

Perspektīvas antimikrobiālās rezistences pārvarēšanā: bakteriofāgu potenciāla izmantošana mūsdienu medicīnā

Sandis Mauriņš, 5. kursa students studiju programmā "Medicīna", RSU, vecākais laborants, RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra

Dace Rezevska, Dr., lektore, RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra, rezidente specialitātē "Klīniskais mikrobiologs", PSKUS

Laima Sevastjanova, *MSc. Clin. Pharm.*, asistente, RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra, vietnes aktivizācijas speciāliste, IQVIA

Juta Kroiča, Dr. med., profesore, RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra, katedras vadītāja, RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedra

Kārlis Rācenis, nefrologs, internists, RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedras lektors, PSKUS Nefroloģijas centrs

Anotācija

Antibakteriālā rezistence kļūst arvien aktuālāka ārsta ikdienā, tā rada būtiskus izaicinājumus bakteriālu infekciju veiksmīgai ārstēšanai. Zinātnieki visā pasaulē aktīvi strādā pie risinājumiem, lai mazinātu antibakteriālo rezistenci un rastu risinājumus rezistentu bakteriālu infekciju ārstēšanā, t.sk. izmantojot alternatīvas metodes antibiotikām, piemēram, bakteriofāgus. Fāgu terapijas pirmsākumi pasaules vēsturē meklējami vairāk nekā simts gadu senā pagātnē. Tā ir viena no plašāk pielietotajām alternatīvajām metodēm, īpaši multirezistentu infekciju ārstēšanā. Arī Latvijā šī terapija tiek arvien intensīvāk pētīta un pielietota praksē.

Kas ir fāgu terapija?

Mūsdienās antibiotikas ieņem nozīmīgu un izšķirošu lomu veselības aprūpē. To apjomīgais patēriņš, nereti nepamatotā un neatbilstošā lietošana ne tikai medicīnā, bet arī citās jomās, galvenokārt lauksaimniecībā, ir radījis ievērojamu antibakteriālās rezistences veidošanās un izplatīšanās risku, kas ir būtisks globāls apdraudējums veselības aprūpē, t.sk. veterinārajā medicīnā. Pasaules Veselības organizācija (PVO) paredz, ka antimikrobiālās rezistences pieaugums 2050. gadā rezultēsies ar aptuveni 10 miljoniem nāves gadījumu gadā. Iepriekš minēto iemeslu dēļ antimikrobiālās rezistences ierobežošana ir viena no sabiedrības veselības prioritātēm visā pasaulē. [1] Antibakteriālās rezistences attīstība un no tās izrietošās sekas bakteriālu infekciju ārstēšanā ir atjaunojusi interesi par fāgu terapiju, kā alternatīvu līdzekli plaši lietotajai antibiotiku terapijai. Antibakteriālās rezistences dēļ potenciāli ārstējamas infekcijas kļūtu letālas, ja netiks meklēti alternatīvi risinājumi.

Antibiotiku rezistence ir baktērijas neuzņēmība pret antibiotikām. Šādos gadījumos kā alternatīva ārstēšanas metode ir fāgu terapija, kurā pielieto bakteriofāgus. Šī terapija apsverama arī brīžos, kad potenciāli nopietno blakusparādību dēļ antibiotiskos li-

dzekļus izmantot nav iespējams, piemēram, kad attīstās nefrotoksicitāte un ototoksicitāte aminoglikozīdu lietošanas gadījumā. Antibiotikas, iznīcinot patogēnās baktērijas, vienlaikus var iznīcināt arī normālo cilvēka mikrobiotu, tādējādi radot disbakteriozi. Savukārt fāgiem darbības spektrs ir šaurs – tas ir mērķēts uz noteiktiem baktēriju celmiem vai sugām, kur specifiskumu nosaka saimniekšūnas (baktērijas) virsmas receptori. [2] Šī specifiskuma dēļ fāgu terapija lielākoties ir individualizēta. Tas padara fāgu terapiju par pievilcīgu alternatīvu infekciju ārstēšanā, īpaši tām infekcijām, kuras ierosina multirezistentas baktērijas. [3]

Kas ir fāgi?

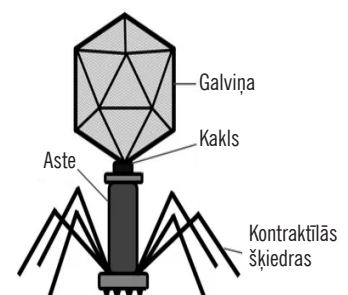
Bakteriofāgi jeb fāgi, ir baktēriju vīrusi. Baktērijas ir prokarioti, tas nozīmē, ka cilvēkam fāgi ir nekaitīgi, jo tie nespēj inficēt eikariotu (t.sk. cilvēku) šūnas un tajās replicēties. Bakteriofāgi ir ļoti daudzveidīgi: tiem ir atšķirīgi izmēri, ģenētiskā struktūra un morfoloģija. Kopumā fāgiem piemīt vīrusiem raksturīgās īpašības, taču pēc uzbūves tie var būt sarežģītāki nekā cilvēku un dzīvnieku vīrusi. Fāga galviņas daļā ir vienpavediena vai divpavedienu RNS vai DNS genoms, ko aptver proteīnu kapsīds. Galviņas daļai

seko īsa kakla daļa, kas savienojas ar asti. Astes daļa ir atbildīga par baktērijas atpazīšanu, baktērijas šūnas sienas un/vai šūnas membrānas caururbšanu un fāga genoma ievadīšanu baktērijas šūnas citosolā, lai tur veidotu jaunās vīrusa daļiņas. Fāga astes daļas distāli novietotās šķiedras ir atbildīgas par saistīšanos ar baktērijas virsmas receptoriem. (skat. 1. un 2. attēlu) [4]

Fāgi vidē ir visuresoši, tie ir atrodami augsnē, ūdenī, cilvēka organismā. Ir pierādīts, ka biosfērā ir ap 10^{31} fāgu daļiņu. Turklāt vīrusu ekologi ir aprēķinājuši, ka globāli ik sekundi noris ap 10^{23} fāgu-baktēriju mijiedarbības, kas liecina ne tikai par fāgu populācijas lielo apmēru, bet arī par procesa dinamisko aktivitāti. [5] Savukārt, cilvēka organismā ir vairāk nekā 10^{16} fāgu daļiņu, kas skaita ziņā pārspēj gan cilvēka mikrobiotā esošo baktēriju, gan cilvēka organisma šūnu skaitu. [6] Lielākā daļa no cilvēka organismā esošajiem fāgiem atrodami baktēriju kolonizācijas vietās, t.i., kuņģa-zarnu traktā, ādā, urogenitālajā traktā un augšējos

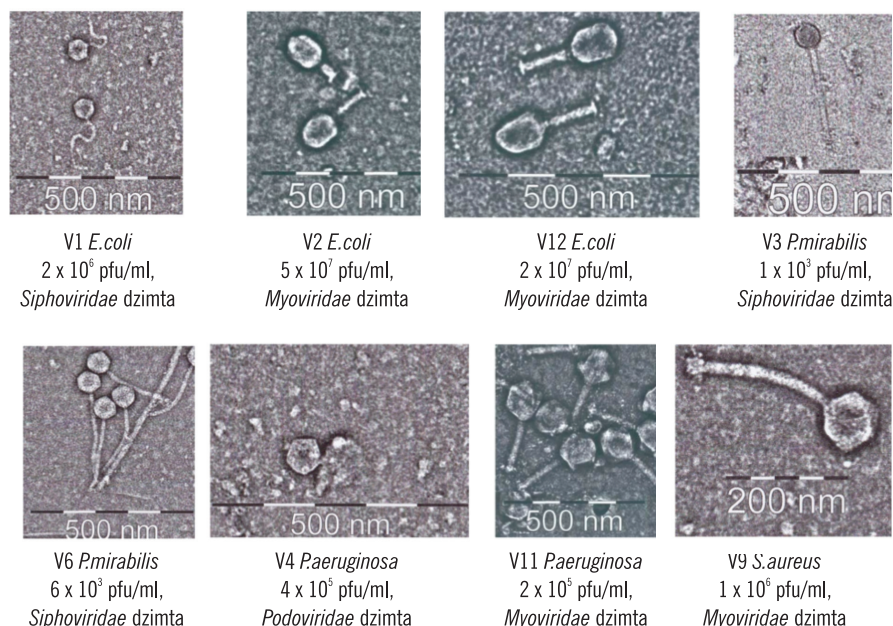
Shematiska bakteriofāga struktūra (adaptēts no Doss et al., 2017. <https://doi.org/10.3390/v9030050>)

1. attēls



2. attēls

K. Rāceņa promocijas darbā izmantotā *Pyobacteriophage* preparātā konstatēto astoņu bakteriofāgu caurstarojošās elektronmikroskopijas attēli



elpceļos. [7] Šis fakts liecina, ka fāgiem ir būtiska loma arī mikrobiotas homeostāzes un tādejādi arī cilvēka homeostāzes nodrošināšanā.

