

УДК 578.7

Экологические основы рациональной фаговой терапии

А.В. Летаров^{*}, А.К. Голомидова, К.К. Тарасян

Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН, 117312, Москва, просп. 60-летия Октября, 7, корп. 2

*E-mail: letarov@gmail.com

РЕФЕРАТ Знание особенностей взаимоотношений бактерий и их вирусов в средах организма человека и животных является основой для любых попыток управления этими процессами, в т.ч. и для фаговой терапии бактериальных инфекций. Однако до сих пор наше понимание значения бактериофагов для экологии симбиотических микробных сообществ и степени их участия в гомеостазе макроорганизма является крайне фрагментарным. Анализ доступных данных позволяет предположить, что механизмы, обуславливающие стабильное сосуществование фагов и чувствительных к ним бактерий, не одинаковы как у различных видов, так и в различных участках экотопов тела животных одного вида. Регуляторное действие фагов на бактериальные популяции зависит от специфических биологических и физико-химических условий, таких как рН, концентрации доступных субстратов, плотность популяции потенциальных хозяев, ассоциации бактерий-хозяев со слизистыми оболочками и другими поверхностями, присутствия веществ, специфически ингибирующих адсорбцию фагов и др. В процессе фаговой терапии часто возникают сложные экологические взаимодействия между популяциями патогенных бактерий, фагами, применяемыми в качестве антибактериальных агентов, и самим макроорганизмом. В обзоре рассмотрены накопленные к настоящему моменту сведения об экологии естественных бактериофагов в микробных системах, связанных с организмом животных и человека, а также экологические и физиологические процессы, определяющие эффективность терапевтического использования препаратов бактериофагов у млекопитающих.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактериофаги, фаговая терапия, микрофлора тела человека, микрофлора тела животных, экология бактериофагов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; БОЕ – бляшкообразующая единица, соответствует жизнеспособной частице бактериофага, если эффективность посева на данном штамме в данных условиях близка к 1; КОЕ – колониеобразующая единица, соответствует одной жизнеспособной бактериальной клетке.

ВВЕДЕНИЕ

Использование бактериофагов в качестве противобактериальных агентов было предложено одним из первооткрывателей феномена бактериофагии Ф. д'Эрелем, который впервые применил фаговый препарат для лечения тяжелой дизентерии у ребенка в 1919 г., всего через два года после публикации его первой статьи, сообщавшей об открытии вирусов бактерий [1, 2]. Период массового увлечения терапевтическим применением фагов в западной медицине в конце 30-х – начале 40-х гг. сменился практически полным забвением этого подхода, чему способствовали, с одной стороны, весьма нестабильные результаты, объясняющиеся во многом недостаточным развитием биологии фагов, технологией производства, хранения и применения их лечебных препаратов, а с другой стороны, триумфом антибиотикотерапии бактериальных инфекций, сулившей более простое и надежное решение большинства клинических задач в этой области [2]. Тем не менее, разработка и применение лечебных фаговых препаратов никогда не прекращались в Советском Союзе, а в дальнейшем и в Польше и Чехии. Накопленный в этих странах обширный опыт

свидетельствует о высокой эффективности и безопасности препаратов бактериофагов. В настоящее время массовое производство таких противобактериальных средств, зарегистрированных национальными органами здравоохранения, сохраняется в России и в Грузии (где с 1930-х гг. действует Институт бактериофага, микробиологии и вирусологии (ныне им. Г. Элиавы), созданный при личном участии Ф. д'Эреля). В Польше препараты фагов производятся и применяются в специализированном центре в Институте Иммунологии и экспериментальной терапии во Вроцлаве.

В связи с широким распространением лекарственной резистентности патогенных микроорганизмов и с резким снижением темпов разработки и коммерциализации новых антибактериальных агентов в последние 20 лет интерес к фаготерапии резко возрос, как в отечественной, так и в западной медицине [3, 4]. По проблеме фаговой терапии в последнее время опубликован ряд обзоров [2, 5, 6, 7].

В современной фаговой терапии находят применение главным образом бактериофаги, относящиеся по классификации международного комитета по таксономии вирусов

(ICTV) к порядку Caudovirales (tailed phages, «хвостатые фаги»). Эти вирусы составляют около 96 % всех описанных бактериофагов [8]. Хвостатые фаги подразделяются на три семейства:

1. Podoviridae, имеющие короткий несократимый хвостовой отросток (хвост);
2. Siphoviridae, снабженные длинным несократимым хвостом;
3. Myoviridae, обладающие сократимым хвостом.

Существенным экологическим значением обладают также РНК-содержащие фаги семейства Leviviridae, а также нитчатые фаги, содержащие однополовую ДНК, принадлежащие к семейству Inoviridae. Вирионы левивирусов имеют форму маленьких (около 26 нм) икосаэдрических частиц, содержащих однополовую РНК-геном. Нитевидные частицы иновирусов представляют собой молекулы кольцевой однополовой ДНК, покрытые оболочечными белками низкой молекулярной массы.

Представители других семейств вирусов прокариот (всего их официально насчитывается к настоящему моменту 14) встречаются, по-видимому, редко и (вероятно) не имеют большого значения для микроэкологии симбиотических микробных сообществ млекопитающих. Более детальные сведения о классификации бактериофагов и биологии отдельных их групп можно найти в работе [8], а также в книге [9].

Несмотря на тот факт, что вирулентные бактериофаги (т.е. такие, которые не обладают способностью к интеграции своего генома в геном бактерии и формированию т.н. лизогенных штаммов) вызывают гибель всех инфицированных ими бактериальных клеток и способны в определенных условиях к лавинообразному размножению и уничтожению большого количества чувствительных к ним микроорганизмов, эти вирусы стабильно сосуществуют со своими хозяевами практически во всех природных экосистемах [10]. Такое сосуществование длится на протяжении всей обзорной истории жизни на Земле [11], при этом на популяционном уровне взаимодействия между бактериями и фагами достаточно сложны и многообразны, и однозначная интерпретация фагов как «естественных врагов» бактерий не отражает истинного положения вещей.

Организм человека или животного представляет собой с точки зрения микробиолога сложный макрокосм, включающий несколько взаимосвязанных экологических систем, локализованных в различных органах и участках тела [12], которые заселены более или менее плотными сообществами микроорганизмов, включающих в т.ч. и бактериофаги [13].

Роль бактериофагов в микрофлоре тела в последнее время принято признавать «существенной», однако детальная информация по этому вопросу в большинстве случаев отсутствует. Присутствие бактериофагов в составе нормальной микрофлоры тела впервые продемонстрировал их первооткрыватель Феликс д'Эрель. Он обнаружил фаги энтеробактерий в фекалиях человека и некоторых видов животных [1]. Тем не менее ни качественные, ни тем более количественные описания и модели взаимоотношений популяций фагов и бактерий в симбиотических микробных системах пока не разработаны ни для одного вида животных. Понимание особенностей эколого-физиологических

взаимоотношений в тройственной системе «бактерии – фаги – макроорганизм» должно служить теоретической основой для управления этой системой, в т.ч. и путем введения экзогенных фаговых препаратов, предназначенных для элиминации нежелательных бактериальных популяций.

Целью настоящего обзора является анализ современных представлений об экологии вирусов бактерий в симбиотических микробных системах человека и животных, механизмах прямого взаимодействия эндогенных и экзогенно вводимых фаговых частиц с клетками и органами макроорганизма, а также краткое рассмотрение основных теоретических принципов, лежащих в основе терапевтического применения фаговых препаратов.

БАКТЕРИОФАГИ В СОСТАВЕ НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ ТЕЛА

КОЛИЧЕСТВО И РАЗНООБРАЗИЕ ФАГОВ В МИКРОФЛОРЕ ЖИВОТНЫХ

Наиболее многочисленны работы, посвященные исследованию бактериофагов в желудочно-кишечном тракте млекопитающих (см. ниже), включая толстый кишечник (и фекалии), а также микрофлору рубцов жвачных и преджелудков сумчатых животных [14], где они составляют абсолютное большинство свободных вирусных частиц [13–26]. Интересно, тем не менее, отметить, что большинство РНК-содержащих вирусов в фекалиях человека представлено частицами вирусов растений, поглощаемыми с пищей [27]. Присутствие свободных фаговых частиц не было до сих пор зафиксировано на коже или в легких животных. Однако в некоторых патологических состояниях, таких как муковисцидоз, в легочном отделяемом обнаруживали фаги к одновременно присутствующим бактериям, включая *Pseudomonas aeruginosa* [28]. По не вполне понятным причинам свободные частицы бактериофагов не удалось пока зафиксировать в полости рта [29].

Поскольку симбиотические сообщества желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) животных и человека включают до нескольких сотен видов (и, соответственно, до тысяч штаммов) бактерий и архей, каждый из которых потенциально подвержен фаговой инфекции, подавляющее большинство фагов, населяющих среды организма, невозможно исследовать культуральными методами. Однако применение прямых методов исследования, таких как выделение и очистка некультивируемых вирусных сообществ из содержимого различных отделов ЖКТ и их исследование методами световой и электронной микроскопии, электрофоретического разделения, а также метагеномики, дало возможность оценить представленность и уровень разнообразия фагов в соответствующих микробных сообществах. Детальное рассмотрение этих работ выходит за рамки данной статьи; их подробный анализ приведен в обзоре [13]. Отметим лишь, что концентрация свободных фаговых частиц в сообществах толстого кишечника и в рубце жвачных животных составляет по разным оценкам 10^8 – 10^{11} частиц на мл⁻¹. Число различимых морфологических типов составляет от первых десятков до сотен, а количество генотипов оценивается от нескольких сотен до 1200 [13]. Общая численность фагов и их качественный состав могут под-

вергаться существенным изменениям во времени. Вопрос о приуроченности определенных типов фагов к различным видам животных, а также проблемы биологической географии фагов, ассоциированных с животными и человеком, остаются практически неисследованными.

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ БАКТЕРИОФАГИ В НОРМАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЕ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Хозяйская специфичность бактериофагов обычно достаточно узка и ограничена, как правило, определенным набором штаммов, принадлежащих к одному или нескольким очень близким видам бактерий. В некоторых случаях, однако, фаги могут инфицировать бактерии нескольких различных видов или даже родов. Ф. д'Эрель (1921) впервые предположил, что выделение фагов *Yersinia pestis* из фекалий крыс через 3 мес. после завершения эпидемии чумы может объясняться ростом этих вирусов на бактериях других видов (на наш взгляд, этот результат может быть также объяснен персистенцией йерсиний у крыс). Персистенцию вибриофагов у устриц при отсутствии заметного количества хозяев в течение зимнего периода наблюдали в недавней работе [30]; авторы предположили, что вибриофаги могут использовать альтернативных хозяев. Таким образом, мультивидовая или мультиродовая специфичность некоторых фагов может иметь определенное экологическое значение в симбиотической микрофлоре животных. Тем не менее во многих случаях даже близкие штаммы одного вида могут существенно отличаться по чувствительности к бактериофагам. Это означает, что воздействие фаговой инфекции на различные популяции отдельных видов или штаммов, населяющих одну и ту же экосистему тела животного, может различаться очень существенно. Культуральные методы являются в настоящее время единственным подходом, позволяющим изучать экологические взаимоотношения фагов и их хозяев с разрешением на уровне отдельных штаммов.

