

## معرفی ویژگی‌های اندولیزین به عنوان جایگزین برای آنتی‌بیوتیک

فروش مجلسین<sup>۱</sup> (M.Sc Student)، شمس‌الضحی ابوالمعالی<sup>۲</sup> (Ph.D)، شکبیا درویش علیپور آستانه<sup>۳\*</sup> (Ph.D)، نوشین بیجاری<sup>۴</sup> (Ph.D)

۱- دانشکده بیوتکنولوژی، پردیس علوم و فناوری نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۸

Darvishalipour@semnan.ac.ir

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۳-۳۱۵۳۲۲۸۸

### چکیده

ظهور سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به یک بحران جهانی برای سلامت عمومی تبدیل گردید. نگرانی‌های بسیاری در مورد افزایش سویه‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو وجود دارد، به طوری که برخی از بیماری‌ها به طور موثر قابل درمان نیستند. بنابراین، نیاز فوری به توسعه جایگزین‌هایی برای آنتی‌بیوتیک‌های معمولی در درمان انسان و حیوانات وجود دارد. فعالیت ضدباکتریایی اندولیزین‌ها به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک، در برابر پاتوژن‌های باکتریایی متعدد مورد توجه هستند و در زمینه‌های مختلف کاربردی از جمله دارو، ایمنی غذا و کشاورزی طیف وسیعی از فعالیت را نشان می‌دهند. چندین ویژگی از این آنزیم‌ها، از جمله فعالیت بالا آن‌ها، به دلیل وجود دو حوزه کاتالیزوری، در ساختار آن است که احتمال ایجاد مقاومت را بیش‌تر کاهش می‌دهد و این یافته که آن‌ها با سایر عوامل ضد میکروب هم‌افزایی دارند، مکانیسم اثر و نوع فعالیت لیتیک آن‌ها بهره‌برداری بیش‌تر از آن‌ها را به عنوان عوامل ضدباکتری با ارزش و قوی برای درمان عفونت‌ها پشتیبانی می‌کند. در این بررسی ساختار و مکانیسم اثر اندولیزین و همچنین مزایای آن به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک و مشکلاتی که در این زمینه وجود دارد، بیان شده است. در ادامه کاربردها و پیشرفت‌های اندولیزین بررسی و اندولیزین‌های جدید مهندسی شده به منظور غلبه بر محدودیت‌های موجود معرفی گردید.

واژه‌های کلیدی: اندولیزین، آنتی‌بیوتیک، جایگزین، فاژتراپی، مهندسی پروتئین

### مقدمه

الگوهای مقاومت به چند دارو در باکتری‌های گرم مثبت و منفی منجر به پیدایش عفونت‌هایی شده است که با استفاده از داروهای معمول ضد میکروبی به سختی درمان می‌شوند یا حتی غیر قابل درمان هستند، و در صورت همراهی با عملکردهای ضعیف در کنترل عفونت، باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توانند به راحتی در بین سایر بیماران و محیط پخش شوند. به عبارتی کمبود داروهای موثر، وجود تنها چند آنتی‌بیوتیک جدید در مسیر بالینی و عدم اقدامات موفقیت‌آمیز در پیشگیری از بیماری نیاز به توسعه گزینه‌های درمانی جدید ضد میکروبی را افزایش داده است [۲،۳،۴].

یکی از روش‌هایی که دانشمندان برای مقابله و حل این مشکل به کار گرفته‌اند، استفاده از اندولیزین فاژ به جای آنتی‌بیوتیک‌ها است. باکتریوفاژها، همه‌گیرترین ارگانیسم‌های روی زمین و ویروس‌هایی هستند که به میزبان باکتریایی برای فعالیت خود نیاز دارند. هر نوع ویروس معمولاً سلول‌های گونه خاصی را می‌تواند آلوده سازد و به صورت اختصاصی عمل می‌کند. اندولیزین‌ها یکی از این آنزیم‌های

مسئله مقاومت آنتی‌بیوتیکی و اهمیت یافتن راه‌کارهای درمانی جایگزین. یکی از بزرگ‌ترین دستاوردهای بشر در قرن بیستم کشف آنتی‌بیوتیک بود. موفقیت آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های عفونی، علم پزشکی مدرن را متحول کرد ولی در شرایط کنونی آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت نادرست و نابه‌جا در درمان میکروب‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، میکروب‌های مقاوم به داروهای آنتی‌بیوتیکی در همه جا توزیع شده‌اند، حساسیت ضد میکروبی در بسیاری از بیماران مبتلا به عفونت باکتریایی وجود ندارد و بروز عفونت ناشی از عوامل بیماری‌زای مقاوم به دارو در حال افزایش است [۱].

منطبق با مستندات سازمان غذا و دارو در ایالت متحده تخمین زده می‌شود، هر سال نزدیک به ۲ میلیون نفر در بیمارستان به عفونت مبتلا می‌شوند که منجر به مرگ نزدیک به ۹۰۰۰۰ نفر می‌شود. بیش از ۷۰ درصد باکتری‌هایی که باعث این عفونت‌ها می‌شوند حداقل به یکی از آنتی‌بیوتیک‌هایی که به طور معمول برای درمان استفاده می‌شوند مقاوم هستند.

۱۹۲۳ و مؤسسه ایمنی‌شناسی و درمان تجربی لودویک هیرزفلد که در سال ۱۹۵۲ در لهستان تأسیس شد. در فاز درمانی انسان از فازها برای درمان بیماری‌هایی از جمله تیفوئید، اسهال خونی، عفونت‌های پوستی و زخم جراحی، سپتی سمی، عفونت‌های دستگاه ادراری و عفونت گوش خارجی استفاده شد [۷]. امروزه، کم‌تر از یک قرن پس از کشف آنتی‌بیوتیک‌ها، مراقبت‌های بهداشتی به دلیل مقاومت ضد میکروبی با تهدید بزرگی مواجه است. این بحران نیازمند توسعه فوری، استانداردهای و اجرای راهکارهای درمانی جدید علیه بیماری‌های عفونی است و فاز درمانی در سال‌های اخیر بار دیگر کانون توجه قرار گرفته است. گسترش فاز درمانی با مشخص شدن زیست‌شناسی فاز، ژنتیک، ایمنی‌شناسی و داروشناسی تسهیل شده است [۸].

مزایا و ضرورت جایگزین کردن فاز درمانی با درمان‌های سنتی وابسته به آنتی‌بیوتیک. استفاده از فاز دارای مزایای بسیاری نسبت به آنتی‌بیوتیک در درمان سنتی است، جداسازی فاز سریع، نسبتاً ساده و ارزان است، مقاومت در برابر فاز حدود ده برابر کندتر از مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد می‌شود، فاز تحت شرایط بسیار سخت محیطی عفونی باقی می‌ماند و تا زمانی که تراکم جمعیت باکتری میزبان به طور قابل توجهی کاهش یابد، تمایل به تکثیر دارد، به تجویز با دوز کم‌تر یا محدودتری برای درمان نیاز است، بیش‌تر فازهای جدا شده تا به امروز در اتصال به میزبان خود ویژگی نسبتاً اختصاصی دارند. این مزیت فاز خطر آسیب رساندن به میکروبیوتای طبیعی بدن انسان و از بین بردن عوارض جانبی مرتبط با آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی را کاهش داده است. فازها به طور عمده از پروتئین و DNA تشکیل شده‌اند و با تزریق به بدن بیمار در نهایت تخریب می‌شوند. تخریب ذرات فاز، برخلاف آنتی‌بیوتیک‌هایی که می‌توانند به کبد آسیب رسانند و منجر به نارسایی در عملکرد اندام‌ها شوند، تولید مولکول‌های سمی نمی‌کند [۹،۱۰]. درمان با آنتی‌بیوتیک آسیب جانبی همراه دارد، در مقابل فاز درمانی به طور مستقیم باکتری‌های بیماری‌زا را هدف قرار می‌دهد و فاقد عوارض جانبی است. آخرین مزیت فاز درمانی تطبیق‌پذیری آن است. به دلیل تنوع ژنتیکی، فراوانی و فراگیر بودن آن‌ها منبع نامحدودی از فازها وجود دارد. علاوه بر این، در فاز درمانی، فاز را می‌توان از طریق روش‌های مختلفی به بدن میزبان تزریق کرد، که هر روش با نوع عفونت و ویژگی‌های فیزیولوژی بیمار سازگار است [۸].

تجاری‌سازی محصولات مبتنی بر فاز. تعدادی از محصولات فازی برای کنترل برخی از عوامل بیماری‌زا مورد

رمزگذاری‌شده‌ی فاز هستند که در انتهای چرخه‌ی لیتیک باکتری‌فاز تولید و با تجمع در سیتوپلاسم باکتری میزبان، پیوندهای پپتیدوگلیکان را در دیواره سلول شکسته و باعث ترکیدگی سلول و آزادسازی فاز به محیط می‌شوند. فعالیت زیستی اندولیزین‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است، زیرا آن‌ها قادرند سلول هدف را چند ثانیه پس از تماس لیز کنند و در نتیجه باعث ایجاد سوراخ‌هایی در دیواره باکتری شوند که منجر به تحلیل و از بین رفتن تعادل اسمزی آن شود. هدف از این پژوهش معرفی اندولیزین به عنوان یک ضد میکروبی جدید جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های مقاوم به چند دارو است [۴،۳].

