат ползите от взаимодействието на метала и метаболитите на организма, използвани за тяхното производство. Те са с ниска токсичност и могат да действат за разбиване на съществуващите механизми на резистентност у бактериите.

Бактериофагите също може да се използват успешно за борба с мултирезистентни бактерии (MDR), но задачата не е проста и се изискват още доста лабораторни изпитвания, за да бъдат изчистени всички проблеми. Употребата на фагови частици като носители на CRISPRs изглежда по-бърза и по-ефикасна стратегия, макар че такава доставка невинаги може да бъде гарантирана. Неотдавнашни проучвания показват, че технологията на CRISPR може да помогне за модифицирането на бактериофаги, като ги направи по-специфични за конкретни бактериални патогени.

В заключение, едно по-задълбочено разбиране на тези иновативни терапевтични стратегии е от първостепенно значение. Докато тези нови стратегии бъдат овладени, структурирани и достъпни в търговската мрежа, е наложително да се контролира използването на наличните понастоящем АМС. От съществено значение е също така специалистите в областта на здравеопазването на хора и животни да използват разумно и само в краен случай новите антибиотици, които се разработват и вече са в крайна фаза на изпитване преди пускане на пазара в близко бъдеще, за да се предотврати появата и разпространението на бактериална резистентност и към тях.



Фигура 12 представя нови технологични инструменти за борба с мултирезистентните бактерии. Акцентът е поставен върху необходимостта да се използва повече от един инструмент.

Заклучение:

Макар усилената работа на учените и безбройните инвестиции в тези иновативни технологии, продължават да са налице много препятствия, които трябва да бъдат преодоляни, преди геномното редактиране и нанотехнологиите да може да бъде внедрени като рутинно и ефективно лечение при инфекции, причинени от патогенни бактерии и да се използват за борба с АМР особено при дивите микробни съобщества. Определянето на подходящ метод или група от стратегии, след обстойна оценка на риска и след години проведени лабораторни и полеви опити с бактериални видове (див и култивиран тип), за изпълнение на целта ще бъде от ключово значение за пълноценното използване на потенциала на тези нови геномни технологии за ограничаване на АМР в околната среда и клиничното разпространение на АМР.

Простотата на геномното редактиране и програмиране на системата CRISPR-Cas, ще повиши в голяма степен ефикасността, с която това може да бъде постигнато. Такъв аванс може да има благоприятни последици за справяне с източниците на резистентност и потенциално да спомогне за запазване или възстановяване на противомикробната активност и ефективността на АМС.

Необходимо е да се проучат и оптимизират бъдещите изследвания на тези стратегии и да се анализират рисковете, свързани с употребата им. Освен това социалните и законодателните предизвикателства, свързани с широкото използване на технологията за редактиране на гени, изискват активна ангажираност с общностите и разработване на ясни насоки за регламентиране на неговата отговорна и безопасна употреба. Трябва да бъдат строго регламентираните стандартни оперативни процедури за тези технологии, както и трябва да бъде строго детерминиран обхватът им на действие и приложение.

Използвана литература:

