

## ГЛАВА 2. БАКТЕРИОФАГИ

А.Ю. Зурабов

## CHAPTER 2. BACTERIOPHAGES

Alexander Yu. Zurabov

Прошло 20 лет с того момента, как понятие микробиома человека вошло в научный оборот благодаря нобелевскому лауреату *Дж. Ледербергу* [1]. Сам же экологический подход для изучения и правильного понимания происходящего в микромире был заложен более 100 лет тому назад на заре формирования самой дисциплины «микробная экология», и это направление в микробиологии связывают с именем *Сергея Николаевича Виноградского* [2, 3]. Сегодня некоторыми авторами высказывается мнение, что не человек, а холобионт (т. е. макроорганизм и его микробиом) является фактически единицей естественного отбора [4, 5]. Постепенно уходят в прошлое представления о стерильности респираторного тракта, появилось огромное количество работ, посвященных анализу микробиоты верхних и нижних дыхательных путей. Признается, что микробиота дыхательных путей является важнейшим фактором респираторного здоровья человека [6]. Показано, что формирование полноценной лимфоидной ткани носоглотки происходит уже после рождения и, таким образом, напрямую связано с микробиотой этого локуса. Хотя точные сроки завершения становления респираторной микробиоты пока неизвестны, но нишевая дифференциация микрофлоры происходит уже в первую неделю жизни и продолжается в течение нескольких начальных лет. Частое применение антибиотиков в этот период является, по-видимому, существенной негативной детерминантой, определяющей состояние респираторного тракта человека на всю последующую жизнь и его предрасположенность к частым заболеваниям [7–9]. Усиливается понимание того, что залогом здоровья является не просто присутствие либо отсутствие тех или иных видов бактерий, но поддержание микробного разнообразия в микробиоме, что неизбежно влечет за собой определенную (а возможно, и радикальную) ревизию традиционных подходов к терапии дисбиотических состояний, которые последние сто с лишним лет были направлены исключительно на выявление и элиминацию отдельных видов бактерий в очаге. Все чаще специалисты высказываются в пользу разработки экологических подходов к терапии многих инфекционных процессов. Например, *D. Conrad et al.* заявляют о необходимости

альтернативы антибиотикам в целях воздействия на микробиоту легких у больных муковисцидозом: речь идет о подборе определенных видов бактерий, способных ограничивать распространение доминирующих патогенов, о введении некоторых видов нутриентов или иных факторов среды, нацеленном на сдвиг в видовом составе и/или функциях микробиоты снижения ее патогенных свойств [10]. Экологические методы воздействия на микробиом завоевывают все большую популярность, хотя следует признать, что пока человечество находится лишь в самом начале этого пути, на котором ждет огромное количество трудностей в силу чрезвычайной сложности того, что называется экологией. Как известно, реакция сложных систем не равна сумме реакций составных частей, входящих в эти системы. Как писал один из крупнейших микробиологов XX в. *Карл Вёзе*, «Знание всех частей целого в биологии не дает знания целого», поскольку не учитывает взаимодействия этих частей между собой. Настает время для понимания того, что реакция микроорганизмов, составляющих микробиом, — скажем, на действие антибиотика — представляет собой реакцию, по сути дела, многоклеточного организма, который предпринимает скоординированные усилия для своего выживания и нахождения новой точки равновесия после химической атаки. Ситуация стресса, вызываемого приемом антибиотика, ускоряет как межклеточный обмен молекулярными сигналами и генетическим материалом между бактериями, так и внутриклеточные процессы обработки поступающих сигналов для решения отдельной клеткой адаптационных задач, поставленных всей биосистемой микробиома.

### История фаготерапии легочных инфекций

Бактериофаги как компонент входят в любую микробную экосистему. Согласно доминирующей в настоящее время концепции, они представляют собой вирусы, заражающие бактериальные клетки. Открытые более 100 лет тому назад, бактериофаги пережили разные периоды в своей эволюции в качестве терапевтического антибактериального средства: от огромной популярности в 1920–1930-е гг. (во многом благодаря усилиям *Феликса Д’Эреля*, фран-

цузского ученого, с именем которого связывают открытие бактериофагов именно как бактериальных вирусов и который дал им их имя – «бактериофаг», т. е. «пожирающий бактерию») до их почти полного забвения врачами в связи с появлением антибиотиков. В СССР после создания в Тбилиси НИИ микробиологии, вирусологии и иммунологии *Георгием Элиавой*, учеником *Ф. Д'Эреля*, при поддержке последнего, работа по изучению и, главное, практическому применению бактериофагов в лечении инфекционных патологий никогда не прекращалась (впоследствии институту было присвоено имя создателя). В 1938 г. *С.Ф. Шищенко* опубликовал статью, в которой он описывал свой опыт применения бактериофаговых препаратов в лечении пневмонии у детей (включая новорожденных) с введением фаговых субстанций в высоких дозах (3–5 мл) в плевральную полость или вокруг абсцессов с 3–5-кратным повторением. Отмечалось отсутствие побочных эффектов, таких как повышение температуры, развитие инфильтрации в местах инъекций и т. п. Автор обращал особое внимание на применение фаготерапии при гнойном плеврите, который был распространен у новорожденных и в 90% случаев приводил к фатальному исходу. В 1974 г. на конференции в Тбилиси, посвященной 50-летию основания НИИ им. Г. Элиавы, *Ю. Николаева* представила доклад, в котором был обобщен опыт применения поливалентного бактериофагового препарата в клиниках г. Горький и Москва. Препараты применялись в 430 случаях стафилококковой инфекции (стафилококковой пневмонии и деструкции легких) путем ингаляции. Отмечались положительная динамика общего самочувствия, нормализация температуры, уменьшение гноеотделения. После 7–10 дней фаготерапии снижалась инфильтрация ткани, абсцессы становились сухими, их размеры сокращались. В работе 1962 г. *J. Hoeflmaier* отмечает 90%-ную результативность применения бактериофаговых препаратов при лечении бронхита через небулайзер [11]. «Этиологической причиной» заболевания были стрептококки ( $\frac{2}{3}$  случаев) и стафилококки ( $\frac{1}{3}$  случаев). Лечение проводилось ежедневными ингаляциями по 10–15 мин. В итоге 55% пациентов вылечились полностью, а у 35% больных состояние заметно улучшилось. В качестве единственного негативного побочного эффекта отмечался краткосрочный подъем температуры, которого в дальнейшем удавалось избежать путем большего разведения концентрации фаголизата. Исследования в области фаготерапии легочных инфекций проводили *S. T. Abedon* [12], *G. Mitropoulou et al.* [13], *J. J. Iszatt et al.* [14], *X. Wang et al.* [15].

