

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Бочкарева С.С.¹, Караулов А.В.^{1,2}, Алешкин А.В.¹, Новикова Л.И.¹, Федорова И.М.¹,
Бляхер М.С.¹, Котелева С.И.¹, Капустин И.В.¹

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ НЕКОТОРЫХ ПАРАМЕТРОВ ГУМОРАЛЬНОГО И КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА НА БАКТЕРИОФАГИ

¹ ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава РФ, 119146, Москва, Россия

Цель исследования заключалась в отработке методических подходов, позволяющих оценивать основные параметры гуморального и клеточного иммунного ответа на бактериофаг с учетом многофакторных аспектов его взаимодействия как с возбудителем, так и с макроорганизмом. Получены необходимые реагенты и сконструирована линейка диагностических тест-систем, позволяющих полуколичественно оценивать концентрацию IgG-антител к бактериофагам в сыворотке крови или других биологических жидкостях человека, а также в препаратах, полученных из крови человека, методом ИФА. Доказана необходимость обязательного проведения также реакции нейтрализации, т.е. определения влияния выявленных антител на активность фага в отношении бактерии-мишени. Апробация использованных методических подходов при исследовании сывороток крови пациентов продемонстрировала, что синтезирующиеся при фаготерапии антитела к бактериофагам не всегда являются нейтрализующими. Отработаны методические подходы к оценке реакции клеточного иммунитета на бактериофаг по выявлению Т-лимфоцитов (Т-хелперов и цитолитических Т-лимфоцитов), способных активироваться в присутствии исследуемого фага (по экспрессии раннего маркера активации (CD69) и по способности продуцировать ИФН γ). Апробация методики при исследовании лимфоцитов у пациентов на фоне фаготерапии продемонстрировала наличие активированных клеток как по экспрессии CD69, так и по продукции ИФН γ , динамика которых зависела от сроков проведения и кратности терапии. Появление нейтрализующих антифаговых антител и соответствующих активированных Т-лимфоцитов необходимо учитывать при фаготерапии, эффективность которой может напрямую зависеть не только от активности фага в отношении бактерии-мишени, но и от ответа иммунной системы пациента на бактериофаг.

Ключевые слова: бактериофаги; IgG-антитела; гуморальный иммунитет; клеточный иммунитет; нейтрализующие антифаговые антитела; лимфоциты.

Для цитирования: Бочкарева С.С., Караулов А.В., Алешкин А.В., Новикова Л.И., Федорова И.М., Бляхер М.С., Котелева С.И., Капустин И.В. Методические подходы к оценке некоторых параметров гуморального и клеточного иммунного ответа на бактериофаги. Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64 (4): 237-242
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-237-242>

Bochkareva¹ S.S., Karaulov A.V.^{1,2}, Aleshkin A.V.¹, Novikova L.I.¹, Fedorova I.M.¹, Blayaher M.S.¹, Koteleva S.I.¹, Kapustin I.V.¹

APPROACHES TO THE ESTIMATION OF SOME PARAMETERS OF HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSE TO BACTERIOPHAGES

¹G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119146, Moscow, Russia.

The aim of the study was to develop some approaches to evaluate the basic parameters of the humoral and cellular immune response to a bacteriophage, taking into account the multifactorial aspects of its interaction with both the pathogen and the macroorganism. The necessary reagents were obtained and a line of diagnostic ELISA test systems was designed to allow semi-quantitative assessment of the anti-bacteriophage IgG-antibody level in serum or other biological human fluids, as well as in preparations obtained from human blood. The need for neutralization reaction to determine the effect of detected antibodies on phage activity against a target bacterium has been proven. Testing the approaches used in the investigation of patients' blood sera showed that antibodies to bacteriophages synthesized during phage therapy are not always neutralizing. Also approaches have been developed to evaluate cell immunity reactions to bacteriophage namely to identify T-lymphocytes (T-helpers and cytotoxic lymphocytes) that can be activated in the presence of the phage under study (by expressing the early activation marker (CD69) and by the ability to produce IFN γ). Aprrobation of the technique in the study of lymphocytes in patients during phage therapy showed the presence of activated cells by both the CD69 expression and IFN γ production, the dynamics of which depended on the timing and frequency of therapy. The appearance of neutralizing anti-phage antibodies and corresponding activated T-lymphocytes should be taken into account in phage therapy, the effectiveness of which can directly depend not only on the activity of the phage against the target bacterium, but also on the response of the patient's immune system to the bacteriophage.

Key words: bacteriophages; IgG-antibodies; humoral immunity; cellular immunity; neutralizing anti-phage antibodies; lymphocytes.

