УДК 612.017.1

Т.О. Филиппова, В.А. Иваница, Б.Н. Галкин, Н.С. Водзинская, Н.Б. Галкин, О.Ю. Зинченко, И.О. Малярчик, А.В. Никитин, М.Ю. Русакова

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: tphilippova@ukr.net

СОДЕРЖАНИЕ ПРО- И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В ОРГАНИЗМЕ МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТА БАКТЕРИОФАГА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Изучено содержание провоспалительных – ФНО-α и γ-ИФН, и противовоспалительного – ИЛ 10 цитокинов у мышей после одно- и трехкратного введения препарата бактериофага Staphylococcus aureus. Полученные результаты показали, что даже однократное введение этого препарата вызывает значительные изменения уровней изучаемых цитокинов. Содержание γ-ИФН в сыворотке, лимфатических узлах и селезенке повышается в 2,2–2,9 раза, а содержание ФНО-α – на 20–28%. После трехкратного введения препарата бактериофага Staphylococcus aureus уровни этих цитокинов, особенно γ-ИФН, возрастают еще больше. Его содержание в сыворотке и лимфоидных органах в 8–10 раз превышает контрольные значения. Содержание ФНО-α повышается на 50–60%. Содержание ИЛ 10, напротив, снижается и после трехкратного введения этого препарата составляет примерно половину от исходного.

Ключевые слова: бактериофаг Staphylococcus aureus, содержание про- и противовоспалительных цитокинов, фактор некроза опухолей альфа (ФНО-α), гамма интерферон (γ-ИФН), интерлейкин10 (ИЛ 10).

В последнее время вновь отмечается рост интереса к использованию бактериофагов в качестве терапевтических средств [4, 9]. Причем препараты бактериофагов применяются не только для лечения и профилактики инфекционных заболеваний, но и используются также для контроля состояния иммунной системы у пациентов с иммунодефицитами [5, 8]. Ведутся исследования иммуномодулирующих свойств, как очищенных фагов, так и коммерческих препаратов, которые кроме фаговых частиц содержат лизаты бактерий и, часто, компоненты культуральной среды. Ранее нами было показано, что препарат бактериофага *Clostridium perfringens*, разработанный сотрудниками Института бактериофагии,

© Т.О. Филиппова, В.А. Иваница, Б.Н. Галкин, Н.С. Водзинская, Н.Б. Галкин, О.Ю. Зинченко, И.О. Малярчик, А.В. Никитин, М.Ю. Русакова, 2010

микробиологии и вирусологии имени Г. Элиавы АН Грузии для лечения и профилактики желудочно-кишечных инфекции у людей и сельскохозяйственных животных, введенный перорально, усиливает ответ организма на стандартные флогогенные агенты: карагенан и зимозан [2] и активирует синтез в организме провоспалительных цитокинов: γ-ИФН и ФНО-α [1, 3]. Способность влиять на баланс цитокинов в организме открывает новые перспективы практического использования препарата. В связи с этим представляет интерес выяснение способности препаратов других бактериофагов оказывать подобные эффекты.

Целью данной работы было выявление способности препарата бактериофага *Staphylococcus aureus* изменять уровни про- и противовоспалительных цитокинов в организме.