Опыт свидетельствует о значительном объеме практических положительных результатов применения бактериофаговых препаратов у больных. Однако в связи с современными требованиями эта практика не признается убедительной и даже корректной из-за отсутствия необходимого уровня доказательности, так как не проводились рандомизированные, двой-

ные слепые, плацебо-контролируемые клинические исследования. Как отмечал *S. T. Abedon*, успешные случаи фаготерапии характеризуются более гибким (и порой более агрессивным) экспериментированием с путями доставки, кратностью и длительностью применения фаголизатов, что также «противоречит» каноническим подходам к проведению доклинических и клинических экспериментов [12]. До настоящего времени оказывались неуспешными все многочисленные попытки провести клинические испытания препаратов с бактериофагами и зарегистрировать их в качестве лекарственных средств. Регуляторные рамки, принятые в фармакопее всех развитых стран, пока делают невозможной такую регистрацию. Почему же за более чем сто лет, в течение которых механизм действия бактериофагов как антибактериальных агентов был, казалось бы, хорошо изучен, они так и не были поставлены на службу медицине? У неуспешности фаготерапии имеется немало причин, начиная с качества и стабильности самих фаговых препаратов и заканчивая экономическими и иными факторами. Обсуждению этих факторов, разработке и совершенствованию методов создания фаговых препаратов посвящены сотни работ, но проблема остается нерешенной. Неизбежно возникают вопросы: возможно, мы не до конца верно понимаем фундаментальные механизмы взаимодействия бактериофага и бактериальной клетки? Возможно, роль и место бактериофагов в функционировании комплексных бактериальных сообществ, в т. ч. микробиома человека и животных, иная, чем представляется?

### Роль генетических репликаторов в эволюции бактерий

Стремительное развитие технических средств изучения микромира и развитие биоинформатики способствовали лавинообразному набору новых данных в сфере молекулярной генетики. В последние 30 лет происходило колоссальное расширение знаний относительно генетического состава микроорганизмов, активно пополнялись базы данных полностью секвенированных бактерий и вирусов. Вместе с тем многообразие выявленных форм генетического материала все больше усложняло для ученых задачу таксономии и систематизации. Появилось и затем закрепилось в научной среде понятие мобильных генетических элементов (МГЭ) для обозначения любых форм генетического материала, участвующего в т. н. горизонтальном движении генов. Иногда МГЭ называют генетическими репликаторами, подчеркивая присущую им возможность самостоятельной репликации при определенных условиях, главным из которых является попадание внутрь клетки и способность последней произвести копирование генетического материала репликатора. Одна из обобщенных классификаций генетических репликаторов предложена *M. Jalasvuori* и *E. V. Koonin*, согласно которой к МГЭ отнесены и вирусы, включая бактериофаги [16].

Изобилие и постоянное расширение выявляемых видов МГЭ с неизбежностью поставило вопрос об уточнении определения вируса как самого известного вида генетических репликантов. Оказалось, что понятие вируса, которое широко используется и в микробиологии, и в медицине, и на бытовом уровне, с большим трудом поддается четкому определению. Сложилась парадоксальная ситуация: казалось бы, известно, что имеется в виду под вирусом, разрабатываются всевозможные противовирусные препараты, врачи лечат вирусные инфекции у людей и животных, но однозначно сформулировать, что такое вирус, оказывается чрезвычайно трудной задачей. С позиции современных молекулярно-генетических знаний ни одна из общепринятых прежде характеристик вируса не может считаться его отличительной чертой. Так, например, инфективность вируса не носит универсального характера: есть множество видов вирусов, которые передаются только вертикально (т. е. при делении клетки) и вне клетки не сохраняются (многие вирусы грибов, вирусы растений и т. п.). Паразитизм также характерен не для всех вирусов. Далеко не все вирусы, скорее даже не большинство, наносят вред клеткам, которые их размножают. Некоторые доставляют клеткам очевидную пользу, и их следует скорее определять как комменсалов или мутуалистов, чем как паразитов. Отсутствие метаболизма также не может быть принято в качестве отличительной черты именно вирусов, поскольку его нет и у всех других видов МГЭ. Наличие капсида, который позволяет вирусному генетическому материалу не разрушаться вне клетки, не является уникальным. Далеко не все виды МГЭ, которые подпадают под определение вирусов, имеют капсиды, и, наоборот, т. н. бактериальные агенты переноса генов (*bacterial gene transfer agents*), которые переносят не вирусные, а бактериальные гены между клетками, морфологически схожи с вирионами и обладают капсидами.

Можно добавить, что т. н. внеклеточные мембранные везикулы, которые синтезируются всеми 3 доменами (прокариотами, археями и эукариотами) и присутствуют во внеклеточном пространстве в количестве, не уступающем вирусам [16], по своей морфологии, молекулярному составу весьма близки к вирионам. Так, на данный момент нет возможности надежно отличить мембранные везикулы от, например, бесхвостых бактериофагов. В морской среде количество мембранных везикул оценивается в  $10^5$ – $10^6$ , что сопоставимо с количественными оценками в отношении бактериофагов.

Согласно недавно принятой формулировке Международного комитета по таксономии вирусов (*International committee on taxonomy of viruses* – ICTV), вирус – это МГЭ, генетический материал которого кодирует хотя бы один протеин, представляющий собой важный компонент капсида. Одновременно предпринимаются попытки определить всю сферу МГЭ (или виросферу) как совокупность известных

и неизвестных форм МГЭ, которая, по всеобщему признанию, является основной «кладовой» генетического материала на Земле: благодаря ей непрерывно пополняется генетический состав хромосом всех форм жизни на планете. Как отмечают *J.H. Kuhn* и *E.V. Koonin*, определение ICTV носит скорее операционно-практический, чем фундаментально-философский характер; в данном случае важнейшей задачей было «максимально сохранить существующий концептуальный каркас современной вирусологии» [18]. Из сказанного можно сделать важный вывод: устоявшееся представление о вирусе как о почти живой субстанции, своего рода микропаразите, имеющем собственную программу действий и цель «существования» (поиск клеточной мишени, проникновение в нее, подчинение ее аппарата в целях репликации вирусного генетического кода), – такое определение, по-видимому, больше не является незыблемым. Скорее всего, его можно расценивать как неточное или даже неверное.

Отнесение вируса к одной из форм МГЭ неизбежно должно повлечь за собой и пересмотр того, что называется его жизненным циклом, который следует рассматривать не как уникальное явление, а в более широком контексте жизненных циклов генетических репликантов во всех их разнообразных формах. Действительно, если мы признаем, что МГЭ, находящиеся на разных стадиях своего распада, составляют основной объем генетического материала в живых организмах, в т. ч. в таких сложных многоклеточных, как растения и животные, то должно формироваться отличное от прежнего понимание законов движения мобильного генетического материала [18]. Если антропоморфное представление о вирусе и его жизненном цикле как клеточном паразите было доминирующим и весьма удобным с практической точки зрения (в первую очередь, с медицинской), то сегодня, при огромном разнообразии форм МГЭ, необходимо двигаться в сторону общего для всех генетических репликантов понимания законов их движения между формами жизни и их роли в эволюции этих форм.

Что касается бактериофагов, их отличают несколько свойств, важных в практическом плане. Во-первых, их генетический материал размножается только в бактериальных клетках, и ни в каких других. Во многих работах показано, что фаговый геном может время от времени попадать в эукариотические клетки, однако ни разу не был установлен какой-либо негативный эффект для клетки от присутствия в ней генетического материала бактериофага [19–22]. Во-вторых, значимой характеристикой бактериофагов является их, как правило, весьма узкая видоспецифичность, т. е. продуктивный контакт генома фага происходит только с определенным видом бактерии, но не с подавляющим большинством других бактериальных видов. В-третьих, существует огромное разнообразие фагов, вирулентных по отношению к бактерии одного вида.