For citation: Bochkareva S.S., Karaulov A.V., Aleshkin A.V., Novikova L.I., Fedorova I.M., Blayaher M.S., Koteleva S.I., Kapustin I.V. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2019; 64 (4): 237-242 (in Russ.)
DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-4-237-242>

For correspondence: Bochkareva Svetlana Sergeevna, senior researcher, laboratory of immunobiological preparations; e-mail: cip1989@gmail.com

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 25.03.2019

Accepted 03.04.2019

Для корреспонденции: Бочкарева Светлана Сергеевна, ст. науч. сотр. лаб. иммунобиологических препаратов; e-mail: cip1989@gmail.com

Введение. Несмотря на то, что исследования бактериофагов проводятся длительное время, в мире насчитывается крайне мало исследовательских центров, использующих фаги в качестве лечебных средств терапии инфекций у людей. Взаимодействие между препаратами фагов и иммунной системой человека стало предметом исследования лишь в последние годы. Имеются данные по изучению антифагового иммунитета в популяции здоровых людей [6]. Обнаружено, что резидентная микрофлора, колонизирующая кишечник человека, в обязательном порядке включает и вирусы (микробиота и вириобиота) [9]. Бактериофаги являются компонентами вириобиоты. Полагают, что кишечник человека содержит около 10^{15} бактериофагов (так называемый «фагеом»), что выше, чем общее содержание в нем микроорганизмов. С помощью современных методов исследования выявлена исключительная микробиологическая обратимость экосистемы кишечника, включая бактериофаги как элементы этой системы [8]. В настоящее время, как в эксперименте, так и на клиническом материале, показано, что введение млекопитающим, в том числе и человеку, бактериофагов, направленных против тех или иных бактерий, активирует в их организме реакции врожденного иммунитета [17], а также сопровождается появлением в кишечнике или в крови антител, направленных против данных бактериофагов [10, 17, 19]. Фаги, присутствующие в кишечнике, могут индуцировать выработку соответствующих антител по доза-зависимому типу при достаточно длительной экспозиции. Если фаг слабо иммуногенен, то только очень высокие его дозы при длительном времени экспозиции могут привести к значимому увеличению специфических иммуноглобулинов в крови [15]. Проведение эффективной фаготерапии требует не только мониторинга специфических антител, но и оценки наличия или отсутствия у выявленных антител нейтрализующего действия на бактериофаг. Кроме того, по мнению ряда авторов, даже выраженный гуморальный ответ на фаги не исключает хорошего эффекта фаготерапии [6, 7, 16].

Действительно, фаги, как и другие вирусы, потенциально способны к взаимодействию с иммунной системой человека. Например, в экспериментах *in vitro* показано, что фаги могут ингибировать активацию и пролиферацию Т-клеток, но механизм этого эффекта до сих пор не установлен [3]. Показано также, что этот процесс сопровождается увеличением количества фагоспецифических В-лимфоцитов и плазматических клеток [10]. Характер и динамика активации Т-лимфоцитов в процессе формирования иммунного ответа на бактериофаги изучены значительно меньше [12]. Совокупность данных о сроках появления активированных клеток, длительности их циркуляции в крови, динамике выработки антител, направленных против бактериофага, в конечном итоге будет определять параметры проведения эффективной фаготерапии при многократных курсах.

Материал и методы. Для отработки методики определения иммунного ответа были использованы сыворотки крови интактных и иммунизированных кроликов, сыворотки крови и выделенные лимфоциты здоровых добровольцев и пациентов, получавших фаготерапию, препараты, полученные из плазмы крови.

В работе были использованы бактериофаги, лизирующие *Paeruginosa* (PA5 – порядок *Caudovirales*, семейство *Myoviridae*, род *Pbunavirus*, регистрационный номер в GenBank KY000082.1; PA10 – порядок

Caudovirales, семейство *Myoviridae*, род *Pakpunavirus*, регистрационный номер в GenBank KY000083.1; PAV1805 – является предметом интеллектуальной собственности; PA1C – порядок *Caudovirales*, семейство *Myoviridae*, род *Phikzvirus*, регистрационный номер в GenBank MK599315), *A.baumannii* (AP22 – порядок *Caudovirales*, семейство *Myoviridae*, род *Ap22virus*, регистрационный номер в GenBank NC_017984.1; AM24 – порядок *Caudovirales*, семейство *Myoviridae*, регистрационный номер в GenBank KY000079.1), *S.aureus* (SCH1 – порядок *Caudovirales*, семейство *Podoviridae*, подсемейство *Picovirinae*, род *P68virus*, регистрационный номер в GenBank KY000084.1; SCH111 – порядок *Caudovirales*, семейство *Podoviridae*, подсемейство *Picovirinae*, род *P68virus*, регистрационный номер в GenBank KY000085.1), *K.pneumoniae* (KPV9024, KPS3 – являются предметами интеллектуальной собственности; KPV811 – порядок *Caudovirales*, семейство *Podoviridae*, подсемейство *Autographivirinae*, род *Kp34virus*, регистрационный номер в GenBank KY000081.1; KPV15 – порядок *Caudovirales*, семейство *Myoviridae*, подсемейство *Tevenvirinae*, род *Jd18virus*, регистрационный номер в GenBank KY000080.1).

