

KATARZYNA ŁYSIAK

Bakteriofagi jako alternatywa dla antybiotyków – możliwości praktycznego ich zastosowania w chirurgii stomatologicznej – przegląd piśmiennictwa

Bacteriophages as an Alternative to Antibiotics – Possibilities of Their Practical Usage in Dental Surgery – Review of Literature

Katedra i Zakład Chirurgii Stomatologicznej AM we Wrocławiu

Streszczenie

Bakteriofagi są to wirusy mające zdolność niszczenia zakażonych przez siebie bakterii. Zostały odkryte w 1915 r. przez brytyjskiego mikrobiologa Felixa Tworta i niezależnie w 1917 r. przez francusko-kanadyjskiego mikrobiologa Felixa d'Herelle. Zdolność bakteriofagów do gwałtownej lizy zakażonych bakterii, mutacji w stosunku do opornych bakterii, wykładniczego wzrostu w czasie zakażenia oraz wysoka swoistość w stosunku do poszczególnych bakterii powodują, iż są potencjalnie bardzo dobrymi środkami terapeutycznymi w zwalczaniu chorób bakteryjnych. Terapia bakteriofagowa może stać się alternatywą dla antybiotyków, szczególnie podczas zakażeń wywołanych przez Gram-dodatnie ziarniniaki, takie jak *Staphylococcus aureus*. Celem pracy było przedstawienie na podstawie piśmiennictwa możliwości praktycznego zastosowania bakteriofagów w chirurgii stomatologicznej, w leczeniu wybranych jednostek chorobowych, takich jak: *sinuitis maxillaris chronica purulenta*, *ostitis chronica mandibulae or maxillae*, *fistula cutanea purulenta*, *pansinuitis chronica*, *rhinitis purulenta*, *lymphadenitis submandibularis*. W pracy opisano techniki leczenia, omówiono kluczowe problemy i ograniczenia tej terapii, przedstawiając możliwości ich przezwyciężania. Zaprezentowano nowe perspektywy terapii bakteriofagami związane z wykorzystaniem inżynierii genetycznej (Dent. Med. Probl. 2004, 41, 4, 761–768).

Słowa kluczowe: bakteriofagi, terapia fagowa, oporność na leki, zakażenia bakteryjne.

Abstract

Bacteriophages are viruses which have ability to kill the bacteria they infect. Phages were discovered in 1915 by British microbiologist Felix Twort, and, independently in 1917 by French-Canadian microbiologist Felix d'Herelle. The ability of BF to: rapid lyse infected bacteria, mutate against resistant bacteria, grow exponentially in number during the infection process and high specificity for particular bacterium, make BF excellent potential therapeutic agents for fighting bacterial disease. Phage therapy can be an alternative to antibiotics in cases when antibiotics fail, especially during infections caused by Gram-positive bacteria, such as *Staphylococcus aureus*. The aim of the study was to show, on the basis of literature, possibilities of practice use BF in dental surgery in treatment: *sinuitis maxillaris chronica purulenta*, *ostitis chronica mandibulae or maxillae*, *fistula cutanea purulenta*, *pansinuitis chronica*, *rhinitis purulenta*, *lymphadenitis submandibularis*. The study describes the technique of treatment, key problems and limitations to phage therapy and how they can be overcome. The article also brings closer future prospects of phage therapy connected with genetic engineering (Dent. Med. Probl. 2004, 41, 4, 761–768).

Key words: bacteriophages, phage therapy, drug resistance, bacterial infections.

Chirurgia stomatologiczna jest dziedziną, w której leczenie schorzeń o etiologii bakteryjnej należy do codziennej praktyki. Kluczową rolę odgrywa także profilaktyka przeciwbakteryjna,

związana z dużym ryzykiem zakażenia bakteryjnego podczas przeprowadzanych nawet prostych zabiegów. Istnieje grupa pacjentów, w przypadku których, mimo spełnienia kryteriów aseptyki i an-

tyseptyki, konieczne staje się wdrożenie osłony przeciwbakteryjnej przed zabiegiem chirurgicznym w jamie ustnej, w celu zapobieżenia bakteriemii. Istotne znaczenie ma zatem znajomość czynników etiologicznych wywołujących zakażenia okołoszczękowe i wrażliwości typowych patogenów na leki przeciwbakteryjne [1]. Coraz częściej w codziennej praktyce lekarskiej można spotkać się z sytuacjami, w których terapia z zastosowaniem leków przeciwbakteryjnych nie prowadzi do pozytywnego wyniku leczenia. Głównym powodem tych niepowodzeń jest oporność bakterii na leki, którą dzieli się na: naturalną (tzw. niewrażliwość) lub nabytą. Niewrażliwość jest związana z niedostępnością dla leku receptorów bakteryjnych, oporność nabyta natomiast jest zakodowana w bakteryjnym DNA. Geny odpowiedzialne za wytworzenie oporności mogą być zlokalizowane bądź w chromosomalnym DNA, bądź w pozachromosomalnych fragmentach DNA, tzw. plazmidach. Szczególnie niekorzystna dla powodzenia terapii jest oporność plazmidowa, gdyż wiąże się z możliwością jej przenoszenia na inne szczepy należące do różnych rodzajów bakterii. Mechanizmy oporności są m.in. związane z: modyfikacją struktury receptorów, zmniejszeniem zewnętrznych struktur bakteryjnych dla leku, syntezą enzymów degradujących lek, tolerancją na lek związaną z funkcją blokowania autolizyn [2].