В литературе имеется значительное число сообщений о выделении и характеристике тех или иных бактериофагов из образцов, полученных от животных и человека. Бактериофаги *Streptococcus bovis*, *S. durans*, *Prevotella bryantii*, *Bifidobacterium ruminale* были выделены из рубцового содержимого разных видов жвачных [14, 31]. Фекалии человека и различных животных послужили источником выделения фагов *E.coli*, *Salmonella*, *Bacteroides*, *Klebsiella* и других бактерий [32–43]. В большинстве случаев фаги выделялись с использованием лабораторных штаммов соответствующих видов либо полевых изолятов, полученных и охарактеризованных заблаговременно.

Присутствие и титры ДНК-содержащих колифагов сильно варьируют у разных видов животных и между отдельными особями. Это хорошо согласуется с данными о том, что некультивируемое вирусное сообщество является высоковариабельным [44, 45]. В то же время отсутствуют сообщения о специфической ассоциации каких-либо типов или групп ДНК-содержащих колифагов с определенным видом животных. Напротив, присутствие F-специфических РНК-содержащих (F-РНК) колифагов (семейства *Leviviridae*) в фекалиях животных обладает определенной видовой специфичностью. Эти бактериофаги могут быть подразделены на четыре генетических группы, которые

различаются также серологически. Встречаемость отдельных серотипов существенно различается у разных видов животных: фекалии лошадей, например, редко содержат F-специфические фаги, тогда как более 70 % образцов помета кур обнаруживают высокие титры этих вирусов (10^5 – 10^7 БОЕ \times г $^{-1}$). Только 10–20 % образцов человеческих фекалий содержат F-РНК фаги, но встречаемость групп II и III в этих образцах значительно выше (> 80 % от общего числа изолятов), чем у животных, у которых группы I и IV преобладают примерно в такой же степени [33, 39, 42, 46]. К настоящему времени удовлетворительного объяснения такой связи не предложено.

Обнаружение возможной ассоциации некоторых генетических подгрупп в пределах установленных родов хвостатых бактериофагов с определенными видами макрохозяев может быть затруднено, поскольку простые и производительные методы селективного выделения генетически родственных фагов из полевых образцов не разработаны. Почти селективное выделение фагов, родственных T-четным, из фекалий педиатрических пациентов с диареей в Бангладеш происходило при использовании тест-культуры штамма *E.coli* K803 [47]. Посев тех же самых образцов на газон энтеропатогенного штамма *E.coli* O127:K63 приводил к выделению совершенно иного набора фагов, причем все они принадлежали к семейству *Siphoviridae* [47].

ИССЛЕДОВАНИЯ ИНДИГЕННЫХ ФАГОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

Furuse et al. [36] обнаружили, что титры колифагов в фекалиях здоровых людей обычно низки и пул свободных фаговых частиц формируется у них в основном за счет умеренных фагов. Эти данные свидетельствуют о том, что у здоровых людей продукция фаговых частиц в кишечнике происходит в основном за счет спонтанной индукции лизогенных бактерий. И, таким образом, размножение фагов в литическом цикле имеет ограниченное значение для экологии колиформных бактерий в кишечнике человека. В противоположность здоровым людям, у некоторых пациентов, страдающих внутренними болезнями или лейкемией, титры колифагов были выше, и значительную часть высеваемых бактериофагов составляли вирулентные фаги [46]. У нескольких пациентов увеличение титров колифагов коррелировало с ухудшением состояния.

С результатами работы [36] согласуются безуспешные попытки выделить колифаги из фекалий собак с использованием индигенных штаммов *E.coli* [48]. При использовании в качестве хозяев более 500 индигенных штаммов *E.coli*, выделенных из 6 образцов фекалий собак, содержащихся в домашних условиях, колифагов обнаружено не было. Лишь один из этих образцов содержал фаги, активные в отношении лабораторного штамма *E.coli* C. Однако у 16 собак, содержащихся в приюте, были обнаружены титры колифагов от 0 до 10^7 БОЕ \times г $^{-1}$. Авторы предполагают, что отсутствие фагов у домашних собак связано с их изоляцией от себе подобных и со «слишком чистыми» условиями содержания. Реконтактация фекальными микроорганизмами, очевидно, ограничена и у людей, что может отчасти объяснить вышеприведенные результаты [36].

Результаты нашей недавней работы, выполненной с использованием лошадей в качестве модельного объекта [15, 49], находятся в противоречии с данными работы [46]. У лошадей целлюлолитическое микробное сообщество, локализованное в толстом кишечнике, отличается высокой сложностью и включает в себя до 500 видов бактерий, архей, а также грибов и простейших. В отличие от рубцового сообщества микробная биомасса толстого кишечника лошадей не подвергается последующему ферментативному гидролизу и экскретируется с фекалиями в практически неизменном виде. Физико-химические условия в толстом кишечнике лошадей являются, по-видимому, более стабильными, чем у многих других видов животных, т. к. среднее время переваривания богатой целлюлозой пищи (травы) составляет до 72 ч, значительно больше, чем промежуток между актами приема пищи или дефекации [50].

Для того чтобы исследовать экологические взаимоотношения колифагов и их хозяев в этой системе, мы проследили динамику титров колифагов и колиформных бактерий у 4 животных с отбором образцов каждые 48 ч. При этом для определения титров фагов использовалась тест-культура лабораторного штамма *E. coli* C600. Мы наблюдали значительные по амплитуде колебания титров фагов (2–4 логарифмических единицы у разных животных в течение 16-дневного периода наблюдений). В то же время титры колиформных бактерий были значительно стабильнее и колебались около значения 5×10^5 КОЕ \times г $^{-1}$.

В работе [36], в 9 сериях образцов, полученных от 19 здоровых людей с двухнедельными интервалами, не обнаружили значительных временных изменений титров колифагов и их биологического разнообразия. Различия динамики колифагов у людей и лошадей может отражать более значимый вклад фаговой инфекции в экологию энтеробактерий у последних.

Отсутствие корреляции между титрами колиформ и колифагов у исследованных животных может быть объяснено высокой степенью разнообразия штаммов *E. coli* и других энтеробактерий, составляющих пул колиформ в кишечнике лошадей [51]. Для дифференциации близкородственных изолятов, которые, однако, могут различаться по чувствительности к фагам, мы предложили простую систему геномного ПЦР-фингерпринтинга [49]. Используя эту систему, мы продемонстрировали, что пул колиформных бактерий, содержащийся в образцах фекалий лошадей, включает до 1500 индивидуальных штаммов (оценка с помощью непараметрического критерия *Chao1*). Доля штаммов колиформ, чувствительных к отдельному изоляту колифага, полученному из того же образца, в среднем составила 1–3 % штаммов. Разнообразие бактериофагов, активных в отношении отдельного индигенного штамма *E. coli* (полученного из того же образца), как правило, очень низко и ограничивается 1–2 генотипами, различимыми с помощью рестрикционного анализа. Разнообразие фагов, высеваемых на лабораторном штамме *E. coli* C600, было также ограничено 1–3 типами в каждом исследованном образце. По всей видимости, эта ситуация отражает напряженную конкуренцию вирусов за доступные клетки хозяев.

ВЛИЯНИЕ ФАГОВОЙ ИНФЕКЦИИ НА ПОПУЛЯЦИИ БАКТЕРИЙ В ЖКТ

Микробная биомасса может составлять до 54 % влажного веса фекалий человека [52]. Колиформные бактерии (> 80 % которых обычно представлены штаммами *E. coli*) обычно присутствуют в фекалиях людей и многих животных в титрах 10^5 – 10^8 КОЕ \times г $^{-1}$ [39]. *Streptococcus bovis* выявляется в рубцовой жидкости овец в концентрациях 10^6 – 10^7 КОЕ \times мл $^{-1}$ [14, 53]. Эти плотности популяций превышают пороговый уровень, необходимый для экспоненциального размножения фагов, составляющий около 10^4 клеток \times мл $^{-1}$ для большинства систем фаг–хозяин [54]. Таким образом, должны существовать определенные механизмы, стабилизирующие сосуществование фагов и бактерий.

Мы предполагаем, что инфекция колифагами представляет собой селективирующий фактор, ответственный за поддержание высокого уровня внутривидового разнообразия колиформ в кишечнике лошадей, ограничивая несколько «наиболее приспособленным» штаммам возможность вытеснить остальные. С другой стороны, это разнообразие сильно ограничивает доступность клеток хозяев для каждого отдельного типа колифагов, стабилизируя, таким образом, систему. Высокий уровень разнообразия и ретикулярная организация делают затруднительным прямой дифференциальный мониторинг численности отдельных штаммов и связанных с ними фагов с целью прямой проверки данной гипотезы. Однако недавно нами был обнаружен эффект резкого понижения внутривидового разнообразия колиформ у лошади, получавшей перорально энрофлоксацин в течение длительного периода лечения тяжелого ранения конечности. При этом общий титр колиформ оставался в пределах нормальных значений (доминирующие штаммы были устойчивы к антибиотикам). Использование таких животных с искусственно сниженным внутривидовым разнообразием симбиотических колиформ в качестве модельного объекта экологии бактериофагов, может позволить провести прямое экспериментальное тестирование нашей гипотезы. Другим возможным подходом к решению этой проблемы является исследование процесса установления нормальной микрофлоры у новорожденных животных.

Структура сообщества кишечных колиформных бактерий и колифагов у лошадей согласуется с результатами математического и экспериментального моделирования развития микробных сообществ, включающих бактерии и их фаги, в условиях, которые допускают коэволюцию обоих компонентов [55–58]. В этих экспериментах наблюдалось расщепление популяции хозяев на множество генетических линий, различавшихся по чувствительности к фагам. В свою очередь фаги испытывали селекцию на расширение спектра хозяев ценой уменьшения эффективности адсорбции. Таким образом, сложность исходно двухкомпонентной системы многократно возрастала [57].

Взаимодействие с бактериофагами может также способствовать отбору штаммов бактерий, несущих мутации в генах систем репарации неспаренных оснований или иные мутации, уменьшающие стабильность генома [59, 60]. Такие гипермутательные штаммы получают преимущество только в быстро меняющейся среде, где возможность приобретения новых свойств «окупает» негативный эффект

накопления вредных мутаций [61]. Воздействие бактериофагов, также способных к эволюции *in situ*, является, по-видимому, одним из вариантов такого варибельного селективного давления. В естественных популяциях энтеробактерий было экспериментально продемонстрировано присутствие заметной доли гипермутабельных штаммов [62]. Таким образом, фаговая инфекция может способствовать формированию фенотипического разнообразия бактерий не только за счет прямого отбора устойчивых вариантов, но и за счет поддержания в популяции гипермутабельных штаммов.

