

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ДЕТСКИХ ИНФЕКЦИЙ,
Г. САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКАЯ ПЕДИАТРИЧЕСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ



ФАГОВАЯ ТЕРАПИЯ: БАКТЕРИОФАГИ КАК АНТИБИОТИКИ

(Обзор литературы)

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2001 год

Фаговая терапия: бактериофаги как антибиотики

Элизабет Кюттер

PHAGE THERAPY: BACTERIOPHAGES AS ANTIBIOTICS

Elizabeth Kutter, Evergreen State College, Olympia, WA 98505 -- Nov. 15, 1997

t4phage@elwha.evergreen.edu

Данный обзор посвящен биологическим и медицинским аспектам феномена бактериофагии. Рассмотрен исторический контекст вопроса, современное состояние проблемы. Актуальность обзора определяется ростом числа микробных штаммов, резистентных к многим антибактериальным препаратам, распространенностью побочных эффектов антибиотиков, проблемами в создании новых классов антибактериальных медикаментов. Обзор предназначен для врачей всех специальностей, педиатров, инфекционистов, семейных врачей, хирургов, а также для студентов медико-биологических специальностей.

Перевод с английского к.м.н. Иванов А.В

Научная ред.: д.м.н. Скрипченко Н.В., к.м.н. Иванов А.В.

БАКТЕРИОФАГИ – АЛЬТЕРНАТИВА АНТИБИОТИКАМ

Сравниваемые особенности	Антибиотики	Бактериофаги
Частота развития вторичной резистентности	От незначительной до очень высокой	Не характерно
Профилактическое использование	Неэффективно, противопоказано	Широко используется
Длительность создания нового препарата	От нескольких лет до десятилетий	От нескольких дней до нескольких месяцев
Способность проникать в различные ткани	От высокой до крайне низкой для различных препаратов	Крайне высокая
Концентрация в инфекционном очаге	Отличается для разных препаратов, зависит от локализации процесса, скорость снижения различна	Нарастает путем саморазмножения, снижается после ликвидации инфекции
Влияние на ферментные системы организма	Характерно для всех препаратов	Не описано
Наличие побочных эффектов и осложнений	Аллергические, токсические, конкурентные (в отношении прочих медикаментов), дисбиотические изменения различных органов, в том числе – тяжелые (псевдомембранозный колит, ассоциированный с <i>Clostridium difficile</i>)	Не характерно. Редко - аллергические реакции. Могут вызывать реакцию высвобождения при массивном разрушении микробов. Дисбиотических нарушений не вызывают, но используются для их коррекции.
Рациональная комбинация с другими антибактериальными препаратами	Зависит от класса антибактериальных средств и может быть по типу суммации, потенцирования и т.д., в зависимости от точек приложения воздействия препарата на бактериальную клетку.	Всегда по типу взаимного потенцирования, по предварительным данным – вне зависимости от класса препарата.
Совместимость с другими медикаментами	с Различная, (конкуренцией за ферментные системы, связывание с тканями, усиление токсических эффектов и пр.)	Полная, в том числе и с антибиотиками.
Активность в отношении патогенных микробов	в Различная. Подавляют облигатную флору организма, вызывая дисбиотические нарушения. Число чувствительных штаммов составляет 60-90%.	Число чувствительных штаммов составляет 70-90%. Не влияют на облигатную флору организма, не вызывают дисбиоз..

**ООО «ПЕТРОХИМФАРМ»
ОФИЦИАЛЬНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ДП «БИОФАГ»**

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

Природа бактериофагов

Исторический контекст

Специфические проблемы ранних работ по фаговой терапии

Свойства фагов

Литические фаги

Рациональная фаговая терапия

Современная работа, связанная с фаготерапией на Западе

Патогенность бактерий

Семейство Т-четных фагов

Заключение

Список литературы

ФАГОВАЯ ТЕРАПИЯ: БАКТЕРИОФАГИ КАК АНТИБИОТИКИ

Элизабет Кюттер

ВВЕДЕНИЕ

Бактерии, резистентные к большинству или ко всем из всех известных антибиотиков, вызывают всё более серьезные проблемы. Это увеличивает риск возврата человечества к проблемам того периода, когда антибиотики были неизвестны, когда были широко распространены неизлечимые инфекции и эпидемии. Несмотря на интенсивную работу фармацевтических компаний, за последние 30 лет не было найдено новых классов антибиотиков. Есть надежда, что вновь обнаруженная возможность полностью секвенировать микробные геномы и определять молекулярные основы патогенности откроет новые пути лечения инфекционных заболеваний, но с всё большим рвением идет поиск других подходов к этой проблеме. Одним из результатов такого поиска является вновь возникший интерес к возможностям терапевтического использования бактериофагов - специфических вирусов, которые атакуют только бактерии и убивают патогенные микроорганизмы (ср. Levin and Bull, 1996; Lederberg, 1996; Radetsky, 1996; Barrow and Soothill, 1997).

Фаговая терапия была впервые разработана в начале этого века и казалась многообещающей, хотя и вызвала много споров. С начала эры антибиотиков в 40-х гг. в западных странах ее использовали мало. Однако в Восточной Европе за последние 50 лет были проведены широкие клинические исследования в отношении фаговой терапии. Результаты этой работы хорошо дополняют ограниченные изыскания последних лет, проведенные на животных на Западе, которые чаще всего цитируются в современных статьях. Это придает оптимизм в том отношении, что фаги могут, в самом деле, играть важную роль в борьбе с инфекциями, вызываемых микробами, резистентность которых к лекарственным средствам растет. Мы должны обрисовать максимально подробно те малоизвестные данные, которые накоплены в Польше, Франции, а также многочисленных странах ранее бывших в составе Советского Союза. Они внесли свой вклад в виде многолетней сложной и кропотливой работы в данном направлении. Данная статья написана, прежде всего, для того, чтобы рассмотреть фаготерапию в историческом и экологическом контексте и осветить часть наиболее

интересных и обширных исследований, проведенных в Восточной Европе, которые были мало доступны англоязычным читателям.

ПРИРОДА БАКТЕРИОФАГОВ

Вирусы похожи на космические челноки тем, что способны вносить генетический материал в чувствительные к ним клетки и затем репродуцироваться в этих клетках. Так, например, вирус СПИД, HIV, избирательно инфицирует Т-лимфоциты человека, имеющие специфический поверхностный белок CD4. Каждый вирус состоит из носителя генетической информации, определяющего все его свойства, упакованного в белковую оболочку. В случае бактериофагов мишенями являются определенные типы бактериальных клеток, они не способны инфицировать клетки организмов более сложного строения ввиду принципиальных различий как ключевых внутриклеточных процессов, так и белков клеточной поверхности. Большинство бактериофагов имеют хвосты, концевые отделы которых обладают способностью присоединяться к специфическим молекулам на поверхности их бактерий-мишеней.

После того, как вирусная ДНК поступает через хвостовую часть в клетку-хозяина, происходит воспроизведение дочерних бактериофагов, причем, зачастую, потомство составляет более сотни фагов в течение получаса. Каждый штамм микроорганизма имеет характерный для него белок, углевод и липополисахарид, которые в большом количестве представлены на поверхности его клеток. Эти молекулы участвуют в формировании каналов, ответственны за подвижность бактерий и адгезию к специфическим поверхностям. Каждая такая молекула может играть роль рецептора для конкретного бактериофага.

Развитие резистентности к определенному фагу в основном отражает потерю микробом специфического рецептора для фага в результате мутации; эта потеря часто оказывает отрицательное действие на бактерию и не защищает ее от многих других фагов, которые используют иные рецепторы.

Каждый тип бактерий имеет свои собственные фаги, которые могут быть выделены везде, где данные бактерии существуют: из сточных вод, фекалий, почвы, даже из океанских глубин и горячих источников. Процесс выделения прост. Просто поместите образец в соответствующий питательный бульон, отделите

жидкую часть и пропустите ее через фильтр с порами такого размера, который обеспечил бы задержку бактерий. Затем добавьте концентрат питательных веществ и смешайте все это (в нескольких различных разведениях) с культурой исследуемых бактерий. Распределите несколько капель на пластинке соответствующей твердой питательной среды, приготовленной из агара, полученного из морских водорослей. На следующий день можно увидеть плотное покрытие или газон бактерий, на котором, при верно выбранном разведении, обнаруживаются круглые чистые пятна, называемыми бляшками. Каждая бляшка содержит много миллионов фаговых частиц, все они являются потомством одного фага, который был иммобилизован на агаре. Этот фаг инфицировал клетку, размножился внутри нее и вызвал ее разрушение. При этом выделилось много фагов, которые инфицировали близлежащие клетки и повторили процесс. Можно воткнуть шпатель в одну из этих бляшек, перенести его на свежую культуру бактерий в жидкой среде, и вырастить гомогенный клон потомков конкретного фага, свойства которого можно потом изучать.