Так, *W.H. Pope et al.* выделили и проанализировали 627 различных бактериофагов к одному бактериальному виду, которые различались между собой и морфологией, и составом геномов (от 60 до 240 генов) [23]. В практическом плане последнее означает, что не существует одной фаговой частицы, которая была бы вирулентна по отношению ко всем бактериям «своего» вида.

Как известно, в вирусологии различают т. н. вирулентные и умеренные бактериофаги. Первые характеризуются тем, что в результате их взаимодействия с бактериальной клеткой внутри нее активно реплицируется фаговый геном, синтезируются фаговые капсиды, и затем дочерние фаговые частицы покидают ее. Их выход сопровождается лизисом клетки, ее гибелью. В отличие от вирулентных бактериофагов, взаимодействие умеренных фагов с клеткой-мишенью не заканчивается лизисом. Геном умеренного фага встраивается в хромосому клетки в виде отдельного ее фрагмента (т. н. профага) и в таком виде передается дочерним клеткам при клеточном делении. Профаг может довольно долго находиться в составе хромосомы и в конечном итоге либо домицилируется («одомашнивается») хромосомой и становится ее уже неособым фрагментом, либо в определенный момент (как правило, связанный с действием стресс-факторов, например антибиотиков) происходит индукция фагового генома из хромосомы клетки и запуск полноценного литического цикла, завершающегося лизисом клетки и выходом дочерних фаговых частиц в межклеточное пространство. Механика взаимодействия вирулентного бактериофага с клеткой-мишенью подробно описана во множестве работ, и в целях этой главы нет необходимости останавливаться на ней подробно. Если вернуться к классификации мобильных генетических элементов, о которой шла речь выше, то бактериофаги, несомненно, относятся к одной из разновидностей МГЭ и одновременно подпадают под определение классического вируса, т. е. содержат в своем геноме гены, кодирующие белки капсида. По крайней мере, это справедливо по отношению к бактериофагам, которые имеют практическое применение, т. е. выделяются и наработываются с целью их последующего терапевтического применения.

### **Перспективы применения бактериофагов в клинической практике**

До последнего времени бактериофаги рассматривались и в вирусологии, и тем более в медицине, исключительно как антибактериальные агенты, т. е. частицы, задачами которых являются поиск клетки-мишени, адсорбция на клеточную мембрану, введение своего генетического материала внутрь клетки, подчинение ее биосинтетического аппарата для репликации фагового генома, синтез дочерних фаговых частиц, лизис клетки и выход дочерних частиц наружу. Не уделялось и не уделяется осо-

бого внимания тому факту, что сам по себе вирион (т. е. бактериофаг вне клетки) является неживой материей и не обладает метаболизмом, а следовательно, энергией, которая позволяла бы ему выполнять какую-либо работу (с физической точки зрения).

Очеловечивание природных явлений, антропоморфный взгляд на природу вообще характерен для человеческого мышления. Такой взгляд существенно упрощает понимание человеком сложных явлений и чрезвычайно распространен. Применительно к бактериофагам этот взгляд «превращает» фаговую частицу в активного участника биологических процессов, имеющего собственную цель «жизни», программу действий, интересы и способность самостоятельно приспосабливаться к изменяющейся среде. Фаг, согласно этому взгляду, подобно подлинно живой материи «заинтересован» в создании своего потомства и с этой целью занят поиском подходящей клетки-мишени для производства своих дочерних фаговых частиц. Таким образом, на философском уровне признается, что вирус (и бактериофаг) не является живой материей [24]. Однако на операционном, практическом уровне он рассматривается как живой субъект, против активных действий которого необходимо предпринимать целевые контрмеры. Разумеется, анализ сложных явлений природы невозможен без упрощения, но рано или поздно от него приходится отказаться, чтобы оно не стало препятствием на пути к углубленному пониманию этих явлений.

Что касается механизма взаимодействия между бактерией и бактериофагом, возникает вопрос: является ли это взаимодействие равноправным, в котором оба участника одинаково активны? В настоящее время доминирует следующее представление: бактериофаг активно ищет клетку-мишень, а та, в свою очередь, предпринимает всевозможные усилия для того, чтобы этого избежать или в крайнем случае задействовать механизмы, блокирующие процесс создания дочерних вирусных частиц. Взаимоотношения фагов и бактериальных клеток описываются в терминах «гонки вооружений», борьбы видов и т. п. Бактериальные клетки совершенствуют системы защиты от нападения фагов (в литературе описано ~ 10 различных видов фагорезистентности), а бактериофаги постоянно мутируют, находя все новые способы обойти клеточную защиту. Не углубляясь в молекулярные аспекты, зададимся фундаментальным вопросом более высокого уровня: как бактериофаг, будучи инертной частицей, в принципе может играть сколь-нибудь активную роль в каком-либо процессе? Из физики известно, что выполнение любой работы требует наличия и расхода энергии, какой бы малой эта энергия ни была. Поскольку у фага нет метаболизма, то вырабатывать энергию сам он не способен. Тогда за счет чего он проявляет активность? Как справедливо отмечают *M.H.V. van Regenmortel* и *S.J. Flint et al.*, концепция живых вирусов является не более чем удобной метафорой: они не способны

«думать, использовать, обеспечивать, синтезировать, проявлять, демонстрировать, разрушать, перемещать, избегать, репрограммировать, удерживать, уклоняться, генерировать и т. п.» [24, 25]. Иначе говоря, вирусы, будучи инертными в физическом смысле частицами, не обладают функциональной автономией, которая давала бы им возможность самостоятельно действовать и эволюционировать. Они «меняются» только в результате действия внутриклеточных механизмов, и в основе таких изменений лежат причины более высокого порядка, нежели активная и целенаправленная деятельность самого вируса.

В лаборатории научно-производственного центра «Микромир» был проведен ряд экспериментов, позволяющих взглянуть на обсуждаемый вопрос с другой стороны. Исходная гипотеза состояла в следующем: если бактериофаг играет активную роль во взаимодействии с бактериальной клеткой, это взаимодействие должно приводить к одному и тому же результату при любых состояниях клетки, т. е. вирулентные бактериофаги должны обязательно и неизбежно лизировать чувствительную к ним бактериальную колонию, независимо от функционального состояния клеток. В качестве исходного постулата было взято известное описание различных состояний бактериальной колонии (рис. 1).

На рис. 1 лог-фаза (экспоненциальная) составляет 24–30 ч, после чего наступает стационарная фаза и бактериальная колония перестает расти. Затем (через ~ 72 ч после начала лаг-фазы) колония переходит в фазу умирания, бактериальные титры снижаются на 2–3 порядка. Именно так описывают продолжительность фазы экспоненциального роста в учебниках по микробиологии, исходя из динамики бактериальных титров. Действительно, увеличение титров продолжается примерно до 24 ч и достигает обычно

$10^8$ – $10^9$ . Однако, если производить титрование каждый час, то продолжительность собственно лог-фазы, когда бактериальная клетка делится с предельной для себя скоростью (период деления *Escherichia coli* – 20 мин), составит 6–7 ч (таблица). После 6 ч скорость деления замедляется и к 12 ч падает до 1-го деления в 4 ч. В дальнейшем рост бактериальных титров происходит весьма медленно (на 1 порядок за 10–12 ч до выхода на абсолютный максимум).