فاز درمانی. فاز درمانی به عنوان تجویز مستقیم فازهای لیتیک به بیمار با هدف لیز کردن عامل بیماری‌زا باکتریایی که باعث عفونت بالینی می‌شود، تعریف شده است. در این روش اصطلاحات مونوفاز و پلی‌فاز درمانی به ترتیب مشخص می‌کنند که یک فاز منفرد یا ترکیبی از فازها در طول فاز درمانی به‌کار می‌رود. طراحی آزمایش در محیط‌های آزمایشگاه و یا مدل‌های حیوانی، استفاده از یک فاز و آماده‌سازی فاز در طول درمان است ولی ممکن است، سودمندی درمان با یک فاز در حوزه بالینی با ظهور مقاومت باکتری به فاز مورد استفاده مختل شود. هم‌چنین در این نوع درمان نیاز به تطابق دقیق بین عامل بیماری‌زا و فاز وجود دارد که این تطابق معمولاً در محیط آزمایشگاهی انجام می‌شود، فعالیت باکتری‌کشی فاز در شرایط آزمایشگاهی و در بدن موجود زنده ممکن است همیشه یکسان نباشد. برای حل این مشکلات استفاده از چندین فاز به طور هم‌زمان برای درمان پیشنهاد گردید که این روش را می‌توان برای هدف قرار دادن یک سویه باکتریایی، سویه‌های متعدد از یک گونه باکتری منفرد یا چندین گونه طراحی کرد. استفاده از مخلوط فازها به طور هم‌زمان به فرآیندهای آماده‌سازی و خالص‌سازی طولانی‌تر و پیچیده‌تری نیاز دارد. اولین گزارش‌ها در مورد اثربخشی فاز درمانی در یک دوره کوتاه‌مدت، با استقبال گسترده مواجه شد، که در ادامه با معرفی آنتی‌بیوتیک‌های جدید با طیف اثر گسترده‌تر و محدود بودن تحقیقات در زمینه فاز‌تراپی، استفاده از فاز برای درمان کم‌رنگ شد، ولی کار فاز درمانی به طور کامل رها نشد. در مناطقی مانند گرجستان بخشی از اتحاد جماهیر شوروی سابق و لهستان، فاز درمانی به طور پیوسته رونق گرفت. برخی از بزرگ‌ترین مؤسسات اختصاصی به فاز درمانی عبارتند از: مؤسسه باکتری و فاز میکروبی‌شناسی و ویروس‌شناسی الیاوا که توسط میکروبیولوژیست گرجی جورج الیاوا در سال

استفاده تجاری قرار گرفته‌اند. این محصولات برای استفاده ایمن شناخته شده‌اند. شرکت‌هایی که در زمینه تولید محصولات فاز فعال هستند، همراه با محصول تولیدکننده به طور مختصر در جدول ۱ ارائه گردید [۱۰].

جدول ۱. شرکت‌های تولید کننده محصولات مبتنی بر فاز

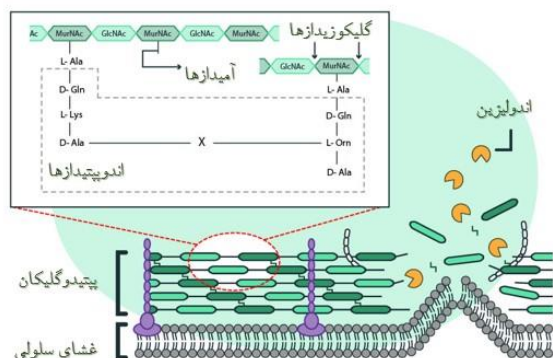
کاربرد	محصول	نام شرکت تولید کننده
محصول مبتنی بر باکتریوفاز برای جداسازی و غنی‌سازی با استفاده از باکتری‌ها از نمونه‌های خام بانک فاز و استفاده در کاربردهای فاز درمانی و امنیت زیستی به عنوان مثال باسیلوس آنتراسیس.	حسگر زیستی PDS	شرکت داروسازی بیوفاز (کانادا)
خوراک دام برای کنترل سالمونلا گالیناروم در پرندگان و سالمونلا پولوروم در طیور.	بیوتکتور	شرکت چیلدینگ (کره جنوبی)
کنترل آلودگی اشرشیا کلی O157:H7 و لیستریا مونوسیتوزنز در مواد غذایی.	اکوشیلد و لیست شیلد	اینترالایتیکس (ایالت متحده آمریکا)
نابودی سویه‌های لیستریا مونوسیتوزنز در محصولات غذایی.	لیستکس P100	میکرئوس (هلند)
SASPject PT1.2: مراحل بالینی اولیه علیه استافیلوکوکوس اورئوس حساس به متی‌سیلین، SASPject PT3.1: مراحل پیش بالینی به منظور استفاده سیستمیک علیه سودوموناس آئروژینوزا و SASPject PT3.X: به منظور استفاده سیستمیک در برابر باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیا کلی.	تحويل ژن‌های کوچک پروتئین اسپور محلول در اسید به باکتری‌های هدف با استفاده از ناقل‌های باکتریوفاز اصلاح شده	فیکو تراپتیکس (انگلستان)

مدولار (چند دامنه) مشخص می‌شوند که دارای دامنه فعال آنزیمی در سمت N - ترمینال و دامنه اتصال‌دهنده دیواره سلولی در سمت C- ترمینال است. دامنه فعال آنزیم (EAD)، آنزیم‌های واقعی را نشان می‌دهد و تجزیه دیواره سلولی را کاتالیز می‌کند. این دو دامنه توسط یک ناحیه اتصال‌دهنده کوتاه و انعطاف‌پذیر به یکدیگر مرتبط می‌شوند (شکل ۱). بیش‌تر دامنه‌های اتصال دیوار سلولی (CBD)، با شناسایی مولکول‌های لیگاند مرتبط با دیواره سلولی خاص، آنزیم‌ها را به سمت مکان فعال خود هدایت می‌کنند. در مقابل اندولیزین‌های موثر بر یک میزبان گرم منفی تک دامنه هستند و از یک دامنه فعال آنزیمی در سمت N- ترمینال تشکیل شده‌اند. مطالعات اخیر وجود اندولیزین‌های فاز موثر بر باکتری‌های گرم منفی با پیکربندی کروی را نشان داد که دارای یک یا دو CBD در N- ترمینال هستند در حالی که EAD در C- ترمینال قرار گرفته است، که یک جهت‌گیری معکوس از ساختار رایج اندولیزین‌ها است. مطابق با شکل ۲، با توجه به مکان برش EAD شش فعالیت آنزیمی مرتبط با پروتئین‌های لیتیک فاز وجود دارد که در سه دسته قرار گرفته است: دسته اول گلیکوزیدازها شامل فعالیت N - استیل - $\beta$ -D- گلوکوزآمینیدازها و N - استیل - $\beta$ -D- مورامیداز که پیوند (۱-۴)  $\beta$  در بخش قند دیواره سلولی باکتری را هیدرولیز می‌کند. دسته دوم آمیدازها شامل فعالیت N - استیل مورامیل -I- آلانین آمیداز که پیوند آمیدی در بخش قند دیواره

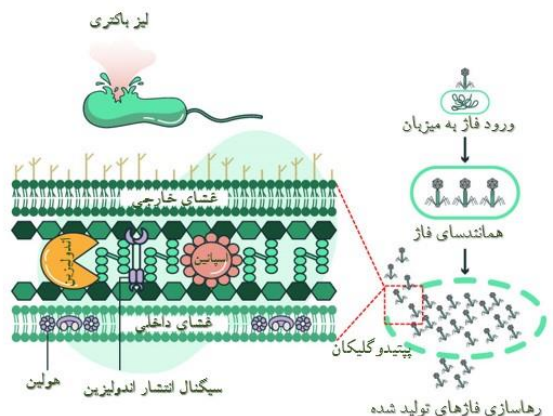
استفاده از اندولیزین فاز به عنوان یک محصول فاز. به طور کلی در استفاده از باکتریوفازها به عنوان ترکیبات درمانی از آنزیم‌های چرخه‌ی لیتیک فاز استفاده می‌شود. آن‌ها دارای آنزیم‌های لیتیک مختلفی هستند که می‌توانند خاصیت ضد میکروبی داشته باشند. اندولیزین اصطلاحی عمومی است که برای توصیف طیف وسیعی از هیدرولازهای پپتیدوگلیکان، در پایان چرخه لیتیک در سلول‌های آلوده به فاز از ژنوم باکتریوفاز رمزگذاری و سنتز می‌شوند. این آنزیم‌ها به عنوان لیزوزیم فاز، لیزین، آنزیم‌های مورالیتیک یا مورئولیتیک نیز شناخته می‌شوند. آنزیم‌های رمزگذاری شده توسط باکتریوفازها را با توجه به مکانیسم عملکرد به دو کلاس هیدرولازها و لیاها تقسیم می‌کنند، که هر دو منجر به تجزیه پلی‌ساکاریدهای دیواره کربوهیدراتی، به الیگوساکاریدهای محلول می‌شوند. آنزیم‌های هیدرولاز که توانایی تخریب پوشش پپتیدوگلیکان باکتری را دارند؛ اندوپیتیداز شامل لیزوستافین، آمیداز و گلیکوزیداز هم‌چون گلوکوزآمینیداز و مورامیداز مانند لیزوزیم نامیده می‌شوند که از اجزای ضروری چرخه زندگی فاز لیتیک و جایگزین امیدوارکننده برای آنتی‌بیوتیک‌ها هستند [۸،۲،۱۱].

ساختار اندولیزین. ساختار اندولیزین‌ها با منشا باکتری میزبان آن‌ها تعیین می‌شود و اکثر اندولیزین‌ها با وزن مولکولی ۱۵ تا ۴۰ کیلو دالتون به دو دسته طبقه‌بندی می‌شوند. لیزین موثر بر یک میزبان گرم مثبت به طور کلی با یک ساختار

یا حفره‌های بزرگی را ایجاد می‌کنند، که از طریق آن اندولایزین‌ها از غشا عبور کرده و باعث نابودی سلول می‌شود. در حالت دوم، نابودی زمانی شروع می‌شود که بین‌هولین بتواند با ایجاد کانال‌های کوچک به کمک دیپلاریزاسیون غشا، اندولایزین ترشح شده را فعال و آماده حمله به پپتیدوگلیکان کند. منطبق با یافته‌های جدید، وجود اسپانین، یکی دیگر از پروتئین‌های نابودی در تخریب غشای خارجی سلول باکتری لازم است [۱۲، ۱۳].



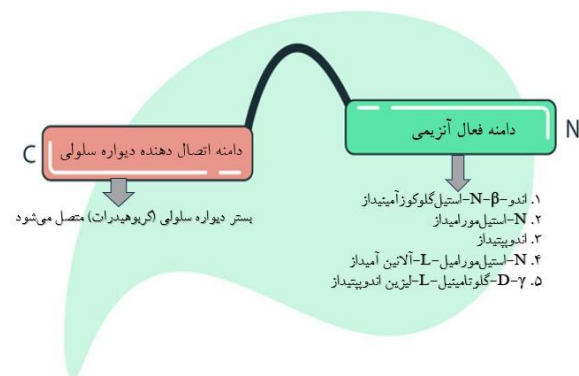
شکل ۲. نمایش ساختار دیواره سلولی باکتریایی که محل‌های برش اندولیزین در هر قسمت از دیواره سلولی پپتیدوگلیکان بر اساس فعالیت آن مشخص شده است [۴۴، ۴۵].



شکل ۳. مکانیسم عملکرد اندولیزین فاز، اندولیزین به کمک پروتئین‌های هولین و اسپانین پپتیدوگلیکان، غشای داخلی و خارجی باکتری‌های گرم منفی را تخریب کرده و باعث نابودی سلول و آزاد شدن فازهای جدید تکثیر یافته می‌شوند [۱۲].