Материалы и методы

Эксперименты проводились на мышах линии BALB/c массой 18—20 г. В исследованиях *in vivo* препарат бактериофага *Staphylococcus aureus,* содержащий 10^7 БОЕ/мл, вводили внутрижелудочно через зонд по 0,5 мл однократно и в течение трех дней. Через сутки после заключительного введения определяли содержание в сыворотке и селезенке γ-интерферона (γ-ИФН), фактора некроза опухолей α (ФНО-α) и интерлейкина 10 (ИЛ 10). Сыворотку получали общепринятым способом. Селезенку и лимфатические узлы гомогенизировали в физиологическом растворе, центрифугировали и использовали супернатант для определения цитокинов. Содержание цитокинов определяли иммуноферментным методом с использованием тест наборов Anti-mouse Ready-Set-Go! Cytokine ELISA Kit фирмы «eBioscience», США, руководствуясь инструкцией изготовителя. Учет результатов осуществляли на планшетном фотометре «Униплан», Россия, при длине волны 450 нм. Все эксперименты повторяли пятикратно. Математическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы MS Exel. Достоверность различий показателей оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Ранее нами было показано, что препараты бактериофагов *Clostridium perfringens* и *Staphylococcus aureus* оказывают провоспалительный эффект, подавляют *in vivo* и *in vitro* фагоцитарную способность макрофагов и образование ими активных форм кислорода, а также увеличивают содержание NK-клеток и их киллерную активность [6]. Выраженность этих эффектов зависит от длительности приема препарата и его концентрации в среде инкубации. Поскольку одним из возможных механизмов такого действия может быть влияние препаратов на образование цитокинов, в работе изучено содержание провоспалительных — ФНО-α и γ-ИФН, и противовоспалительного — ИЛ 10, цитокинов у мышей после одно- и трехкратного введения препарата стафилококкового бактериофага. Уров-

ни данных цитокинов у контрольных животных представлены в таблице. После однократного введения препарата содержание провоспалительных цитокинов возрастает и в сыворотке, и в лимфоидных органах. Уровень ФНО-α превышает контрольные значения на 20–28%, а γ-ИФН – в 2,2–2,9 раза (рис. 1, 2).

Таблица

Содержание цитокинов в сыворотке и лимфоидных органах контрольных мышей (M ± m, n=5)

Table

Cytokines contents in control mice serum and lymphoid organs

Цитокин	Сыворотка, пг/мл	Лимфоузлы, пг/100 мг	Селезенка, пг/100 мг
ФНО-α	70,5 ± 5,1	54,2 ± 3,1	63,6 ± 2,0
γ-ИФН	7,7 ± 0,5	18,3 ± 1,1	17,8 ± 0,9
ИЛ 10	616 ± 45	1360 ± 79	1467 ± 88

Трехкратное введение стафилококкового бактериофага приводит к еще большему увеличению содержания данных цитокинов.

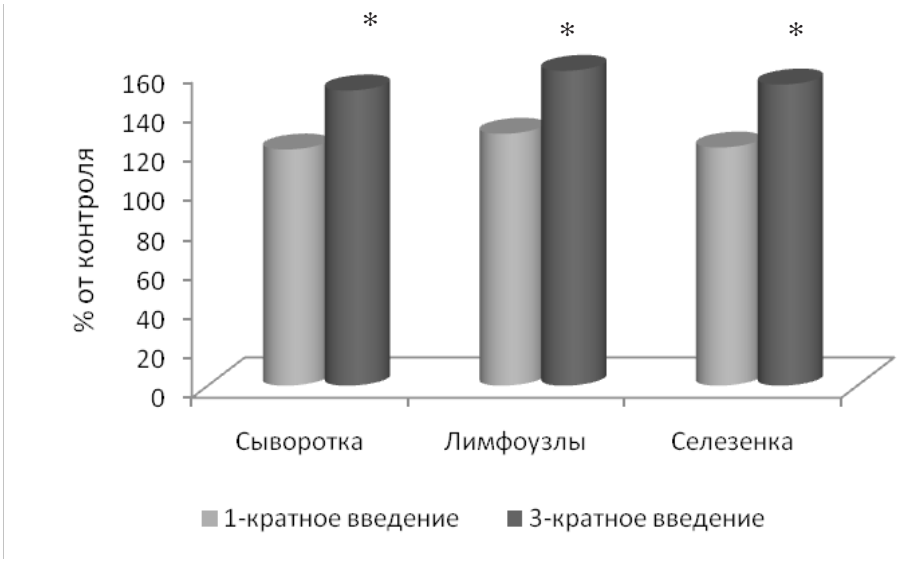

Рис. 1. Содержание фактора некроза опухолей α в сыворотке и лимфоидных органах мышей после введения препарата бактериофага *Staphylococcus aureus*
Примечание: * – различия по сравнению с контролем достоверны