Lai replicētos, fāgi ir atkarīgi no tiem specifiskām baktērijām saimniekorganismā. Līdzko bakteriofāgs inficē atbilstošo baktēriju, tiek īstenota viena no divām iespējamām replikācijas stratēģijām jeb dzīves cikliem – lītiskais vai lizogēnais. Lītiskie jeb virulentie fāgi inficē baktēriju, ienesot tās citoplazmā savu genomu. Baktērijas resursi tiek novirzīti jaunu fāgu izveidē. Lītiskā dzīves cikla rezultātā fāga inficētā baktērija lizējas jeb iet bojā, atbrīvojot jaunus bakteriofāgus, kuri spēj inficēt jau citas baktērijas. (skat. 3. attēlu) Tad, kad inficētās baktērijas ir iznīcinātas un jaunu šūnu, kurās vairoties un turpināt savu dzīves ciklu, vairs nav, fāgi iet bojā. Savukārt, lizogēnie jeb mērenie fāgi, inficējot baktērijas, savu genomu integrē baktērijas šūnas hromosomā vai saglabā kā episomālu elementu. Integrētais fāga genoms tiek saukts par profāgu; baktērija, kura to satur – par lizogēnu. Rezultātā šis genoms tiek replicēts un nodots baktēriju meitšūnām, neradot baktēriju līzi. [8] Lizogēnie fāgi tādejādi ienes baktērijās informāciju par dažādu virulences faktoru veidošanu, kas ir izšķiroši daudzu infekcijas slimību attīstībā. Piemēram, ja lizogēnais fāgs inficē *Corynebacterium diphtheriae*, tas nodod informāciju par difterijas eksotoksīna izveidi un šī baktērija kļūst virulenta un ierosina difteriju.

Fāgu terapijā, kur fāgi tiek izmantoti profilaktiskos un terapeitiskos nolūkos, interese ir tieši par lītiskajiem fāgiem, jo tieši to darbības rezultātā baktērijas tiek iznīcinātas.

Fāgu terapijas vēsture

Fāgu pētniecībai ir vairāk nekā 100 gadu sena vēsture. Pirmie pētījumi tika veikti Pastēra institūtā Parīzē, un 1896. gadā tika publicēti pirmie rezultāti par agentu klātbūtni ūdenī, kuriem piemīt antibakteriāla aktivitāte. Laboratorijas apstākļos šie aģenti spēja samazināt *Vibrio cholerae* daudzumu. Fāgus atklāja, aprakstīja un deva nosaukumu vienlaicīgi divi zinātnieki – Viljams

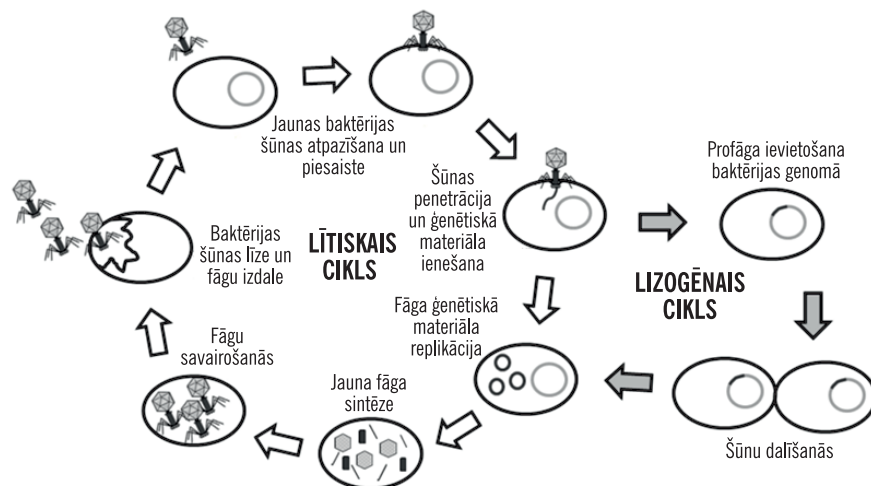
Tvorts 1915. gadā un Felikss d'Erells 1917. gadā – bakteriofāgi tika izolēti no dizentērijas pacienta fecēm. [9, 10] Felikss d'Erells fāgus sāka izmantot terapeitiski dažādās valstīs (Indijā, Ķīnā, Vjetnamā u.c.), lai pārbaudītu to efektivitāti izsituma tīfa, holēras un citu slimību ārstēšanā, kā arī lai apkarotu patogēno baktēriju izplatīšanos vidē. Medicīnā fāgus lieto jau kopš 1919. gada – tas ir daudzus gadus pirms tika novērots *Penicillium* sēnes antibakteriālais efekts un pirmo reizi pacienta ārstēšanā tika izmantots penicilīns. Sākotnēji fāgus izmantoja Francijā. Interesanti, ka jau 1931. gadā pirmo reizi fāgi tika lietoti intravenozi, līdz tam tos ievadīja tikai lokāli vai perorāli.

Agrīnie pētījumi par bakteriofāgu terapiju bija daudzsoļīgi, tomēr eksperimenti bieži tika izstrādāti neatbilstoši mūsdienu standartiem, piemēram, trūka placebo vai kontroles grupas. Rezultāti žurnālos netika publicēti angļu valodā, tādā veidā padarot tos nepieejamus Rietumvalstu zinātniekiem. Neskatoties uz to, fāgu terapija Amerikas Savienotajās Valstīs (ASV) bija populāra. Pirms Otrā pasaules kara vairāki ASV farmācijas uzņēmumi ražoja fāgu preparātus dažādu infekciju ārstēšanai. Fāgi tika bieži izmantoti arī Somijas un Padomju Savienības kara laikā 1940. gadā, lai ārstētu kareivju brūču infekcijas, jo penicilīns vēl nebija pieejams. Penicilīna lietošanu uzsāka amerikāņi Otrā pasaules kara laikā, kad notika industriju apvienošanās un masveida penicilīna ražošana (līdzīgi kā COVID-19 pandēmijas laikā ar vakcīnu ražošanu). Plaša penicilīna lietošana sākās tikai aptuveni 1942.–1944. gadā.

Pakāpeniski fāgu terapija Rietumos zau-

3. attēls

Bakteriofāgu iespējamie dzīves cikli (adaptēts no Doss et al., 2017. <https://doi.org/10.3390/v9030050>)



dēja popularitāti vairāku iemeslu dēļ. Pirmkārt, zinātnieki bija skeptiski par fāgu terapijas efektivitāti. Iespējams, sava loma bija arī nepareizai fāgu uzglabāšanai un preparāta attīrīšanai. Agrīnie komerciālie preparāti ietvēra "konservantus", piemēram, fenolu, kas fāgus denaturē un inaktivē. Zinātnieki nesaprata arī to, ka fāgi ir baktēriju specifiski. Fāgu preparātus izmantoja, lai ārstētu bakteriālas infekcijas, kas nebija atbilstošas preparātu darbības spektram. [3]

Pēc Otrā pasaules kara fāgu terapijas pētījumi un izmantošana turpinājās Austrumeiropas valstīs, kur šīs terapijas lietošana notiek arī mūsdienās. Fāgu terapija joprojām tiek aktīvi lietota Gruzijā un Polijā, bet juridiski Eiropas Savienībā tā ir apstiprināta tikai Beļģijā. Aukstais karš mudināja zinātniekus Rietumeiropā un ASV izvairīties no fāgu terapijas, ņemot vērā tās ciešo saistību ar Padomju Savienību. Penicilīna atklāšana faktiski pielika punktu fāgu terapijas izmantošanai. Antibiotiku parādīšanās radīja revolūciju bakteriālo infekciju ārstēšanā un kļuva par zelta standartu lielākajā pasaules daļā. Interesanti, ka terapeitiski fāgi tika lietoti arī Latvijā un mācību materiālos latviešu valodā ir pieejama informācija par to lietošanu bakteriālu infekciju ārstēšanā. Pat Nacionālā veselības dienesta (NVD) cenrādī ir saglabājusies fāgu tipēšana kā laboratorijas pakalpojums.