اندولیزین‌های موثر بر باکتری‌های گرم منفی. اندولیزین‌ها تا حد زیادی در برابر باکتری‌های گرم منفی بی‌اثر هستند، مانع اصلی در عدم توانایی این پروتئین‌ها در عبور از غشای خارجی باکتری است. برای حل این مشکل، چندین روش از جمله استفاده از عوامل تجزیه‌کننده غشا و هم‌جوشی ابتدا و انتهای حوزه‌های پروتئینی لیزین‌ها با غشا، در عبور از غشا

سلولی باکتری را هیدرولیز می‌کند. دسته سوم اندوپپتیداز که پیوند بین دو اسید آمینه را در بدنه پپتید پپتیدوگلیکان هیدرولیز می‌کنند، فعالیت‌هایی که بر پیوندهای بین پل بین پپتیدی تأثیر دارد و آن‌هایی که در پیوند بدنه و پل بین پپتیدی شکاف ایجاد می‌کنند. دامنه اتصال (CBD) از مفیدترین خواص اندولیزین است، زیرا این امکان را فراهم می‌کند که عوامل بیماری‌زا، مستقیماً بدون تأثیر بر فلور طبیعی هدف قرار گیرد [۱۲].



شکل ۱. ساختار اصلی لیزین فاز، دامنه فعال آنزیمی (کاتالیزوری) در سمت N-ترمینال که یکی از پنج پیوند اصلی پپتیدوگلیکان را می‌شکند و دامنه اتصال سلولی در سمت انتهایی C-ترمینال، که به ترکیبات کربوهیدرات در دیواره سلولی متصل می‌شود. این دو دامنه توسط یک اتصال دهنده به یکدیگر متصل می‌شوند [۴۳].

ساز و کار عملکرد اندولیزین. مطابق با شکل ۳ اندولیزین‌ها به طور یکنواخت با هدف قرار دادن مستقیم پیوندهای پپتیدی در لایه پپتیدوگلیکان دیواره سلول باکتریایی معرفی می‌شوند. در باکتری‌های گرم مثبت دیواره سلولی باکتری حاوی پپتیدوگلیکان به عنوان جز اصلی و متشکل از تکرار دی ساکارید زنجیره‌های N-استیل مورامیک اسید و N-استیل گلوکز آمین است، که با پیوندهای گلیکوزیدی  $\beta(1-4)$  مرتبط هستند. نتیجه این فعالیت تخریب لایه سخت مورثین و آزادسازی ویروس‌های تازه تکثیر شده از طریق لیز دیواره سلولی باکتری است. در باکتری‌های گرم منفی به دلیل وجود غشای خارجی به طور کلی، یک مدل سه مرحله‌ای از نابودی میزبان باکتریایی وجود دارد. این مدل از سه پروتئین به نام‌های اندولیزین، هولین و اسپانین تشکیل شده است. این پروتئین‌ها به ترتیب روی پپتیدوگلیکان، غشای داخلی و غشای خارجی باکتری اثر گذار است. در حالت متعارف، در یک دوره زمانی برنامه‌ریزی شده از نظر ژنتیکی و با استفاده از یک سیگنال خاص (غلظت بحرانی موثر در هولین و دیپلاریزاسیون جزئی غشا)، مونومرهای هولین در فاصله زمانی کمی به شکل لیگومرها تجمع یافته و ضایعات غشایی

مزیت اصلی استفاده از اندولایزین‌ها در مقابل فاز کامل، حذف ماده ژنتیکی فاز از درمان است، بنابراین احتمال وقوع هرگونه انتقال ژنتیکی که قبلاً با فاز نشان داده شده بود، از بین رفته است. این امر ممکن است به پذیرش نظارتی روش‌های درمانی جدید کمک کند. علاوه بر این، اندولایزین‌ها بی‌خطر محسوب می‌شوند. بعید است که مقاومت ایجاد کنند، زیرا نقاط هدف اندولیزین بر دیواره باکتری بسیار حفاظت شده است و به تعداد محدود مکانیسم‌های مقاومت احتمالی در برابر عوامل موثر بر دیواره سلول وجود دارد. همچنین امکان طراحی مدولار و استفاده از مهندسی ترکیبات ضد میکروبی وجود دارد [۱۷].

مقاومت در برابر اندولایزین‌ها. اندولایزین‌ها به عنوان یک عامل درمانی مقاوم در نظر گرفته می‌شوند، زیرا در مقاومت باکتریایی، ویژگی خاص تاثیرگذاری آنزیم برای گونه یا جنس باکتریایی، مزایای متعددی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع فراهم کرده است. همچنین تکامل فازها هم‌راستا با باکتری میزبان مزایای بسیاری دارد، مانند توانایی اتصال و فعالیت حفظ شده و احتمال نادر جهش در مکان‌های اتصال که مقاومت در برابر اندولایزین‌ها را به یک رویداد استثنایی تبدیل کرده است. همچنین با وجود مکانیسم‌های اصلی مقاومت در برابر ترکیبات ضد میکروبی در داخل سلول، استفاده خارج سلولی از اندولایزین‌ها و قرار گرفتن پپتیدوگلیکان در سمت خارج سلول، احتمال گسترش مقاومت را محدود کرده است. در نتیجه جهت تقویت فعالیت درمانی و کاهش احتمال وجود مقاومت سیستماتیک در باکتری‌ها ممکن است از اندولایزین‌های متعدد در ترکیب با سایر ضد میکروب‌ها مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتریوسین‌ها یا اسیدهای آلی استفاده شود [۱۸].

فارماکوکینتیک و فارماکودینامیک اندولایزین. در مورد اثربخشی اندولایزین‌ها علیه باکتری‌ها تحقیقات زیادی در حال انجام است، فارماکوکینتیک را می‌توان به عنوان آنچه بدن روی یک داروی خاص انجام می‌دهد، توصیف کرد. در حالی که فارماکودینامیک در مورد تأثیرات دارو بر بدن بحث می‌کند. همه این عوامل جنبه‌های مهمی برای تایید استفاده درمانی یک دارو هستند. در یک مطالعه در سال ۲۰۱۸ مقدار حساسیت‌زایی دو اندولایزین که استریتوکوک پنومونه را هدف قرار می‌دهند، بررسی گردید و هیچ سطح قابل توجهی از سمیت نشان داده نشد [۱۳].

ایمنی‌زایی اندولایزین. نتایج حاصل از ارزیابی‌های ایمنی‌زایی تا به امروز ایده استفاده از اندولایزین‌ها را به عنوان یک درمان بالقوه تایید می‌کند اما تحقیقات بیشتری در این

خارجی گزارش شده است. یک معماری غیرمعمول برای اندولایزین‌های موثر بر باکتری گرم منفی، استفاده از اندولایزین‌های مدولار شامل دامنه فعال آنزیمی در حوزه انتهایی C و دامنه اتصالی در حوزه انتهایی N است، زیرا اکثر آن‌ها پروتئین‌های کروی تک دامنه هستند. سایر عوامل نفوذپذیری غشای خارجی که در ترکیب با اندولایزین فاز موثر هستند، شامل افزودن هم‌زمان عوامل بی‌ثبات‌کننده غشا مانند نمک اتیلن دی آمین تترا استیک اسید دی‌سدیم (EDTA) یا پپتیدهای کاتیونی مانند پلی-ال-آرژنین است که می‌تواند باعث لیز سلول‌های باکتری شود. علاوه بر این، ترکیب اندولایزین‌ها با فشار هیدرواستاتیک بالا می‌تواند به طور موقت غشای خارجی را نفوذپذیر کرده و از دسترسی آنزیم‌ها به بستر آن‌ها پشتیبانی کند [۱۵].

مزایای استفاده از اندولایزین نسبت به آنتی‌بیوتیک. استفاده از اندولایزین‌ها در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها دارای مزایای بسیاری است. یکی از مهم‌ترین مزیت‌های آن عملکرد سریع است، به طوری که وقتی یک بیمار دچار عفونت تحت درمان با آنتی‌بیوتیک قرار می‌گیرد، چند ساعت طول می‌کشد تا ارگانیسیم‌ها لیز گردد، در حالی که درمان با اندولایزین ظرف چند دقیقه باکتری‌ها را حذف می‌کند. در نتیجه با درمان اندولایزین شانس زنده ماندن بسیار بیشتر از آنتی‌بیوتیک است. مزایای دیگر شامل اثر در برابر سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و بیوفیلیم‌ها، خطر بسیار کم برای ایجاد مقاومت، و طیف وسیع‌تر میزبان (شامل چندین گونه از یک جنس) است، حفظ میکروفلور طبیعی، موثر بر باکتری‌های مقاوم به چند دارو، هم‌افزایی با سایر عوامل ضدباکتری و موثر در تخریب بیوفیلیم‌ها از مهم‌ترین مزایای استفاده از اندولایزین‌ها در رابطه با کاربرد ضد باکتریایی آن است. اندولایزین‌ها در صنایع غذایی نیز مزیت‌های دیگری نسبت به استفاده از ترکیبات ضد میکروبی که از گذشته به طور سنتی استفاده می‌شود مانند اسیدهای آلی ارائه می‌دهند، زیرا آن‌ها باعث تغییر در طعم، قوام یا بافت غذاها نمی‌شوند. علاوه بر این، ساختار مدولار آن‌ها امکان مهندسی آسان و کارآمد را فراهم کرده است. این مزایا در سال‌های اخیر باعث موفقیت اندولایزین‌ها و مشتقات مهندسی آن‌ها در مراحل کارآزمایی پیش بالینی و بالینی شده و آن‌ها را در رده امیدوارکننده‌ترین ترکیبات ضد میکروبی، جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های معمولی قرار داده است [۱۲، ۱۵].

مزایای استفاده از اندولایزین نسبت به فاز کامل. استفاده از اندولایزین‌ها دارای مزایایی نسبت به فازهای کامل نیز است. برخلاف باکتریوفازها، اندولایزین‌ها لزوماً به کشت باکتریایی که به طور فعال در حال رشد است نیاز ندارند.