Инфекция бактериофагами может играть также некоторую роль в последовательности событий, имеющих место в кишечном сообществе лошадей при перегрузке ЖКТ углеводами. Было высказано предположение, что какие-то токсины, продуцируемые измененной кишечной флорой, попадают в кровотоки и вызывают, прямо или косвенно, нарушение адгезии эпителия копыта к базальной мембране. Недавно было показано [63], что резкое увеличение числа клеток стрептококков группы *S. bovis / equinus* в толстом кишечнике происходит через 8–16 ч после дачи олигофруктана. Однако жизнеспособность этих бактерий очень быстро падает. Одно из возможных объяснений этого явления состоит в массовой инфекции стрептококков соответствующими фагами, по аналогии с явлением фагового контроля цианобактериального цветения воды [10].

Значительное селективирующее воздействие природных фагов было продемонстрировано на популяции *Campylobacter jejuni* у кур. Наличие фагов *C. jejuni* в слепой кишке кур негативно коррелировало с уровнем колонизации бактерией (в среднем 10^5 КОЕ \times г $^{-1}$ в образцах, содержащих фаги, против 10^7 КОЕ \times г $^{-1}$ в образцах, где фагов не обнаруживалось) [64]. Позднее удалось показать, что присутствие фагов селективирует варианты *C. jejuni*, несущие крупномасштабные перестройки генома [65], возникающие вследствие латериального переноса или как результат внутринтегномных инверсий по двум Мю-подобным профагам, интегрированным в ДНК бактерии [66]. В обоих случаях варианты, чувствительные к фагам, имели значительное преимущество в способности колонизировать бройлерных кур. В отсутствие фагов популяция быстро возвращалась к чувствительному фенотипу. Авторы предположили, что геномные перестройки *C. jejuni*, возникающие в ЖКТ птиц, служат адаптивным механизмом, позволяющим пережить периоды активности фагов и последующую конкуренцию за ресурсы.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ИСКУССТВЕННО ВВОДИМЫХ ФАГОВ НА БАКТЕРИИ ЖКТ

Эффективная элиминация патогенных бактерий из ЖКТ с помощью фаговых препаратов была многократно продемонстрирована в экспериментах по терапевтическому применению фагов [2, 7]. Терапевтический эффект фагов может, однако, сводиться просто к уменьшению популяции патогена до уровня, при котором иммунная система хозяина способна эффективно контролировать его размножение. В некоторых опытах даже такие низкие дозы фага, как 10^2 БОЕ, могли предотвращать развитие инфекции при последующем экспериментальном заражении патогенной *E. coli* [67], при этом означенные низкие

дозы фага были значительно менее эффективны, если применялись после инокуляции патогеном. Это позволяет предположить, что популяция патогенной бактерии значительно более подвержена фаговой атаке до того, как ей удастся колонизировать определенные защищенные ниши в кишечнике.

Действие вводимого извне коктейля фагов на резидентные и интродуцированные популяции *E. coli* в кишечнике мышей исследовалось в работе [68]. Мыши, использованные в этих экспериментах, стабильно выделяли *E. coli* в титрах около 10^6 КОЕ \times г $^{-1}$ фекалий. Эта величина несколько варьировала во времени, но присутствие естественных колифагов не детектировалось на индикаторном штамме *E. coli* K803, чувствительном ко всем фагам, использованным в последующих опытах. Мыши были подвергнуты действию фагового коктейля с титром 10^7 КОЕ \times мл $^{-1}$, добавляемого к воде. Эти фаги в сумме проявляли активность практически против 100 % резидентных штаммов, полученных от этих же животных до начала эксперимента. Тем не менее воздействие вводимых извне фагов на титры колIFORMных бактерий в фекалиях было незначительным, при этом фаги не могли самоподдерживаться в кишечнике за счет инфекции резидентных бактерий. Изоляты *E. coli*, полученные во время эксперимента, сохраняли те же паттерны чувствительности к компонентам коктейля, как и до эксперимента. В то же время эти фаги были способны очень эффективно снижать численность популяции чувствительного штамма *E. coli*, интродуцированного гнотобиотическим мышам за неделю до приема фагового коктейля. При этом происходила активная репликация фага в кишечнике. Однако выжившая часть популяции оставалась чувствительной к фагам, что позволяет предположить существование в кишечнике мышей определенных сайтов, в которых клетки оказываются физически или физиологически защищены от фаговой инфекции. Так как практически вся резидентная популяция обычных мышей защищена, эти «укрытия», по-видимому, покрывают практически все ниши, пригодные для длительной колонизации *E. coli* в кишечнике мышей. Интересно отметить, однако, что мыши, полученные из того же питомника через 1 год после описанных экспериментов, практически не содержали *E. coli* в своем кишечнике и были колонизированы другими видами энтеробактерий [Brüssow, личное сообщение]. С этим наблюдением согласуются результаты работы [69], в которой было обнаружено, что менее 20 % из 48 исследованных ею мышей содержали резидентную *E. coli* в ЖКТ, при этом колифаги присутствовали в минимальных титрах. Автор предположила, что одним из основных барьеров для размножения колифагов в ЖКТ мыши является отсутствие достаточной популяции хозяев.

На продукцию фагов в кишечнике оказывают также влияние физико-химические факторы среды. Желчные соли и углеводы, например, могут оказывать ингибирующее действие на адсорбцию ряда колифагов [70]. Этот эффект нивелируется экспрессией белка Ag43, представляющего собой поверхностный адгезин бактерий, способствующий агрегации клеток, например при образовании биопленок. Синтез Ag43 регулируется по типу фазовых вариаций, таким образом фаговая инфекция может при некоторых обстоятельствах селективировать клет-

ки с пониженной способностью к образованию биопленок. Необходимо отметить, что на некоторые фаги *Bacteroides* добавление желчных солей к среде культивирования производило противоположный эффект, улучшая эффективность посева [71].

Рост в составе биопленок на поверхности слизистой оболочки или на пищевых частицах может также играть существенную роль в ограничении фаговой инфекции бактерий в ЖКТ. По некоторым данным [72], популяция *E. coli* в просвете кишечника мышей представлена клетками в состоянии голодания, физиологически мало пригодными для размножения фагов. Активно размножающаяся часть популяции может быть локализована только в микроколониях на поверхности слизистой оболочки кишечника этих животных [73]. В обеих работах, однако, были использованы мыши, обработанные стрептомицином и искусственно инокулированные единственным штаммом *E. coli* ВJ4 с известным фенотипом. Кроме того, нужно отметить, что физиология пищеварения у мышей может существенно отличаться от более крупных животных. У мышей скорость метаболических процессов значительно выше, а время прохождения пищи по кишечнику меньше, чем, например, у человека или лошади. Более того, отношение площади слизистой оболочки к объему просвета кишечника у мышей значительно выше, что создает условия для более быстрого всасывания питательных веществ. Таким образом, вопрос о том, в какой мере данные, полученные на мышах, могут быть экстраполированы на более крупные виды животных, остается открытым.

УЧАСТКИ ТЕЛА С Пониженным ВОЗДЕЙСТВИЕМ ФАГОВ НА МИКРОФЛОРУ

По имеющимся данным, в кишечнике по меньшей мере некоторых видов животных бактериофаги успешно преодолевают различные физико-химические барьеры, препятствующие инфекции, и эффективно размножаются за счет резидентных популяций хозяев, представляя из себя фактор, лимитирующий их численность. Принимая во внимание открытый характер экосистемы ЖКТ в отношении обмена веществом с окружающей средой, значительная роль бактериофагов в ней является вполне ожидаемой. Однако ситуация может существенно отличаться в других экосистемах организма животных, также плотно заселенных микроорганизмами. Hitch et al. [29], например, не смогли выделить из ротовой полости людей фаги, активные в отношении индигенных бактерий, что позволило им сделать вывод, что бактерии в данной системе не подвержены существенному влиянию фаговой инфекции. Удовлетворительного объяснения этому факту пока не предложено.

В микробной системе рубца жвачных животных некоторые виды бактерий достигают значительных популяционных уровней. *S. bovis* может присутствовать в концентрациях 10^6 – 10^7 КОЕ×мл⁻¹ [14, 53], причем вся популяция *S. bovis* у овец может принадлежать к единственному фаготипу [53]. Авторы наблюдали быструю смену доминирующего штамма на иной, обладающий другим фаготипом, но эти события не сопровождались появлением в рубцовой жидкости бактериофага, способного лизировать какой-либо из этих штаммов [53]. Тем не менее присутствие фагов *S.*

bovis в рубце в титрах 10^1 – 5×10^4 БОЕ×мл⁻¹, варьирующих у разных индивидуумов, было позднее продемонстрировано [74].

Экология рубцовых стрептофагов активно изучалась Таракановым с соавт. в 1970–80-х гг. К сожалению, большинство работ этих авторов опубликованы в труднодоступных журналах и ведомственных отчетах, поэтому мы ссылаемся здесь на книгу [14], в которой дан детальный обзор их исследований. Авторами были обнаружены фаги *S. bovis* в рубцах коров и овец в титрах 10^1 – 10^4 БОЕ×мл⁻¹. В результате тщательно контролируемого полевого эксперимента было установлено, что пероральное применение препарата бактериофага *S. bovis* (стрептофагина) у коров приводило к увеличению концентрации фага в рубце на 4–5 порядков, сопровождающееся уменьшением количества амилитических бактерий, уменьшением общей амилитической и увеличением целлюлолитической активности рубцового содержимого. Эти изменения приводили к улучшению мясной и молочной продуктивности и улучшению качества продукции этих животных, что было подтверждено детальными и хорошо документированными исследованиями [14]. После прекращения дачи стрептофагина титры фагов в рубце быстро возвращались к исходному уровню, и количество амилитических бактерий возрастало. Полученные результаты свидетельствуют о том, что препарат одного единственного фага может оказывать воздействие на заметную часть популяции *S. bovis* в рубцах экспериментальных животных, что соответствует исследованиям [53] о низком внутривидовом разнообразии *S. bovis* в рубце овец. В то же время очевидно, что присутствует некоторый фактор, препятствующий эффективному размножению стрептофагов на резидентной популяции бактерий в этой системе.

Было показано, что таниновая кислота при физиологических концентрациях может ингибировать размножение бактериофагов, вызывая осаждение фаговых частиц [75]. Тараканов с соавт. [14] продемонстрировал, что рубцовая жидкость коров, а также уксусная кислота при физиологических концентрациях могут инактивировать бактериофаги *S. bovis*. При этом чувствительность разных фагов сильно варьировала и зависела от используемых концентраций инактивирующих веществ. Ингибирование активности фагов в рубце различными химическими веществами может играть ключевую роль в ограничении фагового лизиса резидентных бактерий. Эта модель согласуется с выводами работы [76] о том, что наблюдающийся массовый лизис бактериальной биомассы в рубце обусловлен, скорее, автолитическими процессами, нежели фаговой инфекцией.

Влагалище у женщин и самок животных также представляет собой интенсивно колонизируемую бактериями экологическую нишу. Наиболее существенной частью вагинальной микрофлоры людей являются лактобациллы. Виды и штаммы этих бактерий варьируют у различных индивидуумов [77], однако обычно у каждой отдельной женщины 1–2 штамма являются доминирующими [78]. Плотность колонизации довольно высока и составляет около 10^6 – 10^7 КОЕ на вагинальный мазок. Таким образом, можно предположить, что это сообщество может подвергаться массовому

лизису бактериофагами. Однако все попытки выделения свободных фагов из вагинальных выделений были до сего момента безуспешны [79]. В то же время было показано, что лизогенные штаммы лактобацилл часто встречаются в вагинальном микробном сообществе [79, 80].