Получение кроличьих поликлональных моноспецифических антисывороток к бактериофагам и выделение из них иммуноглобулиновых фракций (использовались в качестве положительного контроля при определении антифаговых антител). Для получения антисывороток к бактериофагам проводили цикл внутримышечных иммунизаций кроликов, состоящий из нескольких (более 3) инъекций соответствующим бактериофагом в физиологическом растворе (концентрация фага 10^8 - 10^{10} БОЕ/мл), смешанным с полным или неполным адьювантом Фрейнда. Иммуноглобулиновую фракцию (Ig-фракцию) выделяли согласно [11].

Иммунохимическая характеристика кроличьих поликлональных моноспецифических антисывороток и выделенных из них иммуноглобулиновых фракций. Использовали метод иммунопреципитации по Оухтерлони [1].

Конструирование иммуноферментной тест-системы для определения антифаговых IgG-антител и проведение иммуноферментного анализа. Антиген (бактериофаг) сорбировали в лунках полистиролового планшета, затем в лунки вносили исследуемый образец, связавшиеся с антигеном IgG-антитела выявляли с помощью конъюгата Protein A-Peroxidase (Sigma, США), а ферментная реакция с добавленным затем субстратом ТМБ (BCM Diagnostics, США) ингибировалась кислотой (стоп-реагент). Регистрировали оптическую плотность в лунках при 450 нм. Положительным контролем служила кроличья антисыворотка к бактериофагу, заведомо содержащая соответствующие антитела, или иммуноглобулиновая фракция антисыворотки, отрицательным контролем – физиологический раствор и сыворотка интактного кролика. Для исключения неспецифической сорбции образцов их вносили также в лунки, не содержащие фаги (так называемые «пустые лунки»). Выбор конъюгата был обусловлен способностью Protein A взаимодействовать с IgG как человека, так и разных видов животных, в частности, кроликов. Ввиду различных физико-химических и биологических свойств бактериофагов были подобраны условия их сорбции как антигенов в лунках планшета (концентрация фагов 10^8 - 10^{11} БОЕ/мл, длительность сорбции в лунках 18-30 ч, темпе-

ратура сорбции +4-8°C). Были также подобраны условия проведения иммуноферментной реакции (концентрации компонентов реакции, температура и длительность этапов инкубации, необходимость встряхивания содержимого планшета во время инкубации). Реакция считалась положительной при достижении оптической плотности, в два раза превышающей оптическую плотность отрицательного контроля (физиологический раствор).

В случае обнаружения в образцах сыворотки крови антифаговых IgG-антител проводили реакцию нейтрализации, позволяющую оценить нейтрализующие свойства этих антител в отношении бактериофагов.

Реакция нейтрализации. Проводили для определения нейтрализующей антифаговой активности выявленных антител согласно [13]. Соответствующую сыворотку крови разводили в 1500 раз в забуференном фосфатами физиологическом растворе (ЗФР) во избежание неспецифической реакции. Затем разведенную сыворотку смешивали с фаголизатом исследуемого бактериофага. Полученную смесь инкубировали в течение 30 минут при 37°C и после инкубации титровали по методу Грация [9]. В контрольном опыте сыворотку не добавляли. Снижение титра бактериофага в смеси с сывороткой крови по сравнению с контролем свидетельствовало о наличии антител, обладающих нейтрализующей антифаговой активностью.

Стимуляция лимфоцитов бактериофагами. Лимфоциты, выделенные из крови центрифугированием в градиенте плотности, вносили в лунки культурального планшета (2,5-3x10⁵ на лунку) и культивировали в присутствии бактериофага в течение 20 ч (37°C, 5% CO₂). Доза бактериофага варьировала от 10⁴ до 10⁷ БОЕ в лунке. В контрольную пробу вносили буфер, используемый на финальной стадии подготовки бактериофага. После культивирования из лунок отбирали супернатанты (для определения в них концентрации ИФН γ или любого другого цитокина) и лимфоциты (для проточной цитометрии).

Оценка продукции цитокинов, индуцированной бактериофагом. В супернатантах (методом ИФА) определяли концентрацию ИФН γ с помощью тест-системы ЗАО Вектор-Бест (Россия).

Оценка активированных бактериофагом Т-лимфоцитов. Методом проточной цитометрии определяли процент активированных Т-хелперов и цитолитических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Применялась трехцветная флуоресцентная метка и следующие комбинации моноклональных антител (Beckman Coulter, США): CD3/CD4/CD69 (FITC/PE/PC7) и CD3/CD8/CD69 (FITC/PE/PC5). Активацию Т-лимфоцитов регистрировали по увеличению среди них количества клеток, экспрессирующих маркер активации CD69. Минимальный прирост показателя, который расценивался как отчетливый признак активации, составлял 2 %.