Необходимо подчеркнуть, что лог-фаза представляет собой особое состояние бактериальной клетки, когда все внутриклеточные процессы ускоряются чрезвычайно. Это касается не только метаболизма клетки, но и ее способности копировать находящийся внутри генетический материал, причем, что очень важно, не только «свой», входящий в хромосому, но и любой другой, который может оказаться в цитоплазме. Было важно исследовать, одинаково ли взаимодействуют бактериальные клетки с вирулентными бактериофагами при различных фазах своего состояния. Для полноты картины в эксперименты помимо бактериофагов были добавлены антибиотики. Результаты представлены на рис. 2 и 3.

Как показано на рис. 2, добавление антибиотика в начале лог-фазы, когда происходит резкое ускорение метаболической активности бактерий, приводит практически к полной остановке развития этого этапа, т. е. экспоненциальный рост не происходит. Добавление антибиотика в стационарной фазе ведет к некоторому снижению бактериальных титров (максимум на 1–2 порядка), но основная часть колонии остается жизнеспособной. Аналогичная картина наблюдается и в случае с добавлением бактериофагов. На рис. 3 видно, что присутствие фагов фактически останавливает процесс в тот момент, когда колония находится в начале лог-фазы и идет перестройка всего клеточного функционала на резкое ускорение

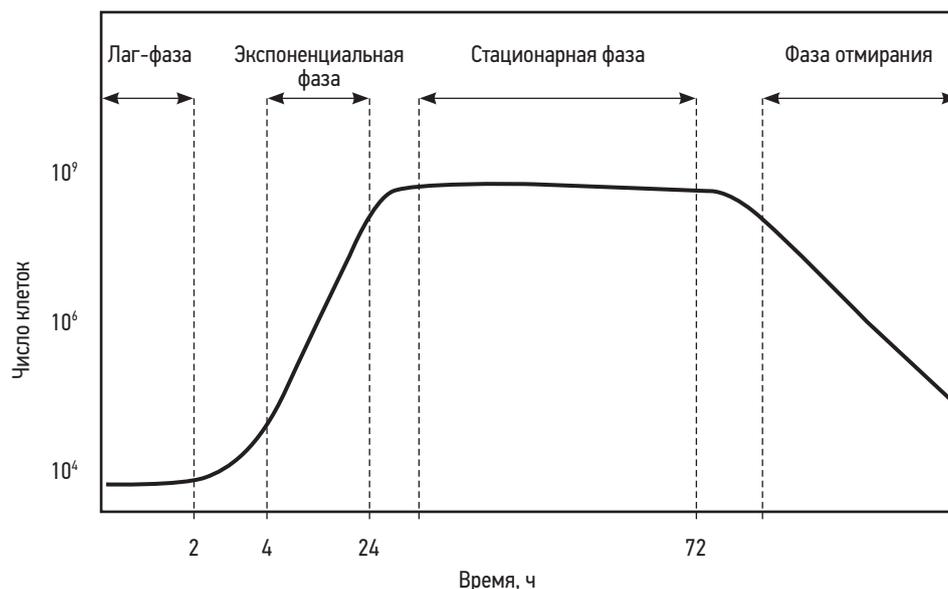
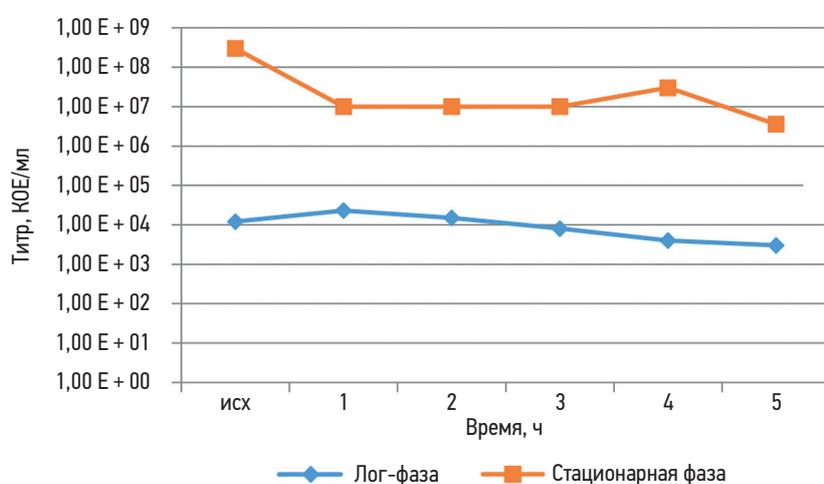
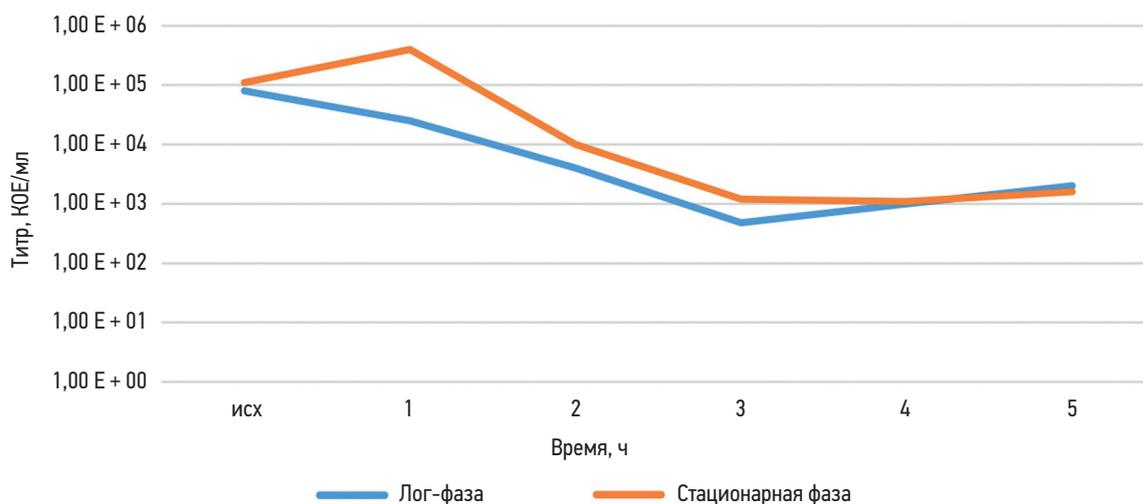


Рис. 1. Динамика роста бактериальной популяции

Таблица. Динамика деления *Escherichia coli*

Время, ч	Бактериальные титры	Рост титров	Степень 2	Количество делений / час	Скорость деления
0	$1,6 \times 10^4$	1,0	–	–	–
1	$1,1 \times 10^5$	7,0	3	3,000	Каждые 30 мин
2	$1,4 \times 10^5$	1,2	0	0	–
3	$1,5 \times 10^6$	11,0	3,5	3,000	Каждые 30 мин
4	$1,3 \times 10^7$	9,0	3	3,000	Каждые 30 мин
8	$1,8 \times 10^8$	14,0	3,5	0,875	Каждые 69 мин
12	$3,7 \times 10^8$	2,0	1	0,250	Каждые 4 ч
24	$3,7 \times 10^8$	0	0	0	0
48	$4,1 \times 10^4$	0	0	0	0

Рис. 2. Изменение концентрации *Escherichia coli* ЭКО-6-15 при внесении 320 мкл антибиотика в лог- и стационарной фазах ростаРис. 3. Изменение концентрации *Escherichia coli* ЭКО-6-15 при внесении бактериофага в лог- и стационарной фазах роста

метаболизма и репликативных возможностей. Если же колония находится в фазе торможения или вошла в стационарную фазу, то воздействие бактериофагов на ее титры оказывается незначительным (снижение 2–3 порядка).