2015. gadā ASV tika aprakstīts veiksmīgs fāgu terapijas klīniskais gadījums. Dr. Toms Patersons atvaļinājuma laikā Ēģiptē saslima ar bakteriālu infekciju, ko ierosināja multirezistenta *Acinetobacter baumannii*. Antibakteriālā terapija šīs infekcijas ārstēšanā bija neveiksmīga, jo ierosinātajam konstatēja ļoti plašu antibakteriālo rezistenci. Tika pieņemts lēmums izmantot fāgu terapiju, kuras lietošanu konkrētajam pacientam apstiprināja ASV Pārtikas un zāļu pārvalde. Pēc intravenozas fāgu kokteiļa ievades dr. Patersona stāvoklis sāka uzlaboties. Viņš pilnībā atveseļojās un pēc deviņu mēnešu ilgas ārstēšanās slimnīcā devās mājās. Šis gadījums ASV ieguva plašu publicitāti un atkārtoti aktualizēja fāgu terapiju, kā iespēju bakteriālu infekciju ārstēšanā, īpaši multirezistentu infekciju apkarošanā. Pēdējo gadu laikā ASV un Rietumeiropas valstīs ir publicēti arvien jauni klīniskie gadījumi, kuros tiek parādīta fāgu terapijas efektivitāte dažādu multirezistentu infekciju ārstēšanā, piemēram, plaušu infekciju ārstēšana pacientiem ar cistisko fibrozi, aknu abscesa ārstēšana bērnam pēc aknas transplantācijas u.c. [3]

Tomēr jāpiemin, ka fāgu terapijā Eiropa apstiež ASV. Tas skaidrojams ar to, ka Eiropā ir vairāki spēcīgi fāgu pētniecības centri. Kā nozīmīgus centrus Eiropā var minēt Ludviga Hiršfelda Eksperimentālās imunoloģijas un terapijas institūtu (*Ludwig Hirschfeld Institute of Experimental Immunology and Therapy*) Polijā, Georga Eliavas Bakteriofāgu, mikrobioloģijas un viroloģijas institūtu (*George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology*) Gruzijā un Karalienes Astrīdas Militārās medicīnas slimnīcu (*Queen Astrid Military Hospital*) Beļģijā. Iepriekš minēto pētniecības centru vadošie pētnieki ir piedalījušies Rīgas Stradiņa universitātes (RSU) fāgu pētniecības grupas dalībnieku apmācībā, kā arī joprojām notiek aktīva un produktīva savstarpēja sadarbība.

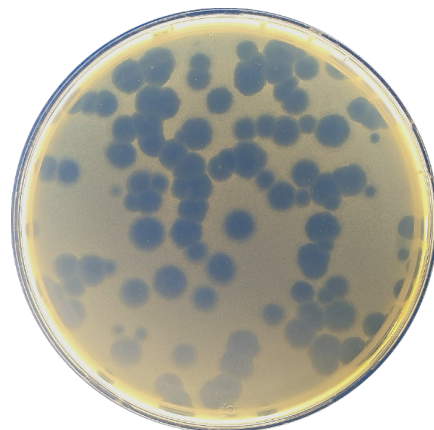
Fāgu pētniecība laboratorijā klīniskai lietošanai

Pētot vīrusus, bieži vien jācenšas ieraudzīt neieraugāmo, jo tikai retu reizi fāgus aplūkojam elektronmikroskopā; citādi tos tiešā veidā ieraudzīt nav iespējams. Ikdienā par fāgu klātbūtni liecina plaki jeb vizuāli caurspīdīgas zonas, kur baktērijas ir aizgājušas bojā fāgu lītiskās iedarbības rezultātā. Plaki tiek iegūti ar plaku metodi, izvērtējot bakteriofāgu lītisko efektu un nosakot to titru. (skat. 4. attēlu) Fāgu titrs jeb daudzums tiek izteikts plaku formējošo vienību skaitā uz mililitru (PFU/mL). Izmantojot šo metodi, baktēriju kultūras suspensija tiek sajaukta kopā ar fāgiem un pusšķidru triptikāzes sojas agaru (TSA), pēc tam iegūto maisījumu izlejot uz cietas TSA plates. Pēc inkubācijas saskaita plakus baktēriju "zālienā" un, izmantojot matemātisku formulu, aprēķina fāgu titru sākotnējā preparātā. Terapijā visbiežāk izmanto fāgus ar titru 10^7 – 10^9 PFU/mL. Fāgu adaptācija jeb bakteriofāgu apmācīšana un sagatavošana ir process, kurš ļauj palielināt fāgu lītisko aktivitāti un pārvarēt fāgu rezistenci, ja tāda ir attīstījusies. Adaptācijas rezultātā bakteriofāgi kļūst virulentāki pret baktēriju, kuru vēlamies iznīcināt ar konkrēto fāgu. [11]

Lai nodrošinātu fāgu terapijas produktu atbilstību kvalitātes un drošības prasībām, izvērtējot fāgu kā potenciālu līdzekli infekcijas ārstēšanā, tiek veikta pilna fāga genoma sekvenčēšana un dzīves cikla izvērtēšana, lai pārliecinātos, ka tas ir lītisks un nesatur dažādus virulences gēnus. Tāpat pirms preparāta izmantošanas tiek veikta tā attīrīša-

4. attēls

Plaku metode fāgu titra noteikšanai (RSU Fāgu pētniecības grupas attēls)



na, tiek noteikts endotoksīna un citu toksisko vielu līmenis tajā, lai nodrošinātu preparāta nekaitīgumu. [12]

Svarīgi, ka fāgu pētniecību nevar veikt tur, kur tiek veikta baktēriju vai vīrusu identifikācija, jo pastāv kontaminācijas risks, kas var rezultēties kļūdainā baktēriju un vīrusu identifikācijā. Tāpat, pielāgojot fāgu preparātus terapeitiskiem nolūkiem, bieži veic fāgu adaptāciju, kas paredz strādāšanu ar ģenētiski mainīgiem vīrusiem. Nākotnē potenciāls ir arī ģenētiski modificētu fāgu lietošanā, kam nepieciešami specifiski laboratorijas apstākļi. Svarīgi atzīmēt, ka fāgu pētniecība atšķiras no klīniskās mikrobioloģijas, tādēļ ir būtiski veidot fāgu pētniecības grupas, kurās iesaistās fāgu terapijā apmācīti dažādu profilu speciālisti. Šādas pētniecības grupas parasti veido internisti, infektologi, klīniskie mikrobiologi, klīniskie farmaceiti, molekulārie biologi, bioinformātiķi un citi speciālisti. Fāgu terapijas neatņemama sastāvdaļa ir regulāra fāgu biobankas uzturēšana un papildināšana, kas prasa ikdienas darbu arī tad, kad nav pieprasījums klīniskai fāgu lietošanai.