Результаты и обсуждение. Основным методическим подходом к изучению возможного гуморального ответа на бактериофаги является определение соответствующих антифаговых антител, причем именно IgG-антитела могут служить маркерами такого ответа. В отсутствие коммерчески доступных диагностических систем необходимо было сконструировать тест-системы, позволяющие полуколичественно оценивать наличие в исследуемом образце IgG-антител к тем или иным фагам методом ИФА. Элементами разработанных тест-систем являлись бактериофаги, исследуемые образцы (сыворотка крови

или любая биологическая жидкость), конъюгат Protein A-Peroxidase, положительный (заведомо содержит антитела) и отрицательный (не содержит антитела) образцы. Положительным контролем служили кроличьи поликлональные моноспецифические антисыворотки к фагам и выделенные из них иммуноглобулиновые фракции (Ig-фракции).

Кроличьи антисыворотки, полученные в результате иммунизации бактериофагами PA5, KPV9024, AP22, SCH1, лизирующими, соответственно, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii*, *S.aureus*, и выделенные из них Ig-фракции были проанализированы методом иммунопреципитации по Оухтерлони. Линии преципитации свидетельствовали о наличии антител к соответствующим антигенам (бактериофагам) (рис. 1 см. обложку).

На примере фагов, лизирующих *S.aureus* и *K.pneumoniae*, и соответствующих антисывороток, показано, что антисыворотки строго специфичны. При взаимодействии бактериофагов SCH1 и KPV9024 с антисыворотками, полученными в результате иммунизации другими бактериофагами, линии преципитации отсутствовали (рис. 2 см. обложку).

Важным аспектом оценки антифагового гуморального иммунитета является не только обнаружение специфических антител, но и выяснение вопроса о том, являются ли эти антитела нейтрализующими фаговую активность в отношении бактерии-мишени, что определяется в реакции нейтрализации. При исследовании в реакции нейтрализации кроличьих антифаговых сывороток было обнаружено, что инкубация фагов с соответствующими антисыворотками приводила к значительному ослаблению (в 100 раз в случае фагов AP22 и SCH1) или даже полному отсутствию (в случае фага PA5) лизиса бактерий, а в случае с фагом KPV9024 нейтрализующая активность антисыворотки отсутствовала. Таким образом, было выявлено, что образовавшиеся антитела необязательно обладают свойством нейтрализовать антибактериальную активность фага, что может иметь принципиальное значение при проведении фаготерапии у больных, особенно при повторных курсах.

Полученные кроличьи антифаговые антисыворотки были исследованы методом ИФА с помощью сконструированных тест-систем. В качестве примера в табл. 1 представлены значения оптической плотности при разных разведениях сывороток, полученных при иммунизации фагами PA5 и AP22, и выделенных из них Ig-фракций. Видно, что разведение до 1:6400 кроличьей антисыворотки к PA5 и соответствующей Ig-фракции и до 1:3200 – антисыворотки к AP22 и ее Ig-фракции – давало оптическую плотность около 0,30, т.е. регистрировалась положительная реакция. В то же время сыворотка неиммунизированного (интактного) кролика не вызывала появления окрашивания (оптическая плотность на уровне отрицательного контроля – 0,1). Не развивалось окрашивание также в «пустых лунках» (без фага), что подтверждает также и специфический характер реакции при наличии в иммуноферментной системе всех необходимых элементов (антиген-антитело-конъюгат-субстрат).

Сконструированные тест-системы были апробированы при анализе уровня IgG-антител к бактериофагам (AP22 и PA5) в препаратах, полученных из крови человека – «Габриглобине» (внутривенный иммуноглобулиновый препарат) и «Комплексном иммуноглобулиновом препарате» (предназначен для перорального применения). Титр антител не превышал 1:64 [5]. Наличие анти-

Таблица 1

Выраженность иммуноферментной реакции при анализе кроличьих антисывороток к бактериофагам PA5 и AP22 и выделенных из них Ig-фракций по сравнению с сывороткой крови неиммунизированного кролика (в ед. оптической плотности)

Разведение а/с и Ig-фракции	Оптическая плотность, Ед				Сыворотка крови неиммунизированного кролика
	PA5		KV9024		
	а/с	Ig-фракция	а/с	Ig-фракция	
Без разведения	0,89	0,88	0,69	0,81	0,1
1:100	0,99	0,94	0,86	0,82	-
1:200	0,94	0,83	0,75	0,79	-
1:400	0,84	0,79	0,63	0,74	-
1:800	0,81	0,78	0,47	0,64	-
1:1600	0,61	0,66	0,32	0,50	-
1:3200	0,53	0,53	0,27	0,35	-
1:6400	0,30	0,32	0,18	0,23	-
1:12800	0,16	0,16	0,13	0,13	-

Таблица 2

Наличие антифаговых антител в сыворотке крови пациентов, получавших различные бактериофаги в течение одного или нескольких курсов

Курсы	Применяемые в терапии бактериофаги							
	фаги, лизирующие <i>P.aeruginosa</i>		фаги, лизирующие <i>A.baumannii</i>		фаги, лизирующие <i>S.aureus</i>		фаги, лизирующие <i>K.pneumoniae</i>	
	Методы определения специфических антифаговых антител в сыворотке крови больных							
	ИФА	р-ция нейтрал.	ИФА	р-ция нейтрал.	ИФА	р-ция нейтрал.	ИФА	р-ция нейтрал.
Первичный	+	+	+	+	+	+	-	-
Повторные	+	+	+	+	+	+	+/-*	-

Примечание. * – в зависимости от способа введения бактериофага.