Analiza licznych wyników badań mikrobiologicznych wskazuje, iż najczęściej izolowanymi drobnoustrojami wywołującymi zakażenia okołoszczękowe są gronkowce a następnie paciorkowce [1, 3]. Spośród gronkowców najczęściej izoluje się gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) [1, 3–5]. Jest to Gram-dodatni ziarniniak mający wybitną zdolność do wytwarzania oporności na antybiotyki. Mechanizm wytwarzania oporności przez gronkowce jest związany z wytwarzaniem przez nie β -laktamaz, a cecha ta ma charakter genetyczny. Wykazano, że około 90% gronkowców wytwarza penicylinazy i jest niewrażliwych na penicylinę, aminopenicylinę i urodenpenicylinę [6]. W badaniach Kozakiewicza et al. [1] tylko w 35% przypadków gronkowiec złocisty wykazywał wrażliwość na amoksycylinę z kwasem klawulanowym, a w 16% przypadków na ampicylinę [1]. W ostatnich latach opisano występowanie szczepów gronkowca złocistego o całkowitej oporności na metycylinę (MRSA – *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) [6–11]. Wykazano, że gronkowiec złocisty hodowany z materiałów klinicznych jest u około 5,8–60% osób metycylinooporny oraz zaobserwowano ciągły wzrost rozpowszechniania szczepów MRSA [6, 12]. Klinicznie oporność na metycylinę oznacza oporność na wszystkie antybiotyki β -laktamowe oraz częstą oporność na gen-

tamycynę i chinolony [6, 13]. Antybiotykami z wyboru w leczeniu zakażeń wywołanych przez *Staphylococcus aureus* MRSA są glikopeptydy, w tym wankomycyna, tzw. antybiotyk ostatniej szansy [9, 15]. Ostatnio jednakże pojawiły się kolejne doniesienia o izolacji gronkowców złocistych średnio wrażliwych na wankomycynę (VISA – *vanomycin intermediate-resistant Staphylococcus aureus*). Wykazano, że wszystkie szczepy VISA są również odporne na metycylinę (MRSA). W związku z coraz częstszym stosowaniem wankomycyny wzrasta ryzyko powstania i rozprzestrzeniania się szczepów MRSA o średniej wrażliwości na glikopeptydy. W 2002 r. odnotowano jednak pierwszy przypadek zakażeń szczepem *Staphylococcus aureus* o całkowitej oporności na wankomycynę [8]. Kozielski podaje, iż [6] miejsce glikopeptydów w zwalczaniu infekcji wywołanych Gram-dodatnimi bakteriami zajmą alternatywne antybiotyki, takie jak linezolid i chinoprystyna\dalfaprystyna [6, 14]. Pozostaje jednak pytanie, jak długo okażą się skuteczne i na jak długo problem oporności zostanie odsunięty na dalszy plan.

Według danych WHO w każdym roku w USA umiera 14 000 osób z powodu zakażeń wywołanych przez bakterie odporne na antybiotyki, a liczba ta z roku na rok się powiększa [8]. Fakt ten stanowi poważny problem medyczny, który nierozwiązany może doprowadzić do sytuacji z „ery przedantybiotykowej”, stąd poszukiwania innych, bardziej efektywnych rozwiązań w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych. W ostatnich latach obserwuje się ponowny, wyraźny wzrost zainteresowania bakteriofagami, przy czym istotną rolę odgrywają możliwości ich genetycznej modyfikacji. Zakłada się, że bakteriofagi mogą stanowić alternatywę dla kosztownych w opracowywaniu antybiotyków [16].

Bakteriofagi (BF) – fagi, wirusy bakteryjne [8, 17] – są to wirusy zakażające bakterie, mające zdolność ich niszczenia, szeroko rozpowszechnione w przyrodzie, bytujące m.in. w wodzie, glebie, ściekach, na skórze, w przewodzie pokarmowym. Odkrycie i wprowadzenie do lecznictwa bakteriofagów jest tematem kontrowersyjnym [8]. Przyjmuje się, iż zostały odkryte przez brytyjskiego mikrobiologa Felixa Tworta w 1915 r. w odniesieniu do gronkowców oraz w 1917 r. przez francusko-kanadyjskiego mikrobiologa Felixa d’Herelle’a w przesączu kału ludzi chorych na czerwonkę [7, 8, 16–20]. d’Herelle określił odkryty przez siebie czynnik rozpuszczający bakterie jako *un etre vivant* i nazwał *Bacteriophagum intestinale* [cyt. wg 4]. Twort nie kontynuował badań, d’Herelle natomiast systematycznie zgłębiał naturę BF oraz starał się je zastosować w leczeniu zakażeń bakteryjnych [7, 16, 18–20]. Istnieją jednak doniesienia, iż bakteriofagi po raz pierwszy zostały użyte w tera-