В следующих экспериментах концентрация антибиотика была увеличена в несколько раз, а введение бактериофагов проводилось многократно. Как видно из рис. 4 и 5, результаты данного эксперимента незначительно отличаются от результатов

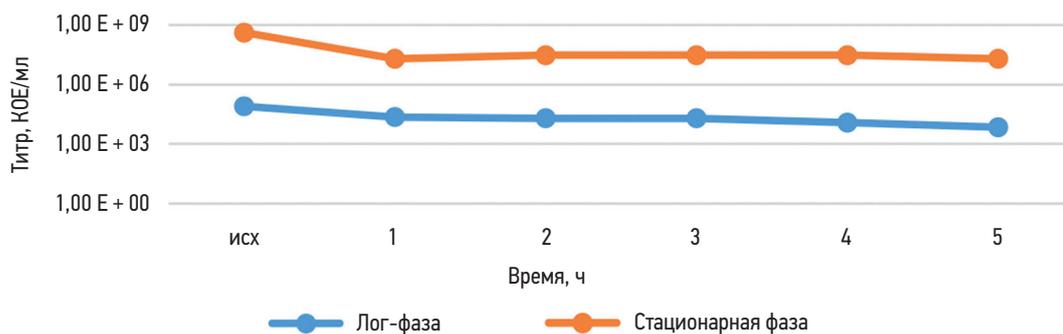


Рис. 4. Изменение концентрации *Escherichia coli* ЭКО-6-15 при внесении 1 000 мкл антибиотика в лог- и стационарной фазах роста

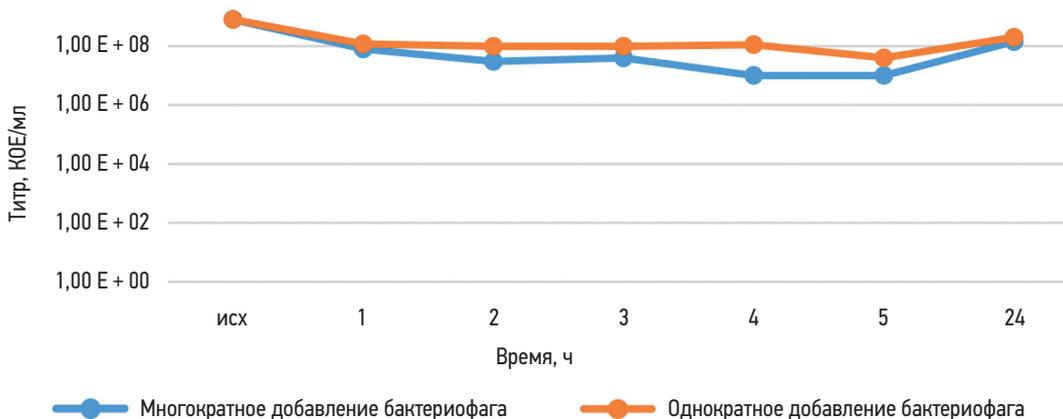


Рис. 5. Изменение концентрации *Escherichia coli* ЭКО-6-15 при внесении бактериофага однократно и многократно

предыдущего. По-видимому, решающее влияние на результат взаимодействия антибиотика и бактериофагов с бактериями оказывает функциональное состояние клеток. Самой чувствительной является лог-фаза, когда клетка претерпевает колоссальные изменения и в характере, и скорости протекающих внутри нее процессов, и в состоянии клеточной мембраны. Переход же клетки в стационарную фазу фактически перекрывает ее контакт с окружающей средой, и факторы, связанные с метаболизмом, теряют способность существенно влиять на ее состояние и поведение.

Описанные эксперименты показали, что и антибиотик (несомненно, инертная субстанция), и бактериофаги наиболее эффективным образом воздействуют на бактериальные клетки, когда те находятся в лог-фазе роста. Во всех других фазах это воздействие либо минимально, либо вообще отсутствует. Если бы бактериофаги были активной стороной взаимодействия с бактериальной клеткой, то они должны были бы находить клетку и, независимо от ее состояния, реализовывать свою «жизненную программу». Фактически же исключительно состояние клетки определяет вероятность запуска литического цикла при встрече ее с вирулентным бактериофагом, и в этом смысле роль последнего ничем не отличается от воздействия ни антибиотика, ни всех иных видов МГЭ, т. е. эта роль исключительно пассивная.

Если гипотеза об активной роли бактериофагов в жизни бактерий оказывается опровергнутой, то возникает вопрос: в чем может состоять их влияние, и отличается ли оно принципиально от роли всех остальных (известных и неизвестных) видов МГЭ? Представляется, что в настоящее время имеется общий консенсус относительно того, что виросфера является основной «кладовой» генетического материала природы. Помимо генов в составе хромосом живых объектов (от одноклеточных прокариотов до многоклеточных животных) существует огромный резервуар генов (по-видимому, многократно больший), носителями которых являются МГЭ. Как отмечают *J.H. Kuhn* и *E.V. Koonin*, чрезвычайно разнообразие генетических репликантов и важнейшая их роль в глобальной экологии начинает осознаваться многими [18]. Становится все более очевидной невозможность формирования адекватного понимания (тем более построения соответствующей теории) функционирования и эволюции биосферы без учета роли МГЭ как ее интегральной части. Присутствие МГЭ в каждый момент времени как вне живых существ, так и внутри них, в т. ч. в крови человека, получает все больше подтверждений, исследователи выявляют новые механизмы горизонтального движения генов, но цели такого движения и его результаты (особенно у многоклеточных, включая человека) остаются неясными. Можно совершенно

определенно сказать, что механизм горизонтального движения генов был неизвестен Ч. Дарвину, когда он формулировал свою знаменитую теорию о том, что вектор эволюции направлен в сторону выживания сильнейшего (или, точнее, наиболее приспособленного). Теория Дарвина базируется исключительно на вертикальном механизме передачи генов. Выживающий наиболее приспособленный передает свою (выигрышную) комбинацию генов своему потомству, и таким образом она закрепляется для последующих поколений. Очевидно, роль горизонтальной передачи генов (неизвестная вначале и недооцененная в последующем) начинает выходить на передний план, и ее роль в эволюции может оказаться даже более важной, чем вертикальной (по крайней мере, у одноклеточных). Проблема антибиотикорезистентности, которая в медицине XXI в. превратилась едва ли не в центральную, иллюстрирует роль именно горизонтальной передачи генов, в частности генов резистентности. Скорость, с которой бактериальные сообщества обмениваются соответствующими генами и механизмами резистентности, преодолевая видовые и пространственные границы между бактериями, достаточно убедительно свидетельствует, что бактериальная эволюция происходит в большей части под воздействием горизонтальной, чем вертикальной передачи генетического кода. Означает ли это, что вектор эволюции направлен не в сторону выживания сильнейшего, а в какую-то другую сторону? Не являются ли коллективные процессы в живой материи существенно более важными, чем процессы внутри отдельных живых объектов и их поведение? Не является ли поддержание гетерогенности, генетического разнообразия в популяции более важным вектором эволюции, чем пресловутое «выживает сильнейшая (отдельная) особь»?

