

**В.О. Іваниця¹, Т.О. Філіпова¹, Б.М. Галкін¹, Т.В. Гудзенко¹,
М.Ю. Русакова¹, Т.Ю. Степанова¹, Т.В. Іваниця¹,
Н. Чанішвілі², Т. Барбуташвілі²**

¹ Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел.: 8 (0482) 68 79 64,
e-mail: v_ivanit@te.net.ua, tphilipova@ukr.net

² Інститут бактеріофагії, мікробіології і вірусології імені Г. Еліава,
Тбілісі, Грузія

ВПЛИВ ПРЕПАРАТУ БАКТЕРІОФАГА *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МАКРОФАГІВ

Встановлено, що препарат бактеріофага Clostridium perfringens in vivo і in vitro пригнічує фагоцитарну здатність макрофагів черевної порожнини і селезінки та утворення ними активних форм кисню. Кількісні прояви цих ефектів залежать від тривалості прийому препарату та його концентрації у середовищі інкубації. Ці зміни функціонального стану супроводжуються посиленням синтезу фактора некрозу пухлин α як в організмі, так і у культурі макрофагів in vitro. Препарат не чинить прямого токсичного впливу на макрофаги.

К л ю ч о в і с л о в а: бактеріофаг Clostridium perfringens, функціональна активність макрофагів, фактор некрозу пухлин α .

Поновлення в останні роки інтересу до бактеріофагів як до антимікробних агентів, які можуть використовуватися для лікування і профілактики інфекційних захворювань людини та тварин, поставило ряд питань про характер їх впливу на організм в цілому [3, 8]. Особливу увагу привертає проблема взаємодії імунної системи з фагами, оскільки ці питання майже не досліджені.

Сьогодні відомі два факти: бактеріофаги, введені тваринам внутрішньочеревинно, індукують синтез специфічних антитіл [7], а пероральне застосування фагів викликає їх тривалу (до 14 діб) персистенцію у печінці та селезінці [11,12]. Ці факти свідчать про активну взаємодію клітин імунної системи з бактеріофагами.

Раніше нами було встановлено, що комерційний препарат бактеріофага *Clostridium perfringens* за перорального введення мишам посилює у них запальну реакцію на карагенан та зимозан [1].

Враховуючи важливу роль у формуванні запалення макрофагів та цитокінів, що синтезуються цими клітинами, метою даного дослідження було вивчення впливу препарату бактеріофага *Clostridium perfringens* in vivo та in vitro на функціональну активність макрофагів та продукцію ними фактора некрозу пухлин α .

Матеріали і методи

Препарат бактеріофага *Clostridium perfringens*, створений в Інституті бактеріофагії, мікробіології і вірусології АН Грузії, містив 10^7 бляшкоутворювальних одиниць (БУО) в 1 мл.

У роботі були використані миші самці лінії BALB/с масою 18-20 г.

В експериментах *in vivo* препарат бактеріофага вводили мишам перорально одно- або трьохразово у дозі 0,5 мл, а в дослідах *in vitro* препарат додавали до моношару макрофагів у кінцевих концентраціях 10^5 та 10^6 БУО/мл.

Сироватку і макрофаги з черевної порожнини та селезінки отримували за загально прийнятими методами [2]. Культивування макрофагів *in vitro* здійснювали у 96-лункових планшетах у середовищі RPMI 1640, яке містило 10 % телячої сироватки, 2 мМ глутаміну та антибіотики. У кожен лунку вносили 0,2 мл суспензії макрофагів з концентрацією клітин 10^6 в 1 мл. Через 60 хв, після прикріплення макрофагів до дна лунок, замінювали культуральне середовище і додавали відповідні кількості препарату бактеріофага. Подальшу інкубацію здійснювали протягом 24 год у термостаті при температурі 37 °С.

Фагоцитарну активність та здатність макрофагів відновлювати нітросиній тетразолій (НСТ-тест) оцінювали за [5,10].