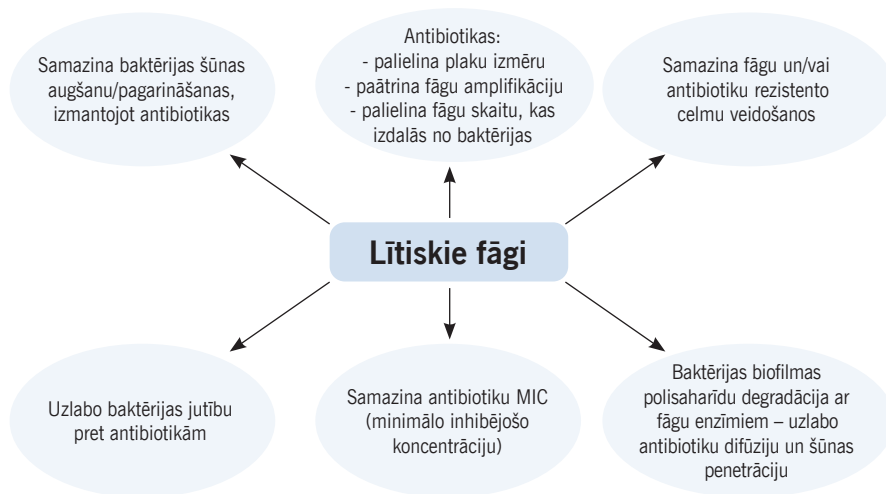
Fāgu terapijas principi

Fāgu terapijā nereti tiek lietoti fāgu kokteiļi, proti, vairāki fāgi vienā preparātā. Tādā veidā tiek panākts plašāks fāgu preparāta darbības spektrs. Līdzīgi kā baktērijas var attīstīt rezistenci pret antibiotikām, tās var kļūt rezistentas arī pret fāgiem. Fāgu kokteiļa lietošana terapijā ir viens no veidiem, kā var pārvarēt fāgu rezistenci.

Literatūrā atrodami dati, ka, lietojot fāgu kokteili kombinācijā ar antibiotikām, tiek panākts sinerģisks efekts, uzlabojot terapijas

5. attēls

Fāgu un antibiotiku sinerģijas iespējamie mehānismi (adaptēts no Szelachowska et al., 2022. <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00806-1>)



efektivitāti. (skat. 5. attēlu) [13]

Rietumvalstīs tas ir galvenais fāgu pielietošanas princips. RSU fāgu pētniecības grupa pētīja *Pseudomonas aeruginosa* fāgus divu infekciju gadījumos: vienā – novērojām aditīvu, otrā – sinerģisku efektu starp konkrētajiem fāgiem un ceftazidīmu-avibaktāmu. [14, 15] Savstarpējais efekts ir atkarīgs no fāga mijiedarbības ar baktēriju, kā arī no antibiotiku darbības mehānisma. To mijiedarbība var būt arī pretēja, proti, antagoniska. Ja terapijā pirmās lieto antibiotikas, tad tās var bloķēt kādu baktēriju struktūru (piemēram, ribosomas), kas nepieciešama fāga replikācijai, rezultējoties ar to, ka fāgs nestrādā un rodas antagonisks efekts. [16] Interesanti, ka pastāv arī fāgu un antibiotiku rezistences izmaiņas, respektīvi, ja baktērija ir rezistenta pret noteiktām antibiotikām un terapijai tiek pievienots fāgs, dažkārt novēro to, ka baktērija kļūst jutīga pret šīm antibiotikām. Tas skaidrojams ar to, ka šīs mijiedarbības rezultātā baktērijas var zaudēt savus virulences faktorus, piemēram, antibiotiku rezistences mehānismu, tādējādi baktērija kļūst uzņēmīga pret antibiotikām. [17]

Fāgu lietošanai jābūt precīzi izvērtētai veiksmīga rezultāta sasniegšanā. Tā kā tie ir dzīvi organismi, tiem nepieciešams nodrošināt atbilstošus apstākļus, piemēram, piemērotu vides pH līmeni. Pirms infekcijas ārstēšanas ir svarīgi noskaidrot, vai vide ir jāmaina, izmantojot nātrija bikarbonātu, lai to padarītu sārmaināku. Bakteriofāgus var ievadīt arī sistēmiski jeb intravenozi, bet ir jāņem vērā, ka tos, tāpat kā citus svešos antigēnus, cilvēka imunitāte spēj ļoti efektīvi un ātri neitralizēt. Mūsu pētījumu dati liecina, ka, dodot fāgus sistēmiski, to koncentrācija perifēro asiņu paraugos samazinās ļoti

strauji no 10^7 līdz 10^2 PFU/mL, kas var rezultēties ar nepietiekamu koncentrāciju infekcijas ārstēšanā. Kopumā fāgus pacientam var ievadīt vairākos veidos – iekšķīgi, intravenozi, intranazāli, inhalāciju veidā, subkutāni, kā arī lokāli brūču skalošanai. [18, 19, 20] Ņemot vērā salīdzinoši komplikētos faktorus fāgu terapijā, tā vairumā gadījumu ir personalizēta pieeja pacientu ārstēšanā.

Fāgi un biofilmas

Biofilma ir baktēriju radīts ekstracelulārs matrikss, kas kalpo kā baktēriju aizsargmehānisms ne tikai pret cilvēka imūno atbildi, bet arī pret antibakteriālajiem līdzekļiem, īpaši pret tādiem, kuriem ir vājas biofilmas penetrācijas spējas. Būtiski, ka līdz pat 65% bakteriālas infekcijas ir saistītas ar biofilmu veidošanos. [21] Bakteriofāgiem ir enzīmi (īpaša nozīme ir depolimerāzēm), kas spēj sagraut biofilmas ekstracelulāro matriksu, tādējādi ļaujot fāgam sasniegt baktēriju, inficēt to un lizēt. Būtiski tiek samazinātas planktonisko jeb brīvi peldošo baktēriju

skaits un baktēriju veidotās biomasas daudzums biofilmā. (skat. 6. attēlu) [22] Biofilmu modeļu pētījumi ir pierādījuši, ka fāgu kombinācija ar antibiotikām (fāgu-antibiotiku sinerģija) ir efektīva ārstēšanas stratēģija. [23] Citi pētījumi liecina, ka bakteriofāgi ir spējīgi veiksmīgi iznīcināt baktēriju biofilmas tādos gadījumos, kad antibiotikas to nespēj. [24]

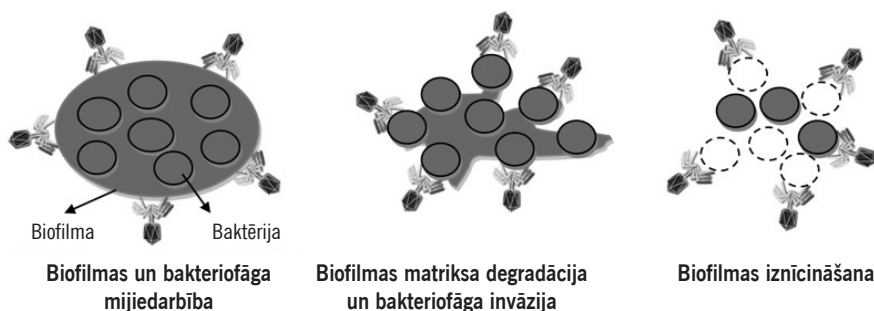
Mūsu pētījumu rezultāti parāda, ka bakteriofāgiem ir izteikta antibiofilmu iedarbība. [24] Piemērā par uropatogēno *Escherichia coli* 7.A attēlā redzams, ka bakteriofāgs veiksmīgi iznīcina planktoniskās baktēriju šūnas (to atspoguļo kā MIC – minimālā inhibējošā koncentrācija) un baktērijas veidoto biofilmu (to atspoguļo kā MBEC – minimālā biofilmas eradikācijas koncentrācija). Savukārt 7.B attēlā redzams, ka bakteriofāgu preparāts pret *Escherichia coli* izolātu 01206UR ir neefektīvs, norādot uz baktērijas rezistenci pret bakteriofāgu preparātu. Šajā gadījumā tika veikta bakteriofāga preparāta adaptācija, lai tas spētu iznīcināt izolātu 01206UR. 7.C attēlā redzams, ka jau adaptētie jeb apmācītie fāgi veiksmīgi iznīcina ne tikai iepriekš pret bakteriofāgu rezistentu *Escherichia coli* izolātu 01206UR, bet arī tās veidoto biofilmu. Šāda veida pieeja, veicot bakteriofāgu adaptāciju, ir būtiska terapijas priekšrocība, jo tā ir iespējams pārvarēt baktēriju rezistenci pret fāgiem, kas nav iespējams ar antibiotikām.