ИСТОРИЧЕСКИЙ КОНТЕКСТ

Сто лет назад Hankin (1896) сообщил, что воды рек Ганга и Джамна в Индии обладают значительной антибактериальной активностью, которая сохранялась после прохождения через фарфоровый фильтр с порами очень малого размера, но устранялась при кипячении. Наиболее подробно изучал он действие неизвестной субстанции на *Vibrio cholerae* и предположил, что она ответственна за предупреждение распространения эпидемий холеры, вызванных употреблением воды из этих рек. Однако, в последующем, он не объяснил этот феномен. Edward Twort (1915) и Felix, d' Herelle (1917) независимо сообщили о выделении фильтруемых субстанций, способных разрушать бактериальные культуры и образовывать на бактериальных газонах небольшие чистые области, что, казалось, подразумевало участие дискретных частиц. Они совместно подали заявку на открытие. Именно d'Herelle, канадский сотрудник Института Пастера в Париже, дал им название "бактериофаги" - используя суффикс "фаг" не в его прямом смысле "есть", а в смысле развития за счет чего-то (d'Herelle, 1922, p. 21), они стали главной частью работы всей его жизни. D'Herelle, микробиолог, преимущественно самоучка, провел 10 лет в Гватемале, Мексике и Аргентине. Там он имел дело с

эпидемиями дизентерии, желтой лихорадки и грибов кофейных деревьев, для контроля чумы саранчи он выделил из умирающей саранчи бактерию, а также исследовал несколько интересных загадок брожения. Всё это было хорошей подготовкой к его более поздней работе с фагами и интересно изложено в Summers (1999). В Институте Пастера он проводил кропотливое исследование метода приготовления вакцины с помощью модельной системы - "B. typhimurium" на её природном хозяине мыши, поскольку был твердо убежден в том, что значимые данные об иммунитете и патогенности можно получить только при использовании природных хозяев. В свободное время он также продолжал обследовать дизентерийных больных - частую проблему в воевавшей Франции. Из фекалий нескольких из этих больных он выделил анти-шигелловый "микроорганизм", который был размножен путем многочисленных серий пассажей на бактерио-хозяине и мог образовывать небольшие чистые круги на газоне этих же бацилл шигеллы (d' Herelle, 1917).

d' Herelle продолжал тщательно характеризовать бактериофаги как вирусы, которые размножаются в бактериях и разрабатывать подробности инфекции различными фагами разнообразных бактерий-хозяев в разных условиях окружающей среды, всегда объединяя в своей работе природные феномены и лабораторные данные, для лучшего понимания иммунитета и естественного (самопроизвольного) излечения от инфекционных заболеваний (Summers, 1999). На Девятнадцатом ежегодном заседании Британской Медицинской Ассоциации в Глазго прошла очень интересная дискуссия между d' Herelle, Twort и несколькими другими выдающимися учеными того времени о природе и свойствах бактериофагов (d'Herelle et al, 1922). Главный её вопрос: является ли причиной основой лизиса бактерий, вырабатываемый ими фермент или это особая форма мельчайшего вируса с некоторым родом собственной жизни, как заявлял d' Herelle. Этот спор продолжался много лет, разделяя людей, работающих с фагами, которых становилось все больше и больше.

d' Herelle суммировал начальный этап работы с фагами в 300-страничной книге "Бактериофаг" (1922). Он провел классические описания образования бляшек и состава, инфекционных центров, литических процессов, специфической адсорбции на бактерии-хозяина и размножения, зависимости продукции фагов от

конкретного состояния бактерии-хозяина, выделения фагов из источников инфекционных бактерий и факторов, регулирующих стабильность внеклеточного фага. Он быстро увлекся очевидной ролью фагов в природном контроле микробных инфекций. Он, например, отметил частое выявление у выздоравливающих больных фагов, специфичных в отношении микроорганизмов, вызвавших заболевание и довольно быстрое по времени изменения популяций этих фагов. Всю свою жизнь он посвятил, разработке возможности применения фагов, полученных путем надлежащей селекции, как средства для лечения заболеваний, наиболее подрывавших здоровье людей в те годы. Вначале, однако, он сосредоточился на простом понимании биологии фагов. По этому первое известное сообщение об успешной фаговой терапии поступило не от d'Herelle, а от Bruynoghe и Maisin (1921), которые использовали фаг для лечения стафилококковых инфекций кожи.

Через год, будучи в институте Пастера в Сайгоне, d'Herelle оказался в тяжелом материальном положении, находясь в конфликте и имея интеллектуальные разногласия с коллективом института Пастера в Париже. Вскоре он принял предложение переехать в Нидерланды, где ему были обеспечены лучшие условия для работы по лечению инфекционных заболеваний и исследованию свойств бактериофагов. Там он опубликовал свою первую книгу и ряд статей, получил степень доктора медицинских наук "an honoragy". В 1925 г. он стал инспектором службы здравоохранения Лиги Наций, (Александрия, Египет), особо уполномоченным за борьбу с инфекционными заболеваниями на кораблях, проходящих по Суэцкому каналу и во время некоторых крупных мусульманских паломничеств. Фаговая терапия и санитарные мероприятия были главными средствами в его арсенале борьбы с крупными вспышками инфекционных заболеваний на Среднем Востоке и в Индии. В течение всего этого периода он продолжал публикации о своем исследовании и клинических испытаниях, оказывал помощь и давал консультации желающим изучать фаги, часто предпринимая длительные путешествия за свой счет. Одно из наиболее обширных исследований фаговой терапии, проведенное с его помощью, было Исследование Бактериофагов в 1927-1936 г. (Summers, 1993), закончившееся тем, "что результаты, подтвержденные августейшей комиссией, кажутся убедительными" и

хотя все еще остается много скептиков в отношении фаговой терапии, эти исследования заслуживают тщательного изучения.

В 1928 г. d'Herelle был приглашен в Стэнфорд, чтобы прочитать престижные лекции - Lane Lectures; его дискуссия “Бактериофаг и его клинические применения” была опубликована в виде монографии (d' Herelle and Smith, 1930). Во время поездок по стране он прочел множество лекций в медицинских институтах и обществах. Затем он отправился в Йель, чтобы занять постоянную должность на факультете, организованную при поддержке George Smith, который перевел первые две его книги на английский язык. Он продолжал проводить летний период в Париже, работая в организованной им фаговой компании, которой руководил его зять. Компания была создана в ответ на большие потребности в высококачественных фаговых препаратах; этот период особенно хорошо описан Summers (1999). В 1933 г. d'Herelle возвратился в Европу на постоянное жительство, проводя много времени в следующие два года в Тифлисе (Тбилиси), Грузия, помогая в организации Международного Института Бактериофагов, как об этом будет рассказано ниже.

С самого начала, одним из главных направлений практического применения фагов была идентификация бактерий путем процесса, называемого фаготипирование – идентификации штаммов микробов с помощью определения спектра чувствительности к специфическому набору фагов. Эта методика обладает преимуществом в виду высокой специфичности многих фагов в отношении их хозяев и по-прежнему широко используется во всем мире. Высокоспецифичная способность фагов уничтожать свои бактерии-хозяева может также оказать негативный коммерческое эффект: случайное заражение фагом может быть катастрофическим для различных бродильных производств, использующих микробные технологии, таких, как производство сыра и ферментативный синтез химических веществ и вызывать финансовые бедствия (ср. Saunders, 1994).

Фаговая терапия испытывалась широко, были сообщения о многочисленных успехах ее при ряде заболеваний включая дизентерию, брюшной тиф и напоминающую брюшной тиф лихорадку, холеру, пиогенные инфекции и инфекции мочевых путей. Фаги непосредственно наносили на место поражения, давали внутрь либо применяли в виде аэрозолей или клизм. Их также вводили в

виде инъекций внутривенно, в сосуды, внутримышечно, интрадуоденально, внутрибрюшинно даже внутрь легких, в сонную артерию и перикард. Сильный интерес к фаговой терапии на раннем этапе нашел отражение в том, что на эту тему опубликовано около 800 статей с 1917 по 1956 г; результаты были довольно разнообразными и подробно освещены Ackerman и Dubow (1987). Многие врачи и предприниматели очень заинтересовались возможным клиническим применением фагов и перескочили к использованию, имея как слабое представление о них самих и о микробиологии, так и дефицит базовых научных знаний вообще. Таким образом, многие из этих исследований были плохо контролируемы или вовсе анекдотичными, многие неудачи были предсказуемыми, а в описании некоторых успехов не доставало научного смысла. Часто фаги с неизвестными свойствами, в неизвестных концентрациях давались больным без специфического бактериологического диагноза, при этом не было никакого упоминания о катамнезе, контроле или плацебо.

На раннем этапе работы с фагами игнорировалось многое из того, что удалось понять d'Herelle, часто использовались неправильные методы приготовления, “консервирования” и хранения. В одном случае d'Herelle описал испытание 20 препаратов изготовленных различными компаниями, в ходе которого выяснилось, что ни один из них не содержал активные бактериофаги (Summers, 1999).

В другом случае препарат рекламировался как содержащий ряд различных фагов, но, как оказалось, ответственный технолог решил, что легче выращивать их в виде одной большой партии, чем отдельно. Неудивительно, что проверка продукта выявила подавление одним фагом всех остальных, и препарат фактически не был поливалентным. Так был получен фаг T7, РНК-полимераза которого сейчас играет большую роль в биотехнологии (личное сообщение William Summers). В целом, исключая несколько исследовательских центров, контроль качества не производился. Крупные клинические исследования были редкостью, и результаты этих немногих работ были большей частью недоступны за пределами Восточной Европы.

В 1931 г. Советом по Фармации и Химии Американской Медицинской Ассоциации был подготовлен обширный обзор по фаговой терапии (Eaton and

Wayne-Jones, 1931). Его целью было: “(а) представить резюме и обсуждения (1) экспериментально установленных фактов, связанных с феноменом бактериофагов, (2) лабораторных и клинических данных "за" и "против" терапевтической применимости бактериофагов и (3) выявить имеет ли отношение так называемый антивирус к материалам, содержащим бактериофаги и (б) служить основой для изучения свойств некоторых коммерческих препаратов”. Этот отчет, имевший 150 ссылок, был крупнейшей попыткой обзора, по крайней мере, тех статей и обзоров, которые рассматривались как наиболее значимые. Оценивая этот отчет, важно понять, насколько мало было известно тогда о бактериофагах. Фактически первым заключением было: “Экспериментальные исследования литического агента, названного “бактериофагом”, не раскрыли его природы. Теория d’Herelle о том, что этот материал является живым вирусом, паразитирующим в бактериях, не доказана. Напротив, факты указывают на то, что этот материал неживой, возможно является ферментом”. В ретроспективе доказательство того, что фаги являются вирусами, выглядит веско, и трудно понять, как можно было придти к такому заключению, явно повлиявшему на все остальные. Они включали в себя следующее:

“2) Поскольку окончательно не показано, что бактериофаг является живым организмом, не обосновано объяснять его действия на культуры бактерий или его возможное терапевтическое действие свойствами живого вещества. 3) В то время как в [бактериальной] культуре бактериофаг растворяет чувствительные бактерии и вызывает многочисленные модификации микроорганизмов, его литическое действие в организме ингибируется или сильно затрудняется кровью и другими жидкостями тела. 4) Материал, называемый бактериофагом, обычно является фильтратом лизированных микроорганизмов, содержащим, в дополнение к литическому началу, антигенные бактериальные вещества, продукты бактериального роста и составляющие культуральной среды. Эффект всех этих компонентов необходимо принимать во внимание всякий раз, когда испытывается терапевтическое действие. 5) Обзор литературы об использовании бактериофагов в лечении инфекций выявил, что обоснование терапевтической значимости литических фильтратов является большей частью спорным. Только при лечении местных стрептококковых инфекций и, возможно, цистита, представлены вполне

убедительные данные”.