می‌تواند فعالیت لایزین را به‌طور بالقوه کاهش دهد. در آزمایشات برون‌تنی و درون‌تنی هنگامی که مقدار آنتی‌بادی در سرم خرگوش ایمن در برابر لایزین پنوموکوک Cpl-1 افزایش یافت، مشخص گردید که فعالیت کشندگی در شرایط برون‌تنی کند است، ولی مسدود نیست. نتایج مشابهی با لایزین‌های باسیلوس آنتراسیس و استرپتوکوک پیوزنز نیز مشاهده شد. بررسی نتایج آزمایش درون‌تنی نشان داد که در پنج مورد از شش مورد، موش‌هایی که سه دز وریدی Cpl-1 دریافت کرده‌اند، مقدار آنتی‌بادی IgG علیه آنزیم بالا است ولی بر مقدار فعالیت اثر مهاری متوسط دارند. در یک مطالعه روی لایزین‌های لیستریا، Ply118 و Ply500، نشان داده شد، تمایل حوزه اتصال C-terminal به هدف آن در دیواره سلول در محدوده نانومولار است، که شبیه به میل اتصال مولکول IgG برای آنتی‌ژن می‌باشد. اگرچه لایزین‌ها می‌توانند یک پاسخ ایمنی ایجاد کنند، اما این پاسخ فعالیت آن‌ها را خنثی نمی‌کند و یا مانع استفاده از آن‌ها به عنوان ضد باکتری در درمان عفونت‌های سیستمیک نمی‌گردد [۱۹].

کاربرد اندولیزین‌ها. از اندولیزین‌ها در زمینه‌های مختلف از جمله در صنایع غذایی، کشاورزی، صنعت و پزشکی استفاده می‌شود. در جدول ۲ تعدادی از اندولیزین‌های شناسایی شده علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی آمده است.

زمینه باید انجام شود تا اطمینان حاصل گردد که کلاس‌های مختلف لایزین خطر قابل توجهی برای میزبان ایجاد نمی‌کنند. از آنجایی که لایزین‌ها سلول‌های پستانداران را آلوده نمی‌کنند، نباید خطرات سمی بالقوه برای انسان و حیوانات ایجاد کنند. این نظریه با درمان موفقیت‌آمیز بالینی عفونت‌های سیستمیک با لایزین در مدل‌های موش تایید گردید و هیچ نشانه‌ای از سمیت مشاهده نشد. همچنین مشخص شد که لایزین درمانی موضعی، سیستمیک یا داخل وریدی هیچ‌گونه عوارض جانبی مضر، غیرطبیعی تحریک‌کننده در آزمایشات پیش بالینی در داخل بدن ندارد. همچنین اندولایزین‌ها با سیستم ایمنی میزبان تعامل برقرار می‌کنند و باعث القای آنتی‌بادی‌هایی می‌شوند که معمولاً از یک داروی پروتئینی انتظار می‌رود، اما مطالعات تا به امروز تأثیر منفی این سری از ترکیبات را بر افراد تحت درمان نشان ندادند. همچنین حضور این آنتی‌بادی‌ها بر مقدار اثربخشی درمان نیز تأثیری نداشته است. یکی از مزایای واضحی که اندولایزین‌ها نسبت به هم‌تایان سنتی خود دارند، اختصاصی بودن آن‌ها نسبت به میزبان است. عملکرد هدفمند اندولایزین‌ها باعث می‌شود که یک پاتوژن منفرد در بین گروهی از باکتری‌ها انتخاب شود و از کشته شدن بی‌هوده سایر فلورها جلوگیری گردد [۱۳].

لایزین در صورت استفاده از طریق مخاط یا سیستماتیک، قادر به تحریک پاسخ ایمنی (آنتی‌بادی‌ها) است. این پاسخ

جدول ۲. خصوصیات تعدادی از اندولیزین‌های شناسایی شده

مرجع	نوع کاتالیز	نام پروتئین فاز	میزبان فاز	نام فاز	نوع باکتری میزبان
[۴۶، ۴۵]	آمیداز	PlyC	استرپتوکوکوس پیوزنز	فاز C1	گرم مثبت
[۴۸، ۴۷]	آمیداز	Pa1	استرپتوکوکوس پنومونیه	فاز Dp-1	گرم مثبت
[۵۰]	پپتیداز، لیزوزیم	HydH5	استافیلوکوکوس اورئوس	vB_SauS_φIPLA88	گرم مثبت
[۵۱، ۵۰]	ال-آلانوفیل-دی-گلوتامات پپتیداز	Ply500	لیستریا مونوسیتوژنز	فاز φA500	گرم مثبت
[۵۳]	لیتیک ترنس گلیکوزیلاز	EL188	سودوموناس آئروژینوزا	فاز EL	گرم منفی
[۵۴]	آمیداز	KP32gp15	کلبسیلا پنومونیه	فاز KP32	گرم منفی
[۵۵]	پپتیداز	LysT5	اشرشیاکلی	فاز T5	گرم منفی
[۵۴]	لیتیک ترنس گلیکوزیلاز	P2gp09	اشرشیاکلی	فاز P2	گرم منفی

امکان‌پذیر باشد. در نتیجه اندولیزین مشتق شده از فاژ و CBD آن نامزدهای امیدوارکننده کنترل و تشخیص سریع باکتری‌های بیماری‌زا هستند [۲۱].

اندولیزین‌ها در زیست فناوری. به دلیل عملکرد اختصاصی اندولایزین‌ها، از آن‌ها در کنترل زیستی بدون تاثیر بر فلور طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرد. واضح‌ترین روش استفاده در کنترل زیستی عوامل بیماری‌زا در غذا و خوراک، افزودن مستقیم آنزیم تصفیه شده به غذا یا محصول خام است. یک گزینه جایگزین ارزان و مناسب، تولید و ترشح اندولایزین‌های خاص توسط باکتری‌های تخمیرکننده لاکتوکوکوس لاکتیس است که در این مورد، دیواره سلولی باکتری میزبان نباید نسبت به اندولیزین حساس باشد. در مقابل، هدف برخی از برنامه‌ها ایجاد خود تخریبی است که با واسطه سلول‌های حامل ژن‌های اندولیزین انجام می‌شود که قادر به تخریب خود هستند [۲۲].

اندولیزین‌ها می‌توانند به عنوان لنگر برای قرار گرفتن پروتئین‌های دیگر بر روی سطح باکتری‌ها استفاده شوند. به عنوان مثال، دامنه‌های اتصال سلولی در اندولیزین می‌توانند در کنار پروتئین‌های دیگر مانند آنتی‌ژن‌ها در سطح باکتری قرار بگیرند، به طوری که ساختار و فعالیت را نیز حفظ کنند. از باکتری‌های اسید لاکتیک برای سیستم‌های نمایش در سطح بر اساس اندولایزین فاژ استفاده می‌شود. ریبلز و همکاران نشان دادند که افزودن آنتی‌ژن برون‌زای E7 دارای برچسب هیستیدین (جهت خالص‌سازی پروتئین) از ویروس پایپلومای انسانی نوع ۱۶، روی سطح باکتری اسید لاکتیک به کمک حوزه اتصال به دیواره سلولی اندولیزین فاژ لاکتوباسیلوس کاسی A2 به عنوان لنگر، از موش‌ها در برابر HPV-16 محافظت می‌کند. در این روش امکان تثبیت بسیار بالا آنتی‌ژن E7 روی سطوح باکتری اسید لاکتیک وجود داشت. بنابراین این نوع سیستم، برای هدایت بیش‌تر پروتئین‌های درمانی به سطح باکتری‌ها روشی ایمن و کم‌هزینه است [۲۲، ۲۳].

#### اندولیزین در کشاورزی

یک کاربرد نه چندان شناخته شده، ولی جالب تولید گیاهان تراریخته است، که ژن‌های اندولایزین فاژ را بیان می‌کنند. این گیاهان با هدف دستیابی به مقاومت در برابر باکتری‌های بیماری‌زا طراحی شده‌اند. نمونه اولیه آن سیب‌زمینی تراریخته که لیزوزیم T4 را بیان می‌کند و قادر به حفاظت در برابر آسیب‌های ناشی از عامل بیماری‌زا است. هم‌چنین مشخص شده است که خیساندن گلابی نارس در لیزهای سلول‌های اشرشیاکلی بیان‌کننده اندولیزین فاژ FFe1h باعث تاخیر و یا جلوگیری از تشکیل پوکه و بافت

اندولیزین در صنایع غذایی. نیاز به روش‌های جدید جهت پیشگیری بهتر از بیماری‌های ناشی از مواد غذایی وجود دارد. مشکلات در نابودی عوامل بیماری‌زا در سطح تولید، ماندگاری آن‌ها در محیط و پیامدهای جدی آن‌ها برای سلامتی انسان و حیوان مشخص است. به عنوان مثال، لیستریا مونوسیژنوز برای زنده ماندن در شرایط مختلف محیطی از جمله pH کم (زیر ۶)، نمک زیاد (۱۰-۲۰) درصد و دمای پایین (۱ درجه سانتی‌گراد) به خوبی سازگار است. علاوه بر این، میزان مرگ و میر بالایی در ارتباط با بیماری‌های ناشی از غذا با این باکتری گزارش شده است. هم‌چنین نگرانی ویژه برای غذاهای آماده وجود دارد. بنابراین، به منظور افزایش ایمنی و ماندگاری غذاهای آماده، تولیدکنندگان به اثر ضد میکروبی مواد نگهدارنده شیمیایی مانند لاکتات، نیترات و پروبیونات و سایر مواد از جمله داروهای ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی، عصاره‌های گیاهی، باکتریوسین‌ها، باکتریوفاژها و آنزیم‌های لیتیک آن‌ها نیاز دارند. ولی با تقاضای مصرف‌کننده برای غذاهایی که دارای حداقل فراوری و حاوی مواد طبیعی و بی‌خطر هستند، جست‌وجو برای شناسایی مواد نگهدارنده که بی‌خطر در نظر گرفته شود، افزایش یافته است. ثابت شده است که اندولایزین‌ها اثر ضد میکروبی موثری برای مهار رشد عوامل بیماری‌زا ناشی از غذا در سیستم‌های غذایی متعدد دارند [۲۰].