Fāgu terapija Latvijā

RSU Bioloģijas un mikrobioloģijas katedrā darbojas fāgu pētniecības grupa, kuru veido dažādu jomu speciālisti, kuri ikdienā veic pētījumus ar bakteriofāgiem un cenšas izvērtēt to potenciālu rezistentu bakteriālu infekciju profilaksē un ārstēšanā. Pateicoties šai iniciatīvai, arī Latvijā multirezistentu infekciju ārstēšanā tiek izmantota bakteriofā-

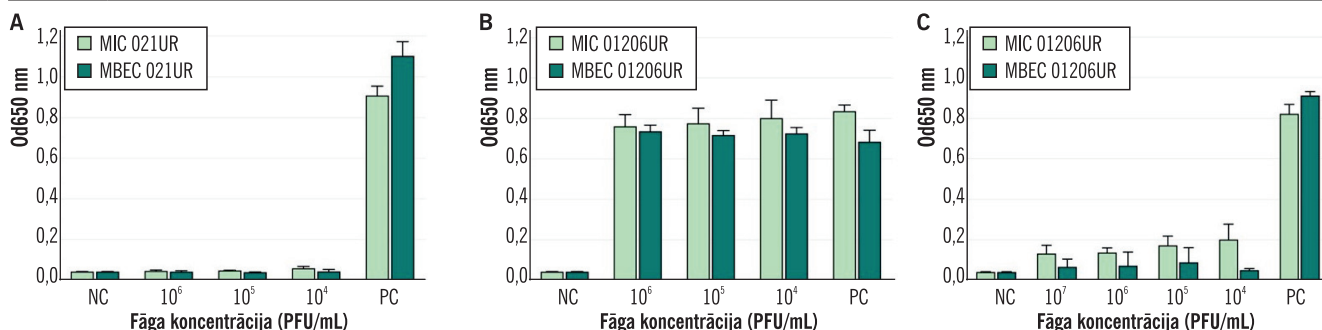
6. attēls

Fāgu efekts baktēriju biofilmu iznīcināšanā (adaptēts no Jalili et al., 2021. DOI: 10.2174/1875318302111010126)



Escherichia coli un fāgu mijiedarbība planktoniskās šūnās un to veidotajās biofilmās. Attēlā redzama baktēriju augšanas inhibīcija, izmantojot dažādas bakteriofāgu koncentrācijas. Bakteriofāgu lītiskais efekts pret 021UR (MBEC) (A), pret 01206UR, neveicot bakteriofāga adaptāciju/apmācību (B), un 01206UR, veicot bakteriofāga adaptāciju/apmācību (C). OD – optiskais blīvums (mērīts pie viļņa garuma 650 nm), NC – negatīvā kontrole (tikai triptikāzes sojas buljons), PC – pozitīvā kontrole (tikai baktēriju suspensija triptikāzes sojas buljonā), MIC – minimālā inhibējošā koncentrācija, MBEC – minimālā biofilmas eradikācijas koncentrācija. (adaptēts no: Mukane et al., 2022. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121706>)

7. attēls



gu terapija. Fāgu pētniecības grupas vadītāja ir prof. Jūta Kroiča. Darba grupā darbojas internists, nefrologs dr. Kārlis Rāčenis, kurš vada un koordinē grupas ikdienas darbu, rezidente klīniskajā mikrobioloģijā dr. Dace Rezevska, klīniskā farmaceite Laima Sevastjanova, kā arī RSU Medicīnas fakultātes 5. gada students Sandis Mauriņš. (skat. 8. attēlu)

Fāgu pētniecības grupas zinātniskās darbības fokuss ir vērsts uz tādām multirezistentām baktērijām kā *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, meticilīnrezistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), taču tiek pētītas arī citas multirezistentas baktērijas, kā piemēram, šobrīd īpaša uzmanība tiek pievērsta *Klebsiella pneumoniae*. Fāgu pētniecības grupas zinātniskās darbības virzieni ir lītisko fāgu aktivitāte planktoniskās un biofilma veidojošās baktērijās, fāgu rezistences attīstība, fāgu impregnēšana biomateriālos, kā arī antibiotiku un fāgu mijiedarbības efektivitātes izvērtēšana.

Pacientu ārstēšanā būtiska ir sadarbība ar speciālistiem lielākajās Latvijas slimnīcās un iepriekš uzsāktā sadarbība ar ekspertiem Karalienes Astrīdas Militārajā slimnīcā Beļģijā. Beļģu kolēģu laboratorijā fāgi tiek ražoti pēc atbilstošiem kvalitātes un drošības kritērijiem, lai tos varētu izmantot fāgu terapijā, veicot ievadi pat intratekāli (cerebrospinalajā šķidrumā). Latvijā bakteriofāgi tiek lietoti kā eksperimentālās medicīnas preparāti, balstoties uz Pasaules Ārstu asociācijas Helsinku deklarācijas 37. paragrāfu, kas nosaka: "Ārstējot atsevišķu pacientu gadījumā, kad nav pierādītu metožu vai tās bijušas neefektīvas, pēc ekspertu sniegtas konsultācijas ārsts ar pacienta vai viņa likumīgā pārstāvja informētu piekrišanu var izmantot nepārbaudītu metodi, ja uzskata, ka

tā dod cerību glābt dzīvību, atjaunot veselību vai atvieglot ciešanas. Pēc tam jāveic šīs metodes izpēte, lai izvērtētu tās drošumu un efektivitāti. Jebkurā gadījumā jaunā informācija ir jādokumentē un vajadzības gadījumā jādara publiski pieejama." [25]

Fāgu terapijas mūsdienu pielietojums – kādi ir fāgu terapijas klīniskie gadījumi Latvijā?

RSU fāgu pētnieki sadarbībā ar Latvijas ārstiem ir ārstējuši vairākus pacientus, bet tikai daļa no šiem gadījumiem ir publicēti. Šī brīža rezultāti atspoguļo fāgu terapijas drošumu un efektivitāti gadījumos, kad ir precīzi veikta slimības diagnostika, terapija ir mērķēta un atbilstoša.

Vienā no gadījumiem Latvijā, fāgu terapija tiek lietota 54 gadus vecam vīrietim ar dilatācijas kardiomiopātiju un smagu hronisku sirds mazspēju, kuram 2016. gadā tika implantēta kreisā kambara mehāniskās palīg-cirkulācijas ierīce (*left ventricular assist device*, LVAD). 2020. gadā Paula Stradiņa Klīniskajā universitātes slimnīcā (PSKUS) šim pacientam tika novēroti strutaini izdalījumi no LVAD izejas vietas, lokāls iekaisums, febrila temperatūra un paaugstināts C-reaktīvais proteīns (44mg/l). Tika konstatēta multirezistentā *Pseudomonas aeruginosa* infekcija. Mēģinājumi to ārstēt ar antibiotikām bija nesekmīgi. Tika lemts par bakteriofāgu izmantošanu, kombinējot ar sistēmisku antibiotiku un ķirurģisku terapiju (LVAD repozīciju). Tika pielietoti divi lītiskie fāgi gan lokāli, gan intravenozi. Šī kombinācija bija efektīva un pacienta multirezistentā infekcija tika izārstēta. (skat. 9. un 10. attēlu) Laboratorijas modeļi parādīja, ka fāgi vieni paši nespēja iznīcināt *P. aeruginosa* veidoto biofilmu, bet spēja novērst tās veidošanos. [14] Būtiski, ka *in vitro* modeļi

parādīja izteiktu sinerģiju starp fāgiem un ceftazidīmu-avibaktāmu. Te svarīga bija ne tikai konkrētā kombinācija, bet arī abu līdzekļu lietošanas secība – vispirms fāgi, pēc tam klāt pievienojot antibiotikas. Šis ir viens no retajiem klīniskajiem gadījumiem, kur fāgi lietoti LVAD infekcijas ārstēšanā, kā arī otrs veiksmīgais gadījums pasaulē, kurš publicēts par multirezistentas *Pseudomonas aeruginosa* LVAD infekcijas ārstēšanu ar fāgiem.