тел такой специфичности в препаратах, полученных из донорской крови, свидетельствует об определенной напряженности антифагового иммунитета в популяции, что согласуется с данными литературы [6,14].

Сконструированные тест-системы были апробированы также при анализе антифагового гуморального иммунитета у пациентов отделения реанимации, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (табл. 2). Было обнаружено, что внутрижелудочный (через зонд) прием бактериофагов, лизирующих *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *S.aureus*, уже через 2–3 недели приводит к появлению антифаговых IgG-антител в различных титрах (1:16-1:4096), причем доказана их нейтрализующая активность. При использовании бактериофагов, лизирующих *K.pneumoniae*, методом ИФА антитела были зафиксированы у пациентов, получавших фаг путем сочетанного внутрижелудочного введения через зонд и инстилляций в инфицированный локус. Однако нейтрализующей активности у данных антител обнаружено не было. При всех иных местных способах введения фагов, лизирующих *K.pneumoniae*, как при первичном, так и при повторных курсах, специфические антитела у пациентов не выявлялись.

При фаготерапии можно ожидать и реакции клеточного иммунитета больного на используемый фаг как на вирусную частицу. Исследование этого феномена тре-

бует выбора соответствующих методических подходов. Широко распространен метод, позволяющий выявлять активированные, способные распознавать исследуемые антигены, Т-лимфоциты по экспрессии на них раннего маркера активации (CD69) и по их способности продуцировать ИФН γ [2,19], но для каждого вида антигенов требуется отработка технических деталей. В качестве апробации использованного подхода к оценке параметров антифагового ответа клеточного звена иммунитета на выраженность экспрессии CD69 и способность к продукции ИФН γ были исследованы лимфоциты, полученные от здоровых добровольцев, пациентов, получающих фаготерапию впервые, и пациентов, проходящих повторные курсы фаготерапии. Образцы лимфоцитов от больных были получены в динамике фаготерапии (до введения каких-либо фагов, через 2 недели и через 6 недель после введения – перед началом следующего курса фаготерапии).

Результаты эксперимента по подбору дозы бактериофага при оценке количества активированных лимфоцитов представлены в табл. 3. Высокие дозы бактериофагов (10^7 - 5×10^7 БОЕ/мл) вызывали активацию клеток даже у здоровых лиц, никогда не имевших контакта с фагами, в 100% случаев. Промежуточная доза 5×10^6 БОЕ/мл активировала лимфоциты в 44% случаев, а доза 10^6 БОЕ/мл не вызывала активации лимфоцитов у здоровых лиц

Таблица 3

Среднее увеличение количества активированных (CD69+) Т-хелперов и ЦТЛ среди лимфоцитов здоровых людей, стимулированных *in vitro* разными дозами бактериофагов (БОЕ/мл)

Субпопуляция лимфоцитов крови	Прирост (%) активированных CD69+ при дозе бактериофага			
	10 ⁶	5x10 ⁶	10 ⁷	5x10 ⁷
Т-хелперы CD3+CD4+	0,8	2,2	3,6	9,7
ЦТЛ CD3+CD8+	1,8	5,7	7,3	5,6

Таблица 4

Результаты проточной цитометрии по выявлению активации лимфоцитов у пациентов при первичном и повторном курсах фаготерапии

Курс фаготерапии		Диапазон прироста (%) CD69+клеток при стимуляции бактериофагом <i>in vitro</i>		
		до лечения	через 2 недели	через 3 недели
первичный	среди Т-хелперов	0,1 - 0,7	1,2 - 2,7	1,6 - 1,9
	среди ЦТЛ	0,5 - 2,1	0,4 - 5,6	0,2 - 6,3
повторный	среди Т-хелперов	0,1 - 4,2	10,6 - 12,3	4,7 - 8,3
	среди ЦТЛ	5,8 - 7,6	7,5 - 10,0	6,8 - 7,8

и была в дальнейшем использована для анализа активированных лимфоцитов у больных.

Предполагалось, что активация лимфоцитов в ответ на дозу фага 10⁶ БОЕ/мл и одновременное отсутствие активации «посторонним» бактериофагом будет указывать на присутствие в крови пациента антигенспецифических Т-лимфоцитов.

Результаты исследования лимфоцитов больных на фоне фаготерапии представлены в табл. 4. Перед началом первого курса фаготерапии в крови пациентов не выявлялись Т-лимфоциты, способные активироваться в присутствии бактериофагов. Однако, через 2 и через 3 недели ЦТЛ, активирующиеся в присутствии бактериофага, применяемого для терапии, обнаруживались у 90% больных и, напротив, Т-хелперы активировались только у 14%.