Вміст фактора некрозу пухлин α (ФНП- α) визначали імуоферментним методом з використанням тест-наборів Anti-mouse Ready-Set-Go! Cytokine ELISA Kit фірми «eBioscience», США. При виконанні аналізів керувалися інструкцією фірми виробника. Рівень ФНП- α визначали у сироватці, селезінці та культуральній рідині. Облік результатів проводили на планшетному фотометрі «Уніплан», Росія, при довжині хвилі 450 нм.

Цитотоксичний вплив препарату бактеріофага *Clostridium perfringens* вивчали за активністю дегідрогеназ макрофагів з використанням 3-[4,5-диметилтіазол-2-іл]-2,5-дифеніл тетразолій броміду (МТТ-тест) фірми SIGMA, США [4,9].

Усі експерименти повторювали п'ятикратно. Математичне опрацювання отриманих даних здійснювали з використанням програми MS Excel. Вірогідність різниці показників оцінювали за допомогою *t*-критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення

У роботі досліджено препарат бактеріофага, що був розроблений для мінімізації ризику шлунково-кишкових інфекцій людини та тварин, які збуджуються штамми *Clostridium perfringens* з нещодавно набутою резистентністю до антибіотиків. Крім фагів, препарат містить лізат клітин клостридій та культуральне середовище (м'ясо-пептонний бульйон).

Отримані нами раніше результати свідчать, що препарат бактеріофага *Clostridium perfringens*, введений мишам у задню лапу під апоневроз, не викликає формування місцевої запальної реакції. У той же час пероральне застосування цього препарату потенціє локальну запальну реакцію на відомі флогогени: карагенан і зимозан, а у 70 % дослідних тварин одночасно реєструвалися ознаки системного запалення. Було висунуто припущення, що компоненти препарату (самі бактеріофаги та/або лізат клітин клостридій, перш за все, їх токсини) індукують утворення в організмі прозапальних цитокінів, зокрема ФНП- α . Експериментальному підтвердженню цього припущення присвячена дана робота.

У дослідженнях *in vivo* препарат вводили перорально, одно- і трьохразово, у дозі 0,5 мл на мишу і через добу після останнього введення оцінювали фагоцитарну здатність і активність у НСТ-тесті макрофагів, вилучених з черевної порожнини та селезінки, а також рівень ФНП- α у сироватці та селезінці.



Отримані результати (табл.) показали, що препарат бактеріофага *Clostridium perfringens* викликає вірогідне зниження як фагоцитарної активності макрофагів, так і продукції ними реакційно активних форм кисню. При цьому на фоні трьохразового застосування препарату відмічені більш суттєві зміни функціональних властивостей фагоцитів. Подібні дані були отримані і у клінічних дослідженнях [14]. Результати цих спостережень свідчать про наявність у пацієнтів пригніченої здатності нейтрофілів до фагоцитозу бактерій після фаготерапії, причому гальмування фагоцитозу рееструвалося також через три місяці після припинення лікування.

Таблиця

Вплив препарату бактеріофага *Clostridium perfringens* на функціональну активність макрофагів in vivo (M ± m, n = 5)

	Варіант	Фагоцитарна активність, клітин дріжджів/10 ⁶ макрофагів, x 10 ⁶	Активність у НСТ-тесті, мкг диформазау/10 ⁶ макрофагів
Макрофаги селезінки	Контроль	1,78 ± 0,09	5,36 ± 0,34
	1-разове введення	1,68 ± 0,11	4,22 ± 0,16*
	3-разове введення	0,79 ± 0,04*	3,67 ± 0,15*
Макрофаги черевної порожнини	Контроль	4,83 ± 0,21	13,94 ± 1,06
	1-разове введення	3,65 ± 0,12*	11,25 ± 0,83*
	3-разове введення	1,49 ± 0,09*	3,83 ± 0,18*

* – різниця вірогідна у порівнянні з контролем (p ≤ 0,05)

Визначення рівня ФНП-α у сироватці та селезінці (рис. 1) виявило його підвищення на 10-15 % після однократного і на 40-50 % після трьохкратного введення препарату.