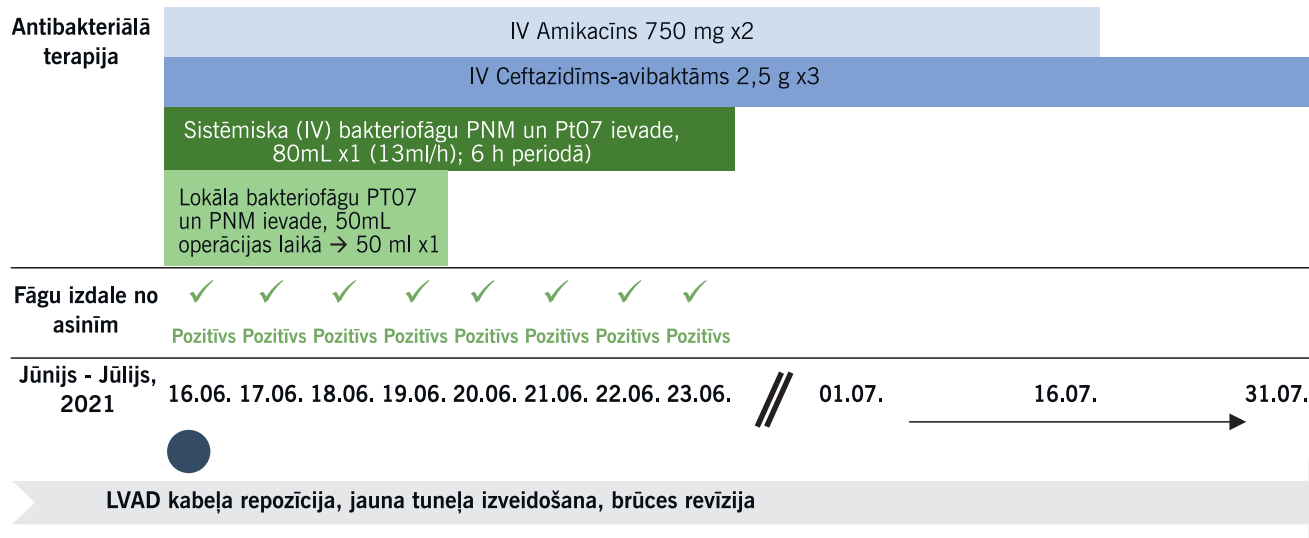
Cits veiksmīgs gadījums Latvijā, kur terapijā izmantoti bakteriofāgi, ir par 21 gadu vecu vīrieti, kurš tika hospitalizēts pēc ceļa satiksmes negadījuma ar vaļēju multiframektāru proksimālu labā ciskas kaula un acetabulāriem lūzumiem, lacerācijām no labā apakšdelma un hemorāģisku šoku. (skat. 11. attēlu) Neskatoties uz plašo antimikrobiālo ārstēšanu un vairākām ķirurģiskām

Fāgu pētniecības grupas dalībnieki RSU Zinātnes nedēļas 2023 laikā: Sandis Mauriņš (no kreisās), Laima Sevastjanova, prof. Jūta Kroiča, Dace Rezevska un Kārlis Rāčenis (foto no personīgā arhīva)

8. attēls



9. attēls Laika grafiks, kurā parādīts antibiotiku un fāgu ārstēšanas režīms, ķirurģiska ārstēšana un fāgu koncentrācija, kas konstatēta pacienta perifērajās asinīs. Perifērie asins paraugi fāgu koncentrācijas noteikšanai tika ņemti 2 stundas pēc katras intravenozas fāga ievades (adaptēts no Racenis et al., 2023. DOI: 10.3390/v15051210)



operācijām ar brūču attīrīšanu, pacientam attīstījās ciskas kaula osteomielīts ar fistulu – pievienojās sekundāra multirezistenta *Pseudomonas aeruginosa* un vankomicīna rezistenta *Enterococcus faecium* brūces infekcija. Pacienta ārstēšana ietvēra ciskas kaula galviņas ekscīziju, nekrektomijas, intravenozu ceftazidīma-avibaktāma un lokālu lītiskā *Pseudomonas aeruginosa* bakteriofāgu kokteiļa lietošanu. Deviņus mēnešus pēc ārstēšanas netika novērotas pazīmes, kas klīniski, laboratoriski vai radioloģiski liecinātu par infekcijas klātesamību. Tika veikta gūžas locītavas endoprotezēšana. Pateicoties bakteriofāgu terapijai, pacients izvairījās no dzīves kvalitātes mazinošas un kropļojošas operācijas – inficētās kājas amputācijas un gūžas eksartikulācijas. [15]

rā ģeogrāfiskā atšķirība, t.i., tie bakteriofāgi, kas uzrāda lītisku aktivitāti Latvijā, iespējams, to neuzrādīs citā reģionā. Turklāt šo vīrusu ražošana un uzglabāšana terapeitiskiem nolūkiem ir sarežģīts process, kas balstās uz bakteriofāgu biobankas izveidošanu, kur tie ir detalizēti aprakstīti, izpētīti un ar zināmu ģenētisko materiālu. Šādu pieeju un biobankas izveidi veic arī mūsu fāgu pētniecības grupa. Tikai tad, kad ir pieejama visa informācija par bakteriofāgu, tas tiek uzskatīts par potenciālu aģentu, ko var lietot terapijā.

Fāgu izmantošanas iespējas neinfekciozu slimību ārstēšanā

Fāgi arvien vairāk tiek pētīti arī kā imūnmodulatori, kas veicina imūnsistēmas ho-

meostāzi un mazina iekaisumu. [26] Joprojām norisinās pētījumi un eksperimenti par fāgu izmantošanu ne tikai bakteriālu infekciju ārstēšanā. Piemēram, fāgu izmantošana autoimūnu slimību ārstēšanā ir jauna pētniecības joma. Šeit fāgus nevar pielietot tieši, kā tas ir bakteriālo infekciju terapijā, tomēr pastāv daži netieši veidi, kā tie var ietekmēt autoimūno slimību norisi. Piemēram, 2022. gadā veiktais pētījums ir pierādījis, ka fāgi mazina zarnu gļotādas iekaisumu iekaisīgo zarnu slimību, t.i., Krona slimības, čūlainā kolīta, gadījumā dzīvnieku modeļos. [27]

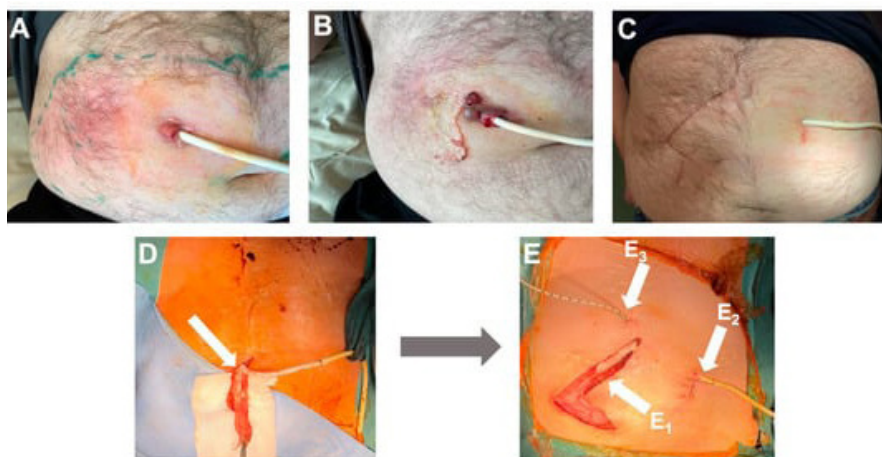
Polijā tika veikts pētījums par fāgu terapeitisko potenciālu autoimūnu aknu slimību (autoimūna hepatīta, primāras biliāras cirozes, primāra sklerozējoša holangīta) ārstēšanā. Dati parāda fāgu pozitīvo imūnterapijas

Fāgu terapijas izaicinājumi

Lai uzsāktu efektīvu fāgu terapiju, nepieciešams precīzi izvērtēt tās indikācijas. Fāgu terapijas preparātu sagatavošanas procesā ir vairāki būtiski un izaicinoši aspekti, kas padziļināti jāizvērtē, kā piemēram, fāgu lītiskā aktivitāte pret konkrēto baktērijas izolātu, fāgu adaptācijas un pavairošanas iespējas, fāgu atbilstība kvalitātes un drošības kritērijiem, nepieciešamie fāgu uzglabāšanas apstākļi, fāgu mijiedarbība ar antibiotikām, fāgu rezistences attīstības risks u.c.