В культурах лимфоцитов крови пациентов, обследованных до начала повторной фаготерапии, получавших повторные курсы тем же фагом, активация ЦТЛ бактериофагом *in vitro* выявлялась в 100%, а Т-хелперов – в 66%. Через 2 и 3 недели после повторного курса у всех больных из этой подгруппы бактериофагом активировались обе субпопуляции Т-лимфоцитов.

Приведенные результаты показывают, что увеличение количества Т-лимфоцитов с иммунофенотипом CD69+ при их культивировании с бактериофагом, примененным для лечения, может служить признаком того, что в крови человека циркулируют Т-клетки, специфически распознающие данный фаг. Не весь наблюдаемый прирост CD69+ Т-хелперов и ЦТЛ обеспечивался антигенспецифическими клетками, но различие в ответе одной и той же культуры лимфоцитов на разные виды фагов, позволяет считать, что запускается этот процесс специфическими Т-лимфоцитами.

Антигенная активация Т-лимфоцитов может быть выявлена также по увеличению продукции ими ИФН γ [2]. При изучении фаг-опосредованной стимуляции выработки ИФН γ необходимо было подобрать дозу бактериофага, а также выбрать граничное значение показателя, при превышении которого эффект активации может быть с уверенностью зарегистрирован.

В группе здоровых людей, не контактировавших ра-

нее с примененными в исследовании различными бактериофагами, стимуляция лимфоцитов крови высокими дозами фага (10⁷ - 5x10⁷ БОЕ/мл) вызывала повышение продукции ИФН γ этими клетками на 50-340 пг/мл. При дозе бактериофага 5x10⁶ БОЭ/мл в 33% образцов наблюдалось повышение концентрации более чем на 50 пг/мл, а при дозе 10⁶ БОЭ/мл – ни в одном образце лимфоцитов, полученном от здоровых лиц, активация не превышала 50 пг/мл (в среднем она составляла 26 пг/мл). Таким образом, доза бактериофага 10⁶ БОЕ/мл была признана оптимальной для обследования больных, а 50 пг/мл ИФН γ – граничным значением для эффекта антигенной активации.

Изучение фаг-опосредованной стимуляции выработки ИФН γ лимфоцитами больных, получавших фаготерапию, продемонстрировало, что до начала лечения практически не выявлялось повышения секреции ИФН γ (1,5–9,4 пг/мл). Значимый прирост концентрации ИФН γ после первичного курса фаготерапии (54–240 пг/мл) начинал регистрироваться не ранее срока в 2 нед или даже через 4–5 недель.

Заключение. Были отработаны подходы к оценке ответа иммунной системы (ее гуморального и клеточного звена) на введение бактериофагов человеку. Оценка гуморального ответа заключается в выявлении антител к бактериофагам и определения их нейтрализующей активности. Оценка клеточного ответа состоит в выявлении Т-лимфоцитов, способных распознавать антигены бактериофага, примененного для фаготерапии. Предложенные *in vitro* методики позволят получить информацию о том, развивается или нет иммунный ответ на конкретный бактериофаг при проведении фаготерапии, в какие сроки после начала лечения появляются соответствующие антитела и активированные клетки и насколько длительно они циркулируют в крови, что в случае снижения эффективности терапии позволит скорректировать штаммовый состав препаратов бактериофагов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–19 см. REFERENCES)

1. Иммунологические методы. Фримель Г., ред. М.: Медицина; 1987.
2. Луцкий А.А., Жирков А.А., Лобзин Д.Ю., Рао М., Алексеева Л.А., Мейер М. и др. Интерферон- γ : биологическая функция и значение для диагностики клеточного иммунного ответа. *Журнал Инфектологии*. 2015; 7 (4): 10-22.