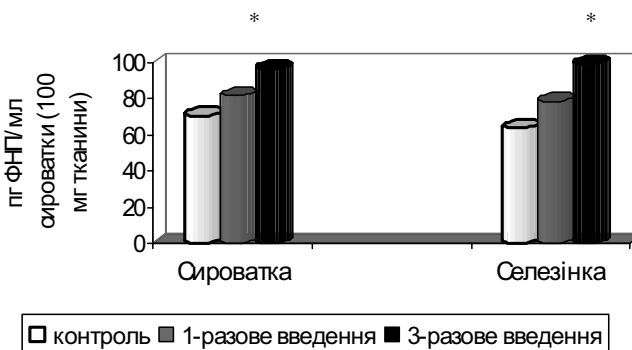


Рис. 1. Вплив препарату бактеріофага *Clostridium perfringens* на вміст фактору некрозу пухлин у сироватці та селезінці мишей
* - різниця вірогідна у порівнянні з контролем (p ≤ 0,05)

Fig. 1. Bacteriophage Preparatus *Clostridium perfringens* effect upon factor contents of tumour necrosis at the serum and spleen of mouse



Враховуючи, що основна кількість фактора некрозу пухлин α в організмі синтезується макрофагами, у досліджах *in vitro* вивчали безпосередній вплив препарату бактеріофага на функціональні властивості макрофагів і продукцію ними прозапального цитокіну. До макрофагів, прикріплених до дна 96-лункових планшетів або чашок Петрі діаметром 35 мм, додавали середовище RPMI 1640, яке містило в 1 мл 10^5 - 10^6 фагових часток. Через 24 години інкубації у термостаті при 37 °С у надосадовій рідині лунок визначали вміст ФНП- α , а у шарах макрофагів на чашках Петрі оцінювали здатність до поглинання клітин дріжджів та відновлення нітросинього тетразолію.

Наведені на рис. 2 дані свідчать про те, що препарат бактеріофага *Clostridium perfringens* в умовах *in vitro* впливає на макрофаги так само, як і *in vivo*. Гальмування функціональної активності фагоцитів та збільшення синтезу фактора некрозу пухлин α виявилися залежними від концентрації фагових часток. При концентрації фага 10^6 БУО/мл поглинальна здатність та активність у НСТ-тесті знижувалися порівняно з контролем майже на 50 %, а рівень синтезу цитокіна підвищився вдвічі.