Эта оценка явно оказала сильное влияние на инвестирование серьезных исследований фаговой терапии медицинской общественностью, по крайней мере, в Соединенных Штатах. Поднятые вопросы, по-прежнему требуют рассмотрения, как, в отношении многих описанных здесь исследований на животных или на людей, которые, казалось, были малоуспешными или безуспешными, так и в отношении таких возможно неправильных объяснений успехов, как сильная стимуляция естественных иммунных механизмов продуктами распада бактерий, содержащимися в используемых лизатах. Далее в 40-х гг. стали широкодоступны новые “чудесные” антибиотики, такие как пенициллин, и Западный мир большей частью отказался от фаговой терапии.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ РАННИХ РАБОТ ПО ФАГОВОЙ ТЕРАПИИ

Сегодня многие полагают, что в первой половине этого века была показана неэффективность фаговой терапии. Однако получилось так, что она просто не исследована в полной мере и должным образом, так что иная ее оценка вполне оправдана. По этому важно рассмотреть во всех деталях как возможные причины проблем раннего периода, так и вопросы касающиеся эффективности, а именно:

- 1) Недостаточность понимания гетерогенности и экологии как фагов, так и вовлеченных бактерий.
- 2) Неудача в селекции фагов, высоко вирулентных против бактерий-мишеней, до их использования у больных.
- 3) Использование моно фагов при инфекциях, вызываемых несколькими различными бактериями.
- 4) Появление резистентных штаммов бактерий. Они могут возникнуть путем селекции резистентных мутантов (это часто происходит, при использовании только одного штамма фага против конкретной бактерии) или путем лизогенизации (если используются умеренные фаги, как обсуждается ниже).
- 5) Неправильная классификация фагов или ошибки в отношении титра препаратов, некоторые из которых были полностью неактивны.
- 6) Неудача в нейтрализации низких значений желудочного pH при использовании пероральных препаратов.

- 7) Инактивация бактериофагов специфическими и неспецифическими факторами в жидкостях организма.
- 8) Высвобождение эндотоксинов вследствие массивного лизиса бактерий внутри организма (что именуется врачами реакцией Herxheimer). Это может привести к токсическому шоку и является потенциальной проблемой также и для химических антибиотиков.
- 9) Недостаточная готовность и надежность бактериологических лабораторий для тщательной идентификации причинных патогенов, необходимой ввиду специфичности фаговой терапии.

При принятии решения вновь исследовать возможности фаговой терапии мы должны также учитывать многие ее потенциальные преимущества, более подробно обсуждаемые ниже:

- 1) Размножаясь, они самостоятельно регулируют свою численность (увеличивая или уменьшая ее), поскольку размножаются только до тех пор, пока имеются чувствительные бактерии, а затем постепенно элиминируются из организма и окружающей среды.
- 2) Они гораздо более специфичны, чем большинство антибиотиков; будучи нацелены на конкретные проблемные бактерии, вызывают гораздо меньшее повреждение нормального микробного баланса организма. Бактериальный дисбаланс или “дисбиоз”, вызванный лечением многими антибиотиками, может привести к серьезным вторичным инфекциям с участием достаточно резистентных бактерий, часто удлиняющим койко-день, увеличивающим затраты и летальность. Специфические проблемы, возникающие в результате, включают инфекции, вызванные псевдомонадами, трудно поддающиеся лечению, и *Clostridium difficile*, причину серьезной диареи и псевдомембранозного колита ([Fékéty, 1995](#)).
- 3) Фаги имеют возможность использовать в качестве мишеней рецепторы на бактериальной поверхности, участвующие в патогенезе, а это означает, что вирулентность любых резистентных к ним мутантов ослаблена.
- 4) В отношении фаговой терапии описано мало побочных эффектов.
- 5) Фаговая терапия была бы особенно применима для лиц с аллергией к антибиотикам.

- 6) Должным образом селекционированные фаги можно легко использовать профилактически, способствуя предотвращению бактериальных заболеваний у людей или животных при контакте с микробами, либо для санации больниц и борьбы с внутрибольничными (нозокомиальными) инфекциями.
- 7) Фаги, особенно для наружного применения, можно изготавливать достаточно недорого и локально, способствуя их потенциальному применению населением соответствующей местности.
- 8) Фаг можно использовать либо независимо, либо в сочетании с другими антибиотиками, с целью уменьшения вероятности развития резистентности бактерий.
- 9) При местном использовании фаги имеют особое преимущество в том, что они продолжают размножаться и проникать глубже до тех пор, пока присутствует инфекция, в противоположность им концентрация антибиотиков быстро снижается по мере удаления от поверхности.

СВОЙСТВА ФАГОВ

Одним из главных источников затруднений в ранней работе с фагами было представление, что все фаги существенно сходны, хотя и подвергаются приспособительным изменениям в соответствии с недавними условиями роста. Одним из следствий этого было то, что в каждой новой серии исследований часто выделялись новые бактериофаги, по этому преемственности было, так же как и возможности для сравнения. Теперь выделены фаги, специфичные в отношении более чем 100 родов (Ackermann, 1996); они найдены практически всюду, где их только искали. Однако лишь некоторые из них пока хорошо изучены или классифицированы (ср. Ackermann and DuBow, 1987).

Вторым давним источником затруднения, влияющим на терапевтическое использование, был вопрос о том, отражает ли литический агент, именуемый “бактериофаг”, врожденное свойство, присущее специфическим бактериям или требуется периодическая повторная инфекция внешнего агента. В течение 30-х и 40-х гг. становилось всё более ясно, что в некотором смысле справедливы обе точки зрения, что фактически имеется две весьма существенно различающиеся группы бактериофагов. Литические фаги всегда должны инфицировать извне,

перепрограммировать клетку-хозяина и взрывообразно выделять фаги путем разрывания или лизирования клетки после относительно постоянного интервала времени. Лизогенные фаги, с другой стороны, имеют иной выбор. Они могут фактически интегрировать свою ДНК в ДНК хозяина, подобно тому, как ВИЧ может внедрять ДНК-копию своей РНК, приводя по существу к постоянной ассоциации, также как профаг со специфической бактерией и всем ее потомством. Профаг управляет синтезом репрессора, блокирующего считывание остальных собственных его генов, а также генов любых близкородственных лизогенных фагов, обеспечивая большое преимущество для бактериальной клетки. Многие профаги еще более помогают своему хозяину, способствуя защите от различных неродственных, литических фагов. Иногда профаг освобождается от регуляции репрессора, вырезает свою ДНК из генома своего рода сайт-специфической рекомбинацией и начинает создавать фаги, разрывая затем клетку лизисом. Иногда процесс вырезания бывает ошибочным, и несколько бактериальных генов переносятся вместе с ДНК фага к новому хозяину; этот процесс, называемый трансдукцией, играет значительную роль в генетическом обмене бактерий. Такие лизогенные фаги - очень плохие кандидаты для фаговой терапии, как из-за их обыкновения индуцировать резистентность, так из-за того, что они могут потенциально приводить к переносу генов, участвующих в патогенности бактерий (это более подробно обсуждается ниже). Однако специфичность часто делает их очень полезными для фаготипирования с целью дифференцирования различных бактериальных штаммов.

Ключевые технические разработки, позволившие выяснить общую природу и свойства бактериофагов, включали в себя: (1) концентрирование и очистку некоторых крупных фагов с помощью высокоскоростного центрифугирования и обнаружение того, что они содержат равные количества ДНК и белка (Schlesinger, 1933 a, b) и (2) визуализацию фагов с помощью электронного микроскопа (Ruska, 1940; Pfankuch and Kausche, 1940). Вскоре после этого Ruska (1943) сообщил о первых попытках использовать электронный микроскоп для систематики фагов; с тех пор он стал главным инструментом в этой области (Ackermann and DuBow, 1987). Выяснилось, что каждый фаг имеет свою специфическую форму и размер, от сложности “полумесяца”, свойственного

строению T4 и его семейству, через варианты круглых головок с длинными или короткими хвостами лямбда и T7 до мелких нитчатых фагов, которые очень похожи на бактериальные пили (смотри рисунок у Ackermann, 1996).

ЛИТИЧЕСКИЕ ФАГИ

Гораздо лучшее понимание взаимодействий между литическим фагом и бактериями пришло благодаря детальным экспериментам с одноступенчатой кривой роста, явившимся продолжением работы d'Herelle (1922) ([Ellis and Delbrück, 1939](#), [Doermann, 1952](#)). Они выявили скрытый период, в течение которого происходила репликация ДНК и в клетке не было свободного фага, период внутриклеточного накопления фага и процесс лизиса, при котором фаг освобождался в поисках новых хозяев.

В начале 40-х гг. были проведены разработки, которые оказали большое влияние на направление исследования фагов в Соединенных Штатах и в большинстве стран Западной Европы. Они существенно переместили акцент от практического применения фагов к фундаментальным исследованиям. Биофизик, изучавший фаги, Max Delbrück, начал работать с ведущими биологами, изучавшими фаги Alfred Hershey и Salvador Luria. Они образовали “Фаговую Группу”, которая в конечном итоге значительно расширилась за счет участников летних Фаговых Курсов в Колд Спринг Харбор, Лонг-Айленд (Cold Spring Harbor, Long Island). Эти курсы продолжают в течение многих лет, начиная с 1945 г. и до сих пор там регулярно проводятся совещания посвященные фагам, хотя центр внимания переместился в направлении “бактериофаг и микробная генетика”.