Хотя влагалище менее подвержено обмену бактериями и вирусами с внешней средой, за исключением передачи, связанной с сексуальной активностью, при исследовании вагинальных мазков, полученных от клинически здоровых женщин, часто наблюдается неожиданное резкое снижение численности лактобацилл. В большинстве случаев нормальная флора самопроизвольно восстанавливается, однако у некоторых индивидуумов возникает т.н. анаэробный бактериальный вагиноз – заболевание, при котором лактобациллярная флора замещается анаэробными бактериями, такими как *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Atapobium* and *Mobiluncus species*. По эпидемиологическим свойствам это заболевание имеет черты инфекции, передающейся половым путем [81, 82], хотя этиологический агент до сих пор не установлен. A. Blackwell [81] было сделано предположение, что причиной нарушения лактобациллярной флоры, приводящей в ряде случаев к развитию вагиноза, является фаговая инфекция. Мы предполагаем, что такого рода событие может возникать при попадании во влагалище лактобацилл, лизогенных по фагу, активному в отношении резидентного штамма.

Частота лизогенизации клеток хозяина умеренными фагами, как правило, невелика: 10^{-1} – 10^{-2} [83–85]. Таким образом, размножение этих вирусов в экологической нише, плотно заселенной чувствительным штаммом хозяина, происходит, главным образом, по литическому пути, что приводит к гибели большинства клеток, которые потом могут быть замещены потомками клеток лизогенного штамма, исходно высвободившего фаг, а также вновь образованными лизогенными бактериями либо, при менее благоприятном стечении обстоятельств, другими видами бактерий. Такой сценарий был смоделирован математически и экспериментально [83] на модели популяций *E.coli*. Принимая во внимание, что частота спонтанной индукции многих лизогенных штаммов вагинальных лактобацилл составляет менее чем 10^{-8} БОЕ×клетку⁻¹ [79] в лабораторных культурах, любой фактор, способствующий повышению частоты индукции, может увеличивать вероятность «экологической катастрофы» в вагинальном микробном сообществе. Это может объяснить существующую эпидемиологическую связь между курением и риском бактериального вагиноза [81], т.к. компоненты табачного дыма могут вызывать индукцию профагов у лактобацилл [86]. В то же время результаты работы [80] противоречат гипотезе Blackwell [81]. Эти авторы показали, что профаги лактобацилл часто теряют способность к индукции и к размножению на клетках, по-видимому, из-за отбора в присутствии перекиси водорода, продуцируемой многими штаммами этих бактерий, которая является активирующим агентом SOS-индуцибельных профагов. Детальное исследование временной динамики штаммов лактобацилл во влагалище и феномена лизогении у этих культур может дать ключ к проверке гипотезы о фаговом происхождении части случаев вагиноза.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФАГ–КЛЕТКА – ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ЭФФЕКТЫ

Во многих случаях полевые изоляты энтеробактерий (и, вероятно, других групп микроорганизмов) имеют частичную устойчивость к бактериофагам, присутствующим одновременно с ними. Эта устойчивость может выражаться в сниженной эффективности посева соответствующих фагов, медленной адсорбции или в снижении урожая фага, которое может быть обусловлено активностью систем рестрикции – модификации [59, 87], а также ряда систем специфической устойчивости бактерий к фагам определенных групп [59, 88, 89]. Кроме того, у прокариот широко распространены CRISPR (clusters of regularly interspaced palindromic repeats)-локусы [90], содержащие короткие фрагменты последовательностей, захватываемых за счет неизвестного пока механизма из геномов бактериофагов, плазмид и иных чужеродных ДНК. Ассоциированные с CRISPR гены кодируют белки, формирующие ферментативные комплексы, атакующие молекулы ДНК или РНК, содержащие последовательности, идентичные т.н. спейсерам CRISPR [91, 92]. Такого рода системы позволяют бактериям многих видов быстро формировать устойчивость к конкретным штаммам фагов, обусловленную снижением эффективности инфекции. Эта устойчивость может, однако, преодолеваться за счет точечных мутаций атакуемых последовательностей [28]. Количественные данные, характеризующие встречаемость и экологическую значимость в природных микробных сообществах систем устойчивости к фагам, действующих на стадии внутриклеточного развития вируса, на сегодняшний день отсутствуют. Этот вопрос, однако, заслуживает специального исследования, т.к. механизмы, вызывающие abortивную инфекцию, превращают часть клеток, адсорбирующих фаги, в экологические ловушки, существенно ускоряющие распад свободных фаговых частиц [94]. В нашем недавнем исследовании в среднем только 1–4% штаммов колиформных бактерий, изолированных из образцов фекалий лошадей, проявляли чувствительность к отдельному изоляту фага, выделенного из той же серии образцов, от того же животного. Интересно, что даже близкородственные бактериофаги, выделенные от одного и того же животного, могут иметь несколько различные спектры хозяев [49]. Это, по-видимому, отражает быструю адаптацию адсорбционного аппарата, происходящую *in situ*. Таким образом, уровень изоляции одновременно существующих в сообществе систем фаг–хозяин может быть значительно недооценен. В результате популяция каждой отдельной генетической линии фага существует в обстановке жесткой лимитации числом доступных клеток хозяев. В некоторых случаях эффективные концентрации фагов и чувствительных к ним клеток оказываются настолько низкими, что можно ожидать исчезновения фага из системы. Например, в описываемом выше случае концентрация в фекалиях лошади бактерий составляла 10^3 – 10^4 КОЕ×мл⁻¹ [49, Тарасян с соавт., неопубликованные данные], что ниже пороговой концентрации, необходимой для эффективного размножения фага [54]. Концентрация же соответствующего вирулентного фага колебалась в диапазоне 10^2 – 10^5 БОЕ×мл⁻¹, при этом данный штамм бактериофага, идентифицируемый по рестриktionному профилю, персистирует в кишечнике данного животного

в течение более 2 лет [наши неопубликованные данные]. Механизмы, стабилизирующие длительное сосуществование этого вируса и его хозяев в кишечной экосистеме, остаются не вполне понятными. Очевидно, что любая адаптация бактериофага, расширяющая число потенциально пригодных хозяев, обеспечивает немедленное селективное преимущество.

Предполагается, что некоторые фаги могут нести «вторичные» белки адгезии, не связанные непосредственно с аппаратом, обеспечивающим проникновение ДНК в клетку. Многие из таких предположительных вторичных адгезинов несут иммуноглобулин-подобные домены, экспонированные на поверхности головок, сократимых чехлов хвоста или на конце воротничковых нитей фагов [95]. Некоторые фаги могут нести на воротничковых нитях домены, сходные с адгезинами, не родственными иммуноглобулинам [96]. Данные о том, что подобные структуры могут быть существенны для роста фагов в лабораторных условиях, пока отсутствуют, однако в экологической ситуации, подобной таковой в кишечнике животных, их роль может быть заметной, в частности за счет увеличения вероятности обратимой адсорбции при столкновении фаговой частицы с потенциально пригодной клеткой-хозяином. Увеличение скорости адсорбции, однако, «выгодно» далеко не во всех экологических ситуациях. При росте фагов на высокоплотных популяциях хозяев, иммобилизованных в вязкой агаровой среде (например, при посеве двуслойным методом), мутанты, имеющие более низкую константу адсорбции, получают значительное преимущество и образуют бляшки большего размера и с большим содержанием вирусных частиц [97]. Это связано с увеличением скорости диффузии вируса как в пределах вязкой среды, насыщенной клетками хозяев, так и в окружающую жидкую фазу. По мнению авторов, аналогичные преимущества медленно адсорбирующиеся фаги могут иметь при развитии внутри биопленок и при распространении на новые их участки. Механизмы, приводящие к обратимой утрате второстепенных адгезинов (например, части хвостовых фибрилл многих фагов) могут иметь, таким образом, существенное значение при адаптации фага к росту на биопленках бактерий или на планктонных клетках [97]. Интересно отметить, что второстепенные фибриллярные адгезины могут затруднять диффузию вязких сред, в т.ч. и за счет увеличения эффективного радиуса вирусных частиц [97]. Как следствие, препараты фагов, полученные путем наращивания в жидких и в плотных средах, могут быть обогащены генетическими вариантами, оптимально приспособленными к различным состояниям популяции хозяев. При этом фаги, дающие наиболее крупные бляшки, могут быть менее эффективными при росте в жидкой среде за счет сниженной скорости адсорбции. Эти соображения, возможно, следует принимать во внимание при разработке терапевтических фаговых препаратов.

Вклад лизогении в экологические взаимоотношения фагов и бактерий в симбиотических микробных сообществах животных также мало исследован. Данные исследований [36] дали возможность предположить, что индукция лизогенных бактерий является главным источником свободных частиц колифагов в кишечнике здоровых людей. Однако большинство умеренных колифагов, выделен-

ных из пула свободных фаговых частиц фекалий человека и животных, принадлежала к группе лямбдоидных фагов, в то время как фаги, полученные путем индукции лизогенных штаммов, относились в основном к группе P2-подобных [98]. В нашем недавнем исследовании все бактериофаги, полученные из фекалий лошадей, отнесенные к той или иной группе на основании морфологии частиц и секвенирования случайных фрагментов геномов, оказались профессионально-вирулентными фагами [49, наши неопубликованные данные]. На данном этапе не представляется возможным определить, отражает ли это расхождение результатов видовые различия кишечных микробных систем животных или связано с методологией исследования.

Колифаги, выделенные из фекалий, часто способны к формированию метастабильных ассоциаций, культивируемых в лабораторных условиях в течение нескольких пассажей, которые определены нами как псевдолизогенные ассоциации [А. Зимин, личное сообщение; наши неопубликованные данные]. Механизмы, стабилизирующие такие ассоциации, не всегда известны [99]. Наиболее вероятное объяснение состоит в том, что некоторая часть клеток в колонии частично защищена от фага полисахаридным материалом или в силу своего физиологического состояния в некоторых случаях наблюдается дивергенция бактерий и фагов в перевиваемой на агаре культуре, превращая псевдолизогенную ассоциацию в сложное многокомпонентное сообщество [наши неопубликованные данные]. Необходимы существенные дополнительные исследования, чтобы определить, играют ли псевдолизогенные ассоциации вирулентных фагов и их хозяев существенную роль в экологии колифагов *in vivo*, или этот феномен имеет чисто лабораторное значение.