pii nie przez d'Herelle'a, a przez Bruynoghe'a i Maisina w 1921 r. w leczeniu gronkowcowych zakażeń skóry [21–23]. Terapia bakteriofagowa była często stosowana w latach trzydziestych i czterdziestych ubiegłego stulecia, a zwłaszcza w okresie II wojny światowej [24]. Jednak już w latach 1930–1934 pojawiały się doniesienia mówiące o istnieniu nieaktywnych preparatów BF, śmiertelnych przypadkach wśród pacjentów poddanych takiej terapii, braku wyraźnych wyników w leczeniu za pomocą BF z wyjątkiem zakażeń wywołanych przez gronkowce [17, 25]. W związku z kontrowersyjnymi wynikami leczenia oraz nadziejami związanymi z antybiotykoterapią osiągnięcia d'Herelle'a stosunkowo szybko poszły w niepamięć [8]. Według Carltona [7] terapia BF w ówczesnym czasie była obarczona znacznie większą liczbą błędów w stosunku do terapii antybiotykowej. Wynikało to m.in. z ówczesnych ograniczeń w technice badawczej, która uniemożliwiała poznanie pełnych możliwości bakteriofagów, a także z faktu, iż antybiotyki okazały się wówczas skuteczniejsze, bezpieczniejsze i prostsze w użyciu [cyt. wg 24]. W latach 1950–1980 ukazało się niewiele publikacji dotyczących praktycznego zastosowania BF w lecznictwie; bazują one przede wszystkim na modelach zwierzęcych. Fagi wykazały się wysoką efektywnością w leczeniu zakażeń u szczurów [26], biegunek u jagniąt i cieląt (*Escherichia coli*) [27–28], biegunki u kurcząt (*Salmonella typhimurium*) [29] oraz w zapobieganiu niszczeniu przeszczepów skóry u oparzonych królików (*Pseudomonas aeruginosa*) [30].

W okresie największego rozkwitu terapii antybiotykowej, przypadającym na lata 80. XX w. tylko nieliczne na świecie ośrodki prowadziły nieprzerwanie badania nad możliwościami terapeutycznego zastosowania bakteriofagów u ludzi. Należy tu wymienić Instytut Bakteriofagów w Tbilisi (Gruzja) oraz Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu [7, 16–17]. W Instytucie Bakteriofagów w Tbilisi wysoką efektywność leczenia za pomocą BF, którą oceniano na 80%, stwierdzono m.in. u pacjentów zakażonych niewrażliwymi na antybiotyki szczepami *Enterococcus*. Ponadto wykorzystywano BF w leczeniu zakażeń wywołanych przez *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia coli* i *Schigella* [16–17]. W Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu w latach 1981–1999 terapię bakteriofagową zainicjowaną przez S. Ślópka zastosowano u 1857 pacjentów z zakażeniami wywołanymi przez różne rodzaje bakterii. Najczęściej infekcje były wywoływane przez szczepy: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus* spp, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp i *Enterococcus* spp. Do lecz-

nych schorzeń należały m.in.: czerwonka, ropne zapalenia opon mózgowych, ropne zapalenia ucha środkowego, zapalenia górnych i dolnych dróg oddechowych, zapalenia płuc, zapalenia opłucnej, zakażenia układu moczowego, zapalenia powiek, ropne zapalenia stawów, ropne zapalenia mięśni, zapalenia kości i szpiku kostnego, ropne infekcje pooperacyjne oraz w następstwie oparzeń [4, 16–17, 24, 31–34].

Bakteriofagi są zbudowane z kwasu nukleinowego otoczonego osłonką–płaszczem białkowym, tzw. kapsydem. Najlepiej poznano budowę BF serii T atakujących *E. coli*, np. faga T2. Kapsyd tego faga wydłuża się w ogonek, przez który nić kwasu jest wstrzykiwana w tzw. strefach bioadhezji do komórki bakteryjnej. Rola kapsydu nie ogranicza się więc tylko do ochrony materiału genetycznego, ale także polega na współdziałaniu w zakażeniu nowego gospodarza. Genom wirusów bakteryjnych jest zbudowany z jedno- lub dwuniciowego DNA (u ponad 90% fagów występuje dwuniciowy DNA), istnieją także fagi zbudowane z RNA. Po zakażeniu komórki bakteryjnej są możliwe dwie drogi rozwoju bakteriofaga: faza lityczna lub faza lizogenna [7, 16–17, 24, 35]. W fazie litycznej po wprowadzeniu wirusowego materiału genetycznego do wnętrza komórki bakteryjnej dochodzi do transkrypcji genów wirusowych i metabolizm komórki bakteryjnej zostaje przestawiony na replikację fagów. W tej fazie bakteriofag przejawia wszystkie swoje funkcje, prowadząc do lizy komórki bakteryjnej i uwolnieniu 50–1000 potomnych cząsteczek wirusa. Według Carltona [7] w zależności od rodzaju BF oraz warunków, „rodzicielski” BF wytwarza najczęściej około 200 potomnych BF w jednym cyklu litycznym. Każdy potomny BF infekuje i zabija kolejne komórki bakteryjne, co powoduje, iż np. pod koniec drugiego cyklu pojawia się około 40 000 potomnych BF, a pod koniec czwartego cyklu około 1,6 biliona. Według Duckwortha i Guliga [17] cykl lityczny odbywa się średnio co 15 minut. Bakteriofagi o zdolnościach litycznych określa się mianem BF wirulentnych (*virulent phages*). Faza lizogenna polega na integracji materiału genetycznego faga z chromosomem bakterii. Fagi o tego typu właściwościach określa się jako łagodne (*temperate phages*) [17]. DNA faga będący częścią genomu bakterii określa się mianem profaga. Profag syntetyzuje tzw. represor, blokujący ekspresję wszystkich pozostałych genów wirusa. W wypadku zaistnienia sytuacji stresowych może nastąpić redukcja represora i wycięcie profaga. Profag uaktywnia się i podobnie jak w cyklu litycznym może niszczyć bakterię [16]. Z medycznego punktu widzenia zjawisko lizogenii jest niekorzystne, gdyż można uznać je za proces uodparniania się szczepów bakteryjnych na fagi.

