

# Wpływ bakteriofagów na aktywację nabłonka ludzkich dróg oddechowych

## The effect of bacteriophages on the activation of the human respiratory epithelium

JANINA ŁUCJA GRZEGORCZYK, JAGODA STANISŁAWSKA, KINGA SŁOWIŃSKA, ALEKSANDRA KARYŚ, MARZANNA JARZĘBSKA, BOGUSŁAW TYMONIUK, MACIEJ CHAŁUBIŃSKI, ADRIAN GAJEWSKI, MARCIN KUROWSKI, MAREK L. KOWALSKI

Klinika Immunologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Praca finansowana z projektu „Constructing a ‘Eubiosis Reinstatement Therapy’ for Asthma” CURE

Praca przygotowana w ramach aktywności Sekcji Tematycznej Polskiego Towarzystwa Alergologicznego „Mikrobiom, infekcje, a alergja”

### Streszczenie

Bakteriofagi wykazują właściwości przeciwzapalne poprzez oddziaływanie na układ odpornościowy drogą obniżenia poziomu cytokin oraz innych mediatorów prozapalnych. Nabłonek dróg oddechowych stanowi istotną, mechaniczną barierę obronną odporności przeciwzakaźnej. Odgrywa również kluczową rolę w kontrolowaniu wielu funkcji dróg oddechowych. Jest źródłem cytokin i mediatorów biorących udział w procesie zapalnym. W niniejszej pracy wykazano zróżnicowany, zależny od czasu działania i stężenia bakteriofagów wpływ na syntezę kwasu 15-HETE, jak również właściwości regeneracyjne nabłonka oddechowego. Wyniki uzyskane w pracy mogą pozwolić na lepsze zrozumienie oddziaływania bakteriofagów obecnych w organizmie człowieka na procesy immunologiczne.

**Słowa kluczowe:** bakteriofagi, nabłonek oddechowy, mediatorzy zapalne, regeneracja, zapalenie

### Summary

Bacteriophages show anti-inflammatory properties by affecting the immune system by lowering the level of cytokines and other pro-inflammatory mediators. The epithelium of the respiratory tract is an important mechanical defensive barrier of immunity. It also plays a key role in controlling many of the functions of the airways. It is a source of cytokines and mediators involved in the inflammatory process. In this study, a divergent, time- and concentration-dependent effect on the synthesis of 15-HETE as well as the regenerative properties of the respiratory epithelium was demonstrated. The results obtained in the study may allow for a better understanding of the influence of bacteriophages present in the human body on immunological processes.

**Keywords:** bacteriophages, airway epithelium, inflammatory mediators, regeneration, inflammation

© Alergia Astma Immunologia 2022, 27 (4): 128-134  
www.alergia-astma-immunologia.pl



### Adres do korespondencji / Address for correspondence

Prof. dr hab. n med. Janina Grzegorzczak  
Klinika Immunologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi  
Ul. Pomorska 251,  
92-213 Łódź  
tel. 42 675 73 09.  
nina\_grzegorzczak@op.pl

### Wykaz skrótów:

**BEAS-2B** – linia ludzkich komórek nabłonka oddechowego  
**15-HETE** – kwas 15-hydroksyeikozatetraenowy  
**IFN-gamma** – interferon-gamma  
**PAMP** – wzorce molekularne związane z patogenami

**LPS** – lipopolisacharyd  
**PGE2** – prostglandyna E2  
**SEA** – toksyna gronkowcowa  
**TLR** – receptory Toll-podobne  
**TNF-alfa** – tumor necrosis factor-alpha

### Wprowadzenie

W świetle współczesnych badań bakteriofagi będące wirusami bakteryjnymi stanowią istotny element mikrobioty człowieka. Poprzez regulację procesów fizjologicznych, jak i patologicznych wpływają na utrzymanie homeostazy organizmu. Oddziałują na komórki ludzkie m.in. po-

zez łączenie się domen Ig-podobnych (występujących na kapsydach bakteriofagów) z białkami mucyny. Wpływają na tworzenie przerzutów i degenerację komórek nowotworowych. Występują licznie w organizmie ludzkim. Są obecne na skórze, w jamie ustnej a także w regionach – powszechnie uznawanych za jałowe – takich jak krew, lim-

fa czy narządach – płuca, wątroba, nerki, drogi moczowe oraz mózg, co wskazuje na zdolność przekraczania bariery krew- mózg [1,2]. W organizmie ludzkim zachodzi ciągła transcytoza fagów poprzez komórki nabłonka, rozpraszając te cząstki z jelit do innych narządów. Międzykomórkowy transport polegający na przenoszeniu cząsteczek bakteriofagów poprzez wnętrze komórki jest naturalnym i wszechobecnym procesem, tłumaczącym ich występowanie w całym organizmie i potwierdzającym założenia o *phagoeme*.