تشخیص سریع عوامل بیماری‌زا در غذا. آلودگی ناخواسته غذا توسط باکتری‌های بیماری‌زا در هر نقطه از زنجیره تولید مواد غذایی می‌تواند رخ دهد. بنابراین چندین فناوری تشخیص برای عوامل بیماری‌زای قابل انتقال از غذا معرفی شده است که شامل: روش تشخیص بیوشیمیایی متداول با استفاده از محیط انتخابی خاص، تشخیص با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مبتنی بر DNA، روش تشخیص ایمنی با استفاده از آنتی‌بادی و اخیراً فناوری مبتنی بر اندولیزین فاژ توسعه یافته است. حوزه اتصال دیواره سلولی اندولیزین (CBD) برای اتصال به دیواره سلول میزبان خاص در گونه‌ها یا حتی سطح سویه است. این CBDها دارای حساسیت بالا، هزینه تولید پایین از طریق بیان ژن مولکولی و زمان تشخیص بسیار کوتاه هستند. بنابراین، این روش جدید تشخیص با استفاده از CBD امکان شناسایی و نظارت بر عوامل بیماری‌زای خاص در غذاها را در زمان کوتاه فراهم کرده است. هم‌چنین CBD دارای برچسب فلورسنس ممکن است برای تشخیص سریع و حتی اندازه‌گیری غلظت مواد غذایی خاص استفاده شود. علاوه بر این تولید انبوه و ارزان آن ممکن است با استفاده از سیستم بیان و تخلیص در اشرشیاکلی

داده شد که اندولیزین فاز LambdaSa2 و چندین اندولیزین فاز لاکتوباسیلوس قادر به لیز کردن سوبه‌های لاکتوباسیل، استافیلوکوک یا استریتوکوک در شرایط تخمیر هستند [۲۷].

اندولیزین و سیستم تحویل دارو با فناوری نانو. با توجه به افزایش مکانیسم‌های مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های تجاری متعدد، رژیم‌های درمانی سنتی نیاز به بازنگری و تبدیل به استراتژی‌های جدید دارند. نانوذرات اکنون به‌طور گسترده برای انتقال عوامل درمانی مانند داروهای ضد سرطان به سلول‌های یوکاریوتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. هم‌چنین امکان هدف‌گیری موثر در سلول‌های باکتریایی را نیز فراهم کرده است. از آن‌جا که می‌توان سطح نانوییتیدهای مختلف را اصلاح کرد تا از طریق گروه‌های مختلف عملکردی با مولکول‌های زیستی ترکیب شود، می‌توان از این ذرات به عنوان حامل کارآمد استفاده کرد. امکان دستیابی به سطوح مهندسی یا فضای داخلی نانوذرات با فلئورسازها به منظور دستیابی در تشخیص کمی عامل بیماری وجود دارد. با استفاده از این ویژگی‌ها به صورت ترکیبی، نانوذرات می‌توانند هم‌زمان تشخیص و درمان عفونت‌های باکتریایی را بهبود بخشند. با هدف افزایش کارایی درمانی، می‌توان از یک یا چند ویژگی ریخت‌شناسی و ضدباکتریایی نانوذرات که شامل استفاده از آن‌ها به عنوان عوامل نفوذپذیر غشا و عوامل متمرکزکننده دارو برای انتقال موثر ضد میکروبی به سلول‌های باکتریایی استفاده کرد، که امکان ایجاد اثرات چند ظرفیتی را از طریق بسته‌بندی مواد ضد میکروبی در سطح نانوذرات فراهم می‌کند. برخی از نانوذرات، مانند آن‌هایی که از مس، نقره و سلیسیم تشکیل شده‌اند، دارای خواص ضد میکروبی ذاتی هستند که با استفاده از اثرات هم‌افزایی، می‌توان با ترکیب یا پوشش دادن آن‌ها با مواد خاص ضدباکتری، این ویژگی‌ها را افزایش داد و یا بهبود بخشید. به عنوان مثال چندین گزارش افزایش تاثیر ضد میکروبی آنزیم‌های لیتیک در ترکیب با نانوذرات نقره علیه عوامل بیماری‌زای مختلف باکتریایی توصیف کرده‌اند. در تحقیقی به منظور جلوگیری از عفونت‌های باکتریایی مبتنی بر تماس در کاربردهای سطحی نانومواد از آنزیم لیتیک فاز Ply500 مبتنی بر فاز استفاده شد. برای فرآیندهای زیست فناوری، اندولیزین‌ها باید با ماندگاری و فعالیت طولانی روی سطوح بی‌اثر شوند. در مطالعه ذکر شده، بی‌حرکتی Ply500 بر روی ذرات سیلیس در مقیاس نانو نیز انجام شد، که Ply500-SNP نام گرفته است و مورد تأیید سازمان غذا و دارو ایالت متحده است. پایداری این ترکیب در هر دو درجه حرارت ۴ و ۲۵ درجه سلسیوس اثرات ضد میکروبی آن را بهبود بخشید و یک گام به جلو هنگام ترکیب Ply500-SNP با

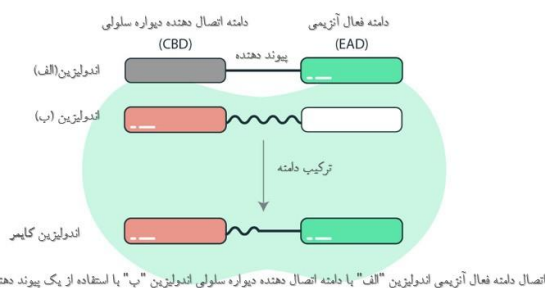
مردگی ناشی از اروینیا کاروتورا شد، که مکانیسم عملکرد مشابه لیزوزیم T4 است [۲۴،۲۵].

اندولایزین‌ها به عنوان عوامل درمانی. معرفی اندولیزین‌های جدید به عنوان یک عامل درمانی و جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در دوره افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک در حال افزایش و پیشرفت هستند تا به امروز اندولیزین‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است، که در برابر تعدادی از عوامل بیماری‌زای کشنده از جمله استریتوکوکوس پنومونیه، استریتوکوک آگالاکتیه، مایکوباکتریوم، سودوموناس آئروژینوزا و اسپینتوباکتریومانی موثر است. استفاده از هیدرولازهای پیتیدوگلیکان رمزگذاری شده باکتریوفاژ به عنوان عامل ضد میکروبی جدید با کاربردهای بالینی رویکرد امیدوارکننده‌ای برای درمان بیماری‌های عفونی است. پتانسیل آنزیم‌های لیتیک فاز برای اولین بار در سال ۲۰۰۱ برای جلوگیری و درمان کلونیزاسیون باکتری عامل عفونت دستگاه تنفسی فوقانی در موش‌ها توسط استریتوکوک‌های گروه A آزمایش شد. پس از ۲ ساعت از مصرف لیزین PlyC در حیوانات، هیچ باکتری مشاهده نشد. متعاقب این کار، مطالعات متعددی اثر آنزیم‌های لیتیک فاز را برای کنترل عفونت‌های مختلف پنوموکوکی مانند ذات‌الریه نشان دادند. هم‌چنین نتایج قابل توجهی در درمان عفونت‌های باسیلوس آنتراسیس که یک عامل بیماری‌زا و بسیار سمی برای انسان است، به‌دست آمد. به‌طور کلی، پروتئین‌های لیتیک رمزگذاری شده باکتریوفاژ به عنوان درمانی در برابر عوامل بیماری‌زای مقاوم به چند دارو مفید و موثر به نظر می‌رسند. این آنزیم‌ها هم‌چنین می‌توانند به عنوان ضد عفونی‌کننده وسایل پزشکی برای جلوگیری از عفونت‌های بعد از جراحی استفاده شوند. اما قبل از گسترش استفاده از آن‌ها در درمان عفونت انسانی، لازم است آزمایشات بالینی به منظور بررسی اثرات این پروتئین‌ها روی سیستم‌های انسانی از جمله تعیین پاسخ ایمنی به این عوامل پروتئینی انجام شود [۲۶،۲۷].

اندولیزین در صنعت. اندولیزین در تولید مواد زیستی، برای ایجاد اختلال در سلول‌ها و تسهیل پردازش در پایین دست استفاده می‌گردد. این روش از نظر اقتصادی امکان‌پذیرتر و کنترل آن آسان‌تر از روش‌های سنتی اختلال سلول است. به‌علاوه، از اندولایزین‌های فاز برای استخراج DNA، RNA و پروتئین از باکتری‌ها استفاده شده است. دو کاربرد اخیر آنزیم‌های لیتیک، کنترل رشد باکتری‌ها در تخمیر زیستی و در آزمایش‌های تشخیصی است. آلودگی کشت‌های تخمیر توسط باکتری لاکتیک اسید باعث کاهش بازدهی اتانول و ضرر اقتصادی در تولید سوخت زیستی می‌شود. در مطالعه‌ای نشان



است که ترکیب این دو فعالیت کشندگی ده برابر بالاتر از فعالیت هر دو به تنهایی نشان داد [۳۳]. همچنین تغییرات در ویژگی از جمله گسترش طیف لیتیک یک اندولیزین می‌تواند با تبادل یا افزودن یک دامنه اتصال سلولی در بین گونه‌ها یا حتی ویژگی جنس اندولیزین بومی حاصل شود. گزارش دیگری، طراحی و ساخت اندولیزین مهندسی شده استافیلوکوک را توصیف می‌کند، که سه نوع فعالیت کاتالیزوری منحصر به فرد را در هم‌جوشی پروتئین‌های منفرد ترکیب کرده است، در نتیجه از ایجاد سویه‌های مقاوم جلوگیری گردید. علاوه بر مثال‌های ذکر شده، مهندسی مولکولی اندولیزین‌ها منجر به ایجاد سازه‌هایی با افزایش میل اتصال برای دیواره سلول، افزایش حلالیت و تغییر بهینه در مقاومت یونی شده است [۳۴].



شکل ۴: راهکارهای مهندسی ساختارهای مدولار لیزین فاژ نشان داده شده است. دامنه‌های فعال آنزیمی (EAD) اندولیزین A و B (مستطیل‌های سبز و سفید) به دامنه‌های اتصال سلولی (CBD) خود (مستطیل‌های خاکستری و قرمز) از طریق پیوند دهنده، متصل شده‌اند. یک اندولیزین کایمر مهندسی شده را می‌توان با ترکیب دامنه با استفاده از حوزه فعال آنزیمی اندولیزین A و حوزه اتصال سلولی اندولیزین B به کمک پیوند دهنده مناسب ایجاد کرد [۵۶].