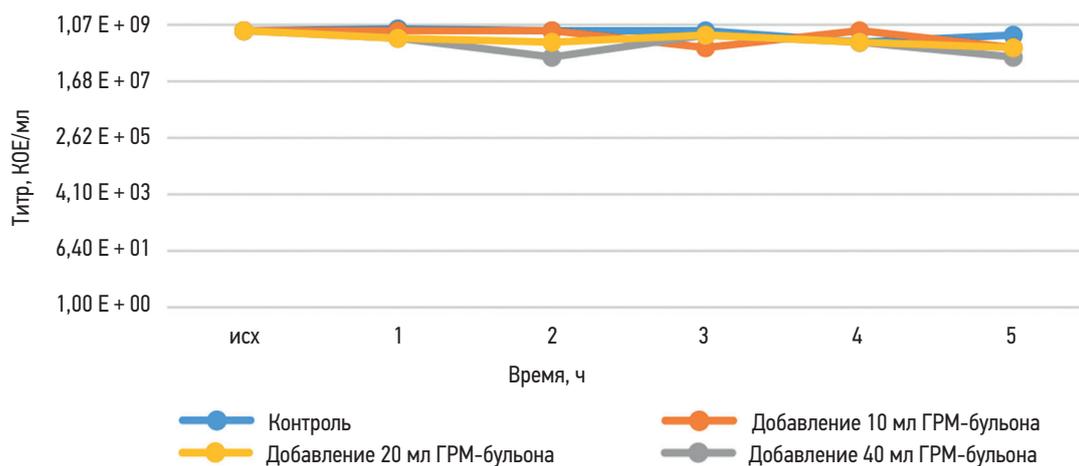
В отличие от экспериментов в лабораториях, опыты и наблюдения в естественных условиях дают множество свидетельств того, что в природе не происходит доминирование наиболее приспособленного, а сохраняется высокая степень разнообразия гено- и фенотипов. Микроорганизмы в большинстве случаев существуют не поодиночке, а в составе больших и разнообразных микробных сообществ, они критически зависят от своего окружения. Неудивительно, что ауксотрофность (неспособность микроорганизмов синтезировать все необходимые для их роста и размножения вещества) является всеобщим признаком, а прототрофность (такая способность) не закрепляется в генотипе. Находясь в составе сообществ, микробы обладают способностями (и активно их используют) к обмену генетическим материалом, биологическими сигналами (кворум-сенсинг), осуществлению коллективного перемещения по поверхностям (англ. *swarming motility* — подвижность роения), формированию биопленок, в которых обеспечиваются скоординированное разделение труда, клеточная дифференциация и коллективная защита от внешних опасностей.

Возникновение внешних условий, которые дают преимущество определенному гено- или фенотипу, не приводит к его полному доминированию. На пути такого доминирования в естественных условиях стоят 3 объективных препятствия. Во-первых, такие особые условия не сохраняются сколь-нибудь долго. Во-вторых, любой бактериальной клетке в силу ее ауксотрофности необходимо окружение, которое бы обеспечивало ее всем, что она не способна синтезировать самостоятельно. В-третьих, существуют барьеры, препятствующие неограниченному размножению бактерий даже при неизменности внешних условий. Одним из таких барьеров является небольшая продолжительность фазы логарифмического роста. На базе НПО «Микромир» был проведен ряд экспериментов с целью подбора условий для удлинения лог-фазы и ее повторного запуска в колонии, вошедшей в фазу торможения или в стационарную фазу. В 1-м эксперименте в колбу с 24-часовой культурой добавляли свежую питательную среду в различных концентрациях. На рис. 6 отражена динамика бактериальных титров при добавлении 10 мл (50% общего объема среды), 20 мл (100%) и 40 мл (200%) свежего питательного бульона. Как видно, добавление дополнительного питания не приводит к возобновлению экспоненциального роста.

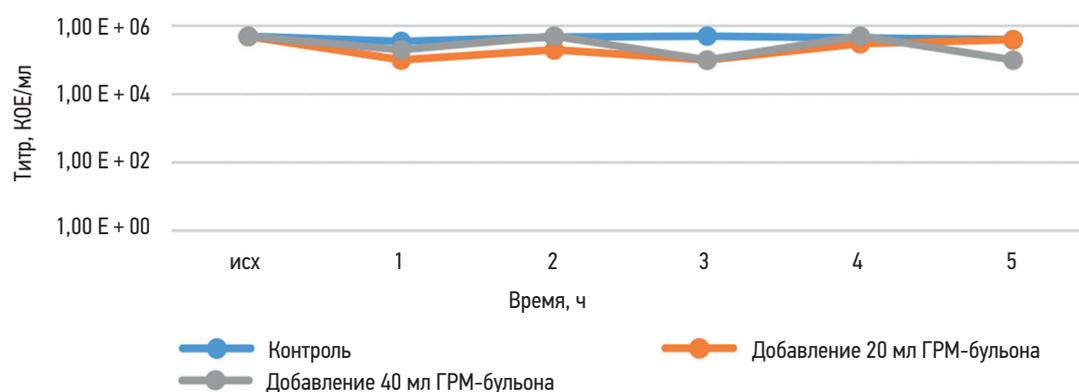
Во 2-й серии экспериментов к 24-часовой колонии *E. coli* добавлялась равная ей по количеству клеток колония *Staphylococcus aureus*. В 1-м случае дополнительная питательная среда отсутствовала, во 2-м — добавляли 20 мл (100% общего объема), в 3-м — 40 мл (200%). Эксперименты показали, что в среде с «отработавшей колонией» лог-рост другой колонии также не происходит.

Пока неясно, в чем состоят причины и каковы механизмы ограничения продолжительности лог-фазы. Сходные результаты были получены, например, *V. Somerville et al.* и *E.J. Smid et al.*, подробно изучавших поведение различных кислomолочных бактерий в естественных условиях сырного производства [26, 27]. Авторы установили, что размножение кислomолочных бактерий останавливается через 12 ч после введения их в молоко, что в целом совпадает с полученными нами результатами. Важным практическим выводом является то, что в условиях микробиома также не следует ожидать безостановочного роста бактериальных титров. После выхода на плато репликация бактерий в инфекционном очаге останавливается по естественным причинам, и это обстоятельство следует учитывать при назначении антибактериальной терапии.

Еще одним (из известных) природным ограничителем на пути безостановочной репликации бактерий являются бактериофаги. Везде, где в природе есть бактерии, существуют и бактериофаги. Переход клеток в лог-фазу делает их максимально уязвимыми для фагов. Выше было показано, что присутствие (добавление) фагов в начале лог-фазы способно полностью остановить рост бактериальных титров,



**Рис. 6.** Изменение концентрации 24-часовой культуры *Escherichia coli* ЭКО-6-15 при добавлении питательной среды  
Примечание: ГРМ – гидролизат рыбной муки.