Stadium profaga jest związane ze zmianą niektórych właściwości bakteryjnych, może dochodzić do transferu genów warunkujących patogenność bakterii, zwiększających ich wirulencję, a także nadających im oporność na antybiotyki [16, 24]. Przykładem są badania Preusa et al. [36–37] przeprowadzone u pacjentów z przedpokwitaniowym i młodzieńczym zapaleniem przyzębia wywołanym przez Gram-ujemnego beztlenowca *Actinobacillus actinomycetemcomitans* zainfekowanego BF. Stwierdzono wyraźny związek między występowaniem *Actinobacillus actinomycetemcomitans* z profagiem a istnieniem postępującej destrukcji tkanek przyzębia oraz tkanki kostnej. Proces lizogenii potwierdzono u bakteriofagów powszechnie występujących w przyrodzie. Odgrywają one istotną rolę w zmienności drobnoustrojów, uczestnicząc czynnie w procesach międzykomórkowego przekazywania materiału genetycznego m.in. na drodze transdukcji, koniugacji, transfekcji, z czego wynikają praktyczne następstwa dotyczące zmian chorobotwórczości bakterii [35]. Cechą szczególną bakteriofagów jest zdolność do atakowania komórek bakteryjnych bez jednoczesnego zakażenia złożonych eukariotycznych komórek ludzkich, co jest związane z jednoczesnym istnieniem na powierzchni faga i komórki bakteryjnej swoistych receptorów. Bakteriofagi charakteryzują się bardzo dużą swoistością, co oznacza, że ich działanie jest związane z bardzo wąskim spektrum bakterii, ograniczają się do określonego gatunku, a nawet szczepu, co czyni je przydatnym narzędziem diagnostycznym i terapeutycznym [16, 24].

Istnieje niewiele doniesień opisujących praktyczne wykorzystanie BF w chirurgii stomatologicznej. W polskim piśmiennictwie można znaleźć prace o wykorzystaniu BF w następujących rozpoznaniach: *sinuitis maxillaris chronica purulenta*, *ostitis chronica mandibulae or maxillae*, *fistula cutanea purulenta*, *pansinuitis chronica*, *rhinitis purulenta*, *lymphadenitis submandibularis* [4, 5]. Ślopek et al. stosowali terapię BF w leczeniu zapaleń jamy ustnej [38]. W wielu przypadkach pacjenci, u których zastosowano fagoterapię byli przez długi czas bezskutecznie leczeni antybiotykami. Czas leczenia przedklinicznego wahał się średnio od kilku tygodni do nawet kilku lat [4, 5]. Leczenie BF wymaga ustalenia czynnika sprawczego zakażenia, na podstawie analizy bakteriologicznej pobranego materiału. W zależności od występującego zapalenia materiałem tym mogą być wyskrobiny z zainfekowanej kości, treść ropna z przetok, popłuczyny z zatok szczękowych lub też wymazy z trudno gojących się ran. Po otrzymaniu dodatniego posiewu bakteriologicznego i określeniu rodzaju flory bakteryjnej dokonuje się

tw. diagnozy fagowej, czyli doboru BF do leczenia. Przykładem jest bakteriofag oznaczany symbolem P4, którego gospodarzem bakteryjnym jest *Staphylococcus aureus*. Symbol faga jest związany z przyporządkowaniem do konkretnej rodziny i grupy morfologicznej i tak np.: BF P4 oznacza, iż fag należy do rodziny *Myoviridae* oraz grupy morfologicznej charakteryzującej się izometrycznymi główkami [35]. Preparaty bakteriofagów są dostępne w postaci płynnej lub tabletek. Roztwory mogą być podawane miejscowo lub doustnie. Możliwe jest stosowanie terapii skojarzonej. Opiszano przypadki donaczyniowego, podskórnego i dożylnego podawania preparatów BF [8, 17]. Aplikacja miejscowa polegała na podawaniu preparatu bezpośrednio na ranę (przymoczek), przestrzykiwaniu przetok ropnych, płukaniu jamy ustnej, przepłukiwaniu zatok igłą punkcyjną. Możliwe jest także podanie preparatu na rozpuszczalny materiał nośny, np. Spongostan.

W leczeniu przewlekłych zapaleń bakteryjnych najczęściej była stosowana terapia skojarzona. W badaniach Weber-Dąbrowskiej et al. [5] miejscowe leczenie ropnego przewlekłego zapalenia zatok szczękowych prowadzono według następującego schematu: płukanie zatok igłą punkcyjną powtarzano co drugi dzień, jeżeli po 7 dniach w popłuczynach stwierdzano obecność bakterii odpowiedzialnych za zakażenie, płukanie zatok powtarzano dalej, ale już w odstępach siedmiodniowych. W badaniach Kaczkowskiego et al. [4] fagi aplikowano miejscowo w pierwszym etapie leczenia, tj. przez 4 dni trzy razy dziennie, a następnie liczbę aplikacji zmniejszono do dwóch na dobę. W obu przypadkach wskazaniem do zakończenia terapii fagowej było uzyskanie jałowych posiewów kontrolnych i ustąpienie objawów klinicznych choroby. Terapia miejscowa była wspomagana doustnym podawaniem preparatów BF [4, 5] według następującego schematu: 10 ml sterylizowanego lizatu o wysokiej koncentracji cząstek fagowych co 6 godzin, na 30 minut przed posiłkiem, po uprzednim zneutralizowaniu kwasu solnego w soku żołądkowym (Gel Alumini Phosphorici, Alusal).