Влияние Фаговой Группы на возникновение молекулярной биологии хорошо документировано ([Cairns et al, 1966](#); [Fischer and Lipson, 1988](#); [Summers, 1993b](#)). У вирулентных фагов было как раз правильное соотношение сложности и простоты, чтобы выявить ключевые концепции клеточной регуляции на молекулярном уровне. Однако главным элементом быстрого успеха фагов, как модельных систем, было то, что Delbrück убедил большинство биологов в Соединенных Штатах, занимавшихся фагами, сосредоточится на одной бактерии-хозяине (*E. coli* B) и ее семи литических фагах, создав очень сильное тесно сплоченную рабочую группу, работающую над одинаковыми проблемами. Члены ее были способны как эффективно организовать собственную работу, так и легко

общаться между собой. Эти 7 фагов были выбраны произвольно и обозначены типом T (T1 - T7). Как оказалось, T2, T4 и T6 были довольно близки друг к другу, организуя семейство “Т-четных” фагов, более подробно обсуждаемое далее. Эти фаги сыграли ключевую роль в выявлении того, что ДНК является генетическим материалом, что вирусы могут кодировать ферменты, что экспрессия генов опосредуется через специфические копии в виде информационной РНК, что генетический код имеет триплетную природу и многих других фундаментальных концепций. Однако отрицательной стороной такого сильного сосредоточения на нескольких фагах, выращиваемых в идеальных лабораторных условиях, было то, что очень мало исследованы и поняты как разнообразие, значения и свойства этих бактериофагов в естественных условиях, так и фагов, инфицирующих другие типы бактерий.

РАЦИОНАЛЬНАЯ ФАГОВАЯ ТЕРАПИЯ

Быстрый, мощный процесс осознания биологии фагов способствовал более осмысленному подходу к отбору и терапевтическому применению лечебных фагов. Однако в целом, взаимодействие между теми, кто так эффективно использовал фаги в качестве инструментов для понимания молекулярной биологии, и теми, кто продолжал работать над их экологией и терапевтическими применениями, отсутствовало. У многих из последних стимулом было беспокойство, в связи с увеличением распространенности нозокомиальных (внутрибольничных) инфекций и бактерий, резистентных к большинству или ко всем из известных антибиотиков. Особенно это касается Польши, Франции, бывшего Советского Союза, где использование лечебных фагов никогда полностью не прекращалось, и где широкое их клиническое применение и исследовательские работы продолжают до сих пор. Французский доктор Jean-Francois Vieu занимался фаготерапией вплоть до своего выхода на пенсию (около 10 лет назад). Он работал в “Service des Enterobacteries” (отделе энтеробактерий) Пастеровского Института в Париже и, в частности, приготовил фаги *Pseudomonas* для разового использования у больных. Этот опыт описан Vieu ([1975](#)) и Vieu et al. ([1979](#)). Фаговая терапия широко использовалась во многих странах Восточной Европы, как обычная часть клинической практики, и теперь в Москве и нескольких других городах России существуют компании, производящие для этой цели

препараты фагов. Однако большинство исследований и производство многих фаговых препаратов проводилось под руководством ключевых центров в Тбилиси (Грузия) и во Вроцлаве, (Польша). Поэтому в данной работе я остановлюсь на двух этих группах.

Академия Наук Польши, Вроцлав

Наиболее подробные публикации, документирующие фаговую терапию, принадлежат группе Stephan Slopek из Института Иммунологии и Экспериментальной Медицины Академии Наук Польши, Вроцлав. Эта группа опубликовала серию подробных статей в *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (ср. [Slopek et al. 1 983, 1985, 1987](#)), описывающих результаты лечения фагами с 1981 до 1986 у 550 больных. В этой серии исследований участвовали 10 польских медицинских центров, включая Вроцлавскую Медицинскую Академию, Кардиохирургическую Клинику, Клинику Детской Хирургии, Ортопедическую Клинику Института Хирургии; Клинику Нефрологии Клинику Легочных Заболеваний Института Внутренних Болезней. Диапазон возраста больных был от 1 недели до 85 лет; в 518 случаях фаг использовался после безуспешного лечения всеми доступными антибиотиками. Основными категориями инфекционных заболеваний были: длительно персистирующая гнойная сыпь, фурункулез, септицемия, абсцессы, гнойные инфекции дыхательных путей и бронхопневмонии, гнойный перитонит. В заключительной обобщающей статье (Slopek et al, 1987) авторы тщательно проанализировали результаты с учетом таких факторов, как природа и тяжесть инфекции, а также моноинфекции по сравнению с микстинфекцией. Положительный эффект наблюдался с частотой от 75 до 100% случаев (в среднем 92%), его критериями были значительное общее улучшение состояния, наличия тенденции к заживлению ран и исчезновению титруемых бактерий. В 84% случаев выявлено полное исчезновение нагноительного процесса и заживление ран. Особенно хорошо проходило лечение у новорожденных и детей; неудивительно, что наихудшие результаты были у пожилых больных и больных в финальной стадии тяжелого длительного заболевания, с ослабленной иммунной системой и сниженной общей резистентностью.

Все использованные бактериофаги были получены из обширной

коллекции Лаборатории Бактериофагов Института Иммунологии и Экспериментальной Терапии; в последующих исследованиях некоторые использованные специфические фаги получили специальные названия. Все они были вирулентными, способными полностью лизировать бактерии, в отношении которых они использовались. Только в первом исследовании было испытано 259 различных фагов (116 для *Staphylococcus*, 42 для *Klebsiella*, 11 для *Proteus*, 39 для *Escherichia*, 30 для *Shigella*, 20 для *Pseudomonas* и один для *Salmonella*); 40% из них были отобраны для использования непосредственно в целях терапии. Лечение происходило в режиме исследования, с фагом, изготовленным стандартными методами и испытанным на стерильность в Институте. В целом, оно включало прием через рот 10 мл стерильного лизата фага за полчаса до каждого приема пищи, с нейтрализацией желудочного сока водой (щелочной) Vichy, пищевой содой или желатином. Кроме того, пропитанные фагом компрессы обычно накладывались 3 раза в день на очаг поражения при местных инфекциях. Лечение продолжалось 1,5-14 недель, в среднем, 5,3 недели; при кишечной патологии было достаточно короткого лечения, тогда как при таких проблемах, как пневмония с плевральным свищем и гнойный артрит оно было очень долгим. Уровень бактериальной обсемененности и чувствительность к фагам постоянно мониторировали, при этом используемый фаг (фаги) меняли, если бактерии теряли чувствительность; терапию обычно продолжали две недели после последнего обнаружения бактерий.

Было выявлено мало побочных эффектов; те же, которые были обнаружены, вероятно, были неотделимы от лечебного процесса.

Примерно на 3-5 день часто регистрировалась боль в области печени, продолжавшаяся несколько часов авторы предположили, что она может быть связана с выделением большого количества эндотоксинов при наиболее интенсивной гибели бактерий под воздействием фагов. В случаях тяжелого сепсиса у больных на 7 - 8 сутки часто возникала лихорадка, длившаяся в течение 24 часов (Slopek et al, 1981a). Успешно использовались различные другие методы введения, в том числе, аэрозоли, ректальную инфузию или введение в хирургические раны. Внутривенное введение не рекомендовалось из-за опасности возможного токсического шока вызванного продуктами распада

бактерий в лизатах (Slopek et al, 1981a). Однако было ясно, что фаги легко попадали в организм из пищеварительного тракта и размножались везде, где присутствовали соответствующие бактерии, что, выявлялось по их присутствию в крови и моче, так же, как по терапевтическим эффектам (Weber-Dabrowska et al, 1987).

Данные о каждом больном подробно регистрировались. При окончательном заключении врач заполнял также специальную форму исследования, которая посылалась в исследовательскую группу Академии Наук Польши вместе с описаниями. Компьютерный Центр Вроцлавского Технического Университета проводил широкий анализ данных. При оценке результатов авторы использовали категории, установленные Международной Классификацией Болезней ВОЗ (1977). Они учитывали также влияние возраста, тяжести заболевания, первоначального состояния, типа (типов) причинных бактерий, продолжительности лечения и другого сопутствующего лечения. Статьи включают в себя много специфических подробностей о конкретных больных, которые помогают пониманию способов применения фаговой терапии, так же, как и подробный анализ трудных случаев.

Институт Бактериофагов Тбилиси

Наиболее обширная, но менее широко известная работа по фаговой терапии проводилась при содействии Института Бактериофагов в Тбилиси, института d'Herelle в бывшей Грузинской Советской Социалистической Республике. Поэтому эта работа будет рассмотрена подробно.

Грузия - это древняя и прекрасная страна с населением 5 миллионов, лежащая в долине между горами Большого Кавказа и югом России. Самцхе-Джаваксет граничит с Турцией, Арменией и Черным Морем. За все века политических переворотов во все критические моменты своей истории ей удавалось сохранить свою собственную культуру и уникальный язык, который родственен только (и отдаленно) языку басков. Грузия является христианской со II века, однако очень гордится своей открытостью для всех религий и культур, своими синагогами, мечетями и различными христианскими церквями, собранными в центре старого Тбилиси. Большую роль играют культура, интеллектуальный труд и гостеприимство. Уровень грамотности составляет 100%

(согласно Отчету ООН о гуманитарном развитии Грузии 1996 г.). Выдающиеся достижения ее в областях от музыки и математики до виноделия и кулинарии имеют древние традиции.

По словам различных грузинских врачей, с которыми я беседовала, фаговая терапия является там частью общего стандарта лечения, и особенно широко используется в условиях педиатрического, ожогового и хирургического госпиталя. Приготовление фагов проводилось в промышленном масштабе. Непосредственно перед распадом Советского Союза на производстве работало 1200 человек. Тонны таблеток, жидких препаратов и аэрозольных баллонов, содержащих тщательно подобранные смеси фагов для терапии и профилактики каждый день отправлялись в разные концы бывшего Советского Союза. Они были доступны как по рецептам врачей, так и в свободной продаже. Наибольшее применение находили они в больницах, для лечения как первичных, так и нозокомиальных инфекций - самостоятельно или в сочетании с химическими антибактериальными средствами. Особенно важную роль играли они тогда, когда обнаруживались антибиотико-резистентные микроорганизмы. Военные до сих пор одни из самых серьезных сторонников исследования и развития фаговой терапии, поскольку фаги доказали свою эффективность при раневых и ожоговых инфекциях, так же, как и для профилактики изнурительных желудочно-кишечных эпидемий в войсках.