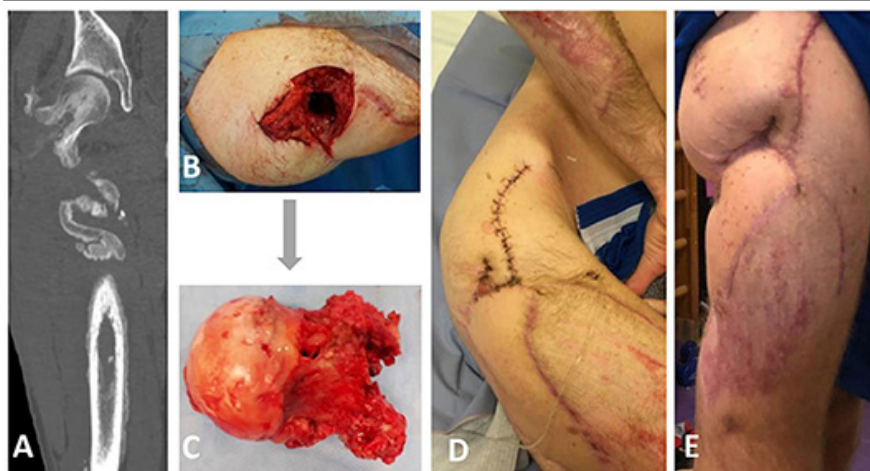
Bakteriofāgi ir ļoti specifiski. Tas nozīmē, ka katrai baktērijai ir jāpiemeklē konkrēts fāgs, kas šo procesu padara laikietilpīgu. Taču ne vienmēr atbilstošais un piemēklētais fāgs varēs iznīcināt baktēriju. Jāņem vē-

10. attēls Pacienta brūce pirms operācijas (A, B), tās laikā (D, E) un pēc tās (C) (adaptēts no: Racenis et al., 2023. DOI: 10.3390/v15051210)



11. attēls

Pacienta brūces klīniskais un radioloģiskais izskats pirms fāgu terapijas (A), tās laikā (B, C) un pēc tās (D, E) (adaptēts no Racenis et al., 2022. DOI: 10.3389/fmed.2022.851310)



efektu. Tie samazina ar aknu bojājumu saistīto faktoru ekspresiju un/vai produkciju un aktivitāti faktoriem, kas saistīti ar aknu bojājumu (samazinās brīvie skābekļa radikāļi, *Toll-like* receptoru-4 aktivācija, nukleārā faktora kappa B aktivācija u.c.), kā arī regulē to faktoru ekspresiju, kam piemīt aizsargājoša loma (palielinās IL-10, IL-1 receptoru antagonisms). [26]

Fāgu terapijas nākotne

Fāgu terapijai priekšā vēl daudz izaicinājumu. Pirmkārt, klīnisko pētījumu trūkums, lai iegūtu padziļinātāku un daudzpusīgāku izpratni tās klīniskā lietošanā. Katrs veik-

smīgais klīniskais gadījums pietuvina fāgu terapiju tam, lai tā kļūtu plašāk zināma un pieejamā. Otrkārt, katram pacientam piemēlēt atbilstošo fāgu var būt laikietilpīgi, īpaši, ja nav iepriekš izveidota fāgu biobanka vai bakteriālais ierosinātājs ir reti sastopams. Jāņem vērā arī fāga aktivitāte konkrētajā vidē, piemēram, vai fāgu izmantojot urīnceļu infekcijas ārstēšanā, tas nezaudēs savu lītisko aktivitāti urīnā.

Pretēji antibiotikām, kuru koncentrācija pacienta ķermenī pakāpeniski mazinās, fāgi vairojas. Joprojām norit pētījumi, kā šis pašreplīcēšanās aspekts ietekmē terapijas efektivitāti un iespējamās blakusēfektus. [28] Svarīga ir arī baktērijas rezistences attīstība

pret fāgu, kas potenciāli var ierobežot fāga aktivitāti, kā arī farmakokinētika, kas limitē fāga penetrācijas spējas un var rezultēties ar tā izvadīšanu no cilvēka organisma. [28] Saņemot fāgu preparātu kokteili, baktērijām ir mazāka iespēja attīstīt rezistenci, taču tas nav neiespējami. Tātad ir nepieciešama regulāra uzraudzība, lai pārliecinātos, ka dotais fāgs joprojām ir lītiski aktīvs pret konkrēto ierosinātāju. [29] Jāņem vērā arī potenciālā un teorētiskā varbūtība izveidoties nevēlamām imunoloģiskajām reakcijām, piemēram, imūno kompleksu izgulsnēšanās organismā, par ko šobrīd nav pieejamu datu.

Neskatoties uz šiem izaicinājumiem, fāgu terapijai ir liels potenciāls. Īpaši fāgu terapijas izmantošana multirezistentu infekciju ārstēšanā, fāgu un plaši lietoto antibiotiku sinerģiskais vai aditīvais efekts, fāgu enzīmu jeb endolizīnu pielietošana, veidojot jaunu antimikrobiālo līdzekļu klasi "enzibiotikas" [30], kā arī fāgu kā vektoru izmantošana fotodinamiskas terapijas pielietošanā vēža ārstēšanā. [31] Arī fāgu pētniecība Latvijā aktīvi turpinās un tiek meklēti arvien jauni risinājumi un atbildes uz šiem jautājumiem. Jau šogad RSU fāgu pētniecības grupas pētnieks Kārlis Rāčenis aizstāvēs promocijas darbu par fāgu terapijas efektivitāti multirezistentu un biofilmu asociētu infekciju ārstēšanā un tuvākajā laikā arī šīs grupas pētniece Dace Rezevska plāno pabeigt savu promocijas darbu pētījumu par fāgu antimikrobiālā efekta izpēti biomateriālu asociēto infekciju ierobežošanā.