ФАРМАКОКИНЕТИКА ФАГОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

ПРЕНИКНОВЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ ВО ВНУТРЕННЮЮ СРЕДУ ОРГАНИЗМА

Известно, что бактериофаги могут проникать в кровяное русло из кишечника и других участков тела, заселенных микроорганизмами, и транспортироваться с кровью [100, 101]. По-видимому, наличие в циркулирующей крови определенного количества естественных бактериофагов является нормальным явлением; был даже предложен термин «физиологическая виремия» [101]. В недавнем экспериментальном исследовании фармакокинетики трех различных фагов у кур [102] показано, что при пероральном приеме фаговых препаратов лишь 1 из 3 используемых фагов обнаруживался в небольших количествах в печени и селезенке. Также данный фаг присутствовал в легких, куда он мог попасть случайно при введении суспензии в рот птиц с помощью шприца. Поэтому следует признать, что при таком способе введения эффективной транслкации фагов не наблюдалось, несмотря на то что в этой работе были использованы довольно высокие дозы фагов (10^6 , 10^7 и 10^8 БОЕ на особь). Несколько более интенсивным было проникновение фагов, применяемых в форме аэрозоля, через легкие. Однако в более ранних работах зарубежных авторов [100, 101] и отечественных исследователей [103–106] было неоднократно продемонстри-

ровано проникновение в кровь терапевтических фагов, применяемых перорально и ректально. При пероральном применении препарата «Секстафаг» (ФГУП «Микроген», Россия) бактериофаги обнаруживались в крови уже через час [105]. Аналогичные результаты были получены при применении этого препарата в форме ректального суппозитория [105, 106]. В данных работах не приведены дозы фагов (дается лишь объем принимаемого препарата), а также не указываются их титры в крови, кроме того, отсутствуют данные о различиях в проникновении разных фагов, входящих в состав данного комплексного препарата. Необходимо отметить, что скорость транслокации фагов, так же как и бактерий из ЖКТ в кровь, может существенно меняться в различных физиологических состояниях. При воспалительном ответе транслокация бактерий (и, вероятно, фагов) из кишечника значительно увеличивается [12]. Какие свойства фагов влияют на их перенос через эпителиальные барьеры – достоверно не установлено. Вероятно, это рецептор-зависимый транспорт, активно осуществляемый специализированными клетками иммунной системы (М-клетками, бокаловидными клетками) и, возможно, клетками эпителия кишечника и других отделов ЖКТ. В ряде работ были предприняты попытки идентификации аминокислотных последовательностей, ответственных за связывание с соответствующими рецепторами посредством технологии фагового дисплея [107–110]. Для этого библиотеки случайных пептидов, экспонированных на частицах нитчатого фага M13 (который сам по себе плохо проникает через слизистые ЖКТ), вводились в ЖКТ экспериментальных животных, после чего фаги выделяли из крови и внутренних органов или из соответствующих тканей самого ЖКТ и определяли последовательности экспонированных на них пептидов. В результате было установлено, что пептиды YPRLLTP [108] и CSKSSDYQC [110] улучшают процесс транспорта фага, пептиды LETTCASLCYPS и VPPHPMTYSCQY [109] усиливают связывание с М-клетками и тканью пейеровых бляшек крысы, а пептид LTHPQDSPPASA стимулирует связывание экспонирующихся его вирусных частиц со слизистой оболочкой кишечника мышей, поврежденной в результате сильной системной воспалительной реакции [107]. В отличие от процитированных выше работ, в исследовании [111] не было обнаружено существенного влияния экспонируемых 7-членных пептидов на транспорт фага M13 из кишечника мышей в кровь. Вполне возможно, что этот результат связан с особенностями использованной авторами экспериментальной системы или с тем, что длины случайного пептида в 7 аминокислотных остатков недостаточно для эффективного связывания с соответствующими рецепторами клеток слизистых кишечника у мышей. В настоящее время в литературе отсутствуют публикации о попытках проводить селекцию терапевтически значимых фагов (главным образом т.н. хвостатых фагов) по признаку усиленной транслокации из ЖКТ в кровь. При этом успех в отборе длительно циркулирующих в крови вариантов фагов (см. ниже) позволяет надеяться, что хотя бы в некоторых случаях такая процедура может быть эффективной. Обращая на себя внимание имеющиеся данные о высокой эффективности транспорта в кровь фагов, вводимых ректально [103, 105].

Данный феномен уже используется в терапевтической практике, на российском рынке уже присутствуют препараты фагов, выпускающиеся в форме ректальных суппозитория (см. выше), однако механизмы транслокации фагов из прямой кишки и факторы, влияющие на этот процесс, требуют более пристального исследования.

При внутримышечном или интраперитонеальном введении фагов их проникновение в кровь и органы было значительно более интенсивным, чем при пероральном пути введения. Так, по данным [102], через 3 ч после внутримышечного введения курам 10^8 КОЕ трех фагов их концентрация в селезенке составляла $2 \times 10^2 - 3 \times 10^4$ БОЕ \times г $^{-1}$ и $6 \times 10^2 - 10^4$ КОЕ \times г $^{-1}$ в печени. В последующие часы концентрация фагов быстро падала, и через сутки фаги практически полностью элиминировались. Обращают на себя внимание существенные различия в эффективности проникновения в органы птиц различных типов фагов, инъецированных в одной и той же дозе. При интраперитонеальном введении мышам 10^{11} БОЕ фагов (всего протестировано 4 фага) их концентрация в крови через 2 ч составляла $5 \times 10^8 - 2 \times 10^{10}$ БОЕ \times мл $^{-1}$, что свидетельствует о достаточно эффективном процессе проникновения фагов во внутреннюю среду организма [112]. В одной из ранних (но в то же время одной из наиболее тщательно выполненных) работ по фармакокинетике фагов [113] продемонстрировано эффективное проникновение бактериофагов *Shigella dysenteriae* через гематоэнцефалический барьер у мышей. При интраперитонеальной инъекции очищенных ультрафильтрацией лизатов фаги практически немедленно появлялись в крови. У здоровых животных их проникновение в ткань мозга отмечалось лишь в незначительном числе у некоторых особей. Напротив, в группе мышей, инфицированных *S. dysenteriae* внутричерепально в дозе, превышающей DL95 %, титр фага в ткани мозга быстро возрастал до $10^7 - 10^9$ БОЕ \times г $^{-1}$. В дальнейшем титр фагов в мозге падал медленнее, чем в крови. Выживаемость инфицированных мышей, получивших $10^7 - 10^9$ БОЕ фага, составляла 72 % против 4 % в контрольной группе, которой вводили инактивированный нагреванием препарат.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ФАГОВЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОРГАНИЗМЕ И ИХ ЭЛИМИНАЦИЯ

Еще в ранних работах 20–30-х гг. [2] было показано, что бактериофаги быстро исчезают из циркулирующей крови. В крови мышей, получавших фаги интраперитонеально [112], быстро создавались очень высокие концентрации вирусов (до 10^{10} БОЕ \times мл $^{-1}$), после чего их титр падал примерно на 3 порядка за 12 ч и далее снижался по более плавной кривой. Авторы аппроксимировали такую двухфазную кинетику уравнениями вида: $C = 3.525 \times 10^9 \times e^{-0.753t} + 2.35 \times 10^7 \times e^{-0.0997t}$, где C – концентрация, БОЕ \times мл $^{-1}$, t – время, ч, числовые коэффициенты варьировали для различных типов бактериофагов. В крови некоторые бактериофаги могут адсорбироваться на эритроцитах и лейкоцитах [93, 114]. Участвуют ли таким образом сестивированные фаги в инфекции целевых бактерий в процессе фаготерапии – не вполне понятно. Наиболее активно частицы фагов поглощаются печенью, где они быстро разрушаются [102, 115]. В селезенке фаги сохраня-

ются несколько дольше [2, 102, 116]. По-видимому, ретикулоэндотелиальная система играет ведущую роль в этом процессе по сравнению с циркулирующими фагоцитами, так, у мышей с индуцированной циклофосфамидом нейтропенией элиминация фагов замедлялась лишь в ограниченной степени [112].

Фаговые частицы подвергаются эффективной элиминации ретикуло-эндотелиальной системой. Возможно, однако, отобрать штаммы фагов с измененной структурой поверхностных белков, обладающих значительно увеличенным временем полужизни в крови (для этого может быть достаточно одной аминокислотной замены [117], такие длительно циркулирующие мутанты могут находиться в кровотоке в 1000 и более раз дольше родительского штамма [117–119]).

Выделение фагов с мочой было показано неоднократно [104–106, Дарбеева, личное сообщение], однако, по-видимому, этот механизм не имеет решающего значения в процессе элиминации фагов, т.к. концентрации этих вирусов в моче 10^1 – 10^2 [106], суммарное выведение их незначительно. Вместе с тем даже этих незначительных количеств бактериофагов, попадающих в мочевыводящую систему, оказывается достаточно для достижения терапевтического эффекта пероральных препаратов бактериофагов при урологических инфекциях [104]. Логично предположить также, что при повреждении вследствие воспалительного процесса базальной мембраны капилляров почечных клубочков (при пиелонефрите), интенсивность выделения фага увеличится. Возможно также, что попадание фага в мочу связано не только с его фильтрацией в клубочках, но и с переносом из крови через клетки эпителия канальцев. Вопрос о выделении фагов с мочой и факторах, контролирующих этот процесс, нуждается в более тщательном изучении.

Выработка в организме пациентов специфических антител к бактериофагам может препятствовать успеху фаговой терапии. Определенные титры антифаговых антител обнаруживаются также и у здоровых людей и пациентов до фаговой терапии [120]. Однако, по имеющимся на данный момент наблюдениям, присутствие таких антител в крови слабо коррелирует с результатами терапии [A. Gorski, личное сообщение, 2]. Необходимо отметить, что не все антитела, взаимодействующие с фаговой частицей, обладают прямым нейтрализующим действием. Для этого антитела должны взаимодействовать с адгезинами и (у части фагов) некоторыми другими белками хвоста. Выработка специфических высокоаффинных иммуноглобулинов класса IgG требует нескольких недель времени, поэтому при относительно непродолжительных курсах фаготерапии эта проблема не имеет существенного значения. Кроме того, иммуногенность разных фагов существенно различается, для достижения значимого ответа против некоторых бактериофагов требуется применение адьювантов и повторной иммунизации. Нужно также отметить, что количество антигена, содержащегося в терапевтических дозах очищенных бактериофагов, незначительно, так, например, 10^{10} частиц бактериофага T4 содержат только около 1 мкг белка (подсчет основан на том, что массовое содержание ДНК и белка в частицах хвостатых фагов примерно одинаково [121]).

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ФАГОВЫХ ЧАСТИЦ

Непосредственное воздействие некоторых типов фаговых частиц на иммунную систему человека и животных было продемонстрировано в недавних работах группы проф. Gorski. Было показано, что вирусные частицы T-четных бактериофагов уменьшают продукцию активных форм кислорода нейтрофилами, индуцированными бактериями или эндотоксином, супрессируют активацию T-клеток, способствуя толерантности к трансплантатам, а также оказывают некоторое противоопухолевое воздействие [122–124]. Применение бактериофаговых препаратов при лечении различных инфекций, вызванных стафилококками и *E.coli*, часто наблюдалось резкое падение уровня сывороточного C-реактивного белка, являющегося важным маркером воспаления. По-видимому, такое падение не может быть объяснено только антибактериальным эффектом фагов и может быть вызвано иммуномодулирующей активностью фаговых частиц [5].