История института интересна и тем, что отражает относительно неизвестный период карьеры d'Herelle's. Последующий материал основан на данных полученных от ряда сотрудников Института, из недавней статьи Shrayeg (1996) о d'Herelle в России, из Summers (1998) и из собственной работы d'Herelle.

В 1917 г. Георгий Элиава из Грузинского Института Микробиологии заметил, что вода в реке Коура (Мтквари) в Тбилиси (Тифлисе) оказывает бактерицидное действие. Такое наблюдение, можно было объяснить открытием бактериофага d'Herelle. Элиава неоднократно и по долгу бывал в Париже, в Институте Пастера и был одним из первых и преданных сотрудников d'Herelle; несколько его статей цитируются в первой монографии о фагах d'Herelle (1922). Они оба воплощали в жизнь мечту об основании Института Исследования Бактериофагов в Тбилиси, как всемирного центра фаговой терапии инфекционных заболеваний, имеющего как научную, так и производственную базу со своими

собственными экспериментальными клиниками. Эта мечта быстро стала реальностью, благодаря поддержке Серго Орджоникидзе, Наркома тяжелой промышленности, несмотря на оппозицию КГБ этому “иностранному проекту” и личным конфликтам между Элиава и Берия, тогда руководившим местным КГБ и вскоре возглавившим КГБ СССР, внушавшим всем страх прихвостнем Сталина. В 1926 г. согласно этому проекту на реке Мтквари был создан большой университетский городок. В течение многих лет d’Herelle делал поставки оборудования и библиотечных материалов, главным образом, за свой счет. В 1934 - 1935 гг. он со своей женой провел два 6-и месячных периода, работая в Тбилиси. За это время он посетил в Москве Каменского, Наркома здравоохранения и отказался от приглашения переехать туда. Он также написал книгу “Бактериофаг и феномен выздоровления”, переведенную на русский язык Элиавой и посвященную Сталину. D’Herelle намеревался, в конечном счете, переехать в Грузию; коттедж фактически, построенный для него, по прежнему стоит на территории Института. Однако в 1937 г. Элиава был арестован Берия, как “враг народа” и был казнен без суда, разделив трагическую судьбу многих грузинских и русских прогрессивных интеллигентов того времени, а d’Herelle, разочарованный, никогда не возвратился в Грузию или в СССР. Однако их институт сохранился и продолжает функционировать на своем первоначальном месте на Мтквари (которое он теперь разделяет с позже созданными институтами Молекулярной Физиологии и Биофизики и Физиологии Животных).

В 1938 г. Институт Бактериофагов был соединен с Институтом Микробиологии и Эпидемиологии под управлением Наркома здравоохранения Грузии. В 1951 г. он был формально передан группе Институтов Вакцин и Сывороток Всесоюзного министерства здравоохранения, заняв ведущее место в обеспечении бактериофагами для терапии и бактериального типирования во всем бывшем Советском Союзе. По заявкам Министерства здравоохранения сотни тысяч образцов патогенных бактерий посылались в Институт со всего Советского Союза для выделения наиболее эффективных штаммов фагов и лучшей характеристики их полезности. В 1988 г. было образовано Научно-производственное объединение “Бактериофаг” расположенное в Тбилиси с производственными площадками в Уфе, Хабаровске и Нижнем Новгороде.

Производственный отдел всегда работал на основе самокупаемости. Научный отдел института, поддерживаемый государством, имел электронно-микроскопическое оборудование, постоянный набор штаммов, лаборатории, изучающие фаги энтеробактерий, стафилококков и псевдомонад и составляющие новые смеси фагов, а также группы, занятые изучением иммунологии производством вакцин, работой с *Lactobacillus* и другими терапевтическими подходами. Объединение также проводило очень обширные исследования, необходимые для утверждения Министерством здравоохранения в Москве каждого нового штамма фагов, лечебного препарата и способа применения.

Тщательное исследование вариации бактерий-хозяев, литического спектра и особенностей перекрестной резистентности используемых фагов были главным фактором описанных успехов работы по фаговой терапии, проведенной в Институте. Все используемые для терапии фаги являются литическими, во избежание проблем, вызванных лизогенией. Проблемы бактериальной резистентности решались главным образом, путем использования грамотно выбранных смесей фагов с различной специфичностью рецепторов против каждого типа бактерий, так же как и фагов против разных бактерий, предположительно, вызывающих проблему микстинфекций. Эта ситуация далее улучшалась всякий раз, когда клиницисты типировали патогенные бактерии и мониторировали их чувствительность к фагам; при необходимости затем готовились новые смеси, к которым были чувствительны данные бактерии. Нередко использование фага в сочетании с другими антибиотиками демонстрировало лучшие результаты, чем каждый из фагов или антибиотиков в отдельности.

Глубина и степень проведенной работы сильно впечатляют. Например, только в 1983-85 гг. Лаборатория Морфологии и Биологии Бактериофагов Института провела исследования роста, биохимических свойств и чувствительности к фагам 2038 штаммов *Staphylococcus*, 1128 *Streptococcus*, 328 *Protease*, 373 *Ps. aeruginosa* и 622 *Clostridium*, полученных из клиник и госпиталей городов бывшего Советского Союза. Новые штаммы фагов более широкого спектра действия были выделены с помощью этих и других культур Института и включены в новую технологию приготовления широко используемого препарата; после чего он ингибировал 71% штаммов *Staphylococcus* вместо 58% до того, 76%

Pseudomonas вместо 55%, 51% *E. coli* вместо 11%, 30% *Proteus* вместо 3%, 60% *Streptococcus* вместо 38% и 80% *Enterococcus* вместо 3% (Zemphira Alavidze, личное сообщение). В последующие годы продолжалось совершенствование технологии приготовления лекарственных средств на основе дальнейших исследований, были выделены фаги против *Klebsiella* и *Acinetobacter* и на их основе созданы терапевтические препараты. Одной из последних разработок является препарат *Intestiphage*, включающий 23 различных фага, активных против ряда кишечных бактерий.

Много усилий затрачено на разработку и документации для получения утверждения Министерством здравоохранения новых специализированных систем введения таких, как аэрозоль для использования при инфекциях дыхательных путей, при обработке области разреза перед операцией и при санировании таких проблемных зон больницы, как операционные. Были также созданы драже с энтеросоллюбилильным покрытием на основе штаммов фагов, способных перенести процессы выслушивания, что объясняется тем, что основная часть продукции поставлялась в другие части бывшего Советского Союза. Фаги особенно эффективны при непосредственном нанесении на раны или другие места локализации инфекции, так как они вначале размножаясь в бактериях расположенных недалеко от поверхности, затем проникают все глубже и глубже, повторяя инфекционный цикл.

В связи с тем, что микроорганизмы, устойчивые к нескольким лекарственным препаратам, стали проблемой, вносящей большой вклад в летальность, и для проведения правильного долговременного поиска, в последние 12 лет большое внимание уделялось борьбе с нозокомиальными инфекциями. Клинические исследования эффективности фаговой терапии по соответствующим протоколам были проведены в сотрудничестве с рядом больниц, но в доступном виде они представлены недостаточно. Земфира Алавидзе и ее коллеги, в настоящее время занимающиеся большинством текущих терапевтических разработок и клинической работой, имеют готовящиеся рукописи, в которых описывается их работа в таких институтах, как Ленинградский (Санкт-Петербургский) Центр Интенсивной Терапии Ожогов, Ленинградская Военно-Медицинская Академия, Казанский Травматологический Центр, Кемеровский родильный дом. Некоторые

из наиболее интенсивных исследований проводятся в Тбилиси, в Педиатрическом Госпитале, Ожоговом Центре, Центре по лечению Сепсиса и Институте Хирургии. Специальные смеси были разработаны для борьбы со штаммами, вызывающими проблемы нозокомиальных инфекций в различных больницах. Они очень эффективно используются для санитарной обработки операционных и оборудования, водопроводных кранов и других источников распространения инфекции (большой частью представленной *Staphylococcus*).

Производственный отдел на базе Института Бактериофагов имел большие цистерны для выращивания выбранного фага с помощью соответствующих непатогенных бактерий и бульона, который они готовили сами из высококачественного мяса. Получившиеся лизаты фагов фильтровались в стерильных условиях с помощью керамических фильтров, которые могли стерилизоваться нагреванием. Различные фаги для каждого лекарственного препарата после этого комбинировались, автоматически упаковывались и запечатывались в 10 мл ампулы или приготавливались и упаковывались для употребления другим способом. Приблизительные титры определяли по разведению, которое могло вызвать лизис после одновременного заражения определенного количества бактерий стандартных тестовых штаммов, каждая партия также испытывалась на предмет бактериального загрязнения. В тех редких случаях, когда планировалось инъекционное введение, фаги концентрировали и ресуспендировали в физиологическом растворе, к режиму контроля добавлялось тестирование на морских свинках, чтобы убедиться в отсутствии остаточных фрагментов бактериальной поверхности (эндотоксинов), которые могут вызывать проблемы при инъекции. (Как упоминалось выше, обычно сообщается, что фаги появляются в кровотоке и других жидкостях организма вскоре после введения *per os* или нанесения на рану, и продолжают оставаться эффективными против системных инфекций, так что инъекционное введение обычно не нужно.)

Инъецируемые формы составляли только около 5% от общего производства фагов в разгар активности Института Бактериофагов. Теперь там производство прекращено из-за таких факторов, как дороговизна и сложность содержания животных для необходимого контроля токсичности, а также тяжелой ситуации в Грузии в связи с распадом Советского Союза. Ожесточенные бои в Абхазии

привели к эмиграции 350 000 человек в стране с 5-миллионным населением и обрезали главные железнодорожные, шоссейные и энергетические трассы между Россией и Грузией, оставив лишь одно существенное шоссе через горы Большого Кавказа. До сих пор электроэнергия доступна только несколько часов в сутки и отопление – серьезная проблема зимой. Для науки страна может предоставить очень мало денег, но некоторые исследования продолжаются, несмотря на фактическое отсутствие финансирования заработной платы и оборудования. Конфликт создал интересную возможность для широкого распространения использования бактериофагов. Каждый солдат грузинской армии носил с собой аэрозольный баллончик со смесью фагов, который они применяли для дезинфекции ран (Alavadze, Meipariani, Gvasalia, рукопись в работе). Завод был приватизирован несколько лет назад и используется для других целей, так что фаги, используемые в настоящее время для терапии, выращиваются в больших оплетенных бутылках, после чего готовятся соответствующие смеси, которые переносятся во флаконы и запечатываются вручную. Однако контроль на стерильность и эффективность в отношении соответствующих бактерий по-прежнему остается тщательным. К сожалению, пока не восстановлен электронный микроскоп, и обеспечение электроэнергией не стало более предсказуемым, приготовленные бактериофаги не могут быть проверены так, чтобы быть уверенным в том, что они соответствуют определенным морфотипам, размерам и форме. Ученые Института продолжают делать все, что от них зависит в данных условиях и многие в Тбилиси считают себя обязанными жизнью усилиям этой группы. Обширная терапевтическая работа все еще проводится в местных госпиталях: хирургическом, ожоговом, педиатрическом и инфекционном, амбулаториях, включая расположенную на территории Института.