Literatūra

- World Health Organization. Antimicrobial resistance. Iegūts no: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Fong K., Wong C.W.Y., Wang S., Delaquis P. How Broad Is Enough: The Host Range of Bacteriophages and Its Impact on the Agri-Food Sector. *Phage* (New Rochelle). 2021 Jun; 1; 2(2): 83–91. DOI: 10.1089/phage.2020.0036. Epub 2021 Jun; 16. PMID: 36148040; PMCID: PMC9041489.
- Barron, M. (2022, August 31). Phage therapy: Past, present and future. *ASM.org*. <https://asm.org/Articles/2022/August/Phage-Therapy-Past,-Present-and-Future>
- Doss J., Culbertson K., Hahn D., Camacho J., Barekzi N. A Review of Phage Therapy Against Bacterial Pathogens of Aquatic and Terrestrial Organisms. *Viruses* 2017, 9, 50. <https://doi.org/10.3390/v9030050>
- Hatfull G.F., Dedrick R.M., Schooley R.T. Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Annu Rev Med.* 2022 Jan; 27; 73: 197–211. DOI: 10.1146/annurev-med-080219-122208. Epub 2021 Aug 24. PMID: 34428079.
- Nguyen S., Baker K., Padman B.S., Patwa R., Dunstan R.A., et al. 2017. Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers. *mBio* 8(6): e01874–17.
- Popescu M., Van Belleghem J.D., Khosravi A., Bollyky P.L. Bacteriophages and the Immune System. *Annu Rev Virol.* 2021 Sep; 29; 8(1): 415–435. DOI: 10.1146/annurev-virology-091919-074551. Epub 2021 May 20. PMID: 34014761.
- Kasman L.M., Porter L.D. Bacteriophages. [Updated 2022 Sep 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493185/>
- Twort T.W. An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. *Lancet* 1915, 186, 1241–1243.
- d'Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysenteriques. *CR Acad Sci Paris* 1917, 163, 173–175.
- Racenis K., Kroica J., Rezevska D., Avotins L., Skuditis E., Popova A., Puide I., Kuzema V., Petersons A. S. aureus Colonization, Biofilm Production, and Phage Susceptibility in Peritoneal Dialysis Patients. *Antibiotics* (Basel). 2020 Sep; 7; 9(9): 582. DOI: 10.3390/antibiotics9090582. PMID: 32906685; PMCID: PMC7558627.
- Pirnay J.P., Blasdel B.G., Bretaudeau L., Buckling A., Chanishvili N., Clark J.R., Corte-Real S., Debarbieux L., Dublanquet A., De Vos D., Gabard J., Garcia M., Goderdzishvili M., Górski A., Hardcastle J., Huys I., Kutter E., Lavigne R., Merabishvili M., Olchawa E., Parikka K.J., Patey O., Poulot F., Resch G., Rohde C., Scheres J., Skurnik M., Vanechoutte M., Van Parys L., Verbeke G., Zizi M., Van den Eede G. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products. *Pharm Res.* 2015 Jul; 32(7): 2173–2179. DOI: 10.1007/s11095-014-1617-7. Epub 2015 Jan 14. PMID: 25585954; PMCID: PMC4452253.
- Abedon S.T., Danis-Wlodarczyk K.M., Wozniak D.J. Phage Cocktail Development for Bacteriophage Therapy: Toward Improving Spectrum of Activity Breadth and Depth. *Pharmaceuticals* (Basel). 2021 Oct; 3; 14(10): 1019. DOI: 10.3390/ph14101019. PMID: 34681243; PMCID: PMC8541335.
- Racenis K., Lācis J., Rezevska D., Mukane L., Vilde A., Putnins I., Djebara S., Merabishvili M., Pirnay J.P., Kalnina M., Petersons A., Stradins P., Maurins S., Kroica J. Successful Bacteriophage-Antibiotic Combination Therapy against Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Left Ventricular Assist Device Driveline Infection. *Viruses*. 2023 May; 20; 15(5): 1210. DOI: 10.3390/v15051210. PMID: 37243293; PMCID: PMC10223274.
- Racenis K., Rezevska D., Madelane M., Lavrinovics E., Djebara S., Petersons A., Kroica J. Use of Phage Cocktail BFC 1.10 in Combination With Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Femur Osteomyelitis-A Case Report. *Front Med* (Lausanne). 2022 Apr; 25; 9: 851310. DOI: 10.3389/fmed.2022.851310. PMID: 35547216; PMCID: PMC9081798.
- Gu Liu C., Green S.I., Min L., Clark J.R., Salazar K.C., Terwilliger A.L., Kaplan H.B., Trautner B.W., Ramig R.F., Maresso A.W. Phage-Antibiotic Synergy Is Driven by a Unique Combination of Antibacterial Mechanism of Action and Stoichiometry. *mBio*. 2020 Aug; 4; 11(4): e01462–20. DOI: 10.1128/mBio.01462-20. PMID: 32753497; PMCID: PMC7407087.
- Gao D., Ji H., Wang L., Li X., Hu D., Zhao J., Wang S., Tao P., Li X., Qian P. Fitness Trade-Offs in Phage Cocktail-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Results in Increased Antibiotic Susceptibility and Reduced Virulence. *Microbiol Spectr.* 2022 Oct; 26; 10(5): e0291422. DOI: 10.1128/spectrum.02914-22. Epub 2022 Sep 27. PMID: 36165776; PMCID: PMC9603643.
- Morozova V.V., Vlassov V.V., Tikunova N.V. Applications of Bacteriophages in the Treatment of Localized Infections in Humans. *Front Microbiol.* 2018 Aug; 2; 9: 1696. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01696. PMID: 30116226; PMCID: PMC6083058.
- Uyttebroek S., Onsea J., Metsemakers W.J., Dupont L., Devolder D., Wagemans J., Lavigne R., Priet I., Van

- Gerven L. The Potential Role of Bacteriophages in the Treatment of Recalcitrant Chronic Rhinosinusitis. *Antibiotics* (Basel). 2021 Jun; 5; 10(6): 675. DOI: 10.3390/antibiotics10060675. PMID: 34198741; PMCID: PMC8229554.
20. Suh G.A., Lodise T.P., Tamma P.D., Knisely J.M., Alexander J., Aslam S., Barton K.D., Bizzell E., Totten K.M.C., Campbell J.L., Chan B.K., Cunningham S.A., Goodman K.E., Greenwood-Quaintance K.E., Harris A.D., Hesse S., Maresso A., Nussenblatt V., Pride D., Rybak M.J., Sund Z., van Duin D., Van Tyne D., Patel R. Antibacterial Resistance Leadership Group. Considerations for the Use of Phage Therapy in Clinical Practice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022 Mar; 15; 66(3): e0207121. DOI: 10.1128/AAC.02071-21. Epub 2022 Jan 18. PMID: 35041506; PMCID: PMC8923208.
21. Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M.A., Hussain T., Ali M., Rafiq M., Kamil M.A. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc*. 2018 Jan; 81(1): 7–11. DOI: 10.1016/j.jcma.2017.07.012. Epub 2017 Oct 15. PMID: 29042186.
22. Knecht L.E., Veljkovic M., Fieseler L. Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases. *Front Microbiol*. 2020 Jan; 10; 10: 2949. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02949. PMID: 31998258; PMCID: PMC6966330.
23. Łusiak-Szelachowska M., Międzybrodzki R., Drulis-Kawa Z., Cater K., Knežević P., Winogrodow C., Amaro K., Jończyk-Matysiak E., Weber-Dąbrowska B., Rękas J., Górski A. Bacteriophages and antibiotic interactions in clinical practice: what we have learned so far. *J Biomed Sci*. 2022 Mar; 30; 29(1): 23. DOI: 10.1186/s12929-022-00806-1. PMID: 35354477; PMCID: PMC8969238.
24. Mukane L., Racenis K., Rezevska D., Petersons A., Kroica J. Anti-Biofilm Effect of Bacteriophages and Antibiotics against Uropathogenic Escherichia coli. *Antibiotics* 2022, 11, 1706. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121706>
25. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA*. 2013; 310(20): 2191–2194. DOI:10.1001/jama.2013.281053
26. Górski A., Jończyk-Matysiak E., Łusiak-Szelachowska M., Weber-Dąbrowska B., Międzybrodzki R., Borysowski J. Therapeutic potential of phages in autoimmune liver diseases. *Clin Exp Immunol*. 2018 Apr; 192(1): 1–6. DOI: 10.1111/cei.13092. Epub 2018 Jan 23. PMID: 29266228; PMCID: PMC5842411.
27. Federici S., Kreda-Russo S., Valdés-Mas R., Kviatkovsky D., Weinstock E., Matiuhiu Y., Silberberg Y., Atarashi K., Furuichi M., Oka A., Liu B., Fibelman M., Weiner I.N., Khabra E., Cullin N., Ben-Yishai N., Inbar D., Ben-David H., Nicenboim J., Kowalsman N., Lieb W., Kario E., Cohen T., Geffen Y.F., Zelcbuch L., Cohen A., Rappo U., Gahali-Sass I., Golebo M., Lev V., Dori-Bachash M., Shapiro H., Moresi C., Cuevas-Sierra A., Mohapatra G., Kem L., Zheng D., Nobs S.P., Suez J., Stettner N., Harmelin A., Zak N., Puttagunta S., Bassan M., Honda K., Sokol H., Bang C., Franke A., Schramm C., Maharshak N., Sartor R.B., Sorek R., Elinav E. Targeted suppression of human IBD-associated gut microbiota commensals by phage consortia for treatment of intestinal inflammation. *Cell*. 2022 Aug; 4; 185(16): 2879–2898.e24. DOI: 10.1016/j.cell.2022.07.003. Epub 2022 Aug 4. PMID: 35931020.
28. Dąbrowska K., Abedon S.T. Pharmacologically Aware Phage Therapy: Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Obstacles to Phage Antibacterial Action in Animal and Human Bodies. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2019 Oct; 30; 83(4): e00012–19. DOI: 10.1128/MMBR.00012-19. PMID: 31666296; PMCID: PMC6822990.
29. Oechslin F. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses*. 2018 Jun; 30; 10(7): 351. DOI: 10.3390/v10070351. PMID: 29966329; PMCID: PMC6070868.
30. Murray E., Draper L.A., Ross R.P., Hill C. The Advantages and Challenges of Using Endolysins in a Clinical Setting. *Viruses*. 2021 Apr; 15; 13(4): 680. DOI: 10.3390/v13040680. PMID: 33920965; PMCID: PMC8071259.
31. Ulfo L., Cantelli A., Petrosino A., Costantini P.E., Nigro M., Starinieri F., Turrini E., Zadrán S.K., Zuccheri G., Saporetto R., Di Glosia M., Danielli A., Calvaresi M. Orthogonal nanoarchitectonics of M13 phage for receptor targeted anticancer photodynamic therapy. *Nanoscale*. 2022 Jan; 20; 14(3): 632–641. DOI: 10.1039/d1nr06053h. PMID: 34792088.