Было высказано предположение, что связывание частиц фага T4 с эукариотическими клетками опосредовано белком вершин капсида пг 24, который содержит аминокислотный мотив KGD, близкий к мотиву RGD, распознаваемому $\beta 3$ -интегринами [101]. Это связывание может отчасти обуславливать иммуносупрессорный и противоопухолевый эффект фага T4 *in vivo* и *in vitro* [125]. Мутант фага T4, лишенный декорирующего белка капсида пг 24, имеет более высокую иммунобиологическую активность [125], что, возможно, связано с частичным маскированием этим белком мотива связывания $\beta 3$ -интегринов. У нескольких фагов обнаружены поверхностные белки, обладающие структурным сходством с молекулами, вовлеченными в сигнальные каскады иммунокомпетентных клеток. Целый ряд структурных белков различных фагов имеет в своем составе иммуноглобулин-подобные [95] или коллаген-подобные домены [126]. В работе [24] было отмечено значительное увеличение концентрации фаговых частиц на изъязвленной слизистой оболочке кишечника и предположили, что иммунологическая активность фаговых частиц может принимать какое-то участие в патологическом процессе при болезни Крона. С другой стороны, предполагается, что природные фаговые популяции могут участвовать в регуляции взаимодействий лимфоидной ткани кишечника и кишечной микрофлоры, в частности, в подавлении воспалительного ответа, вызванного массивным контактом с антигенами [101]. Однако экспериментальные данные, характеризующие взаимодействия естественного вирусного сообщества с иммунной системой, пока отсутствуют.

ДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ФАГ– БАКТЕРИЯ В ПРОЦЕССЕ ФАГОВОЙ ТЕРАПИИ

Среди медиков и микробиологов, не знакомых близко с теоретическими основами экологии бактериофагов и фаготерапии, распространено мнение, что при появлении даже ограниченного количества фаговых частиц, специфичных к данному штамму возбудителя, в колонизированном бактериями участке тела происходит лавинообразное размножение фагов, продолжающееся до полного истребления бактериальной популяции. Эти взгляды высказываются

даже в ряде методических изданий (ссылки на которые мы не приводим по этическим соображениям). Однако существование фагов и бактерий в одних и тех же экотопах является широко распространенным явлением в природе [10], существующим со времен предшествующих разделению доменов эукариот, бактерий и архей [11]. При этом взаимоотношения бактерий и их вирусов на популяционном уровне далеко не всегда носят антагонистический характер, более того, активность бактериофагов при определенных условиях увеличивает разнообразие и общую метаболическую активность природных бактериальных сообществ [10].

По современным нормам для целей фаговой терапии используются только вирулентные бактериофаги, т.е. такие, размножение которых происходит исключительно в литическом цикле. При этом каждая инфицированная клетка по прошествии определенного промежутка времени, называемого латентным периодом, лизируется, освобождая 50–200, а иногда и более частиц бактериофага. В результате концентрация фаговых частиц может увеличиваться. Однако в реальных системах процессу размножения вируса противостоят процессы разрушения вирусных частиц и их выноса из исследуемой системы. В случае фаговой терапии наибольшее значение имеют поглощение фагов ретикуло-эндотелиальной системой, их секвестр за счет прочной ассоциации с эритроцитами, клетками тканей или межклеточным матриксом, разрушение в результате адсорбции на мертвых или обладающих специфическими системами устойчивости клетках (см. выше), а также вынос из организма с мочой или калом. Немаловажно отметить также, что размножение фагов в большинстве случаев локализовано в очаге инфекции, тогда как рассеяние потомства фагов часто происходит в масштабе всего организма. Если скорость размножения бактериофагов *in situ* превышает скорость их рассеяния и (или) разрушения, то концентрация фагов будет расти до исчерпания доступных клеток хозяев. В этом случае говорят об активной фаговой терапии [127]. Вероятно, именно такой сценарий реализуется при фаготерапии ряда кишечных инфекций, в т.ч. экспериментальных. В этих случаях достаточно одного или нескольких приемов фага, чтобы добиться излечения [2, 6, 7]. В случае же, когда для поддержания концентрации фагов, необходимой для подавления роста бактерий (см. ниже), необходимо введение значительных количеств фага извне, как это бывает при лечении большинства хронических инфекций, можно говорить о пассивной терапии [127]. Во многих реальных ситуациях имеет место сочетание обоих сценариев.

Рассмотрим факторы, которые определяют кинетику взаимодействия популяции бактерий с фагом в процессе терапии. Ключевым событием в литическом цикле бактериофага является адсорбция вирусной частицы на поверхности бактерии, обычно приводящая к введению в клетку вирусной нуклеиновой кислоты (у терапевтически значимых фагов – геномной ДНК). Процесс адсорбции обусловлен высокоспецифичным молекулярным узнаванием фаговыми адгезинами соответствующих рецепторов на поверхности бактериальных клеток [128], которыми обычно являются липополисахариды, поверхностные белки, тейхоевые кислоты, а также компоненты капсул

и другие поверхностные структуры бактерий. Это узнавание представляет собой пассивный физико-химический процесс, зависящий от частоты соударений фаговых частиц и клеток в процессе броуновского движения [129]. Этот процесс подчиняется уравнению кинетики второго порядка, т.е. его скорость зависит от концентрации бактерий и фагов. В частности, $\ln(P/P_0) = -kct$, где P/P_0 – доля фаговых частиц, остающихся не адсорбированными к моменту времени t , C – концентрация бактериальных клеток, не меняющаяся в течение времени t , k – константа адсорбции ($\text{мл}^{-1} \times \text{мин}^{-1}$). При этом все различия в скорости диффузии фага, числе рецепторов на поверхности клеток, ингибирование адсорбции физико-химическими условиями среды и т.д. выражаются в значениях k , измеряемых для каждого случая эмпирически [129]. В лабораторных условиях в жидких средах большинство хвостатых фагов имеют k порядка $(1.5-2.5) \times 10^{-9} \text{ мл} \times \text{мин}^{-1}$.

Эмпирически было установлено, что для различных систем фаг-хозяин имеется пороговое значение концентрации клеток хозяев, необходимой для «начала размножения» вируса [54], составляющее примерно 10^4 . В реальных природных экосистемах (в т.ч. и в организме животного) пороговое значение концентрации хозяев, необходимое для роста фага (МТ), можно определить как такое, при котором за время полувыведения фага $t_{1/2}$ минус длительность латентного периода t_{lat} будет адсорбироваться количество фага, обеспечивающее продукцию потомства, равного половине исходной популяции, т.е. такое значение концентрации клеток C , при котором $P_{(t_{1/2}-t_{\text{lat}})} = 0.5P_0/Y$, где Y – урожай фага на одну инфицированную клетку в данных условиях (с учетом гибели части инфицированных клеток до освобождения потомства фагов). При превышении этого порогового уровня $C > \text{МТ}$ скорость продукции фага будет превышать скорость его вывода и разрушения, следовательно, количество его в системе будет увеличиваться.

Существует также пороговое значение концентрации фага C_{phage} , при которой происходит подавление роста бактериальной популяции [127]. При этом значении C_{phage} (ИТ) половина бактерий окажется инфицирована за время, равное среднему времени генерации (при условии, что в течение этого периода времени концентрация фага остается неизменной). Для быстро растущих бактериальных культур в лаборатории подавление роста происходит при концентрации фага около 10^7 [127, 129] БОЕ $\times \text{мл}^{-1}$. Эта величина не имеет особенного значения в лабораторной практике, т.к. *in vitro* $C \gg \text{МТ}$, а скорость разрушения фаговых частиц пренебрежимо мала, поэтому вирусы быстро накапливаются, вызывая практически полный лизис культуры. Очевидно, что при использовании фаговых препаратов *in vivo* создаются иные соотношения этих процессов, поэтому популяции патогенных бактерий обычно не уничтожаются в ходе фаговой терапии полностью. Скорее, имеет смысл говорить об уменьшении численности патогена до уровня, при котором инфекция может контролироваться иммунной системой [127].

В ситуации реальной фаговой терапии большинство бактериальных популяций колонизируют лишь ограниченные ниши в организме, при этом значительная часть бактерий может находиться в физиологических состояниях, неблагоприятных для размножения фага, например в составе

биофленок [130]. Состояние клеток в биофленках отличается от такового в суспензионной культуре [131], при этом восприимчивость их к инфекции фагами снижается [119, 132]. Отчасти это обусловлено затруднением диффузии фагов в матриксе, который окружает бактериальные клетки в пленках, однако, даже при искусственном инфицировании. Тем не менее бактериофаги способны инфицировать клетки в составе биофленок [132, 133]; некоторые вирусы кодируют ферменты, способные гидролизовать полисахариды матрикса, кроме того, соответствующие гены могут быть введены в геном фага генно-инженерным путем [134]. Немаловажно, что фаговая инфекция вызывает нарушение структуры биофленки, делая оставшиеся там клетки доступными для иммунной системы. Бактериофаги, по-видимому, способны инфицировать и клетки-персистеры [135], которые во многом обуславливают неудачи антибактериальной химиотерапии такого рода инфекций [136]. Пространственная неоднородность структуры биофильмов [131], а также многих микросред в организме человека и животных может приводить, по-видимому, к тому, что волнообразное распространение фаговой инфекции в популяции бактерий самопроизвольно затихает. Ограничивают распространение волны инфекции также мертвые и покоящиеся клетки, способные адсорбировать фаговые частицы. Таким образом, имеет место сочетание активно-пассивного процесса на микроуровне и пассивного – на уровне организма в целом. Этим эффектом можно объяснить успех фаговой терапии ряда инфекций, например синегнойного остеомиелита [М. Кутеталадзе, личное сообщение], при которых применение антибиотиков не достигает своей цели не столько из-за устойчивости возбудителя, сколько из-за специфической локализации инфекции. Хотя проникновение фагов в такие очаги инфекции также затруднено, возможность локальных «вспышек» цепной инфекции определяет, вероятно, успех терапии. Кроме того, покоящиеся клетки с пониженной физиологической активностью, на которых размножения фага не происходит, могут, тем не менее, подвергаться инфекции, которая развивается отсроченно при активации [135, 136]. Таким образом, сочетание активной и пассивной фаговой терапии является наиболее распространенным сценарием при лечении установившихся хронических инфекционных заболеваний. При этом необходимо применение весьма длительных курсов терапии, приводящих, однако, к успешному излечению пациентов [5, 6]. В таких случаях необходимо в течение значительного времени поддерживать концентрацию фага в очаге инфекции за счет его введения извне. При лечении раневых инфекций это может достигаться постановкой дренажей с постоянным притоком фагового препарата в рану или применением препаратов, медленно высвобождающих фаговые частицы, таких как препарат «фагобиодерм», созданный в Тбилиском институте бактериофагов, микробиологии и вирусологии им. Г. Элиавы (Грузия) [137].