СОВРЕМЕННАЯ РАБОТА, СВЯЗАННАЯ С ФАГОТЕРАПИЕЙ, НА ЗАПАДЕ

Levin и Bull (1996), а также Barrow и Soothill (1997) опубликовали хорошие обзоры большинства работ о применении фаготерапии у животных, выполненных в Великобритании и США, в 80-х гг. в этих странах вновь возрос интерес к фаготерапии. Результаты хорошо согласуются с описанными выше клиническими исследованиями в отношении эффективности, безопасности, и важности

соответствующего внимания к биологии взаимодействия бактериофага и хозяина, усиливая доверие к обширному Восточно-европейскому опыту.

В Великобритании Н. W. Smith и М. В. Huggins (1982, 1983) провели ряд исследований по использованию фагов при системных инфекциях *E.coli* на мышах и при диспепсическом заболевании у молодых телят. Они, например, обнаружили, что введение 10^6 колониеобразующих единиц специфического патогенного штамма внутримышечно убивало 10/10 мышей, но ни одна не погибала, если одновременно вводили 10^4 бляшкообразующих единиц бактериофага, селективного в отношении K1 капсульного антигена этого же бактериального штамма. Лечение бактериофагом было более эффективным, чем использование таких антибиотиков, как тетрацилин, стрептомицин, ампициллин или триметоприм/сульфафуразол. Более того, вновь появившиеся резистентные бактерии были лишены капсулы и были гораздо менее вирулентными. У телят они обнаружили очень высокую степень защиты, несмотря на то, что не удалось выделить бактериофаги, специфические в отношении K88 или K99 адгезивным фимбриям, играющим ключевую роль в присоединении бактерий к внутренней поверхности тонкой кишки. Тем не менее бактериофаг смог уменьшить на много порядков количество бактерий фиксированных на ней и, фактически, остановить потерю жидкости. Наиболее хорошие результаты были получены тогда, когда бактериофаги вводились одновременно с бактериями или заранее, а так же при совместном использовании различных бактериофагов отличавшихся друг от друга по специфичности адгезии. Кроме того, бактериофаг мог передаваться от животного к животному, поддерживая возможность профилактического действия в стаде. Если бактериофаг давался только после развития диареи, тяжесть инфекции все равно существенно снижалась, и ни одно животное не погибло (Smith et al, 1987).

Levin and Bull (1996) провели детальный анализ динамики популяции бактериофага и его распределения в тканях на основе исследования Smith и Huggins (1982). Этот анализ может быть полезен в оценке параметров как влияющих на успех фаготерапии, так и обеспечивающих ей очевидное преимущество по сравнению с антибиотикотерапией. Они перешли к проведению собственных, очень интересных исследований на животных (Levin and Bull, рукопись в работе) и пришли к заключению, что фаготерапия, по крайней мере, заслуживает

дальнейшего изучения.

Soothill (1994) провел ряд весьма красивых исследований по подготовке к использованию бактериофагов при инфекционных заболеваниях и у ожоговых больных. Используя морских свинок, он показал, что отторжение кожного трансплантата может быть предотвращено предшествующей обработкой бактериофагом против *Pseudomonas aeruginosa*. Он также наблюдал великолепный защитный эффект фагов как *Pseudomonas*, так и *Acinetobacter* при системных инфекциях мышей, вызванных соответствующими возбудителями (Soothill, 1992). В последнем случае всего 100 фаговых частиц защищали от инфицирования 100 миллионами бактерий – пятикратной LD50!

Merrill и соавт. (1996) провели ряд экспериментов, целью которых было выявление особенностей взаимодействия бактериофагов с иммунной системой человека. Merrill был первым консультантом доктора Richard Carlton при создании компании "Exponential Biotherapies, Inc.", занимающейся исследованиями возможностей фаговой терапии. Опубликованная ими совместная работа была посвящена литическим производным лизогенного лямбда бактериофага. Хотя конкретный штамм был плохим кандидатом для терапевтического использования, как об этом говорилось ранее, и будет обсуждаться ниже, авторы собрали очень интересные и важные данные о факторах, влияющих на взаимодействия бактериофагов и иммунной системы.

ПАТОГЕННОСТЬ БАКТЕРИЙ

Большинство бактерий непатогенные; фактически, они играют ключевую роль в экологическом балансе различных органов нашего тела, включая систему органов пищеварения и поверхность тела. Они помогают защищать нас от патогенов; это одна из причин того, что использование антибиотиков широкого спектра действия делает нас столь уязвимыми и того, что более узконаправленные бактерицидные средства более предпочтительны. Большинство серьезных патогенов – близкие родственники непатогенных штаммов. Так в чем же различия, что делает определенные штаммы такими вирулентными? В последние годы наблюдается значительный прогресс в отношении исследований, разъясняющих молекулярные механизмы патогенеза (ср. Falkow 1996). Они увенчались определением полной последовательности оснований ДНК *E.coli* K12

(непатогенной) и нескольких других бактериальных штаммов, а так же широкомасштабным клонированием и секвенированием детерминант патогенности. В целом, они включают множество генов, которые сгруппированы в так называемые, “острова патогенности” ("pathogenicity islands" или "Pais", “Пайс”), которые могут иметь длину от 50 до 200 тыс. оснований. В общем, они обладают некоторыми уникальными свойствами, указывающими на то, что сами бактерии приобрели их, как своего рода “инфекционную болезнь” в прошлом и сохранили их, поскольку они помогали бактериям колонизировать новые экологические ниши с меньшей конкуренцией. Многие из этих Pais переносятся на маленьких вне хромосомных кольцевых ДНК, называемых плазмидами, которые также могут быть передатчиками генов резистентности к лекарствам. Другие Pais расположены в хромосоме, где их часто обнаруживают в составе дефектного лизогенного профага, потерявшего некоторые ключевые гены и не способного индуцировать формирование частиц бактериофага. Однако иногда дефектные профаги могут рекомбинироваться со сходными (лизогенными) инфицирующими фагами. Поэтому есть смысл избегать использования лизогенных бактериофагов или их литических производных для фаготерапии, чтобы избежать какого-либо шанса приобретения и перемещения таких островков патогенности.

Патогенность бактерий человеческого кишечника обусловлена двумя главными факторами: (1) продукцией молекул токсинов, типа шигатоксина (шигелл и некоторых патогенных *E. coli*) или холерного токсина. Эти токсины вызывают проблемы, модифицируя белки в клетках-мишенях. (2) приобретением новых адгезинов клеточной поверхности, которые позволяют бактериям в большей степени связываться со специфическими рецепторами клеток тонкой кишки, а не просто перемещаться по направлению к толстой кишке. Все эти адгезины содержат компоненты так называемого механизма секреции III-типа, относящиеся к объектам, участвующим в сборке жгутиков, обеспечивающих подвижность, и нитевидных бактериофагов, а также функционирующие во многих растительных патогенах. Инфекционный процесс, вызванный любыми патогенными кишечными бактериями, запускает изменения в расположенных поблизости кишечных клетках. Они включают дегенерацию микроворсинок, образование индивидуальных “пьедесталов”, окружающих каждую бактерию и, в случае *Salmonella* и *Shigella*,

индукцию клеточных сигнальных молекул, вызывающих поглощение бактерии и последующий ее внутриклеточный рост.

Недавно *E. coli* O157 вызывала большое беспокойство, в связи с контаминацией ей таких продуктов, как гамбургеры и не пастеризованные соки, что приводило к серьезным эпидемиям (ср. Grimm et al., 1995). Смертельные случаи встречались, в основном, среди детей и пожилых людей, обычно от геморрагического колита (кровавой диареи) или гемолитико-уремического синдрома, когда поражались почки. Антибиотикотерапия оказалась бесполезной (ср. Greenwald and Brandt, 1997). Мы обнаружили, что вариант O157, вызвавший эпидемию в Сиэтле, распространявшуюся через сеть быстрого питания, является восприимчивым, по крайней мере, к нескольким из наших бактериофагов, родственным T4 (Mark Mueller, Kutter et al., не опубликовано). Интересно рассмотреть их возможное использование на откормочных площадках и предприятиях, занимающихся упаковкой мяса, а также для профилактики и терапии при эпидемических вспышках.

СЕМЕЙСТВО Т-ЧЕТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

Существенной долей лечебных фаговых смесей являются бактериофаги, родственные T4, сыгравшему ключевую роль в развитии молекулярной биологии (ср. Kagam, 1994). Как обсуждалось выше, название “семейство Т-четных бактериофагов” является исторической случайностью, отражающим тот факт, что все: T2, T4 и T6 из оригинальной коллекции Дельбрукской “Фаговой группы”, были родственными. Большие серии T4-подобных фагов были изолированы для исследования на всех континентах, например из водоочистных сооружений Лонг-Айленда, у животных Денверского зоопарка, у дизентерийных больных в Восточной Европе (шигеллы часто являются хозяевами упомянутых фагов). Члены семейства вызывают инфицирование большинства тонкокишечных и родственных им бактерий (Ackermann and Krisch, Archives of Virology, в печати). Почти все из исследованных до настоящего времени Т-четных фагов используют 5-гидроксиметилцитозин вместо цитозина в своих ДНК, что защищает их от большинства бактериальных ферментов рестрикции, предохраняющих ДНК бактерий от вторжения из вне. Это существенно расширяет диапазон возможных хозяев представителей этого семейства. Известна последовательность оснований

ДНК фага T4 (Kutter, Stidham et al., 1994), нам известно многое об инфекции в стандартных лабораторных условиях и о способах применяемых им для столь эффективного поражения бактерий. Потенциально мы можем использовать некоторые из этих данных, особенно, наиболее изученные сходства и различия представителей этого обширного семейства, для более точных подходов к фаготерапии. Нам известно, что различные члены семейства T-четных фагов используют в качестве своих рецепторов различные белки и олигосахариды наружной мембраны, данных о волокнистых структурах хвостовой части, вовлеченных в этот процесс, вполне достаточно для возможности прогноза того, какой фаг будет “работать” на данных бактериях и проектирования фагов, обладающих новой специфичностью (cf. Henning and Hashemolhosseini, 1994; Krisch, личное сообщение).