Fig. 1. Tumor necrosis factor α content in mice serum and lymphoid organs after administration of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage
Note: * – significant different from control

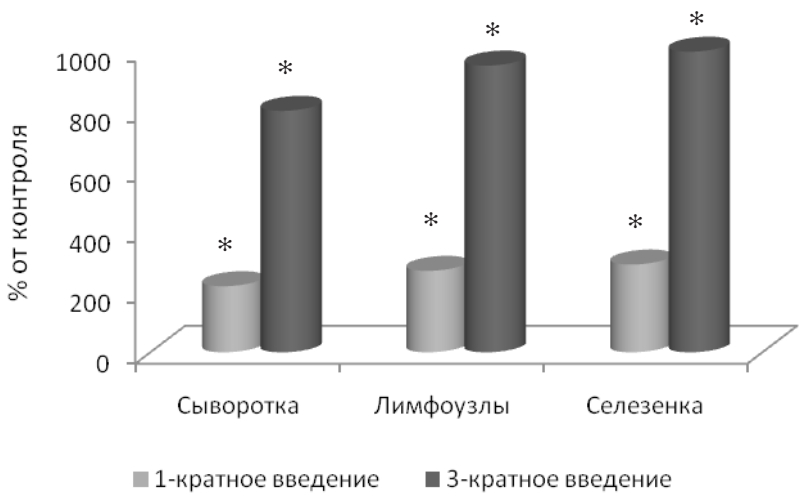

Рис. 2. Содержание γ-интерферона в сыворотке и лимфоидных органах мышей после введения препарата бактериофага *Staphylococcus aureus*
Примечание: * — различия по сравнению с контролем достоверны

Fig. 2. Gamma interferon content in mice serum and lymphoid organs after administration of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage
Note: * — significant different from control

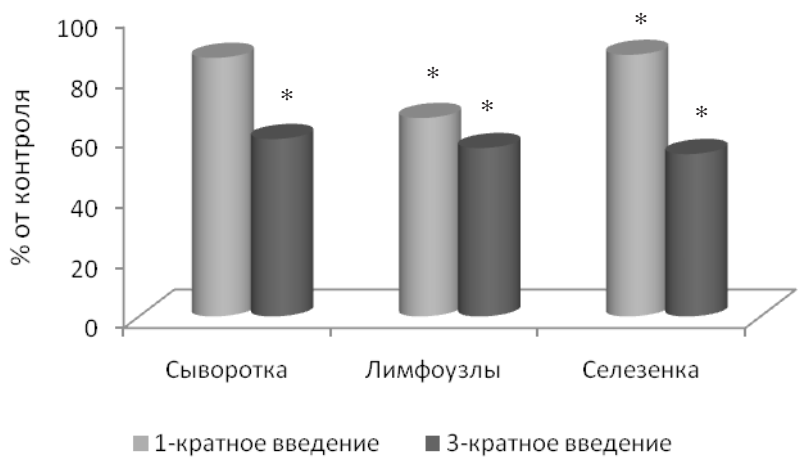

Рис. 3. Содержание интерлейкина 10 в сыворотке и лимфоидных органах мышей после введения препарата бактериофага *Staphylococcus aureus*
Примечание: * — различия по сравнению с контролем достоверны

Fig. 3. Interleukin 10 content in mice serum and lymphoid organs after administration of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage
Note: * — significant different from control

Особенно значительно возрастает уровень γ-интерферона — в 8—10 раз. Содержание фактора некроза опухолей увеличивается на 50—60%.

В то же время, содержание ИЛ 10 под влиянием препарата бактериофага дозо-зависимо снижается и после трехкратного введения составляет примерно половину от исходного (рис. 3).