تولید و تجاری‌سازی محصولات مبتنی بر اندولیزین. شرکت کانترافاکت، لیزین‌هایی علیه استافیلوکوکوس اورئوس در میزبان اشیریشیاکلی تولید کرده است که به راحتی می‌تواند به شکل فعال خالص شوند. ترکیب تولید شده توسط این شرکت با نام CF-301، با همکاری فیشتی و همکارانش در راکفلر ساخته شد. CF-301 اولین عامل از کلاس لیزین است که در ایالات متحده، به عنوان یک درمان سیستمیک برای باکتری‌می و اندوکاردیت ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس وارد فاز دوم کارآزمایی بالینی شده است. ویژگی‌های بارز CF-301 شامل هدفمند و سریع بودن در برابر طیف وسیعی از ایزوله‌های استافیلوکوکوس اورئوس از جمله آن‌هایی که به آنتی‌بیوتیک‌های معمولی مقاوم هستند، فعالیت ضد بیوفیلم قوی، تمایل کم برای ظهور مقاومت و هم‌افزایی با آنتی‌بیوتیک‌های ضد استافیلوکوک معمولی و فعالیت

یک فیلم پلی‌هیدروکسی اتیل متاکریلات توانست سلول‌های لیستریا را در دمای ۴ درجه سلسیوس به طور کامل از بین ببرد، بنابراین به عنوان پوشش ضدباکتری در پردازش یا ذخیره‌سازی مواد غذایی در سرما کاربرد دارد. به طور کلی پیوندهایی که توسط اندولیزین‌ها مورد هدف قرار گرفته و هیدرولیز می‌شوند فقط در دیواره سلول‌های باکتری وجود دارند. اگرچه اندولیزین‌ها برای انجام عملکرد صحیح از داخل بر روی سلول‌های آلوده طراحی شده‌اند، اما هنگامی که از خارج بر روی سلول‌های باکتری اعمال می‌شوند به همان اندازه کارایی دارند و از آن‌ها می‌توان در کاربردهای مختلف زیستی، درمانی و صنعتی استفاده کرد [۲۸،۲۹].

مهندسی اندولیزین‌ها، آنزیم‌های کایمر و لیزین‌های نسل بعدی اندولیزین‌ها و مشتقات آن‌ها در سال‌های اخیر به عنوان یک کلاس جدید از ترکیبات ضد میکروبی معرفی و هم‌اکنون وارد مراحل کارآزمایی بالینی شده‌اند. عملکرد سریع و ماهیت پروتئینی این ترکیبات آن‌ها را از آنتی‌بیوتیک‌ها متمایز کرده است. اگرچه اندولیزین‌ها نتایج امیدوارکننده‌ای در مورد اثرات ضدباکتریایی نشان دادند، سطوح بیان ضعیف و یا نامحلول بودن آن، استفاده از اندولیزین‌های فاژی بسیار فعال را محدود کرده است. علاوه بر این، شناسایی یک اندولیزین جدید نسبتاً دشوار است، زیرا اکثر اندولیزین‌های هدفدار دارای ترکیبات دامنه مشابهی هستند و حفاظت بالایی در توالی اسید آمینه را نشان می‌دهند. برای غلبه بر این مشکلات، برخی از گروه‌های تحقیقاتی توالی‌های کوتاه یا کایمر لیزین‌ها را طراحی کرده‌اند. ساختار مدولار در حوزه‌های عملکردی اندولیزین گرم مثبت به ما این اجازه را می‌دهد تا برای تولید اندولیزین‌های کایمر، این نوع آنزیم‌ها از طریق تعویض دامنه با خواص برتر مهندسی شود (شکل ۴). تلاش‌های گسترده‌ای از طریق مهندسی پروتئین، به منظور اصلاح حلالیت و سایر خصوصیات فیزیکوشیمیایی این آنزیم‌ها انجام گرفته است، که باعث افزایش طیف فعالیت آنزیم‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی مقاوم در برابر دارو شد. همچنین فعالیت عوامل بیماری‌زا گرم مثبت را نیز بهبود بخشید [۳۱]. مهندسی اندولیزین مانند دامنه نوترکیب با طراحی یا تعویض تصادفی دامنه مورد آزمایش قرار گرفته است، به عنوان مثال، یانگ و همکاران غربالگری تصادفی از یک کتابخانه دامنه از اندولیزین‌های نوترکیب را در لیز کنترل شده اشیریشیاکلی گزارش کردند [۳۲].

یکی از نمونه‌های اصلی آنزیم مهندسی شده با افزایش فعالیت کشندگی، Ply187AN-KSH3b است، که تلفیقی از دامنه اندوپیتیداز استافیلوکوک لیزین Ply187 (Ply187AN) به همراه دامنه اتصال SH3b یک اندولیزین دیگر با نام LysK،

توسعه تکنیک‌های مدرن مانند ویرایش ژنوم منجر به کشف فرآیندهای زیستی، از جمله اصول بنیادی زیست‌شناسی مولکولی، بوم‌شناسی و تکامل گردید. مطالعات اولیه نشان داد که تنوع گسترده‌ای در هر جامعه فازی وجود دارد. در عین حال، به دلیل افزایش شیوع باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، علاقه به درمان‌های مبتنی بر آنزیم‌های لیتیک فاز افزایش یافته است [۷،۳۹]. عصر حاضر توالی‌یابی ارزان قیمت از کل ژنوم، فناوری خودکار برای اندازه‌گیری رشد میکروب‌ها و روش‌های کارآمد با توان بالا برای غربالگری صدها یا حتی هزاران نمونه به‌طور هم‌زمان ارائه می‌دهد. با پیشرفت مداوم در فناوری‌های توالی‌یابی نسل بعدی پیشرفت‌های سریعی در زمینه شناسایی ژنوم فاز نیز حاصل شده است. دسترسی به تعداد زیادی از ژنوم‌های فازی به کشف ژن‌های جدید کمک کرده و در مورد تکامل فازها و تعامل آن‌ها با میزبان‌های باکتریایی اطلاعات مفیدی ارائه می‌دهد [۴۱].

مشکلات و معایب استفاده از اندولیزین. سویه‌های باکتری‌های بیماری‌زا که به یک یا چند آنتی‌بیوتیک مقاوم هستند به طور فزاینده‌ای شیوع پیدا کرده‌اند، اندولیزین‌ها پتانسیل زیادی را به عنوان جایگزینی احتمالی برای آنتی‌بیوتیک‌های معمولی یا افزودن آن نشان می‌دهند. با این وجود برخی از اندولایزین‌ها هم‌چنین دارای محدودیت‌هایی مانند نیمه عمر کوتاه در داخل بدن، تولید سیتوکین‌های التهابی و آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده هستند. کمبود داده‌های حاصل از آزمایشات بالینی نیز کاربرد بالینی آن‌ها را محدود می‌کند. تعدادی از رویکردهای آینده‌نگر مانند مهندسی پروتئین، توسعه سیستم‌های تحویل هدفمند به محل عفونت نیاز به زمان دارند. اندولیزین‌های کایمر، مهندسی شده و استفاده از روش‌های جدید تحویل، احتمالاً خطرات مرتبط با تجویز سیستمیک، پایداری و دامنه فعالیت میزبان را کاهش می‌دهند. داده‌های حاصل از آزمایشات بالینی در مورد اندولیزین‌های بالقوه هم‌چنین می‌تواند امید تازه‌ای برای پزشکان برای مقابله با عوامل بیماری‌زای مقاوم در برابر دارو باشد که درمان آن دشوار است و با آنتی‌بیوتیک‌های معمولی ریشه‌کن نمی‌شود. اگرچه اندولایزین‌ها توانایی بالقوه خود را در ریشه‌کن کردن عفونت‌های مهلک شدید در مدل‌های حیوانی نشان دادند، اما آزمایشات بالینی، روش‌های مقرون به صرفه برای مقیاس و ترخیص نظارتی قبل از در نظر گرفتن آن‌ها برای استفاده در سیستم بهداشت و درمان انسان، بسیار مورد نیاز است. هم‌چنین سمیت و ایمنی‌زایی موارد مهمی است که باید در طول پیشرفت بالینی درمان‌های مبتنی بر پروتئین مانند اندولایزین‌ها مورد توجه قرار گیرد. پاسخ‌های ایمنی در برابر

باکتری‌کشی بسیار موثر در سنجش‌های آزمایشگاهی در طیف گسترده‌ای از مدل‌های حیوانی را می‌توان نام برد. این تیم در یک مدل موش با عفونت استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد که CF-301 حفاظتی مشابه با دوزهای بالای داپتومايسين کيوييسين نشان می‌دهد [۳۴،۳۵].

شرکت میکروئوس در سال ۲۰۱۷ یک لیزین به نام استافاکت XDR.300 با نام تجاری گلد اسکین به بازار عرضه کرد که دارای تاییدیه از سازمان غذا و دارو در ایالت متحده است و برای درمان عفونت‌های پوستی استافیلوکوکوس اورئوس در بیماری‌هایی مانند آگزما و آکنه به شکل کرم یا ژل یک داروی بدون نسخه استفاده قرار گرفت. این دارو به میکروفلور طبیعی پوست آسیب نمی‌رساند. میکروئوس در حال توسعه فرمول جدید است تا خلوص دارو را افزایش دهد و برای زخم‌ها و محل‌های جراحی استفاده شود. نشان داده شده است که جدایه‌های بالینی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به درمان با آنتی‌بیوتیک موپیروسین، نسبت به استافاکت مقاوم نیستند [۳۷].

هم‌چنین آرتیلایزین کلاس جدیدی از لیزین‌ها هستند که با ترکیب اندولیزین و پپتیدهای هدفمند توسط شرکت زیست فناوری لیزاندو و ایکوریس طراحی و تولید شده است. این یک ترکیب اصلاح شده، برای نشان دادن میل ترکیبی بالاتر به دیواره سلولی باکتری و افزایش ثبات دارو است. بخش پپتیدی آرتیلایزین‌ها، مولکول‌ها را قادر می‌سازد تا از غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی عبور کرده و به پپتیدوگلیکان برسند. بنابراین دیواره سلولی بی‌ثبات شده، باکتری توانایی مقاومت در برابر فشار اسمزی بالا را از دست داده و منجر به لیز سریع سلولی و نابودی باکتری می‌شود. علاوه بر این مشخص گردید که آرتیلایزین‌ها در برابر باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با اندولیزین‌های ساده موثرتر هستند. این ترکیب ضد میکروبی جدید ویژگی‌های قابل تنظیم دارد، هر دو باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را هدف قرار می‌دهد، در برابر سویه‌های بالینی مقاوم به چند دارو فعال است، هیچ‌گونه مقاومتی گزارش نشد، موثر در نابودی بیوفیلم، فاقد عوارض جانبی، زیست تخریب‌پذیر و غیر سمی است [۳۷،۳۸].