Пока еще имеется слишком мало исследований экологии T4 и его поведения при условиях, более приближенных к естественной среде обитания и обстоятельств, которые возникнут при фаготерапии, когда среда часто анаэробная и бактерии нередко оказываются в условиях недостатка питательных веществ. Немногочисленная доступная информация на эту тему была обобщена Kutter, Kellenberger et al (1994). Различные исследования проливают свет на возможность сосуществования этих высоковирулентных бактериофагов в равновесии с их хозяевами в природе. Например, они способны репродуцироваться в отсутствие кислорода в течение нескольких поколений анаэробного роста бактерии-хозяина. Мы обнаружили, что они могут переживать некоторое время в состоянии своего рода гибернации, бездействия, внутри голодающих клеток, а затем позволять своему хозяину в достаточной степени адаптироваться повторно, когда обеспечение питательными веществами вновь восстановится, и производить некоторое количество фагов. Это особенно интересно и важно, поскольку бактерии претерпевают многие коренные изменения, повышающие их сопротивляемость к различным неблагоприятным воздействиям окружающей среды, дабы пережить периоды голодания (cp. Kolter, 1992).

T-четные фаги обладают уникальной способностью, которая существенно влияет на их широкое распространение в природе и конкурентные преимущества. Они способны выбирать время лизиса в зависимости от относительной

доступности бактерий-хозяев в своем окружении. Когда клетки *E. coli* инфицируются одиночными T4, они лизируются через 35-30 минут при температуре тела в условиях богатой питательной среды, высвобождая около 100-200 фагов из одной клетки. Однако когда дополнительные T-четные фаги атакуют клетку более чем через 4 минуты после начального инфицирования, клетка не лизируется в обычное время. Вместо этого она продолжает создавать фаги в течение целых 6 часов, причем окончательное время возможного лизиса зависит от множественности суперинфицирующего фага (ср. Doremann, 1948; Abedon, 1994). Эта задержка называется “запрещением лизиса”.

Таким образом, по многим причинам семейство фагов, родственных T4, является отличным кандидатом для терапевтического использования против тонкокишечных и других грамотрицательных бактерий. Исследования их экологии и распределения проводятся с учетом этих целей, как в Тбилиси, так и в The Evergreen State College. Также важно развитие аналогичного рода понимания других семейств фагов, потенциально полезных для фаготерапии, с использованием преимуществ многих доступных сейчас мощных инструментов. Работа, направленная на достижение этого результата, развивается во множестве лабораторий во всем мире, но по-прежнему пока находится в зачаточном состоянии, поскольку никто не выходит за рамки тонкокишечных бактерий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ясно, что настало время для более внимательного рассмотрения потенциала фаготерапии, как через поддержку новых исследований, так и через тщательное изучение уже доступных данных. Как заключают Barrow и Soothill, “Фаготерапия может быть очень эффективна, и в определенных условиях имеет некоторые уникальные преимущества перед антибиотиками. Противовесом росту частоты антибиотико-резистентных бактерий и дефициту созданию новых классов антибиотиков является необходимость исследования применения фага при ряде инфекционных болезней”. Здесь важны оговорки Ackermann (1987): “Лечение вслепую явно не приносит пользы; фаги должны тестироваться так же, как антибиотики, показания должны быть правильными, но этого придерживаются в медицине повсюду. Однако фаготерапия требует создания банков фагов и тесного сотрудничества между клиницистом и лабораторией. Фаги имеют, по крайней

мере, одно преимущество... В то время как концентрация антибиотика с момента его применения уменьшается, число фагов должно увеличиваться. Другое преимущество состоит в том, что фаги способны распространяться и, таким образом, предотвращать болезнь. Тем не менее, предстоит сделать много исследований...по стабильности терапевтических препаратов; клиренсу тканей и крови от фагов; их размножению в человеческом организме; инаktivации антителами, сывороткой или гноем и выделению бактериальных токсинов при лизисе... Кроме того, терапевтические бактериофаги должны быть охарактеризованы, по крайней мере, с помощью электронной микроскопии". В то время как внедрение инъекционных форм фагов на Западе кажется преждевременным без широких дальнейших исследований, их правильное применение в некоторых сельскохозяйственных целях и для наружного использования может потенциально способствовать уменьшению появления антибиотико-резистентных штаммов. Более того, аккуратное использование соответствующих фагов, кажется оправданным в случаях, когда бактерии, устойчивые ко всем доступным антибиотикам, угрожают жизни больного. Они особенно полезны в случаях упорных госпитальных инфекций, когда большое количество особо уязвимых людей инфицируются одним и тем же штаммом бактерии в условиях закрытого стационара.

Существенную роль в росте популярности возможностей фаготерапии и связанных с ней возможных научных и этических дилемм (Summers, 1991), сыграл классический роман Синклера Льюиса (Sinclair Lewis) *Arrowsmith*, за который автор получил Нобелевскую премию по литературе. Сегодня рост научного, общественного и коммерческого интереса к фаготерапии находит отражение и стимулируется несколькими путями. Например, "BBC" недавно выпустила документальный фильм *Horizon The Virus that Cures* ("Вирус, который лечит") о фаговой терапии, основанный на Исследовательской статье Радецкого о Возвращении Хорошего Вируса. Несколько компаний начали исследовательскую работу по фаготерапии. Кроме того, для поддержки связей, в образовательных и исследовательских целях создан некоммерческий фонд "PhageBiotics". Хочется верить, что такое внимание приведет к росту поддержки крайне необходимых в этой области исследований и быстрому прогрессу в развитии соответствующего их

применения, обеспечив, по крайней мере, одну альтернативу растущей проблеме полирезистентных бактерий.

Выражаю признательность

Особая благодарность Drs. Rezo Adamia, Zemphira Alavidze, Teimuraz и Nino Chanishvili, Taras Gabisonia, Liana Gachechiladze, Mzia Kutateladze, Amiran Meipariani и их коллегам в Институте Бактериофагов, Тбилиси за их гостеприимство и усилия, которые они приложили, чтобы помочь мне осознать проведенную ими обширную клиническую работу. Мне также оказали информационную и коммуникационную поддержку: доктор Marina Shubladze, работавшая педиатром в Тбилиси 10 лет, ныне проживающая в Сиэтле; Nino Mzavia, Nino Trapaidze, Timur и Natasha Zurabishvili, которые работают в моей лаборатории по биологии T4; Hans-Wolfgang Ackermann (университет Laval), Eduard Kellenberger (Базель), William Summers (Йель), Steve Abedon (штат Огайо) и Bruce Levin (Emory); Mansour Samadpour, Вашингтонский университет; Kathy d'Acci (руководитель клинической лаборатории, госпиталь Св. Петра, Олимпия); врач, д.м.н. Jess Spielholz, и Robin Moore, доктор естественных наук; и, особенно, множество коллег и студентов, работающих в нашей лаборатории в Evergreen, особо Barbara Anderson, Pia Lippincott, Mark Mueller, Stacy Smith, Elizabeth и Chelsea Thomas, Burt Guttman и Jim Neitzel.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1) Abedon, S. T. (1994). Lysis and the Interaction between Free Phages and Infected Cells, p. 397-405. In J. D. Karam (ed.), *Molecular Biology of Bacteriophage T4*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 2) Ackermann, Hans-Wolfgang and Michael DuBow (1987) *Viruses of Prokaryotes I: General Properties of Bacteriophages*, ch. 7. Practical Applications of Bacteriophages. CRC Press, Boca Raton, Florida
- 3) Ackermann, H.-W. (1996). Frequency of morphological phage descriptions in 1995. *Arch. Virol.* 141:209-218.
- 4) Ackermann, H.-W. and H. Krisch (1997) A catalogue of T4-type bacteriophages. *Archives in Virology*. 142, in press.
- 5) Adamia, R. et al: (1990) The virulent bacteriophage IRA of *Salmonella typhimurium*: cloning of phage genes that are potentially lethal for the host cell. *J. Basic Microbiol.* 30: 707-716

- 6) Barrow, P. A. and J. S. Soothill. (1997). Bacteriophage Therapy and Prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of the potential. *Trends Microbiol* 5:268-271
- 7) Begley, Sharon. (1994). The End of Antibiotics. *Newsweek*, March 28, pg. 47-51.
- 8) Burnet, F. and M. McKie (1929). Observations on a permanently lysogenic strain of *B. enteridis gaerther*. *Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci.* 6: 277-284.]
- 9) Bruynoghe, R. and J. Maisin (1921). Essais de therapeutique au moyen du bacteriophage du Staphylocoque. *C. R. Soc. Biol.* 85:1120-1121;
- 10) Cairns, John, George Stent and James Watson (1966). *Phage and the Origins of Molecular Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH, Long Island N. Y.
- 11) D'Herelle, F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bac. dysentériques. *Cr. r. Acad. Sci. Paris* 165:373.
- 12) D'Herelle, F. (translated to English by Dr. George H. Smith, PhD) (1922). *The Bacteriophage: Its Role in Immunity*. Williams and Wickens Co./Waverly Press, Baltimore, USA.
- 13) D'Herelle, F., F. W. Twort, J. Bordet and Andre Gratia. Discussion on the Bacteriophage (Bacteriolysin). from the Ninetieth Annual Meeting of the British Medical Association, Glasgow, July, 1922. Published in the *British Medical Journal* 2:289-297, and reproduced in G. Stent, *Papers on Bacterial Viruses*, second edition, Little, Brown and Co., Boston, 1965
- 14) Doermann, A. D. (1948). Lysis and lysis inhibition with *Escherichia coli* bacteriophage. *J. Bacteriol.* **55**:257-275.
- 15) Doermann, A. D. (1952). The Intracellular Growth of Bacteriophages. I. Liberation of intracellular bacteriophage T4 by premature lysis with another phage or with cyanide. *J. Gen. Physiol.* 35:645-656.
- 16) Eaton, Monroe D. and Stanhope Bayne-Jones (1934). Bacteriophage Therapy. *JAMA* **103**:1769-1776; 1847-1853; 1934-1939.
- 17) Ellis, E. L. and M. Delbrück (1939). The Growth of Bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 22:365-384.