- Sorek, R., Lawrence, C. M., and Wiedenheft, B. (2013). CRISPR-mediated adaptive immune systems in bacteria and archaea. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 237–266. doi: 10.1146/annurev-biochem-072911-172315
- Bikard, D., Euler, C. W., Jiang, W., Nussenzweig, P. M., Goldberg, G. W., Duportet, X., et al. (2014). Exploiting CRISPR–Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat. Biotechnol.* 32 (11), 1146–1150. doi: 10.1038/nbt.3043
- Hsu, P. D., Lander, E. S., and Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR–Cas9 for genome engineering. *Cell* 157 (6), 1262–1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010
- Goma, A. A., Klumpe, H. E., Luo, M. L., Selle, K., Barrangou, R., and Beisel, C. L. (2014). Programmable removal of bacterial strains by use of genome-targeting CRISPR–Cas systems. *MBio.* 5 (1), e00928–00913. doi: 10.1128/mBio.00928-13
- Citorik, R. J., Mimee, M., and Lu, T. K. (2014). Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat. Biotechnol.* 32 (11), 1141–1145. doi: 10.1038/nbt.3011
- Yan, M., Wen, J., Liang, M., Lu, Y., Kamata, M., and Chen, I. S. Y. (2015). Modulation of gene expression by polymer nanocapsule delivery of DNA cassettes encoding small RNAs. *PLoS ONE* 10 (6), e0127986. doi: 10.1371/journal.pone.0127986
- Fuente-Núñez, C., and Lu, T. K. (2017). CRISPR–Cas9 technology: applications in genome engineering, development of sequence-specific antimicrobials, and future prospects. *Integr. Biol.* 9, 109–122. doi: 10.1039/c6ib00140h
- Gorski A, Miedzybrodzki R, Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Lobočka M, Fortuna W, Letkiewicz S, Zimecki M, Filby G. 2009. Bacteriophage therapy for the treatment of infections. *Curr Opin Investig Drugs* 10: 766 –774.
- Pursey, E., Sünderhauf, D., Gaze, W. H., Westra, E. R., van Houte, S. (2018). CRISPR–Cas antimicrobials: challenges and future prospects. *PLoS Pathog.* 14 (6), e1006990. doi: 10.1371/journal.ppat.1006990
- Insertion sequences in the CRISPR-Cas system regulate horizontal antimicrobial resistance gene transfer in *Shigella* strains - Shuaiyin Chen, Huiying Liu, Wenjuan Liang, Lijuan Hong, Bing Zhang, Lu Huang, Xiangjiao Guo, Guangcai Duan. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.09.020
- The bacterial ribosome as a target for antibiotics - Jacob Poehlsgaard & Stephen Douthwaite, *Nature Reviews Microbiology* volume 3, pages870–881(2005)
- Wang, C., Wang, Y., Zhang, L., Miron, R. J., Liang, J., Shi, M., et al. (2018). Pretreated macrophage-membrane-coated gold nanocages for precise drug delivery for treatment of bacterial infections. *Adv. Mater.* 30 (46), e1804023. doi: 10.1002/adma.201804023

• Wang, Y., Wan, J., Miron, R. J., Zhao, Y., and Zhang, Y. (2016). Antibacterial properties and mechanisms of gold–silver nanocages. *Nanoscale* 8 (21), 11143– 11152. doi: 10.1039/C6NR01114D

• Wang, Y., Wang, S., Chen, W., Song, L., Zhang, Y., Shen, Z., et al. (2018). CRISPR–Cas9 and CRISPR-assisted cytidine deaminase enable precise and efficient genome editing in *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (23), e01834–01818. doi: 10.1128/AEM.01834-18

• Hullahalli, K., Rodrigues, M., and Palmer, K. L. (2017). Exploiting CRISPR–cas to manipulate enterococcus faecalis populations. *Elife* 6, e26664. doi: 10.7554/ eLife.26664

• Zaidi, S., Misba, L., and Khan, A. U. (2017). Nano-therapeutics: a revolution in infection control in post antibiotic era. *Nanomedicine* 13 (7), 2281–2301. doi: 10.1016/j.nano.2017.06.015

• РЕДАКТИРАНЕТО НА ГЕНИ: Рискове за здравето и околната среда – преводен доклад от Д-р Джанет Котер от Logos Environmental, Великобритания и Дана Перлс, Friends of the Earth U.S. - http://foe.org/wp-content/uploads/2018/09/FOE_GenomeEditingAgReport_final.pdf, <https://www.zazemiata.org/resources/topics/%d0%b3%d0%bc%d0%be/>

• Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? - Kira S. Makarova, Yuri I. Wolf, and Eugene V. Koonin, <https://www.liebertpub.com/doi/full/10.1089/crispr.2018.0033>

Изготвил:

Красимира Захариева,

Главен експерт в дирекция ОРХВ към ЦОРХВ

28.09.2020 г.