Полученные данные дают основание предполагать, что препарат бактериофага оказывает активирующее воздействие на Th1 субпопуляцию хелперных лимфоцитов и NK-клетки, которые служат основными продуцентами γ-интерферона. Учитывая эти результаты, а также увеличение образования в организме фактора некроза опухолей α, можно ожидать усиление противовирусной и противоопухолевой резистентности организма при фаготерапии. Вместе с тем, подавление продукции ИЛ 10 свидетельствует о возможном снижении активности Th2 хелперов и, соответственно, интенсивности гуморальных иммунных реакций.

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о том, что препарат бактериофага *Staphylococcus aureus* индуцирует образования в организме двух важнейших цитокинов с провоспалительным действием: γ-ИФН и ФНО-α. Аналогичное возрастание уровня фактора некроза опухолей α отмечалось при фаготерапии у людей. Кроме того, у этих пациентов подавлялась фагоцитарная активность нейтрофилов, что наблюдалось и через три месяца после окончания лечения [7, 14]. Снижение продукции ИЛ 10 может быть обусловлено эффектами провоспалительных цитокинов. Следует подчеркнуть, что воздействие стафилококкового бактериофага на уровень цитокинов в организме мышей полностью совпадает с обнаруженными ранее эффектами бактериофага *Clostridium perfringens* [1, 3, 6].

Нерешенным остается вопрос о том, сами ли фаги, или другие компоненты препаратов (лизаты бактерий) ответственны за обнаруженные эффекты. Известно, что фаги при пероральном введении могут проникать через слизистую желудочно-кишечного тракта и длительное время персистировать в организме [10, 11]. При этом они обнаруживаются в лимфоузлах и селезенке и могут оказывать прямое влияние на иммунокомпетентные клетки. Значительное усиление образования в организме γ-ИФН и ФНО-α объясняет также обнаруженную в экспериментах на животных противоопухолевую активность фага Т4 [12]. Причем такое действие может быть обусловлено как цитокинами, так и активированными иммунным интерфероном натуральными киллерами. Поэтому представляется интересным оценить количественные и функциональные изменения основных популяций и субпопуляций лимфоцитов в организме при введении очищенных бактериофагов и их препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Іваниця В.О., Філіпова Т.О., Галкін Б.М., Гудзенко Т.В., Русакова М.Ю., Степанова Т.Ю., Іваниця Т.В., Чанішвілі Н., Барбуташвілі Т. Вплив препарату бактеріофага *Clostridium perfringens* на функціональний стан макрофагів // Мікробіологія і біотехнологія. — 2008. — № 1. — С. 23–28.

2. Иваница В.А., Филиппова Т.О., Галкин Б.Н., Гудзенко Т.В., Русакова М.Ю., Степанова Т.Ю., Иваница Т.В., Чанишвили Н., Барбуташвили Т. Провоспалительные и цитотоксические свойства бактериофага *Clostridium perfringens* // Тези доповідей міжнародної конференції «Мікробні біотехнології», Одеса, 2006. — С. 126.

3. Филиппова ***Т.О., Иваница В.А., Галкин Б.Н., Гудзенко Т.В., Русакова М.Ю., Степанова Т.Ю., Иваница Т.В., Чанишвили Н., Барбуташвили Т.*** Влияние препарата бактериофага *Clostridium perfringens* на образование про- и противовоспалительных цитокинов // Материалы VI международной научной конференции «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии», Минск, 2008. — С. 139–141.

4. Barrow P.A., Soothill J.S. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential // Trends Microbiol. — 1997. — V. 5. — P. 268–271.

5. Brockstedt D.G., Bahjat K.S., Giedlin M.A., Liu W. Killed but metabolically active microbes: a new vaccine paradigm for eliciting effector T-cell responses and protective immunity // Nature Med. — 2005. — V. 11. — P. 853–860.