Problem dystrybucji BF w organizmie pacjenta nie jest jeszcze dokładnie poznany. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że podane doustnie BF penetrują do tkanki limfatycznej, a następnie do krwi, gromadzą się w nerkach i przez błonę śluzową kłębków przedostają się do moczu [21]. Okres, w którym można wyizolować BF z krwi lub moczu gospodarza to tzw. okres „bakteriofagemii” [16]. W badaniach na zwierzętach po domięśniowym podaniu BF stwierdzono ich obecność we wszystkich badanych tkankach, np. mięśniach, wątrobie, śledzionie, mózgu. Wydalanie BF z organizmu

odbywa się głównie przez nerki z moczem oraz przewodem pokarmowym [17].

Zastosowanie BF w leczeniu ropnego przewlekłego zapalenia zatok szczękowych zakończyło się powodzeniem w przypadku 76,8% [5]. Badania Kaczковского et al. [4] w leczeniu przewlekłych chorób bakteryjnych, takich jak m.in.: przewlekłe zapalenia kości, ropne przetoki skórne, przewlekłe zapalenia zatok szczękowych, u 68,75% potwierdziły wyraźną skuteczność tej terapii. W obu przypadkach leczenie trwało stosunkowo długo (1–8 tygodni) [4], a w przypadku przewlekłego ropnego zapalenia zatok (4–14 tygodni) [5]. Terapia fagowa, podobnie jak antybiotykoterapia, może powodować objawy uboczne. Z reguły są to jednak niegroźne dla zdrowia i życia objawy, w przypadku których nie ma konieczności przerwania terapii. Opisano występowanie przemijających dolegliwości gastrycznych, bólów głowy, mięśniowych i stawowych, w obrębie twarzy i jamy ustnej, uczucia osłabienia, rozbicia, wymioty oraz zwiększone ciepłoty ciała [4]. W badaniach Śłopka et al. [38] wykazano stosunkowo rzadkie występowanie działań ubocznych po zastosowanej terapii BF. Spośród 138 pacjentów poddanych terapii stwierdzono 3 przypadki, w których terapia fagowa spowodowała wystąpienie skutków ubocznych. Po doustnym podaniu preparatu BF opisano występowanie objawów hepatalgii oraz wzrost temperatury ciała, a po podaniu miejscowym zanotowano nieliczne przypadki wystąpienia reakcji alergicznych. Objawy hepatalgii występowały najczęściej 3–5 dnia terapii BF, zwiększone ciepłoty ciała 7–10 dnia leczenia, dlatego postuluje się, aby pacjent pozostawał pod ścisłą obserwacją co najmniej do ósmego dnia terapii [38]. Wykazano, że terapia BF nie powoduje uchwytynych zaburzeń w organizmie, co potwierdzają wyniki badań laboratoryjnych wykonywane przed, w czasie i po przeprowadzonej terapii [4, 21]. Nie zawsze jednak terapia jest zakończona powodzeniem. Opisano nieliczne przypadki niepowodzeń, których przyczyną może być: wyselekcjonowanie fagoopornych form bakterii, nadkażenie bakteriami heterologicznymi, niedocieranie fagów do komórek bakteryjnych w ognisku zakażenia oraz występowanie przeciwciał neutralizujących fagi [5]. Krążące w organizmie bakteriofagi są rozpoznawane przez organizm pacjenta jako obce antygeny, w związku z czym dochodzi do ich eliminacji. Nie opisano jeszcze powstawania swoistych kompleksów antygen–przeciwciało, znane jest jednak zjawisko „oczyszczania” organizmu gospodarza z BF, opisane po raz pierwszy przez Merrila et al. [40], polegające na gwałtownym wychwycie BF przez wątrobę, śledzionę oraz inne narządy układu retikulo-endoplazmatycznego (RES) [7, 17, 40].

Nie jest jeszcze jednoznacznie stwierdzone, czy wytwarzane ludzkie przeciwciała znoszą dodatkowo aktywność przeciwbakteryjną BF [cyt. wg 16], ale już sam fakt szybkiego usuwania BF jest niekorzystny i zmusza do stosunkowo częstego podawania lizatów.

Terapia fagowa może w niedalekiej przyszłości nie tylko może być tak samo często stosowana jak antybiotykoterapia, lecz może okazać się jedynym skutecznym narzędziem terapeutycznym skutecznym w zwalczaniu zakażeń bakteryjnych. Wykazuje wiele zalet w porównaniu z antybiotykoterapią. Po pierwsze, mimo iż istnieje możliwość wykształcenia się oporności na BF, to nie stanowi to tak poważnego zagrożenia jak zjawisko oporności na antybiotyki, ponieważ bakteriofagi jako organizmy żywe charakteryzują się zmiennością mutacyjną, co stwarza szansę, iż może znaleźć się zmutowany BF zdolny do zainfekowania najbardziej opornych bakterii. Rozwój oporności na BF wiąże się głównie z utratą ligandu, będącego nie tylko receptorem dla BF, ale pełniącego również wiele innych istotnych dla życia bakterii funkcji (tworzenie porów w bakteryjnej błonie zewnętrznej, wiązanie bakterii do swoistych powierzchni). Po drugie, bakteriofagi cechują się znacznie większą swoistością w stosunku do niszczonej bakterii, zatem nie naruszają naturalnej endogennej flory bakteryjnej człowieka. W przeciwieństwie do BF antybiotyki mogą być przyczyną zachwiania równowagi flory bakteryjnej pacjenta, co może doprowadzić do nadkażeń bakteryjnych lub/i grzybiczych najczęściej dotyczących przewodu pokarmowego, układu oddechowego i moczowo-płciowego. Do najczęściej izolowanych patogenów będących przyczyną nadkażeń w następstwie antybiotykoterapii należą: *Pseudomonas* spp., *Clostridium difficile* oraz *Candida albicans* [7–8, 16]. Według niektórych autorów [7–8] wysoka swoistość BF w stosunku do określonych szczepów bakterii może być postrzegana w pewnym sensie jako wada w porównaniu z antybiotykami. Antybiotyki, mając znacznie szersze spektrum działania, pozwalają często na uniknięcie wykonania posiewu bakteriologicznego, co ma istotne znaczenie w leczeniu nagłych, progresywnych zakażeń zagrożających życiu. Rozwiązaniem powyższego problemu są złożone preparaty BF, tzw. *phage cocktail*, przykładem jest PhageBioderm® oraz Intestiphage®, powstałe w Instytucie Bakteriofagów w Tbilisi. PhageBioderm to nietoksyczny, podlegający biodegradacji kopolimer zawierający BF przeznaczony do pokrywania ran. Intestiphage jest mieszaniną 23 różnych BF skierowanych przeciwko patogennym bakteriom przewodu pokarmowego. Mieszaniny takie pozwalają również rozwiązać problem oporności bakterii na BF [17]. Tera-