روش‌های شناسایی فاز و آنزیم لیتیک آن با توالی‌یابی نسل بعد. در طول دهه‌های گذشته محققان تنوع ویروس‌ها را با استفاده از روش‌های متاژنومی توصیف کرده‌اند. این مطالعات نشان داد ویروس‌هایی که باکتری‌ها را آلوده می‌کنند (باکتریوفازها) احتمالاً از متنوع‌ترین اجزای زیست‌کره از نظر ژنتیکی هستند. از زمان کشف باکتریوفازها بیش از یک قرن، فازها زیست‌شناسی را متحول کردند. تحقیقات در مورد فاز با

و عوارض جانبی کم‌تری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. با این وجود اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها دارای دامنه میزبان وسیع هستند و می‌توانند طیف وسیعی از باکتری‌ها را هم‌زمان از بین ببرند. همچنین علی‌رغم تحقیقات گسترده در زمینه استفاده از اندولیزین‌ها به عنوان یک دارو، با مشکلات بسیاری روبرو است. ولی تحقیقات در زمینه فاز درمانی و اندولیزین فاز در حال پیشرفت است و نیاز به آزمایشات پیش‌تری وجود دارد. همچنین اخیراً توجه محققان به اندولیزین افزایش یافته است و به کمک مهندسی اندولیزین و تولید لیزین‌های کایمر با طیف اثر گسترده‌تر و کشندگی بیشتر در حال رفع این مشکلات هستند. علاوه بر این، محققان اخیراً بر توسعه انتقال جدید مبتنی بر فناوری نانو برای عوامل ضد میکروبی، از جمله اندولایزین فاز متمرکز شده‌اند. سیستم‌های با کنترل آزاد، که بسته به پارامترهای نشان‌دهنده التهاب، امکان انتقال اندولایزین به سایت‌های عفونی را فراهم می‌کند، ممکن است مورد توجه ویژه‌ای برای پیشرفت‌های آینده باشد. در نتیجه، اندولایزین‌ها نویدبخش خوبی برای استفاده به عنوان عوامل درمانی جدید علیه عفونت‌های باکتریایی است که دارای چندین مزیت مهم از جمله فعالیت کاتالیزوری و پتانسیل مهندسی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سنتی دارند. اولین محصولات مبتنی بر اندولیزین قبلاً وارد بازار شده‌اند و با توجه به آزمایشات بالینی مداوم، می‌توان انتظار داشت که در آینده نزدیک پیشرفت‌های پیش‌تری انجام گیرد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه سمنان انجام گرفت.

### مشارکت و نقش نویسندگان

نقش هر یک از نویسندگان این مقاله به شرح زیر است: درویش علیپور: ایده و طراحی مطالعه، مجلسین: جمع‌آوری داده‌ها و نگارش نسخه اول مقاله، ابوالعالی و بیجاری: آنالیز و تفسیر نتایج، درویش علیپور. همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تایید نمودند.

### منابع

- [1] Mirhoseini SH, Nikaeen M, Shamsizadeh Z, Aali R. Prevalence and molecular identification of antibiotic resistant airborne bacteria at intensive care units. *Koomesh* 2018; 20: 772-778. (Persian).
- [2] Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health* 2017; 10: 369-378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007> PMID:27616769
- [3] Falco A, Medina-Gali RM, Poveda JA, Bello-Perez M, Nova B, Encinar JA. Antiviral activity of a Turbot

پروتئین‌های خارجی، از جمله تولید آنتی‌بادی‌های ضد دارو می‌تواند تأثیرپذیری داروها را تغییر دهد، اثر درمانی را کاهش دهد و حتی منجر به عوارض جدی مانند واکنش‌های حساسیت بیش از حد و آنافیلاکسی شود. با افزایش تعداد درمان‌های پروتئینی، تحقیقات به طور فزاینده‌ای بر کاهش ایمنی‌زایی این داروها نیز متمرکز است [۱۸،۴۲]. مسئله مهم دیگری که باید مورد بحث قرار گیرد، تولید گسترده صنعتی در هنگام ترجمه، بیان و خالص‌سازی پروتئین‌های درمانی از آزمایشگاه در مقیاس صنعتی، هزینه‌های تولید و جنبه‌های ایمنی از فاکتورهای مهمی هستند که باید مورد توجه قرار گیرند. این مربوط به کل فرایند تولید است، از انتخاب سلول میزبان بیانی (مانند باکتری‌ها، مخمرها یا گیاهان) تا مراحل پردازش پایین دست مانند برداشت و لیز سلول، شفاف‌سازی، تصفیه، پرداخت و حذف اندوتوکسین، همه این‌ها باید تحت استانداردهای عملکرد خوب تولید (GMP) انجام شوند. علاوه بر این، محصول دارو باید به روشی فرموله شود که ثبات و سازگاری کافی با روش تجویز مورد نظر را تضمین کند [۴۳].

### بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش عفونت باکتری‌های بیماری‌زا مقاوم به یک یا چند دارو در سراسر جهان، اندولیزین‌ها به عنوان یک راه حل جایگزین مورد توجه قرار گرفته است. اندولیزین‌ها پتانسیل زیادی را به عنوان جایگزین احتمالی برای آنتی‌بیوتیک‌های معمولی یا افزودن به آن‌ها جهت افزایش اثربخشی دارو در درمان باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان می‌دهند. فعالیت لیتیک و خاصیت ضدباکتریایی بالای آن‌ها و کم بودن احتمال مقاومت در برابر آن‌ها باعث می‌شود که به عنوان یک جایگزین امیدوارکننده ضد میکروبی در برابر پاتوژن‌های باکتریایی متعدد و در زمینه‌های مختلف مانند دام‌پزشکی و پزشکی مورد استفاده قرار گیرند و دارای مزایای بسیاری در بخش‌هایی مانند کشاورزی و زیست فناوری هستند. با این وجود درمان باکتری‌های گرم منفی به دلیل نازک بودن لایه پپتیدوگلیکان و وجود غشای خارجی در دیواره سلولی باکتری همواره با مشکلاتی روبرو است. برای حل این مشکل از روش‌هایی شامل افزودن مواد افزودنی کم‌هزینه مانند یون‌های گلیسرول و کلسیم استفاده می‌شود و راهکارهای جدید تحویل ممکن است اثربخشی این اندولایزین‌ها را افزایش دهد. یکی دیگر از محدودیت‌های اندولیزین، نیمه عمر کوتاه آن در داخل بدن است که به دلیل تولید پاسخ ایمنی، فعالیت لیتیک اندولیزین را محدود می‌کند. در مقابل اندولیزین فازها به سلول‌های بدن آسیب نمی‌رسانند

- [20] Van Tassel ML, Ibarra-Sánchez LA, Hoepker GP, Miller MJ. Hot topic: Antilisterial activity by endolysin PlyP100 in fresh cheese. *J Dairy Sci* 2017; 100: 2482-2487. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11990> PMID:28161174
- [21] Cho JH, Kwon JG, O'Sullivan DJ, Ryu S, Lee JH. Development of an endolysin enzyme and its cell wall-binding domain protein and their applications for biocontrol and rapid detection of *Clostridium perfringens* in food. *Food Chem* 2021; 345: 128562. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128562> PMID:33189482
- [22] Shannon R, Radford DR, Balamurugan S. Impacts of food matrix on bacteriophage and endolysin antimicrobial efficacy and performance. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2020; 60: 1631-1640. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1584874> PMID:30880427
- [23] Ribelles P, Benbouziane B, Langella P, Suárez JE, Bermúdez-Humarán LG, Riazi A. Protection against human papillomavirus type 16-induced tumors in mice using non-genetically modified lactic acid bacteria displaying E7 antigen at its surface. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97: 1231-1239. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4662-3> <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4575-1> PMID:23212671
- [24] Hu S, Kong J, Kong W, Guo T, Ji M. Characterization of a novel LysM domain from *Lactobacillus fermentum* bacteriophage endolysin and its use as an anchor to display heterologous proteins on the surfaces of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76: 2410-2418. <https://doi.org/10.1128/AEM.01752-09> PMID:20173067 PMID:PMC2849211
- [25] Kim WS, Salm H, Geider K. Expression of bacteriophage  $\phi$ Ea1h lysozyme in *Escherichia coli* and its activity in growth inhibition of *Erwinia amylovora*. *Microbiology* 2004; 150: 2707-2714. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27224-0> PMID:15289567
- [26] Schmelcher M, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins: applications for food safety. *Curr Opin Biotechnol* 2016; 37: 76-87. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.005> PMID:26707470
- [27] Rodríguez-Rubio L, Gutiérrez D, Donovan DM, Martínez B, Rodríguez A, García P. Phage lytic proteins: biotechnological applications beyond clinical antimicrobials. *Crit Rev Biotechnol* 2016; 36: 542-552.
- [28] Doehn JM, Fischer K, Reppe K, Gutbier B, Tschernig T, Hocke AC, et al. Delivery of the endolysin Cpl-1 by inhalation rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2111-2117. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt131> PMID:23633685
- [29] Haddad Kashani H, Schmelcher M, Sabzalipoor H, Seyed Hosseini E, Moniri R. Recombinant endolysins as potential therapeutics against antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*: current status of research and novel delivery strategies. *Clin Microbiol Rev* 2018; 31: e00071-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00071-17> PMID:29187396 PMID:PMC5740972
- [30] Schmelcher M, Waldherr F, Loessner MJ. *Listeria* bacteriophage peptidoglycan hydrolases feature high thermoresistance and reveal increased activity after divalent metal cation substitution. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 93: 633-643. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3372-6> PMID:21720825
- [31] Haddad Kashani H, Fahimi H, Dasteh Goli Y, Moniri R. A novel chimeric endolysin with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7: 290. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00290> PMID:28713777 PMID:PMC5491540
- [32] Son B, Kong M, Lee Y, Ryu S. Development of a novel chimeric endolysin, Lys109 with enhanced lytic activity against *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* 2021; 11: (Scophthalmus maximus) NK-lysin peptide by inhibition of low-pH virus-induced membrane fusion. *Mar Drugs* 2019; 17: 87. <https://doi.org/10.3390/md17020087> PMID:30717094 PMID:PMC6410327
- [4] Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. Resistance pattern to macrolides and tetracyclines and detection of *ermA*, *ermB*, *ermC* and *mphC* genes in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* producing toxic shock syndrome toxin-1. *Koomesh* 2018; 21: 188-194. (Persian).
- [5] Caflisch KM, Patel R. Implications of bacteriophage- and bacteriophage component-based therapies for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2019; 57: e00229-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00229-19> PMID:31092596 PMID:PMC6663902
- [6] Walmagh M. Development and evaluation of engineered bacteriophage endolysins to inactivate Gram-negative bacteria. 2013.
- [7] Wittebole X, De Rook S, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 2014; 5: 226-235. <https://doi.org/10.4161/viru.25991> PMID:23973944 PMID:PMC3916379
- [8] Gordillo Altamirano FL, Barr JJ. Phage therapy in the postantibiotic era. *Clin Microbiol Rev* 2019; 32: e00066-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00066-18> PMID:30651225 PMID:PMC6431132
- [9] C. Loc-Carrillo and S. T. Abedon. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 2011; 1: 111-114. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.14590> PMID:22334867 PMID:PMC3278648
- [11] Doss J, Culbertson K, Hahn D, Camacho J, Barezki N. A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses* 2017; 9: 50. <https://doi.org/10.3390/v9030050> PMID:28335451 PMID:PMC5371805
- [12] F. Abdelrahman et al. Phage-encoded endolysins. *Antibiotics* 2021; 10: 124. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020124> PMID:33525684 PMID:PMC7912344
- [13] Murray E, Draper LA, Ross RP, Hill C. The advantages and challenges of using endolysins in a clinical setting. *Viruses* 2021; 13: 680. <https://doi.org/10.3390/v13040680> PMID:33920965 PMID:PMC8071259
- [14] Chu JJ, Poh WH, Hasnuddin NT, Hew EY, Dam LC, Sahili AE, et al. Novel phage lysin Abp013 against *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics* 2022; 11: 169. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020169> PMID:35203772 PMID:PMC8868305
- [15] Gontijo MT, Jorge GP, Brocchi M. Current status of endolysin-based treatments against Gram-negative bacteria. *Antibiotics* 2021; 10: 1143. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10101143> PMID:34680724 PMID:PMC8532960
- [16] Bragg RR, Meyburgh CM, Lee JY, Coetzee M. Potential treatment options in a post-antibiotic era. *Infect Dis Nanomedicine* 2018; 51-61. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7572-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7572-8_5) PMID:29785480
- [17] Love MJ, Abeysekera GS, Muscroft-Taylor AC, Billington C, Dobson RC. On the catalytic mechanism of bacteriophage endolysins: Opportunities for engineering. *Biochim Biophys Acta* 2020; 1868: 140302. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140302> PMID:31678195
- [18] Gondil VS, Harjai K, Chhibber S. Endolysins as emerging alternative therapeutic agents to counter drug-resistant infections. *Int J Antimicrob Agents* 2020; 55: 105844. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.11.001> PMID:31715257
- [19] Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11: 393-400. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.012> PMID:18824123 PMID:PMC2597892