Ciągły przepływ fagów z jelit i ich dystrybucja przez krew oraz limfę może zapewnić gospodarzowi ochronę przed wtargnięciem oportunistycznych bakterii jelitowych. Transcytoza fagów może dodatkowo wpływać na procesy przebiegające w komórkach eukariotycznych. Istnieją badania potwierdzające tezę, że pomiędzy bakteriofagami, a komórkami eukariotycznymi dochodzi do horyzontalnej wymiany genów [2]. Wykazano także symbiotyczną reakcję między fagiem a gospodarzem wielokomórkowym, w tym ludzkim, zapewniającą aktywną ochronę powłoki śluzowej jelit przed zakażeniem bakteryjnym.

Bakteriofagi wykazują właściwości przeciwpalną poprzez oddziaływanie na układ odpornościowy drogą obniżenia poziomu cytokin oraz innych mediatorów prozapalnych. U pacjentów z przewlekłą, oporną na antybiotykoterapię infekcją bakteryjną zastosowanie fagoterapii spowodowało istotny spadek poziomu białka CRP, liczby leukocytów oraz wskaźnika opadania krwinek (OB) [3]. Skuteczność fagoterapii w połączeniu z antybiotykoterapią wykazano w leczeniu wielobakteryjnej, opornej na antybiotyki infekcji kości. Zaobserwowano szybsze gojenie się ran oraz eliminację zakażenia bakteryjnego i uniknięcie amputacji kończyny dolnej u chorego [4]. Obserwacje te promują do poszukiwań odpowiedzi na pytanie dotyczące wpływu bakteriofagów na proces regeneracji tkanek i innych aktywności komórek – w tym nabłonka – u człowieka.

Nabłonek dróg oddechowych stanowi istotną, mechaniczną barierę obronną odporności przeciwpalną. Odgrywa również kluczową rolę w kontrolowaniu wielu funkcji dróg oddechowych. Jest źródłem cytokin i mediatorów biorących udział w procesie zapalnym [5]. Komórki nabłonka generują spontanicznie, jak i po stymulacji, różnorodną gamę mediatorów lipidowych, czynników wzrostu i białek zwiężających oskrzela, a także chemokin m.in IL-8 i cytokin IL-1, IL-6, IL-11. Są również głównym źródłem metabolitów kwasu arachidonowego, które regulują napięcie mięśni gładkich dróg oddechowych, wydzielanie śluzu nabłonkowego, uwalnianie neuroprzekazników i proces zapalny. Uszkodzenie nabłonka oddechowego przez szeroko rozumiane czynniki środowiskowe skutkuje uwolnieniem szeregu substancji bioaktywnych i stałą odnową komórkową.

Regeneracja uszkodzenia jest zasadniczą funkcją nabłonka dróg oddechowych w odpowiedzi na urazy w przebiegu przewlekłych chorób dróg oddechowych i wdychane patogeny [6]. Takie czynniki, jak zanieczyszczenie powietrza, alergeny, dym tytoniowy, wirusy i bakterie mogą prowadzić do uszkodzenia nabłonka dróg oddechowych, wymuszając tym samym zapoczątkowanie i regulację procesów naprawczych. Dochodzi do aktywacji komórek i migracji nabłonka w celu odnowy uszkodzonej powierzchni. Całkowita regeneracja może być osiągnięta poprzez współdziałanie wielu procesów takich, jak proliferacja komórek multipotencjalnych nabłonka, aktywna mitozą oraz po-

nowne różnicowanie komórek, pozwalające na osiągnięcie pierwotnej formy pseudoskratyfikowanego nabłonka śluzówkowo-rzęskowego dróg oddechowych. Upośledzoną funkcję barierową nabłonka oddechowego, zmiany patologiczne oraz osłabienie migracji komórek wykazano w przebiegu chorób zapalnych dróg oddechowych takich jak astma oskrzelowa, przewlekłe zapalenie błony śluzowej nosa i zatok czy przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc – POCHP [7,8,9]. Upośledzona regeneracja nabłonka sprzyja utrzymywaniu się stanu zapalnego i prowadzi do przebudowy (*remodelling*) ściany dróg oddechowych w astmie.

Znaczenie bakteriofagów w procesach fizjologicznych i patologicznych zachodzących w komórkach nabłonka oddechowego nie jest jeszcze dobrze poznane. Celem pracy było określenie roli bakteriofagów w aktywacji komórek nabłonka poprzez zbadanie *in vitro* ich wpływu na regenerację komórek nabłonka, uwalnianie metabolitów kwasu arachidonowego (15-HETE) i prostaglandyny E2 (PGE2) oraz generację wybranych cytokin.