pia BF jest ponadto alternatywą w przypadkach występowania reakcji alergicznych na antybiotyki. Jest również istotne, że terapia antybiotykami może powodować zaburzenia odporności, podczas gdy BF mogą ją potencjalizować [cyt. wg 16]. Inną ważną cechą odróżniającą terapię bakteriofagową od antybiotykowej jest to, że bakteriofagi mają zdolność do wykładniczego wzrostu, tzn. reagują na obecność i nasilenie wzrostu bakterii. Replikacja trwa tak długo, jak obecne są swoiste dla nich bakterie, gdy zmniejsza się liczba bakterii, liczba bakteriofaga również się obniża. Z medycznego punktu widzenia istotnym zagadnieniem jest skojarzone zastosowanie fagoterapii i antybiotykoterapii. Z badań przeprowadzonych przez Ślopka et al. [38] oraz Sakandelize [39] wynika, iż stosowanie połączeń BF i antybiotyku jest niekorzystne, a wypadkowy efekt takiej terapii jest słabszy niż w przypadku zastosowania samego BF, ponieważ antybiotyk może zmniejszać skuteczność terapii fagowej, wydłużając m.in. czas namnażania BF. W opozycji do tego stwierdzenia pozostaje Carlton et al. [7], według których BF są idealnym uzupełnieniem terapii antybiotykowej. Ocenia się, że łączne zastosowanie BF i antybiotyku znacznie ogranicza niebezpieczeństwo wytworzenia się oporności na oba czynniki. Duckworth podaje [17], iż zdaniem badaczy z Instytutu Bakteriofagów w Tbilisi, terapia skojarzona z zastosowaniem BF i antybiotyków jest bardziej efektywna niż leczenie samymi BF.

Obecnie dzięki najnowszym zdobyciom genetyki otwierają się nowe możliwości w terapii BF. Dzięki ustaleniu sekwencji materiału genetycznego BF, a następnie jego modyfikacji można będzie wprowadzić pożądane zmiany w aktywności bakteriofagowej BF. W związku z tym będzie możliwe znaczne zmniejszenie lub nawet całkowita eliminacja opisanych wyżej niepowodzeń. Znane są już przykłady mutacji nadającej BF zdolność ochrony przed systemami obronnymi zarówno bakterii, jak i leczonego pacjenta. Powoduje to, iż bakterie tracą zdolność do ograniczania aktywności BF, ustróż człowieka natomiast powoduje wolniejszą eliminację BF z organizmu, co wydłuża okres „bakteriofagemii” [16]. Opracowano metodę otrzymywania BF wolniej usuwanych z organizmu, tzw. *serial passage method*, której istotą jest modyfikacja białek wchodzących w skład kapsydu [7, 16, 40, 41]. Metoda ta polega na podawaniu tzw. dzikich bakteriofagów (*wild-type bacteriophages*) serii pasaży na myszach, w wyniku czego otrzymuje się BF zdolne do przedłużonego utrzymywania się w organizmie (*long-circulating bacteriophages*). Według Carltona [7] doświadczenia na zwierzętach wykazały, że przy podaniu 100 000 cząsteczek niezmodyfikowanych, dzikich BF λ (*wild-type*

BF), po osiemnastu godzinach wykryto w organizmie gospodarza tylko pojedynczą cząsteczkę BF, a podanie BF λ otrzymanego po 8 pasażach pozwoliło na wykrycie w organizmie gospodarza po tym samym czasie, aż 62 500 cząsteczek BF [7]. Opisana przez Carltona [7] metoda otrzymywania BF zdolnych do przedłużonego utrzymywania się w organizmie bazowała na wykorzystaniu łagodnych fagów λ z rodziny *Styloviridae*. DNA bakteriofagów λ po infekcji komórki gospodarza, ulega replikacji lub integracji z genomem gospodarza. Nie powoduje natomiast rozpadu DNA i lizy komórki gospodarza [35]. Jednakże w związku z możliwością wystąpienia niekorzystnych zjawisk będących następstwem lizogenii, opisanych wcześniej, wielu autorów postuluje o wykluczenie z terapii bakteriofagów lizogennych, a nawet ich pochodnych [16, 24, 35–37]. Mimo postępu w dziedzinie genetyki, na obecnym poziomie wiedzy nie ma możliwości pełnej kontroli bakteriofagów, a metody skutecznego zapobiegania lizogenii nie są jeszcze do końca poznane [cyt. wg 24].