Очевидно, что в ходе фаговой терапии возможен отбор фагоустойчивых мутантов бактерий. Интересно, однако, что в доступной нам литературе мы не смогли найти ни одного документированного случая неудачи фаговой терапии из-за развития фагоустойчивых мутантов. Отчасти это может быть связано с тем, что в большинстве случаев такие мутанты имеют нарушенные структуры клеточной

поверхности, которые служат рецепторами соответствующих фагов. Физиологической ценой такой устойчивости является снижение скорости роста [10, 138], способности к колонизации [7, 65, 66, 139, см. также раздел 3.3] и вирулентности [139].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По накапливающимся данным геномики и структурной биологии [11], история сосуществования бактерий и бактериофагов насчитывает более 2 млрд лет. Сформировавшиеся за это время «правила игры» между ними устроены таким образом, что присутствие фагов в природных экосистемах не только не уменьшает разнообразия и общей активности бактерий, а, напротив, существенно увеличивает их [10]. В результате развития биологии и экологии бактериофагов становится все более очевидно, что простая, на первый взгляд, идея использования «естественных врагов» бактерий для борьбы с инфекциями, впервые опробованная на практике 1919 г. Феликсом д'Эрелем и проф. Виктором-Анри Гутинелем (Hutinel) [2], представляет собой нечто вроде шулерского приема, который должен позволить в данных конкретных условиях добиться полного подавления одного игрока – патогенной бактериальной популяции и последующего неизбежного исчезновения второго – популяции бактериофагов. Для рационального (в противовес чисто эмпирическому) решения этой задачи необходимо, прежде всего, ясное понимание упомянутых «правил игры» применительно к экологическим системам, входящим в состав организма животного или человека.

Учет особенностей экологии фагов в этих средах позволяет сформулировать дополнительные требования к терапевтическим фагам, помимо их спектра хозяев и эффективности *in vitro*, что определяет возможные векторы развития фаговой терапии в XXI в. Среди таких перспективных направлений можно упомянуть: 1) усовершенствование технологии подбора терапевтических фагов, в т.ч. разработка и стандартизация быстрых тестов на умеренность – вирулентность, создание систем типирования потенциальных терапевтических фагов для установления их принадлежности к известным группам, а также развитие методологии анализа фаговых геномов для установления их пригодности для терапевтического применения; 2) создание специализированных баз данных и коллекций охарактеризованных терапевтических фагов для быстрого их подбора с целью оперативного формирования индивидуализированных фаговых коктейлей, адаптированных под конкретного пациента; 3) создание методов управления транслокацией и распределением фагов в организме, в т.ч. и обеспечение длительной циркуляции фагов в крови, их проникновения в различные ткани и органы и т.д.; 4) создание методов тестирования способности инфицировать бактерии, находящиеся в различных физиологических состояниях и колонизирующие различные «защищенные» экологические ниши в организме, как, например, резидентные бактериальные популяции в кишечнике, бактерии в составе биофленок и т.д. Разработка методов модификации этих свойств фагов, в т.ч. методами генной инженерии; 5) учет и управление иммунобиологической активностью фагов, а также целенаправленное использование свойства

фаговых частиц взаимодействовать с клетками иммунной системы; б) использование в качестве терапевтических агентов препаратов отдельных белков бактериофагов, в т.ч. фаговых лизинов [140] и бактериоцинов.

Кроме этого, дальнейшие исследования роли бактериофагов в гомеостазе нормальной микрофлоры и в развитии ряда патологических явлений позволят найти новые подходы к терапевтическому воздействию на эти процессы. ●

Работа лаборатории вирусов микроорганизмов ИНМИ РАН поддержана Федеральным агентством по науке и инновациям (ГК № 02.740.11.0313), РФФИ (грант № 09-04-01482-а), Федеральным агентством по образованию и программой Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».
Авторы благодарны М. Левиной за критическое прочтение рукописи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- d'Herelle F. (1921) La bactériophage. Son rôle dans l'immunité. Paris. Cited after Russian edition (1926). Moscow – Leningrad: State Editor.
- Sulakvelidze A., Kutter E. (2005) Bacteriophage therapy in humans. In: Bacteriophages: biology and applications. Eds. Kutter E. and Sulakvelidze, A. P. 381–436. Boca Raton: CRC Press.
- Hawkey P.M., Jones A.M. // J Antimicrob Chemother. 2009. Sep;64 Suppl 1:i3-10.
- Livermore D.M. // J Antimicrob Chemother. 2009 Sep;64 Suppl 1:i29-36.
- Gorski A., Miedzybrodzki R., Borysowski J., et al. // Curr. Opin. Investig. Drugs. 2009.10. P. 766–774.
- O'Flaherty S., Ross R.P., Coffey A. // FEMS Microbiol. Rev. 2009.33, 801.
- Sulakvelidze A. and Barrow P. Phage therapy in animals and agribusiness. In: Bacteriophages: biology and applications. Eds. Kutter E. and Sulakvelidze A. 2005. P. 335–380. Boca Raton: CRC Press.
- Ackermann H.W. 5500 // Arch. Virol. 2007.152. P. 227–243.
- Calendar R. ed. The bacteriophages. 2nd edition, Oxford university press, New York. 2006.746P.
- Weinbauer M. // FEMS Microbiol. Rev. 2004. 28: P. 127–181.
- Bamford D. // Res. in Microbiol. 2003. 154. P. 231–236.
- Домарадский И.В., Хохоев Т.Х., Кондракова О.А. и др. // Российский химический журнал. 2002. 46. С. 80–89.
- Letarov A., Kulikov E. // J. Appl. Microbiol. 2009. 107. С. 1–13.
- Тараканов Б.В. Феномен бактериофагии в рубце жвачных. М.: Научный мир. 2006. 184с.
- Куликов Е.Е., Исаева А.С., Роткина А.С., Манькин А.А., Летаров А.В. // Микробиология. 2007. 76. С. 271–278.
- Тараканов Б.В. // Микробиология. 1971. 40. С. 544–550.
- Тараканов Б.В. // Микробиология. 1971. 41. С. 862–870.
- Alexander F., Davies M. E., Muir A. R. // Res Vet Sci 1970.11. P. 592–593.
- Breitbart M., I. Hewson B., Felts J, et al. // J. Bacteriol. 2003. 185. P. 6220–6223.
- Cann J. A., Fandrich S. E., Heaphy S. // Virus genes 2005. 30. P. 151–156.
- Flewett T.H., Bryden A.S., Davies H. // J. Clin. Path. 1974. 27. P. 603–614.
- Hoogenraad N.J., Hird F.J.R. // Aust. J. Biol. Sci. 1970. 23. P. 793–808.
- Hoogenraad N.J., Hird F.J.R., Holmes I., Millis F. // J. Gen. Virol. 1967. 1. P. 575–576, 942–943.
- Lepage P., Colombet J., Marteau P. et al. // Gut 57. 2008. P. 424–425.
- Paynter M.J.B., Ewert D.L., Chalupa W. (1969) // Applied Microbiol. 1969. 18. P. 942–943.
- Ritchie A.E., Robinson I.M., Allison M.J. Rumen bacteriophage: survey of morphological types. In: Microscopie electronique, ed Favard P. 1970. Vol. 3. P. 333–334. Paris: Societe Francaise de Microscopie electronique (cited by Tarakanov, 2006).
- Zhang T., Breitbart M., Heng Lee W. et al. // PLoS Biol. 2006. 4(1): e3C3.
- Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M. et al. // Science. 321. 2008. P. 960–964.
- Hitch G., Pratten J., Taylor P.W. // Lett in Applied Microbiol. 2004. 39. P. 215–219.
- Comeau A.M., Buenaventura E., Suttle C.A. // Appl. Env. Microbiol. 2005. 71. P. 5324–5331.
- Klieve A.V. // Appl. Environ. Microbiol. 1991. 57. P. 3660–3663.
- Calci K.R., Burkhardt IIIW., Watkins W.D., Scott. R.R. // Appl. Environ. Microbiol. 1998. 64. P. 5027–5029.
- Cole D., Long S.C., Sobsey M. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. 69. P. 6507–6514.
- Cornax R., Morinigo M.A., Gonzalez-Jaen F., Alonso M.C., Borrego J.J. // Zentralbl Bakteriol. 1994. 281. P. 214–224.
- Dhillon T.S., Dhillon E.K., Chau H.C., Li W.K., Tsang A.H. // Appl. Environ. Microbiol. 1976. 32. P. 68–74.
- Furuse K., Osawa J., Kawashiro R. et al. (1983) // J. Gen. Virol. 1983. 64. P. 2039–2043.
- Gantzer C., Henny J., Schwartzbrod L. // Int. J. Hyg. Environ. Health. 2002. 205. P. 325–328.
- Grabow W.O.K., T.E. Neubrech C.S Holzrhausen and Jofre. J. // Water Science and Technology. 1995. 31. P. 223–230.
- Havelaar A.H., Furuse K., Hogeboom W.M. // J. Appl. Bacteriol. 1986. 60. P. 55–262.
- Lusiak-Szelachowska M., Weber-Dabrowska B., Gorski A. // Pol. Merkur. Lekarski. 2006. 124. P. 381–383.
- Muniesa M., Moce-Llivina L., Katayama H., Jofre J. // Antonie Van Leeuwenhoek. 2003. 83. P. 305–315.
- Schaper M., Jofre J., Uys M., Grabow W. O. K. // J. Appl. Microbiol. 2002. 92. P. 657–667.
- Schmid E. N., von Recklinghausen G., Ansorg. R. // J. Med. Microbiol. 1990. 32. P. 101–104.
- Klieve A.V., Swain R.A. // Appl. Environ. Microbiol. 59. P. 2299–2303.
- Swain R.A., Nolan J.V., Klieve A.V. // Appl. Environ. Microbiol. 1996. 62. P. 994–997.
- Furuse K., Sakurai T., Hirashima A., Katsuki M., Ando A., Watanbee I. // Appl. Environ. Microbiol. 1978. 35. P. 995–1002.
- Chibani-Chenoufi S., Sidoti J., Bruttin A. et al. // J. Bacteriol. 2004. 186. P. 8287–8294.
- Ricca D.M., Cooney J.J. // J. Indust. Microbiol. Biotechnol. 2000. 24. P. 124–126.
- Golomidova A., Kulikov E., Isaeva A., Manykin A., Letarov A. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. 73. P. 5975–5981.
- Hintz H.F., Cymbaluk N.F. // Annu Rev. Nutr. 1994. 14. P. 243–267.
- Yoshida T., Ellner S.P., Jones L.E. et al. // PLoS. Biol. 2007. 5. P. 1868–1879.
- Stephen A. M., Cummings J. H. // J. Med. Microbiol. 1980. 13. P. 45–56.
- Iverson W. G., Mills N. F. // Appl. Environ. Microbiol. 1977. 33. P. 810–813.
- Wiggins B.A., Alexander M. // Appl. Environ. Microbiol. 1985. 48. P. 19–23.
- Brokhurst M.A., Buckling A., Rainey P.B. // Proc. R Soc. 2005. B 272. P. 1385–1391.
- Holmfeldt K., Middelboe M., Nybroe O., Riemann L. // Appl. Environ. Microbiol. 2007. 73. P. 6730–6739.
- Poullain V., Gandon S., Brokhurst M.A., Buckling A., Hochberg M.E. // Evolution. 2008. 62(1). 1–11.
- Weitz J.S., Hatman H., Levin S.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. 2005. 102. P. 9535–9540.
- Hoskisson P., Smith M.C.M. // Curr. Opin. Microbiol. 2007. 10. P. 396–400.
- Pal C., Macia M., Oliver A., Schachar I., Buckling A. // Nature. 2009. 450. P. 1079–1081.
- Sundin G.W., Weingard M.R. // FEMS Microbiol. Let. 2007. 277. P. 11–20.
- LeClerc J.E., Li B., Payne W.L., Cebula T.A. // Science. 1996. 274. P. 1208–1211.
- Milinoevich G.J., Trott D.J., Burrell P.C. et al. // Environ. Microbiol. 2006. 8. P. 885–898.
- Atterbury R. J., Dillon E., Swift C., et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2005. 71. P. 4885–4887.
- Scott A.E., Timms A.R., Connerton P.L., El-Shibiny A., Connerton I.F. // Environ. Microbiol. 9. P. 2341–2353.
- Scott A.E., Timms A.R., Connerton P.L. et al. // Plos. Biology. 2007. 3. P. 114.
- Brussow H. // Microbiology. 2005. 151. P. 2133–2140.
- Chibani-Chenoufi S., Sidoti J., Bruttin A. et al. // Antimicrob. Agents. Chemotherapy. 2004. 48. P. 2558–2569.
- Kasman L. // Virology. 2. P. 34.
- Gabig M., Herman-Antosiewicz A., Kwiatkowska M. et al. // Microbiology. 2002. 148. P. 1533–1542.
- Araujo R., Muniesa M., Méndez J. et al. // J. Virol. Meth. 2001. 93. P. 127–136.
- Poulsen L.K., Licht T.R., Rang C., Krogfelt K.A., Molin S. // J. Bacteriol. 1995. 177:5840–5845.
- Krogfelt K.A., Poulsen L.K., Molin S. // Infect. Immun. 1993. 61. P. 5029–5034.
- Stryiak I., Kmet V., Spanova A. // Microbiologica. 1989. 12. P. 317–322.
- Swain R.A., Nolan J.V., Klieve A.V. // Microbiology Australia. 1996. 17. A87(GWP:27).
- Wells J.E., Russel J.B. // J. Dairy Sci. 1996. 79. P. 1487–1495.
- Antonio M.A.D., Hawes S.E., Hillier S.L. // The J. Inf. Diseases. 1999. 180. P. 1950–1956.
- Antonio M.A.D., Hillier S.L. // J. Clin. Microbiol. 2003. 41. P. 1881–1887.
- Kiliç A.O., Pavlova S. I., Alpaya S., Kiliç S.S., Tao L. (2001) // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001. 8. P. 31–39.
- Martin R., Sobeyrn N., Escobedo S., Suarez J. // Int. Microbiol. 2009. 12. P. 131–136.
- Blackwell A.L. // Sex Transm. Infect. 1999. 75. P. 352–353.
- Fethers K.A., Fairley C.K., Hocking J.S., Gurrin L.C., Bradshaw C.S. // Clin. Infect. Dis. 2008. 47. P. 1426–1435.
- Brown S.P., Le Chat L., De Paepe M., Taddei F. // Curr. Biol. 2006. 16. P. 2048–2052.
- Kihara A., Akiyama Y., Ito K. (2001) // J. Biol. Chem. 2001. 276. P. 13695–13700.