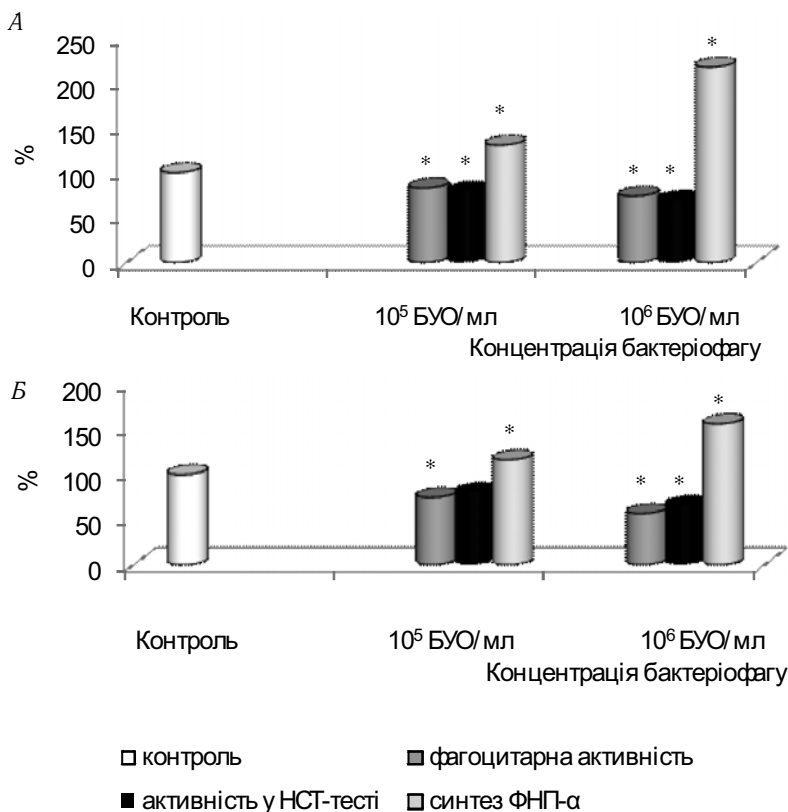


Рис. 2. Вплив різних концентрацій бактеріофага *Clostridium perfringens* на функціональний стан макрофагів черевної порожнини (А) та селезінки (Б) *in vitro* * — різниця вірогідна порівняно з контролем ($p \leq 0,05$)

Fig. 2. Bacteriophage *Clostridium perfringens* different concentration effect upon functional macrophages activity of peritoneal (A) and spleen (B) *in vitro*



За даними МТТ-тесту встановлено, що досліджуваний препарат бактеріофага *Clostridium perfringens* не впливає на життєздатність макрофагів в культурі: рівень активності дегідрогеназ у клітинах, що інкубувалися у присутності бактеріофага впродовж доби, не відрізнявся від контрольних значень і складав 97 % від величин, зареєстрованих у макрофагах одразу після вилучення з організму тварин.

Таким чином, проведене дослідження підтвердило, що препарат бактеріофага *Clostridium perfringens* стимулює синтез в організмі дослідних тварин одного з прозапальних цитокінів — фактора некрозу пухлин α . Крім того, показано безпосередній вплив препарату на функціональний стан макрофагів. Слід зазначити, що вплив фаготерапії на цитокіниний профіль хворих встановлений рядом авторів [6,13]. Оскільки досліджений препарат містить крім фагів лізат кластридій, не можна стверджувати, що встановлені ефекти обумовлені саме фагами. Для остаточного вирішення цього питання необхідно отримати фагові частки, очищені від фрагментів бактеріальних клітин, і провести вивчення їх впливу на функціональну активність макрофагів та продукцію ними ФНП- α .

ЛІТЕРАТУРА

1. *Иваница В. А., Филиппова Т. О., Галкин Б. Н., Гудзенко Т. В., Русакова М. Ю., Степанова Т. Ю., Иваница Т. В., Чанишвили Н., Барбуташивили Т.* Провоспалительные и цитотоксические свойства бактериофага *Clostridium perfringens* // Тези доповідей міжнародної конференції «Мікробні біотехнології», Одеса, 2006. — С. 126.
2. *Barrow, P. A., Soothill J. S.* Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential // *Trends Microbiol.* — 1997. — V. 5. — P. 268-271.
3. *Hansen M.B., Nielsen S.E., Berg K.* Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill // *J. Immunol. Methods.* — 1989. — V. 119. — P. 203-210.
4. *Kaminski N.E., Roberts J.F., Guthrie F.E.* A rapid spectrophotometric method for assessing macrophage activity // *Immunol. Lett.* — 1985. — V. 10. — P. 329-331.
5. *Kozminska J., Weber-Dabrowska B., Mulczyk M.* The study on biology of bacteriophages and their usage in the treatment of bacterial diseases and on the influence of different bacteriophages on cytokine production by leukocytes in human peripheral blood // *Otolaryngologia Polska.* — 1997. — V. 51, Suppl. 25. — P. 195-198.
6. *Kucharewicz-Krukowska A., Slopek S.* Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy // *Archivum Immunologii et Therapiae Experimentalis.* — 1987. — V. 35. — P. 553-561.
7. *Merril, C. R., Scholl D., Adhya S. L.* The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine // *Nat. Rev. Drug Discov.* — 2003. — V. 2. — P. 489-497.
8. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* — 1983. — V. 65. — P. 55-63.
9. *Raichvarg D., Marchand E., Sarfati G., Agneray J.* Technique colorimetrique d'evaluation de l'activite phagocytaire des macrophages peritoneaux de souris // *Ann. Immunol.* — 1980. — V. 131. — P. 71-78.
10. *Reynaud A., Cloastre L., Bernard J.* Characteristics and diffusion in the rabbit of a phage for *Escherichia coli* 0103. Attempts to use this phage for therapy // *Vet. Microbiol.* — 1992. — V. 30. — P. 203-212.
11. *Smith H.W., Huggins M.B.* Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: Its general superiority over antibiotics // *J. Gen. Microbiol.* — 1982. — V. 128. — P. 307-318.
12. *Weber-Dabrowska B., Dabrowski M., Slopek S.* Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy // *Archivum Immunologii et Therapiae Experimentalis.* — 1987. — V. 35. — P. 563-568.
13. *Weber-Dabrowska B., Zimecki M., Mulczyk M., Gorski A.* Effect of phage therapy on the turnover and function of peripheral neutrophils // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* — 2002. — V. 34. — P. 135-138.