Ustalenie sekwencji materiału genetycznego bakteriofagów umożliwia również wprowadzenie zmian, mających na celu zwiększenie ich aktywności bakteriofagowej. Związane jest to z modyfikacją m.in. genów odpowiedzialnych za efekt letalny i zniszczenie komórki bakteryjnej, genów odpowiedzialnych za stopień wrażliwości BF na aparat restrykcyjny bakterii oraz genów odpowiedzialnych za przejście BF w stadium profaga [16]. Najnowsze zdobycze genetyki stwarzają ponadto możliwość zmieniania specyficzności BF, czyli ich programowania, konstruowania komplementarnego dla określonego szczepu bakterii. Przykładem jest BF M13 atakujący wybiórczo pałeczki *Escherichia coli*, który po modyfikacji genetycznej wykazywał efekt przeciwbakteryjny w stosunku do szczepu *Helicobacter pylori* [16, 19].

Rozwój nauki sprawił, iż terapia bakteriofagowa stała się obecnie metodą obciążoną znacznie mniejszym ryzykiem powikłań w porównaniu z czasami d’Herelle’a. W latach dwudziestych ubiegłego stulecia istotnym problemem było odpowiednie oczyszczenie preparatów BF z białek bakteryjnych. Już niewielka zawartość cząstek bakteryjnych bądź ich endotoksyn w preparacie powodowała zaostrenie choroby, a nawet zgony pacjentów. Prymitywne metody oczyszczania lizatów przez dodawanie do nich związków rtęci, czynników utleniających oraz podgrzewanie powodowało inaktywację wirusów bakteryjnych. Obecnie dzięki postępom technicznym możliwe jest otrzymywanie sterylnych lizatów z zachowanymi, aktywnymi bakteriofagami BF [7].

Reasumując, terapia BF może w przyszłości stać się powszechną metodą leczenia przewle-

kłych, niepoddających się antybiotykoterapii zakażeń okołoszczękowych. Pomimo licznych doniesień opisujących efektywność terapii BF w zwalczaniu infekcji bakteryjnych należy pamiętać o istnieniu ograniczeń terapii fagowej oraz pro-

blemów, jakie może ona za sobą pociągać. Ciągły postęp w dziedzinie genetyki stwarza szanse na zwiększenie skuteczności leczenia, ograniczając ryzyko powikłań.

Piśmiennictwo

- [1] KOZAKIEWICZ M., SAŁATA E., ARKUSZEWSKI P.: Analiza wyników badań bakteriologicznych w materiale Kliniki Chirurgii Szcękowo-Twarzowej Instytutu Chirurgii Akademii Medycznej w Łodzi. *Magazyn Stomat.* 2001, 12, 11, 58–62.
- [2] KOSTOWSKI W.: Podstawy farmakoterapii. PZWL, Warszawa 1998, 1215.
- [3] PANAS M., MUCK B.: Porównanie flory bakteryjnej wyizolowanej w latach 1966–1969 i 1996–1997 z zakażeń zębopochodnych oraz ocena jej wrażliwości na antybiotyk. *Czas. Stomat.* 1998, 51, 524–528.
- [4] KACZKOWSKI H., WEBER-DĄBROWSKA B., DĄBROWSKI M., ZDROJEWICZ Z., CŹWORO F.: Zastosowanie bakteriofagów w leczeniu przewlekłych chorób bakteryjnych. *Wiad. Lek.* 1990, 43, 136–140.
- [5] WEBER-DĄBROWSKA B., KOŹMIŃSKA J., MULCZYK M., KACZKOWSKI H.: Wykorzystanie bakteriofagów w leczeniu przewlekłego ropnego zapalenia zatok szczękowych. *Post. Med. Klin. Dośw.* 1996, 5, 291–293.
- [6] KOZIELSKI J.: Ciężkie zakażenia szpitalne wywołane bakteriami Gram-dodatnimi. *Medical Update, Medipress*, 2004, 2, 5–11.
- [7] CARLTON R. M.: Phage Therapy: Past history and future prospects. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 1999, 47, 267–274.
- [8] INAL J. M.: Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2003, 51, 237–244.
- [9] SMITH T. L., PEARSON M. L., WILCOX K. R., CRUZ C., LANCASTER M. V., ROBINSON-DUNN B., TENOVER F. C., ZERRVOS M. J., BAND J. D., WHITE E., JARVIS W. R.: Emergence of vanomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340, 493–501.
- [10] SIERADZKI K., ROBERTS R. B., HABER S. W., TOMASZ A.: The development of vanomycin resistance in a patient with methillicin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340, 517–523.
- [11] HRYNIEWICZ W., TRZCIŃSKI K.: Oporność na metycylinę *Staphylococcus aureus*. *Mikrob. Ed.* 1995, 2/3, 12–19.
- [12] SAWICKA-GRZELAK A., ROKOSZ A., MEISEL-MIKOŁAJCZYK F.: Lekowrażliwość szpitalnych szczepów gronkowców metycylinoopornych. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1998, 50, 69–76.
- [13] KOCHMAN M., FORDYNACKI P., ŁAWRYNOWICZ M.: Wrażliwość na wybrane chemioterapeutyki opornych szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych z materiału klinicznego w latach 1991/1992 i 1997 roku. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 1993, 45, 187–198.
- [14] PERRY C. M., JARVIS B.: Linezolid. A review of its use in the management of serious Gram-positive infections. *Drugs* 2001, 61, 525–555.
- [15] ZWIEFKA A., WEBER-DĄBROWSKA B., GÓRSKI A.: Symulacje komputerowe terapii fagowej. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2003, 12, 105–109.
- [16] DĄBROWSKA K., BUŚ R., MAZUR A., WEBER-DĄBROWSKA B., MULCZYK M., GÓRSKI A.: Możliwości genetycznej modyfikacji bakteriofagów w celach terapeutycznych. *Pol. Arch. Med. Wew.* 2001, 105, 85–90.
- [17] DUCKWORTH D. H., GULIG P. A.: Bacteriophages potential treatment for bacterial infections. *Biodrugs* 2002, 16, 57–62.
- [18] VAN HELVOORT T.: Bacteriological and physiological research styles in the early controversy on the nature of the bacteriophage phenomenon. *Med. Hist.* 1992, 36, 243–270.
- [19] d'HERELLE F.: Sur un microbe invisible antagoniste des bac dysenteriques. *Crit. Rev. Acad. Sci. Paris* 1917, 167, 373–375.
- [20] d'HERELLE F.: The bacteriophage: its role in immunity. Williams and Wilkins Co./Waverly Press, Baltimore, USA 1922.
- [21] BORATYŃSKA M., SZEWCZYK Z., WEBER-DĄBROWSKA B.: Kliniczna ocena bakteriofagów w leczeniu zakażeń układu moczowego. *Post. Med. Klin. Dośw.* 1994, 3, 7–11.
- [22] WEBER-DĄBROWSKA B., MULCZYK M., GÓRSKI A.: Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2000, 48, 547–551.
- [23] BRUYNOGHE R., MAISIN J.: Essais de therapeutique au moyem du bacteriophage. *C. R. Soc. Biol.* 1921, 85, 1120–1121.
- [24] KOWALSKI J.: Bakteriofagi i możliwości ich zastosowania w diagnostyce i terapii chorób przyzębia – przegląd literatury. *Nowa Stomat.* 2003, 25, 155–156.
- [25] EATON M. D., BAYNE-JONS S.: Bacteriophage therapy. Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections. *JAMA* 1934, 23, 1769–1939.
- [26] SMITH H. W., HUGGINS R. B.: Successful treatment of experimental *E. coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol.* 1982, 128, 307–318.
- [27] SMITH H. W., HUGGINS R. B.: Effectiveness of phages in treating experimental *E. coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J. Gen. Microbiol.* 1983, 129, 2659–2675.
- [28] SMITH H. W., HUGGINS R. B., SHAW K. M.: The control of experimental *E. coli* in calves by means of bacteriophage. *J. Gen. Microbiol.* 1987, 133, 1111–1126.