**Рис. 7.** Количество бактериальных клеток *Staphylococcus aureus* «Ж» при внесении их в 24-часовую культуру *Escherichia coli* ЭКО-6-15 с добавлением различных объемов питательной среды  
Примечание: ГРМ – гидролизат рыбной муки.

несмотря на идеальные условия для размножения клеток. Получается, что бактерии, входя в лог-фазу, одновременно готовят себя к «массовому самоубийству», оказываясь готовыми к запуску литического цикла бактериофагов. На первый взгляд, для живой материи такое поведение кажется иррациональным. Однако, если посмотреть на это с позиции не отдельной клетки, а бактерии как вида, подобную «иррациональность» можно объяснить.

Генетический код бактериофагов, как правило, отличается от генов, находящихся в хромосомах бактерий. Совокупный геном бактериофагов представляет собой кладовую генов, которые могут оказаться полезными бактериальному виду при изменении внешних условий. Однако, чтобы эта кладовая стала доступной для бактерий, необходимо, во-первых, предохранять ее от исчезновения, а, во-вторых, доставлять присутствующие в ней гены в состав бактериальных хромосом. Первая задача решается путем копирования геномов вирулентных бактериофагов клеткой и выведения этих копий наружу во время литического цикла. Вторая реализуется через механизм создания профагов «умеренными» фага-

ми. Контакт клетки с умеренным фагом приводит к встраиванию генома фага в состав бактериальной хромосомы. Хотя геном профага первоначально репрессируется генетическим аппаратом клетки, но через некоторое время эти гены могут быть доместифицированы клеточным геномом и начнут принимать участие в работе клеточного аппарата (если до этого не произойдет индукция профага и запуск литического цикла). Так работает один из механизмов расширения генетического разнообразия бактериального вида посредством бактериофагов. Он отличается от других механизмов горизонтального перемещения генов. Главное условие сохранения вида – поддержание его генетического разнообразия. Решение этой задачи представляет собой основное препятствие на пути полной и абсолютной реализации сформулированного Ч. Дарвином принципа: «выживает сильнейший». Коллективное доминирует над индивидуальным, и если интересы сохранения вида требуют от отдельных его представителей самопожертвования, то это будет происходить безусловно. Для понимания поведения бактериальных клеток в микробиоме необходимо учитывать не толь-

ко особенности отдельной клетки, но и особенности организации бактериальных колоний, причем имеющих в своем составе не один вид, а множество различных видов [28]. *A. Babic et al.* показали, что частота конъюгации между бактериями, в результате которой происходит передача плазмидов между клетками, зависит от плотности бактериальной популяции: в биопленках эта частота на порядок выше, чем между клетками, находящимися в планктонном состоянии [29]. Микробное сообщество в составе биопленки ведет себя как многоклеточный организм, а не как набор отдельных конкурирующих между собой клеток, осуществляет интенсивную коммуникацию между клетками, как информационную, так и генетическую. Цель такой коммуникации, по видимому, состоит в ускоренной адаптации всей популяции как единого целого к условиям окружающей среды. По мнению *J. Shapiro*, бактерии, объединенные в колонии, имеют целый ряд преимуществ перед планктонными формами [30]. Эти преимущества состоят, в частности, в следующем:

- в более эффективной пролиферации благодаря клеточному «разделению труда»;
- доступности ниш и ресурсов, недоступных отдельным клеткам;
- коллективной защите от антагонистов;
- оптимизации возможностей для выживания (вида) через дифференциацию внутри;
- колониях клеток с определенными (необходимыми в данных условиях) гено- и фенотипами.

В процессе этой адаптации изменения гено- и фенотипов клеток внутри колонии диктуются «целями» именно колонии, а не выживания отдельных клеток. Как пишет *J. Shapiro*, задачей *E. coli* при формировании колонии является максимизация межклеточных контактов (т. е. увеличение плотности колонии), а не доступ отдельных клеток к питательному субстрату [30]. Внутри организованной колонии наблюдаются клетки различных размеров, морфотипов, различаются и способы участия в поддержании жизнедеятельности колонии. Накопленные наукой сведения о поведении отдельной бактериальной клетки или однородной колонии в искусственных условиях лаборатории не дают ключ к пониманию поведения бактерий в природе, подобно тому, как наблюдение за животными в зоопарке не дает такого ключа в отношении поведения этих животных в дикой природе.

Таким образом, на наш взгляд, бактериофаги следует рассматривать не как паразиты бактерий, которые сразу при встрече бросаются «пожирать» их, а как механизм поддержания генетического разнообразия бактериальных популяций. Когда бактериальные клетки находятся в метаболически активном состоянии, то присутствие рядом с ними бактериофагов приводит к активному производству новых фагов бактериями (ценой своей жизни), когда активного метаболизма нет, но тогда наблюдается «мирное сосуществование» в одном пространстве и потенциально вирулентных бактериофагов, и потенциально

чувствительных к ним клеток. Такое явление многократно подтверждалось исследователями, которые изучали процессы взаимодействия фагов и бактерий не в искусственных лабораторных, а в естественных природных условиях [31, 32]. Нет оснований полагать, что в микробиоме наблюдается иная картина [33].

Успешность применения бактериофагов в клинической практике зависит от 2 основных условий:

- 1) правильно подобранного состава препарата с бактериофагами. Под таким составом понимается тот, который включает в себя вирулентные бактериофаги к бактериям, способным проявлять повышенную метаболическую активность в биотопе;
- 2) правильно выстроенных ожиданий от применения препаратов с бактериофагами.

Чего следует ожидать от использования таких препаратов? Выше обсуждалось, что бактериофаги нельзя рассматривать в качестве антибактериального средства, тем более с активным началом. В естественных условиях (в отличие от искусственного лабораторного опыта) присутствие фагов в бактериальной популяции никогда не приводит к полной элиминации чувствительных к ним бактерий: в ней остаются и вирулентные фаги, и чувствительные бактерии. Фаги, как встроенные ограничители, сдерживают чрезмерную репликацию бактерий, препятствуя интенсивному росту их титров, причем как в период вхождения клеток в лог-фазу, так и впоследствии. Оставаясь в бактериальной популяции, бактериофаги продолжают выполнять эту ограничительную функцию в течение определенного времени. Постоянное присутствие фагов способствует расширению доступа бактерий к дополнительному генетическому материалу и, как следствие, повышению устойчивости этой популяции к воздействию меняющихся различных (внешних) биохимических условий. Это представляется особенно важным в закрытых системах, у которых нет свободного доступа к горизонтальному генетическому обмену, а организм человека и отдельные его биотопы представляют собой именно такие закрытые системы.

Таким образом, на наилучшие результаты от применения препаратов с бактериофагами следует рассчитывать:

- если есть возможность их использования в период вхождения бактериальной популяции в фазу лог-роста (начала активного инфекционного процесса). В итоге возможны фактическая остановка экспоненциального роста и возврат колонии в стационарную фазу;
- если такая возможность отсутствует – при профилактическом применении комплексных средств, содержащих широкий набор различных бактериофагов.