## Materiał i metody

Do realizacji celu badań wykorzystano hodowlę komórek nabłonka dolnych dróg oddechowych linii BEAS-2B (ludzki nabłonek oskrzeli unieśmiertelniony adenowirusem 12-SV40; American Typ eCulture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) spontaniczną oraz poddaną działaniu bakteriofagów (skierowanych przeciwko *Staphylococcus* i *Streptococcus*) oraz toksyn bakteryjnych (lipopolisacharyd – LPS i toksyna gronkowcowa – SEA). Komórki nabłonka hodowano wg wystandaryzowanej metody [5]. Po uzyskaniu wzrostu zlewnego, komórki BEAS-2B były poddawane trypsynizacji za pomocą 0,25% roztworu trypsyny – EDTA (Sigma) i kontynuowano hodowlę w podłożu hodowlanym w celu namnożenia komórek. Komórki o gęstości  $1 \times 10^6$  kom/mL wysiewano na szalki Petriego o średnicy 35mm z 2 mm siatką w celu oceny regeneracji, a w uzyskanych po hodowli nadsączach oceny uwalniania metabolitów kwasu arachidonowego oraz IL-6.

## Przygotowanie bakteriofagów

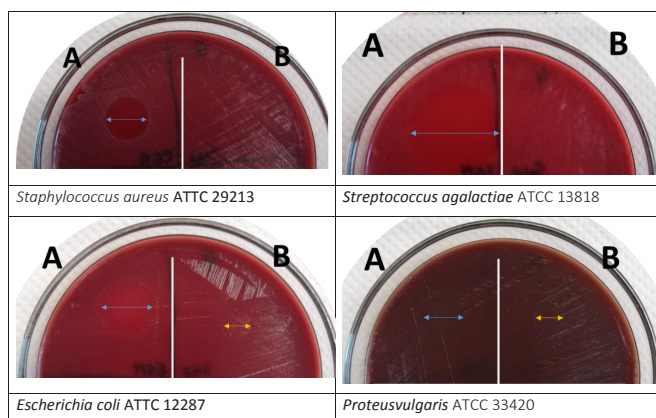
Preparat leczniczy bakteriofagów – 10 mL (Fersis Bacteriophage, ELIVA George Elivalnstitute of Bacteriophages, Microbiology and Virology). W celu zagęszczenia, poddawano ultra wirowaniu w jałowych warunkach 25000 x g; 60 min; 8°C; nadsącz usuwano a do próbki dodawano 1 mL podłoża hodowlanego. W tak przygotowanej próbce oznaczono stężenie białka przy użyciu testu Urinary/CSF Protein za pomocą aparatu BeckmanCoulter. Aktywność lityczną bakteriofagów sprawdzono w odniesieniu do referencyjnych szczepów bakteryjnych. Aktywność lityczną preparatu leczniczego bakteriofagów Fersis Bacteriophage, ELIVA George Elivalnstitute of Bacteriophages, Microbiology and Virology oceniono na podstawie zmodyfikowanej metody Kirby-Bauera w odniesieniu do szczepów referencyjnych bakterii tj.: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Streptococcus agalactiae* ATCC 13818, *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 12287, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus mirabilis* ATCC 21100, *Proteus vulgaris* ATCC 33420. Przygotowywano inoculum bakterii według wzorca zmełnienia – 0,5 w skali McFarlanda – z 4-5 kolonii o tym samym wyglądzie

z podłoża stałego w jałowej soli fizjologicznej. Następnie szczepy referencyjne wysiewano na murawę na podłożu stałe Mueller Hinton Agar z 5% dodatkiem krwi baraniej, po czym nakrapiano 10 $\mu$ L zawiesiny bakteriofagów z preparatu wyjściowego lub roztworu gentamycyny o stężeniu 5  $\mu$ g/mL jako kontroli dodatniej. Inkubowano 24 godziny w temperaturze 37°C, atmosferze tlenowej bez dodatku CO<sub>2</sub>. Po tym czasie w miejscu naniesionego preparatu mierzono średnice strefy zahamowania wzrostu bakterii (Rycina 1). Uzyskane wyniki średnicy zahamowania wzrostu przedstawiono w tabeli nr I.

Preparat bakteriofagów Fersis Bacteriophage wykazywał aktywność lityczną tylko względem wzorcowych szczepów bakterii Gram-ujemnych: *Escherichia coli* ATCC 12287, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus mirabilis* ATCC 21100, *Proteus vulgaris* ATCC 33420. Jednak obserwowana strefa zahamowania wzrostu drobnoustrojów była mniejsza niż w przypadku zastosowanego układu kontrolnego – gentamycyny o stężeniu 5  $\mu$ g/mL. Nie wykazano aktywności litycznej zastosowanego preparatu bakteriofagów względem referencyjnych szczepów bakterii Gram-dodatnich z rodzaju *Streptococcus* oraz *Staphylococcus*.