REFERENCES

1. Immunological methods [Immunologicheskie metody]. Frimel G., ed. Moscow: Meditsina; 1987. (in Russian)
2. Lutskii A.A., Zhirkov A.A., Lobzin D.Yu., Rao M., Alekseeva L.A., Meier M. et al. Interferon- γ : biological function and significance for the diagnosis of cellular immune response. *Zhurnal infektologii*. 2015; 7 (4): 10-22. (in Russian)
3. Avgustin B., Kotnik V., Skoberne M., Malovrh T., Skralovnik-Stern A., Tercej M. CD69 expression on CD4+ T lymphocytes after in vitro stimulation with tuberculin is an indicator of immune sensitization against Mycobacterium tuberculosis antigens. *Clin. diagn. lab. immunol.* 2005; 12 (1): 101–6.
4. Bacteriophages: Biology and Application. Kutter E., Sulakvelidze A., eds. CRC Press, Boca Raton, FL.; 2005.
5. Bochkareva S.S., Aleshkin A.V., Ershova O.N. et al. Anti-phage antibody response in phage therapy against healthcare-associated infections (HAIs). *Infektsionnye Bolezni*. 2017; 15(1): 35-40.
6. Bruttin A, Brussow H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005; 49 (7): 2874-8.
7. Dąbrowska K., Miernikiewicz P., Piotrowicza A. et al. Immunogenicity studies of proteins forming the t4 phage head surface. *Journal of Virology*. 2014; 8 (21): 12551-7.
8. Dalmaso M, Hill C, Ross RP. Exploiting gut bacteriophages for human health. *Trends Microbiol*. 2014; 22 (7): 399-405.
9. Duerkop B. A., Hooper L. V. Resident viruses and interaction with the immune system. *Nat. immunol.* 2013; 14 (7): 654-9.
10. Henry K.A., Murira A., Van Houten N. E., Scot J. K. Developing strategies to enhance and focus humoral immune responses using filamentous phage as a model antigen. *Bioengineered Bugs*. 2011; 2 (5) 275-83.
11. Hudson L., Hay F.C. Practical immunology. Blackwell Scientific, Oxford, 1976.
12. Kim K.P., Cha J.D., Jang E.H., Klumpp J., Hagens S., Hardt W.D. et al. PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immuneresponse. *Microb Biotechnol*. 2008; 1(3): 247-57.
13. Lanni F., Lanni Y. T. Antigenic structure of bacteriophage. *Cold Spring Harb Symp. Quant Biol*. 1953; 18: 159-68.
14. Łusiak-Szelachowska M., Zaczek M., Weber-Dąbrowska B., Międzybrodzki R., Kłak M., Fortuna W., et al. Phage neutralization by sera of patients receiving phage therapy. *Viral Immunology*. 2014; 27 (6): 295-304.
15. Majewska J., Beta W., Lecion D., Hodyra-Stefaniak K., Kłopot A., Kaźmierczak Z. et al. Oral application of T4 phage induces weak antibody production in the gut and in the blood. *Viruses*. 2015; 7(8): 4783-99.
16. Pescovitz M.D., Torgerson T.R., Ochs H.D., Ocheltree E., McGee P., Krause-Steinrauf H. et al. Effect of rituximab on human in vivo antibody immune responses. *Journal allergy clinical immunology*. 2011; 6: 1295-1302.
17. Van Belleghem J.D., Dąbrowska K., Vaneechoutte M., Barr J. J., Bollyky P.L. Interactions between Bacteriophage, Bacteria, and the Mammalian Immune System. *Viruses*. 2019; 11 (1): 10.
18. Won D. I., Park J. R. Flow cytometric measurements of TB-specific T cells comparing with QuantiFERON-TB Gold. *Cytometry Part B (Clinical Cytometry)*. 2010; 78(2): 71–80.
19. Zaczek M., Łusiak-Szelachowska M., Jończyk-Matysiak E., Weber-Dąbrowska B., Międzybrodzki R., Owczarek B. et al. Antibody Production in Response to Staphylococcal MS-1 Phage Cocktail in Patients Undergoing Phage Therapy. *Front Microbiol*. 2016; 24 (7): 1681.