Робота виконана за підтримки гранту INTAS Ref. Nr. 03-51-5563.



**В.А. Иваниця¹, Т.О.Филиппова¹, Б.Н. Галкин¹, Т.В. Гудзенко¹,
М.Ю. Русакова¹, Т.Ю. Степанова¹, Т.В. Иваниця¹, Н. Чанишвили²,
Т. Барбуташвили²**

¹ Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: 8 (0482) 68 79 64,
e-mail: tphilippova@ukr.net

² Институт бактериофагии, микробиологии и вирусологии имени Г. Элиава,
Тбилиси, Грузия

ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА БАКТЕРИОФАГА *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МАКРОФАГОВ

Реферат

Показано, что препарат бактериофага *Clostridium perfringens* *in vivo* и *in vitro* подавляет фагоцитарную способность макрофагов брюшной полости и селезенки и образование ими активных форм кислорода. Выраженность этих эффектов зависит от длительности приема препарата и его концентрации в среде инкубации. Эти изменения сопровождаются усилением синтеза фактора некроза опухолей α как в организме, так и в культуре макрофагов *in vitro*. Препарат не оказывает прямого токсического влияния на макрофаги.

К л ю ч е в ы е с л о в а: бактериофаг *Clostridium perfringens*, функциональная активность макрофагов, фактор некроза опухолей α .

**V.O. Ivanytsya¹, T.O. Filipova¹, B.M. Galkin¹, T.V. Gudzenko¹,
M.Yu. Rusakova¹, T. Yu. Stepanova¹, T.I. Ivanytsya¹,
N. Chanishvili², T. Barbutashvili²**

¹ Odesa Mechnykov National University, Dvoriyanska, 2, Odesa, 65082, Ukraine, tel.: 8 (0482) 68 79 64, e-mail: tphilippova@ukr.net

² Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology, Tbilisi, Georgia

***CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* BACTERIOPHAGE EFFECT ON MACROPHAGES FUNCTIONAL ACTIVITY**

Summary

We have shown that *Clostridium perfringens* bacteriophage both *in vivo* and *in vitro* suppresses the phagocytic activity of peritoneal cavity and spleen macrophages as well as restoration of nitro blue tetrazolium. The effect depends on duration of treatment and preparation concentration in incubation media. All changes in cell activity are entailed with the increase of tumor necrosis factor α synthesis in organism as well as in macrophage culture *in vitro*. The preparation does not have any direct toxic effect on macrophages.

К e y w o r d s: *Clostridium perfringens* bacteriophage, functional activity of macrophages, tumor necrosis factor α .