- 18) Falkow, Stanley (1996). The Evolution of Pathogenicity in *Eschericia*, *Shigella* and *Salmonella*. p. 2723-2729 in *E. coli* American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 19) Fékéty, Robert (1995). Antibiotic-associated Diarrhea and Colitis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 8:391-397.
- 20) Fischer, Ernst and Carol Lipson. (1988). *Thinking about Science: Max Delbrück and the Origins of Molecular Biology*. W. W. Norton and Co.
- 21) Gabisonia T.G. et al. (1995). Phagotherapy of nosocomial strains of *P. aeruginosa*, belonging to different o-groups. *Georg. Med. News*. N.15, pp.19-21.
- 22) Gachechiladze, K. K. et al: (1991). Host-controlled modification and restriction as a criterion of evaluating the therapeutical potential of *Pseudomonas* phage. *J. Basic Microbiol.* 31:101-106.
- 23) Greenwald, David and Lawrence Brandt (1997). Recognizing *E. coli* O157:H7 Infection. *Hospital Practice*, April 15, 123-140
- 24) Grimm, Linda, M. Goldoft, J. Kobayashi, J. Lewis, D. Alfí, A. Perdichizzi, P. Tarr, J. Ongerth, S. Moseley and M. Samadpour. Molecular Epidemiology of a Fast-Food Restaurant-Associated Outbreak of *E. coli* O157:H7 in Washington State. *J. Clin. Microbiol.* 33:2155-2158.
- 25) Hankin, E. H. (1896). L'action bactericide des Eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Ann. de l'Inst. Pasteur* 10:511
- 26) Jacob, F. and J. Monod (1961). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.* 3: 318-56.
- 27) Kolter, R. (1992). Life and death in stationary phase. *ASM News* 58:75-79.
- 28) Krueger, A. P. and J. H. Northrop (1931). The Kinetics of the Bacterium-Bacteriophage Reaction. *J. Gen. Physiol.* 14:223-**
- 29) Kutter, E., E. Kellenberger, K. Carlson, S. Eddy, J. Neitzel, L. Messinger, J. North, and B. Guttman. (1994). Effects of Bacterial Growth Conditions and Physiology on T4 Infection, p. 406-420. In J. D. Karam (ed.), *Molecular Biology of Bacteriophage T4*. American Society for Microbiology, Washington, DC.

- 30) Kutter, E., T. Stidham, B. Guttman, E. Kutter, D. Batts, S. Peterson, T. Djavakhishvili, F. Arisaka, V. Mesyanzhinov, W. Ruger, and G. Mosig. (1994). Genomic Map of Bacteriophage T4, p. 491-519. In J. D. Karam (ed.), *Molecular Biology of Bacteriophage T4*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 31) Kutter, Elizabeth, Ketevan Gachechiladze, Alexander Poglazov, Elena Marusich, Mikhail Shneider, Pia Aronsson, Alberto Napuli, Darlene Porter, Vadim Mesyanzhinov (1996). Evolution of t4-related phages. *Virus Genes* 11:285-297.
- 32) Lederberg, Joshua (1996) Smaller Fleas ... ad infinitum: Therapeutic Bacteriophage: *PNAS* 93:3167-3168
- 33) Levin, Bruce and J. J. Bull (1996). Phage Therapy Revisited: The Population Biology of a Bacterial Infection and its Treatment with Bacteriophage and Antibiotics. *The American Naturalist* 147:881-898.
- 34) Lewis, Sinclair (1925). *Arrowsmith*. Harcourt and Brace, New York.
- 35) Merril, Carl... and Sankar Adhya (1996): Long-circulating bacteriophages as antibacterial agents -- *PNAS* 93:3188-3192.
- 36) Pfankuch, E., Kausche, G.A. Isolierung und Dbermikroskopische Abbildung eines Bakteriophagen. *Naturwissenschaften* 28, 46. 1940.
- 37) Ptashne, Mark (1967). Isolation of the Lambda Phage Repressor. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 57:306-**
- 38) Radetsky, Peter (1996). Return of the Good Virus. *Discover* 17:50-58
- 39) Ruska, H. Dber die Sichtbarmachung der bakteriophagen Lyse im Dbermikroskop. *Naturwissenschaften* 28: 45-46, 1940.
- 40) Ruska, H. Ergebnisse der Bakteriophagenforschung und ihre Deutung nach morphologischen Befunden. *Ergeb. Hyg. Bakteriol. Immunforsch. Exp. Ther.* 25: 437-498, 1943.
- 41) Saunders, Mary Ellen (1994). Bacteriophages in Industrial Fermentations. p. 116-121 in *Encyclopedia of Virology*, R. Webster and A. Granoff, ed. Academic Press.
- 42) Schlesinger, M. (1933). Reindarstellung eines Bakteriophagen in mit freiem Auge sichtbaren Mengen. *Biochem. Zschr.* 264: 6

- 43) Shryer, David (1996). Felix d'Herelle in Russia. Bull. Inst. Pasteur **94**:91-96.
- 44) Slopek, Stefan, Irina Durlakova, Beata Weber-Dabrowska, Alina Kucharewica-Krukowska, Marek Dabrowski and Regina Bisikiewicz (1981). Results of Bacteriophage Treatment of Suppurative Bacterial Infections I. General Evaluation of the Results. Arch. Immunol. Ther. Exp. 31:267-291.
- 45) Slopek, Stefan, Irina Durlakova, Beata Weber-Dabrowska, Alina Kucharewica-Krukowska, Marek Dabrowski and Regina Bisikiewicz (1981). Results of Bacteriophage Treatment of Suppurative Bacterial Infections II. Detailed Evaluation of the Results. Arch. Immunol. Ther. Exp. 31:293-327.
- 46) Slopek, Stefan, Irina Durlakova, Beata Weber-Dabrowska, Marek Dabrowski and Alina Kucharewica-Krukowska (1984). Results of Bacteriophage Treatment of Suppurative Bacterial Infections III. Detailed Evaluation of the Results Obtained in Further 150 Cases. Arch. Immunol. Ther. Exp. 32:317-335.
- 47) Slopek, Stefan, Kucharewicz-Krukowska A; Weber-Dabrowska B; Dabrowski M (1985). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. IV. Evaluation of the results obtained in 370 cases. Arch Immunol Ther Exp 33(2):219-40
- 48) Slopek, Stefan, Kucharewicz-Krukowska A; Weber-Dabrowska B; Dabrowski M (1985). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. V. Evaluation of the results obtained in children. (Slopek S; Arch Immunol Ther Exp 33(2):241-59
- 49) Slopek, Stefan, Alina Kucharewica-Krukowska, Beata Weber-Dabrowska and Marek Dabrowski (1985). Results of Bacteriophage Treatment of Suppurative Bacterial Infections VI. Analysis of treatment of suppurative staphylococcal infections. Arch. Immunol. Ther. Exp. 33:261-273.
- 50) Slopek, Stefan, Beata Weber-Dabrowska, Marek Dabrowski and Alina Kucharewica-Krukowska, (1987). Results of Bacteriophage Treatment of Suppurative Bacterial Infections in the Years 1981-1986. Arch. Immunol. Ther. Exp. 35:569-583.

- 51) Slopek, Stefan, and Alina Kucharewica-Krukowska, (1987). Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. *Arch Immunol Ther Exp* 35(5):553-61
- 52) Smith, H. W. and R. B. Huggins (1982). Successful treatment of experimental *E. coli* Infections in mice using Phage: its general superiority over Antibiotics. *J. Gen. Microbiology* 128:307-318.
- 53) Smith, H. W. and R. B. Huggins (1983) Effectiveness of Phages in treating Experimental *E. coli* Diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J. Gen. Microbiology* 129:2659-2675.
- 54) Smith, H. W. and R. B. Huggins. (1987) The Control of Experimental *E. coli* Diarrhea in calves by means of Bacteriophage. *J. Gen. Microbiology* 133:1111-1126
- 55) Smith, H. W., R. B. Huggins and K. M. Shaw. (1987) Factors influencing the Survival and Multiplication of Bacteriophages in Calves and in their Environment. *J. Gen. Microbiology* 133:1127-1135.
- 56) Summers, William C. (1991). On the Origins of the Science in *Arrowsmith*: Paul de Kruif, Felix d'Herelle and Phage. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* 46:315-332.
- 57) Summers, William C. (1993a). Cholera and Plague in India: The Bacteriophage Inquiry of 1927-1936. *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences* 48:275-301.
- 58) Summers, William C. (1993b). How Bacteriophage came to be Used by the Phage Group. *J. Hist. Biol.* 26:255-267.
- 59) Summers, William C. (1998). *D'Herelle* **. Yale University Press, in press.
- 60) Twort, F. W. (1915) An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet* 1915 II:1241.
- 61) Vieu, J.-F. (1975). Les Bacteriophages. In *Traite de Therapeutique*, Vol. Serums et Vaccins. Fabre, J., ed. Flammarion, Paris, p. 337-40
- 62) Vieu, J.-F., F. Guillermet, R. Minck and P. Nicolle (1979). Donneees actueles sur les applications therapeutiques des bacteriophages. *Bull. Acad.Natl.Med* 163:61.

- 63) The Virus That Cures, a BBC Horizon Documentary produced by Judith Bunting.
- 64) Weber-Dabrowska, Beata, Marek Dabrowski and Stefan Slopek (1987). Studies on Bacteriophage Penetration in Patients Subjected to Phage Therapy.