6. Filipova T., Ivanytsya V., Gudzenko T., Galkin B., Ivanytsya T., Rusakova M., Stepanova T., Chanishvili N., Barbutashvili T. Clostridium perfringens bacteriophage effect on macrophages functional activity and TNF-α production in vivo и in vitro / In: 2nd Polish-Ukrainian Weigl Conference “Microbiology in the XXI century”, 24–26 September, Warsaw, 2007. — P. 163–167.

7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. Reynaud A., Cloastre L., Bernard J., Laveran H., Ackermann H.W., Licois D., Joly B. 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. Dabrowska K., Opolski A., Wietrzyk J., Switala-Jelen K., Godlewska J., Boratynski J., Syper D., Weber-Dabrowska B., Gorski A. Anticancer activity of bacteriophage T4 and its mutant HAP1 in mouse experimental tumor models // Anticancer Res. — 2004. — V. 24. — P. 3991—3995.

14. 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.

T.O. Filipova, V.O. Ivanytsia, B.M. Galkin, N.S. Vodsinska, M.B. Galkin, O.Yu. Zinchenko, I.O. Maliarchyk, O.V. Nikitin, M.Yu. Rusakova

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (048) 765 33 61,
e-mail: tphilippova@ukr.net

THE PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES CONTENTS IN MICE AFTER *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* BACTERIOPHAGE ADMINISTRATION

Summary

A contents of the proinflammatory — TNF-α, γ-IFN; and anti-inflammatory — IL 10 cytokines in mice after one- and three times administration of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage have been studied. Results of this investigation show that even one administration of this preparation, posses a strong changes in the level of the examined cytokines. γ-IFN content in serum, lymph nodes and spleen of mice increase in 2.2—2.9 times, and content of the TNF-α increase for 20—28%. After three times administration of the *Staphylococcus aureus* bacteriophage, level of this

cytokines increase were higher, then after one time injection, especial for γ-IFN. Its level in serum and lymphoid organs was in 8—10 times higher in contrast the control animals. Tumor necrosis factor content increased for 50—60%. In contrast, level of the IL 10 were decrease and after three time administration of this preparation its level compiled a half over there starting level.

K e y w o r d s: *Staphylococcus aureus* bacteriophage, pro- and anti-inflammatory cytokines content, tumor necrosis factor alpha (TNF-α), gamma interferon (γ-IFN), interleukin 10 (IL 10).

Т.О. Філіпова, В.О. Іваниця, Б.М. Галкін, Н.С. Водзінська, М.Б. Галкін, О.Ю. Зінченко, І.О. Малярчик, А.О. Нікітін, М.Ю. Русакова

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: tphilippova@ukr.net

ВМІСТ ПРО- И ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ В ОРГАНІЗМІ МИШЕЙ ПІСЛЯ ВВЕДЕННЯ ПРЕПАРАТУ БАКТЕРІОФАГА *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Реферат

Вивчено вміст прозапальних — ФНП-α і γ-ІФН, та протизапального — ІЛ 10, цитокінів у мишей після одно- і триразового введення препарату бактеріофага *Staphylococcus aureus*. Отримані результати показали, що навіть одноразове введення цього препарату викликає значні зміни рівнів досліджуваних цитокінів. Вміст γ-ІФН у сироватці, лімфатичних вузлах та селезінці підвищується у 2,2—2,9 рази, а вміст ФНП-α — на 20—28%. Після триразового введення препарату бактеріофага *Staphylococcus aureus* рівні цих цитокінів, особливо γ-ІФН, зростають ще більше. Його вміст у сироватці і лімфоїдних органах у 8—10 разів перевершує контрольні значення. Вміст ФНП-α підвищується на 50—60%. Рівень ІЛ 10, навпаки, знижується і після триразового введення цього препарату складає приблизно половину від початкового.

К л ю ч о в і с л о в а: бактеріофаг *Staphylococcus aureus*, вміст про- і протизапальних цитокінів, фактор некрозу пухлин альфа (ФНП-α), гамма інтерферон (γ-ІФН), інтерлейкін10 (ІЛ 10).