- <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.01.009>  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.04.007>  
 [46] Nelson D, Schuch R, Chahales P, Zhu S, Fischetti VA. PlyC: a multimeric bacteriophage lysine. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103: 10765-10770.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0604521103>  
 PMID:16818874 PMCID:PMC1487170
- [47] Nelson D, Loomis L, Fischetti VA. Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A Streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 4107-4112.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.061038398>  
 PMID:11259652 PMCID:PMC31187
- [48] Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. Rapid killing of Streptococcus pneumoniae with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 2001; 294: 2170-2172.  
<https://doi.org/10.1126/science.1066869>  
 PMID:11739958
- [49] Varea J, Monterroso B, Sáiz JL, López-Zumel C, García JL, Laynez J, et al. Structural and thermodynamic characterization of Pal, a phage natural chimeric lysin active against pneumococci. *J Biol Chem* 2004; 279: 43697-43707.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M407067200>  
 PMID:15247237
- [50] Rodríguez-Rubio L, Martínez B, Rodríguez A, Donovan DM, García P. Enhanced staphylolytic activity of the Staphylococcus aureus bacteriophage vB\_SauS-philPLA88 HydH5 virion-associated peptidoglycan hydrolase: fusions, deletions, and synergy with LysH5. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 2241-2248.  
<https://doi.org/10.1128/AEM.07621-11>  
 PMID:22267667 PMCID:PMC3302612
- [51] Loessner MJ, Wendlinger G, Scherer S. Heterogeneous endolysins in Listeria monocytogenes bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. *Mol Microbiol* 1995; 16: 1231-1241.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02345.x>  
 PMID:8577256
- [52] Loessner MJ, Kramer K, Ebel F, Scherer S. C-terminal domains of Listeria monocytogenes bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol Microbiol* 2002; 44: 335-349.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02889.x>  
 PMID:11972774
- [53] Briers Y, Peeters LM, Volckaert G, Lavigne R. The lysis cassette of bacteriophage  $\phi$ KMV encodes a signal-arrest-release endolysin and a pinholin. *Bacteriophage* 2011; 1: 25-30.  
<https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14868>  
 PMID:21687532 PMCID:PMC3109451
- [54] Walmagh M, Boczkowska B, Grymonprez B, Briers Y, Drulis-Kawa Z, Lavigne R. Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97: 4369-4375.  
<https://doi.org/10.1007/s00253-012-4294-7>  
 PMID:22832988
- [55] Mikoulinskaia GV, Odinkova IV, Zimin AA, Lysanskaya VY, Feofanov SA, Stepnaya OA. Identification and characterization of the metal ion-dependent l-alanoyl-D-glutamate peptidase encoded by bacteriophage T5. *FEBS J* 2009; 276: 7329-7342.  
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07443.x>  
 PMID:19919545
- [56] Kim B, Kim ES, Yoo YJ, Bae HW, Chung IY, Cho YH. Phage-derived antibacterials: Harnessing the simplicity, plasticity, and diversity of phages. *Viruses* 2019; 11: 268.  
<https://doi.org/10.3390/v11030268>  
 PMID:30889807 PMCID:PMC6466130
615887.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.615887>  
 PMID:33519773 PMCID:PMC7843465
- [33] Mao J, Schmelcher M, Harty WJ, Foster-Frey J, Donovan DM. Chimeric Ply187 endolysin kills Staphylococcus aureus more effectively than the parental enzyme. *FEMS Microbiol Lett* 2013; 342: 30-36.  
<https://doi.org/10.1111/1574-6968.12104>  
 PMID:23413880 PMCID:PMC3690576
- [34] Becker SC, Roach DR, Chauhan VS, Shen Y, Foster-Frey J, Powell AM, et al. Triple-acting lytic enzyme treatment of drug-resistant and intracellular Staphylococcus aureus. *Sci Rep* 2016; 6: 1-10.  
<https://doi.org/10.1038/srep25063>  
 PMID:27121552 PMCID:PMC4848530
- [35] Parmley S. Lysin in wait. *Sci Exch* 2014; 7: 1369.  
<https://doi.org/10.1038/scibx.2014.1369>  
 [36] Indiani C, Sauve K, Raz A, Abdelhady W, Xiong YQ, Cassino C, et al. The antistaphylococcal lysin, CF-301, activates key host factors in human blood to potentiate methicillin-resistant Staphylococcus aureus bacteriolysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; 63: e02291-18.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.02291-18>  
 PMID:30670427 PMCID:PMC6437495
- [37] Rahman MU, Wang W, Sun Q, Shah JA, Li C, Sun Y, et al. Endolysin, a promising solution against antimicrobial resistance. *Antibiotics* 2021; 10: 1277.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10111277>  
 PMID:34827215 PMCID:PMC8614784
- [38] Briers Y, Lavigne R. Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiol* 2015; 10: 377-390.  
<https://doi.org/10.2217/fmb.15.8>  
 PMID:25812461
- [39] Gerstmans H, Rodríguez-Rubio L, Lavigne R, Briers Y. From endolysins to Artilysin® s: novel enzyme-based approaches to kill drug-resistant bacteria. *Biochem Soc Trans* 2016; 44: 123-128.  
<https://doi.org/10.1042/BST20150192>  
 PMID:26862197
- [40] Reyes A, Semenkovich NP, Whiteson K, Rohwer F, Gordon JI. Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10: 607-617.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2853>  
 PMID:22864264 PMCID:PMC3596094
- [41] Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host Microbe* 2019; 25: 219-232.  
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.01.014>  
 PMID:30763536
- [42] Schmelcher M, Loessner MJ. Bacteriophage endolysins-Extending their application to tissues and the bloodstream. *Curr Opin Biotechnol* 2021; 68: 51-59.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.09.012>  
 PMID:33126104
- [43] Fischetti VA. Exploiting what phage have evolved to control gram-positive pathogens. *Bacteriophage* 2011; 1: 188-194.  
<https://doi.org/10.4161/bact.1.4.17747>  
 PMID:23050211 PMCID:PMC3448103
- [44] Roach DR, Donovan DM. Antimicrobial bacteriophage-derived proteins and therapeutic applications. *Bacteriophage* 2015; 5: e1062590.  
<https://doi.org/10.1080/21597081.2015.1062590>  
 PMID:26442196 PMCID:PMC4590002
- [45] Porfírio S, Carlson RW, Azadi P. Elucidating peptidoglycan structure: an analytical toolset. *Trends Microbiol* 2019; 27: 607-622.

## Introducing the characteristics of Endolysin as an alternative to antibiotics

Farnoosh Majlesain (M.Sc Student)<sup>1</sup>, Shamsozoha Abolmaali (Ph.D)<sup>2</sup>, Shakiba Darvish Alipour Astaneh (Ph.D)<sup>\*1</sup>, Nooshin Bijari (Ph.D)<sup>2</sup>

1- Dep. for Biotechnology, Faculty of New Sciences and Technologies, Semnan University, IRAN

2 - Dep. for Biology, Faculty of Basic Science, Semnan University, IRAN

\* Corresponding author. +98 23-31 53 2288 Darvishalipour@semnan.ac.ir

Received: 14 Feb 2023; Accepted: 23 Aug 2023

The emergence of antibiotic-resistant bacterial strains has become a global crisis for public health. There are many concerns about the increase of multi-drug resistant bacteria so that some diseases cannot be effectively treated. There is an urgent need to develop alternatives to conventional antibiotics for human and animal treatment. As an alternative to antibiotics, endolysins are interesting due to their high antibacterial activity and properties against numerous bacterial pathogens and in various fields of application, including medicine, food safety, and agriculture. Most phage endolysins show a wide spectrum of activity. Several features of these enzymes, including their high activity, are the presence of two catalytic domains in their structure, which further reduces the possibility of resistance formation, also, the mechanism of action and their type of lytic activity support their further exploitation as valuable and strong antibacterial agents for the treatment of infections. In this review, the structure and mechanism of endolysin, as well as its benefits as an alternative to antibiotics, and the problems in this field are stated. Moreover, the applications and advances of endolysin have been reviewed, and the newly engineered endolysins as potential candidates have been introduced.

**Keywords:** Alternatives, Antibiotics, Endolysin, Phage Therapy, Protein Engineering

---