Во 2-м случае возможно: а) предотвращение наступления лог-фазы, если есть основания ее ожидать (например, перед различными врачебными инвазиями или сразу после них); б) расширение

генетического репертуара, находящегося в доступе у колонии, что при прочих равных условиях ведет к повышению ее генетического разнообразия, гетерогенности и устойчивости при возможных пертурбациях. Последнее может быть весьма актуально для часто болеющих пациентов, микробиом которых не в состоянии самостоятельно найти точку равновесного состояния и склонен к постоянным «дисбиозам».

### Заключение

У фаготерапии легочных инфекционных состояний большое будущее, которое определяется не только постоянно сужающимися возможностями применения антибиотиков. О нем можно судить по нарастающей потребности в новых, более экологических методах воздействия на микробиом человека, в более активном его использовании как помощника для восстановления здоровья человека (каковым микробиом и является, когда человек здоров), а порой и в качестве защитника. Но это будущее не могут приблизить одни ученые-микробиологи. Перед клиницистами стоят задачи отработки практических методик по использованию препаратов с бактериофагами при тех или иных состояниях, выстраивания корректных ожиданий от такого применения, активного экспериментирования с составами, путями доставки, кратностями применения. В настоящее время не вызывает сомнений безопасность средств с бактериофагами, приготовленных специалистами в надлежащих условиях. Сложность и динамичность микробного сообщества, называемого микробиомом, требует адекватного отношения к себе. Без осторожного, но настойчивого экспериментирования здесь не обойтись [34].

### Литература

1. Fungi in biological control systems / ed. M.N. Burge. Manchester University Press, 1988.
2. Dworkin M. Sergei Winogradsky: a founder of modern microbiology and the first microbial ecologist. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012; 36: 364–379.
3. Prescott S. History of medicine: origin of the term microbiome and why it matters. *Human Microbiome Journal*. 2017; 4: 24–25.
4. Roughgarden J., Gilbert S.F., Rosenberg E. et al. Holobionts as units of selection and a model of their population dynamics and evolution. *Biol. Theory* 2018; 13: 44–65.
5. Laforest-Lapointe I., Arrieta M.-C. Patterns of early-life gut microbial colonization during human immune development: an ecological perspective. *Front. Immunol.* 2017; 8: 788.
6. Wing Ho Man, Wouter A.A., de Steenhuijsen Pieters, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health. *Nat. Rev. Microbiol.* 2017; 15(5): 259–270.
7. Hoeflmayr J. Inhalationstherapie mit Bakteriophagen bei therapieresistenten Infektionen. In: Nüchel H., ed. *Fortschritte der biologischen Aerosol-Forschung in den Jahren 1957–1961*. Stuttgart, Germany, 1962. 403–409.
8. Biesbroek G. et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014; 190: 1283–1292.
9. Teo S.M. et al. The infant nasopharyngeal microbiome impacts severity of lower respiratory infection and risk of asthma development. *Cell Host Microbe* 2015; 17: 704–715.
10. Vissing N.H., Chawes B.L.K., Bisgaard H. Increased risk of pneumonia and bronchiolitis after bacterial colonization of the airways as neonates. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013; 188: 1246–1252.
11. Conrad D., Haynes M., Salamon P. et al. Cystic fibrosis therapy: a community ecology perspective. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2013; 48(2): 150–156.
12. Abedon S.T. Phage therapy of pulmonary infections. *Bacteriophage*. 2015; 5(1): e1020260.
13. Mitropoulou G., Koutsokera A., Csajka C. et al. Phage therapy for pulmonary infections: lessons from clinical experiences and key considerations. *Eur. Respir. Rev.* 2022; 31(166): 220121.
14. Iszatt J.J., Larcombe A.N., Chan H.-K. et al. Phage therapy for multi-drug resistant respiratory tract infections. *Viruses* 2021; 13(9): 1809.
15. Wang X., Xie Z., Zhao J. et al. Prospects of inhaled phage therapy for combatting pulmonary infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11: 758392.
16. Jalasvuori M., Koonin E.V. Classification of prokaryotic genetic replicators: between selfishness and altruism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2015; 1341: 96–105.
17. Soler N., Krupovic M., Marguet E., Forterre P. Membrane vesicles in natural environments: a major challenge in viral ecology. *ISME J.* 2015; 9: 793–796.
18. Kuhn J.H., Koonin E.V. Viriforms – a new category of classifiable virus-derived genetic elements. *Biomolecules*. 2023; 13: 289.
19. Barr J.J., Auro R., Furlan M. et al. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013; 110: 10771–10776.
20. Górski A., Wazna E., Dabrowska B.-W. et al. Bacteriophage translocation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006; 46: 313–319.
21. Weber-Dabrowska B., Dabrowski M., Slopek S. Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 1987; 35: 563–568.
22. Zhang L., Sun L., Wei R. et al. Intracellular *Staphylococcus aureus* control by virulent bacteriophages within MAC-T bovine mammary epithelial cells. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2017; 61(2): e01990–16.
23. Pope W.H. et al. Whole genome comparison of a large collection of mycobacteriophages reveals a continuum of phage genetic diversity. *eLife*. 2015; 4: e06416.
24. van Regenmortel M.H.V. The metaphor that viruses are living is alive and well, but it is no more than

a metaphor. *Stud. Hist. Philos. Biol. Biomed. Sci.* 2016; 59: 117–124.

25. Flint S.J., Enquist L.W., Racaniello V.R. *Principles of virology: pathogenesis and control*. 3<sup>rd</sup> ed. Washington DC, USA: ASM Press, 2009.

26. Somerville V., Berthoud H., Schmidt R.S. et al. Functional strain redundancy and persistent phage infection in Swiss hard cheese starter cultures. *ISME J.* 2022; 16: 388–399.

27. Smid E.J., Erkus O., Spus M. et al. Functional implications of the microbial community structure of undefined mesophilic starter cultures. *Microb. Cell. Factor.* 2014; 13 (Suppl. 1): S2.

28. Ben-Jakob E., Cohen I., Levin H. Cooperative self-organization of microorganisms. *Advances in Physics.* 2000; 49(4): 395–554.

29. Babic A., Lindner A., Vulic M. et al. Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science* 2008; 319(5869): 1533–1536.

30. Shapiro J. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu. Rev. Microbiol.* 1998; 52: 81–104.

31. Brum J.R., Hurwitz B.L., Schofield O. et al. Seasonal time bombs: dominant temperate viruses affect Southern Ocean microbial dynamics. *The ISME Journal.* 2016; 10: 437–449.

32. Guerero L.D., Pérez M. V., Orellana E. et al. Long-run bacteria-phage coexistence dynamics under natural habitat conditions in an environmental biotechnology system. *ISME J.* 2021; 15: 636–648.

33. Hsu B., Gibson T. E., Yeliseyev V. et al. Dynamic modulation of the gut microbiota and metabolome by bacteriophages in a mouse model. *Cell Host & Microbe.* 2019; 25(6): 803–814.e5.

34. Белобородова Н.В. и др. Адаптивная фаготерапия пациентов с рецидивирующими пневмониями (пилотное исследование). *Общая реаниматология.* 2021; 17(6): 4–14. doi: 10.15360/1813-9779-2021-6-4-14.

### Информация об авторе

**Зурабов Александр Юрьевич** – генеральный директор ООО «НПЦ «Микромир»; тел.: (495) 625-32-65; e-mail: office@micromir.bio