85. Riipinen K.A., Raisanen L., Alatosava T. // *J. Appl. Microbiol.* 2007. 103. P. 2465–2475.
86. Pavlova S.I., Tao L. // *Mutat. Res.* 2000. 466. P. 57–62.
87. Tock M.R., Dryden D.T. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2005. 8. P. 466–472.
88. Durmaz E., Klaenhammer T.R. // *J. Bacteriol.* 2007. 189. P. 1417–1425.
89. Fineran P.C., Blower T.R., Foulds L.J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009. 106. P. 894–899.
90. Sorek R., Kunin V., Hugenholz P. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2008. 6. P. 181–186.
91. Hale C.R., Zhao P., Olson S. et al. // *Cell.* 2009. 139. P. 945–956.
92. Wiedenheft B., Zhou K., Jinek M., Coyle S.M., Ma W., Doudna J.A. // *Structure.* 2009. 17. P. 904–912.
93. Bystrycky V., Drahos V., Mulczyk M., Przondo-Hessek A., Slopeck S. // *Acta Virol.* 1964. 176. P. 369–372.
94. Dennehy J.J., Friedenbergh N.A., Yang Y.W., Turner P.E. // *Ecol.Lett.* 2007. 10. P. 230–240.
95. Fraser J.S., Maxwell K.L., Davidson A.R. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2007. 10. P. 382–387.
96. Letarov A., Manival X., Desplats C., Krisch H.M. // *J. Bacteriol.* 2005. 187. P. 1055–1066.
97. Gallet R., Shao Y., Wang I. // *BMC Evolutionary Biology.* 2009. 9:241.
98. Dhillon E.K.S., Dhillon T.S., Lam Y.Y., Tsang A.H.C. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1980. 39. P. 1046–1053.
99. Miller R.V., Day M. Contribution of lysogeny, pseudolysogeny, and starvation to phage ecology. In S. T. Abedon (ed): *Bacteriophage Ecology.* Cambridge U. Press, Cambridge. 2008. P. 114–143.
100. Dabrowska K., Switala-Jelen K., Opolski A., Weber-Dabrowska B. Gorski A. // *J. Applied Microbiol.* 2005. 98. P. 7–13.
101. Gorski A., Wazna E., Weber-Dabrowska B., Dabrowska K., Switala-Jelen K., Miedzybrodzki R. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006. 46. P. 313–319.
102. Olivera A., Sereno R., Nicolau A., Azeredo J. // *Poultry Sci.* 2009. 88. P. 728–733.
103. Боговазова Г.Г., Ворошилова Н.Н., Бондаренко В.М. // *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* 1991. № 4. P. 5–8.
104. Перепанова Т.С., Дарбеева О.С., Котлярова Г.А. и др. // *Урология и нефрология.* № 5. С. 14–17.
105. Субботин А.В., Функер М.Г., Урман Э.С. и др. Применение секстафага в комплексной антибактериальной терапии инфицированного панкреонекроза. Здоровье и образование: Материалы междунар. научно-практич. конф. Пермь, 2006. С. 191–197.
106. Токарев М.В., Давидов М.И., Функер Е.В. Лечение острого пиелонефрита бактериофагами. Актуальные вопросы клинической медицины. Сборник научных трудов, посвященный 130-летию Пермской ГРБ № 6. Пермь. 2005.
107. Constantini T.V., Putnam J.G., Sawada R. et al. // *Surgery.* 2009. 146. P. 206–212.
108. Duerr D.M., White S.J., Shluesener H.J. // *J. Virol. Methods.* 2004. 116. P. 177–180.
109. Higgins L.M., Lambkin I., Donnelly G. et al. // *Pharm. Res.* 2004. 21. P. 695–705.
110. Kang S.K., Woo J.H., Kim M.K., Woo S.S., Choi J.H., Lee N.K., Choi Y.J. // *J. Biotechnol.* 2009. 135. P. 210–216.
111. Hamzeh-Mivehroud M., Mahmoudpour A., Rezazadeh H., Dastmalchi S. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008. 70. P. 577–581.
112. Uchiyama J., Maeda Y., Takemura I. et al. // *Microbiol. Immunol.* 2009. 53. P. 301–304.
113. Dubos R., Straus J.H., Pierce C. // *J. Exp. Med.* 1943. 20. P. 161–168.
114. Raynaud A., Cloastre J.H., Bernard J. et al. // *Vet. Microbiol.* 1992. 30. P. 203–212.
115. Inchley C.J. // *Clin. Exp. Immunol.* 1969. 5. P. 173–187.
116. Appelmans R. Le bacteriophage dans l'organisme. *Compt. Rend. Soc. de Biol.* 1921. 85. P. 722–724.
117. Vitiello C.L., Merrill C.R., Adhya S. // *Virus. Res.* 2005. 114. P. 101–103.
118. Capparelli R., Parlato M., Borriello G., Salvatore P., Iannelli D. // *Antimicrobiol. Agents Chemother.* 2007. 51. P. 2765–2773.
119. Capparelli R., Ventimiglia S., Roperto S., Fenizia D., Iannelli D. // *Clin. Microbiol. Infect.* 12. P. 248–253.
120. Kucharewicz-Krukowska A., Slopeck S. // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 1987. 35. P. 553–561.
121. Адамс М. Бактериофаги. М.: Изд-во иностр. лит. 1961. 527 с.
122. Miedzybrodzki R., Switala-Jelen K., Fortuna W. et al. // *Virus. Res.* 2008. 131. P. 233–242.
123. Pajtasz-Piasecka E., Rossowska J., Dus D., Weber-Dabrowska B. et al. (2008) // *Immunol. Lett.* 2008. 116. P. 24–32.
124. Przerwa A., Zimecki M., Switala-Jelen K. et al. // *Med. Microbiol. Immunol.* 2006. 195. P. 143–150.
125. Dabrowska K., Zembala M., Boratynski J. et al. // *Arch. Microbiol.* 2007. 187. P. 489–498.
126. Rasmussen M., Jacobson M., Bjork L. // *The J. Biol. Chem.* 2003. 278. P. 32313–32316.
127. Cairns B., Timms A.R., Jansen V.A.A., Connerton I.F., Payne R.J.H. // *PLoS Pathog.* 2009. 5(1): e1000253. doi:10.1371/journal.ppat.1000253.
128. Vinga I., Sao-Jose C., Tavares P., Santos M. Bacteriophage entry in the host cell. In *Modern bacteriophage biology and biotechnology.* Wegrzyn G. ed. Research signpost, Kerala, India. 2006.
129. Kasman L., Kasman A., Westwater C., Dolan J., Schmidt M.G., Norris J.S. // *J. Virol.* 2002. 76. P. 5557–5564.
130. Macfarlane S., Dillon J.F. // *J. Appl. Microbiol.* 2007. 102. P. 1187–1196.
131. Anderson G.G., O'Toole G.A. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. 322. P. 85–105.
132. Azeredo J., Sutherland I.W. // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2008. 9. P. 261–266.
133. Cerca N., Olivera R., Azeredo J. // *Lett. Appl. Microbiol.* 2007. 45. P. 313–317.
134. Lu T.K., Collins J.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007. 104. P. 11197–11202.
135. Pearl S., Gabay C., Kishony R., Oppenheim A., Balaban N. // *PLoS Biol.* 2008. 6(5): e120. doi:10.1371/journal.pbio.0060120.
136. Lewis K. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. 322. P. 107–131.
137. Jikia D., Chkhaidze N., Imedashvili E. et al. *Clin. Exp. Dermatol.* 2005. 30. P. 23–26.
138. Bohannon B.J.M., Lenski R.E. // *Ecology Lett.* 3. P. 362–377.
139. Fischetti V.A. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2008. 11. P. 393–400.
140. Smith H.W., Huggins M.B. // *J. Gen. Microbiol.* 1983. 133. P. 1111–1126.