Поступила 25.03.19

Принята к печати 03.04.19

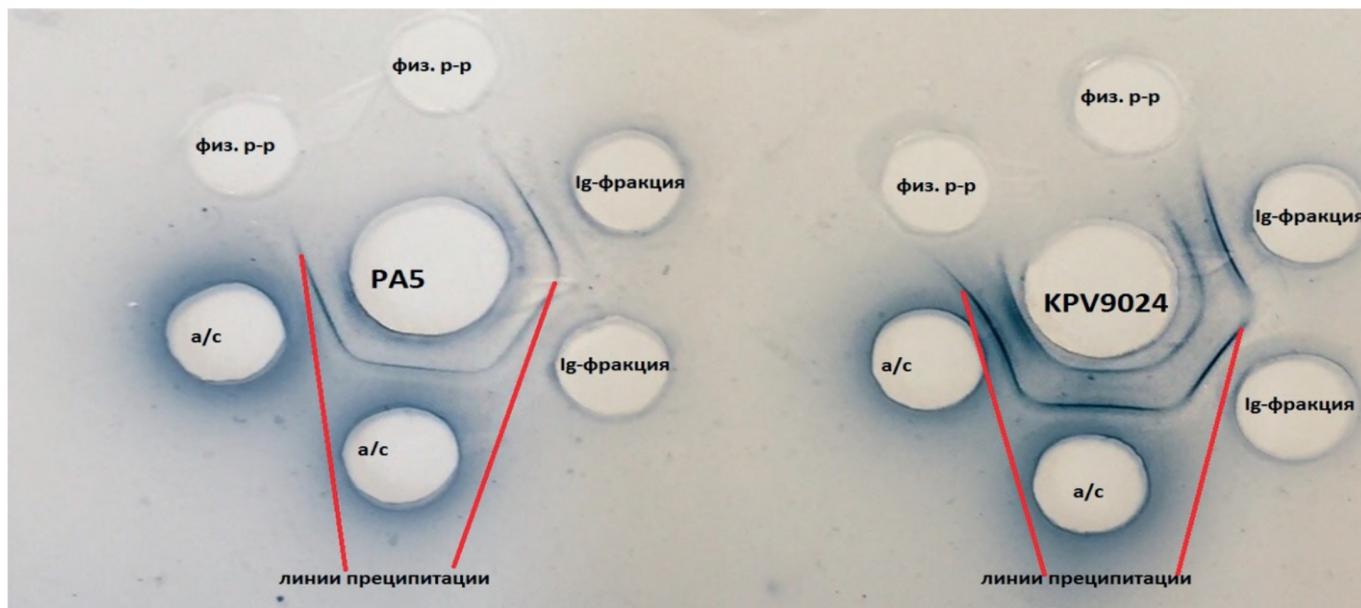


Рис. 1. Иммунохимическая характеристика антифаговых сывороток и выделенных из них Ig-фракций с помощью иммунопреципитации по Оухтерлони (центральные лунки – фаги РА5 и КРV9024 в титре 10^{10} БОЕ/мл, периферические лунки – соответствующие кроличьи моноспецифические антисыворотки к фагам, соответствующие Ig-фракции, физиологический раствор)

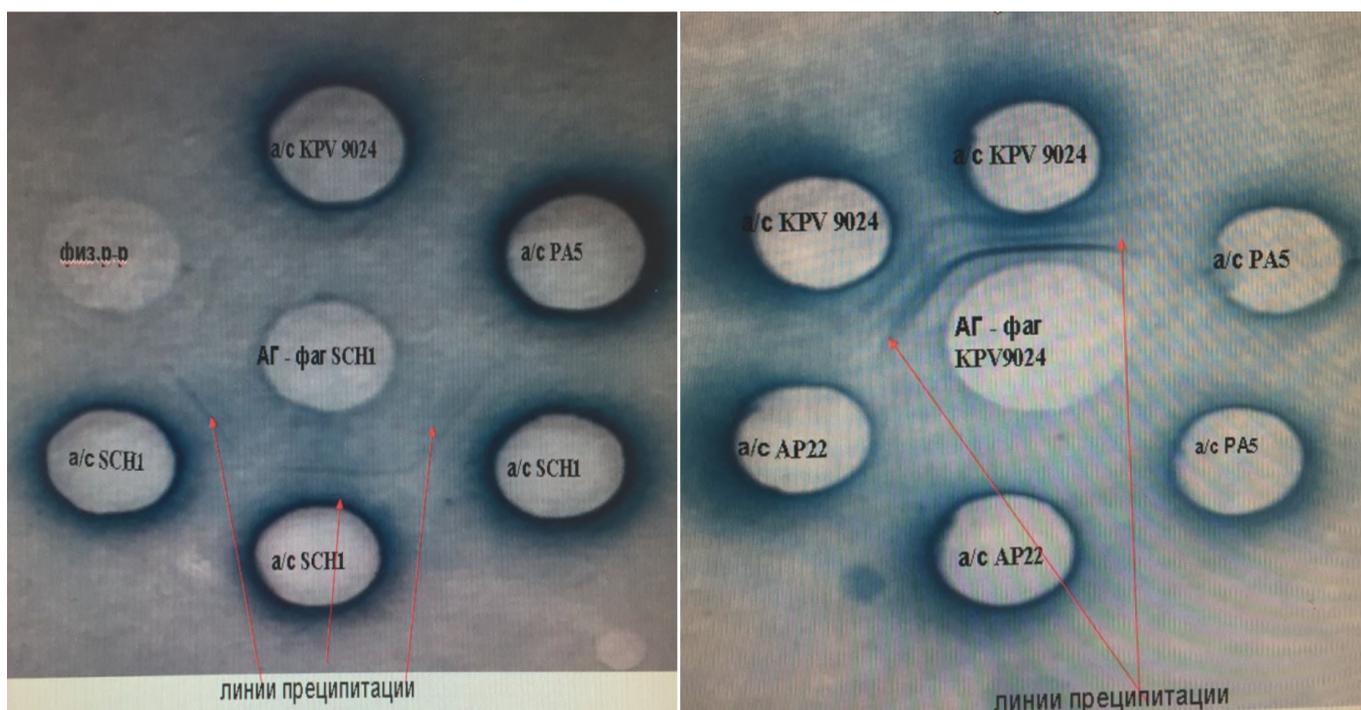


Рис. 2. Проверка специфичности антисывороток к фагу SCH1, лизирующему *S. aureus*, и фагу KPV9024, лизирующему *K. pneumoniae*, методом иммунопреципитации по Оухтерлони (центральные лунки – фаг SCH1 или фаг KPV9024 в титре 10^{10} БОЕ/мл, периферические лунки – кроличьи моноспецифические антисыворотки к фагам SCH1, KPV9024, PA5, AP22, физиологический раствор).