- [29] BERCHIERI A. JR., LOVELL M. A., BARROW P. A.: The activity in chicken alimentary tract of bacteriophage lytic for *Salmonella typhimurium*. Res. Microbiol. 1991, 142, 541–549.
- [30] SOOTHILL J. S.: Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. Med. Microbiol. 1992, 37, 258–261.
- [31] ŚLOPEK S., KUCHARIEWICZ-KRUKOWSKA A.: Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. Arch. Immunol. Ther. Exp. 1987, 35, 553–561.
- [32] ŚLOPEK S., KUCHARIEWICZ-KRUKOWSKA A., WEBER-DĄBROWSKA B., DĄBROWSKI M.: Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. IV. Evaluation of the results obtained in 370 cases. Arch. Immunol. Ther. Exp. 1985, 33, 219–240.
- [33] ŚLOPEK S., KUCHARIEWICZ-KRUKOWSKA A., WEBER-DĄBROWSKA B., DĄBROWSKI M.: Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. VI. Analysis of treatment of suppurative staphylococcal infections. Arch. Immunol. Ther. Exp. 1985, 33, 261–273.
- [34] ŚLOPEK S., WEBER-DĄBROWSKA B., DĄBROWSKI M., KUCHARIEWICZ-KRUKOWSKA A.: Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986. Arch. Immunol. Ther. Exp. 1987, 35, 569–583.
- [35] MŁYNARCZYK G.: Podział i ogólna charakterystyka bakteriofagów. Post. Mikrobiol. 1990, 35, 151–171.
- [36] PREUS H. R., OLSEN I., NAMORK E.: The presence of phage-infected *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis patients. J. Clin. Periodontol. 1987, 14, 605–609.
- [37] PREUS H. R., OLSEN I., NAMORK E.: Association between bacteriophage-infected *A. actinomycetemcomitans* and rapid periodontal destruction. J. Clin. Periodontol. 1987, 14, 254–247.
- [38] ŚLOPEK S., DURLAKOWA I., WEBER-DĄBROWSKA B., KUCHARIEWICZ-KRUKOWSKA A., DĄBROWSKI M., BISIKIEWICZ R.: Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. Arch. Immunol. Ther. Exp. 1983, 31, 267–291.
- [39] SAKANDELIDZE V. M.: The combined use of specific phages and antibiotics in different infectious allergoses. Vrach. Delo 1991, 3, 60–63.
- [40] MERRIL C. R., BISWAS B., CARLTON R., JENSEN N. C., CREED G. J., ZULLO S., ADHYA S.: Long circulating bacteriophages as antibacterial agents. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 3188–3192.
- [41] PRISI A.: Phage therapy – advantages over antibiotics? Lancet 2000, 356, 1418.

Adres do korespondencji:

Katarzyna Łysiak
Katedra i Zakład Chirurgii Stomatologicznej AM
ul. Kuźnicza 43/45
50-138 Wrocław
tel. +48 71 343 32 52
e-mail: katarzyna_lysia@op.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 5.05.2004 r.

Po recenzji: 4.06.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 16.06.2004 r.

Received: 5.05.2004

Revised: 4.06.2004

Accepted: 16.06.2004