### Model uszkodzenia i ocena regeneracji

Po uzyskaniu wzrostu zlewnego na szalkach Petriego, hodowle uszkodzono mechanicznie za pomocą jałowej końcówki pipety a następnie dodawano odpowiednio 1mL podłoża hodowlanego (hodowla spontaniczna); bakteriofagi o stężeniu białka odpowiednio – 1,42 $\mu$ g/mL; 0,71 $\mu$ g/mL; 0,284 $\mu$ g/mL; 0,142 $\mu$ g/mL; LPS – 50 $\mu$ g/mL oraz SEA – 100 $\mu$ g/mL). Regenerację komórek nabłonka oceniano w 3 seriach doświadczeń w czasie T<sub>0</sub>, oraz po 2, 4, 6, 12 i 24 godzinach działania na nie bakteriofagów lub toksyn bakteryjnych. Uszkodzenie oceniano w tych samych kwadratach siatki za pomocą mikroskopu z odwróconym polem widzenia Olympus CK2 (Olympus Optical, Middlesex, UK) wyposażonego w kamerę cyfrową Olympus 304Z oraz system do wizualnej analizy obrazu CellSens Standard. Pole powierzchni uszkodzenia mierzono w każdym z 4 kwadratów na jednej płytce i oceniano naprawę wyliczając % regeneracji wg wzoru Koff i wsp. [6,7].



Ryc. 1. Reprezentatywne obrazy strefy zahamowania wzrostu wybranych, wzorcowych szczepów bakterii. Strzałkami zaznaczono strefę zahamowania wzrostu drobnoustrojów, którą mierzono i analizowano. A – gentamycyna [5  $\mu$ g/mL]; B – preparat bakteriofagów Fersis Bacteriophage.

### Ocena uwalniania metabolitów kwasu arachidonowego – 15(S)-HETE i PGE2 oraz IL-6

Komórki nabłonka (po uzyskaniu wzrostu zlewnego; 1 mL o gęstości 1x10<sup>6</sup> /mL) przenoszono na 24-dółkowe płytki i dodawano odpowiednio bakteriofagi oraz LPS i SEA. Kontrolę stanowiły komórki zawieszony w podłożu hodowlanym. Komórki inkubowano (temp. 37°C; 5% CO<sub>2</sub> oraz 95% wilgotności) przez 2, 4, 6, 24 lub 48 godzin. Po tym czasie próbki wirowano 1200obr/min. przez 10 min. a uzyskany nadśącz zabezpieczano w temp. -70°C. Ocena stężenia wydzielanych metabolitów kwasu arachidonowego oraz IL-6 przez komórki nabłonka wykonano przy użyciu komercyjnych zestawów ELISA (Tab. 2).

### Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej przeprowadzonej w programie Statistica 13PL (*StatSoft Polska, Kraków, Polska*). Wartości parametryczne były analizowane za pomocą testu T-Studenta, dla prób niezależnych. Do sprawdzenia zmiennych nieparametrycznych zastosowano test U-Manna Whitney'a. Za istotność statystyczną przyjmowano poziom ufności p $\leq$ 0,05.

### Wyniki

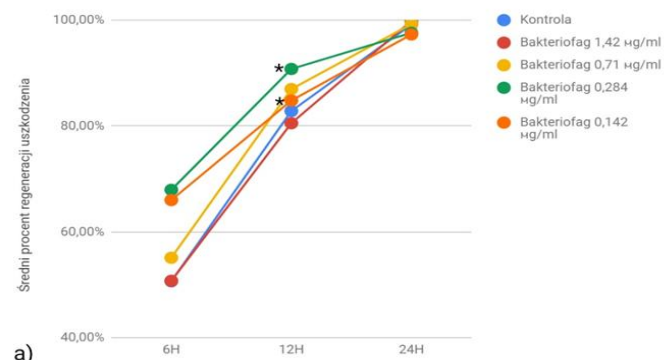
Ocena regeneracji uszkodzenia komórek nabłonka pod wpływem bakteriofagów i toksyn bakteryjnych

Regeneracja uszkodzeń komórek nabłonka poddanych działaniu bakteriofagów różniła się istotnie statystycznie (p $\leq$  0,05) w porównaniu do próby spontanicznej. Różnice te zaobserwowano po 12 godzinach inkubacji komórek z bakteriofagami o stężeniu białka równym 0,284  $\mu$ g/mL oraz 0,142  $\mu$ g/mL.

Po inkubacji komórek nabłonka w obecności toksyn bakteryjnych, statystycznie istotne różnice – w odniesieniu do próby spontanicznej odnotowano po 24 godzinach inkubacji komórek nabłonka w obecności SEA (p $\leq$ 0,05).

### Ocena uwalniania metabolitów kwasu arachidonowego 15-HETE i PGE2

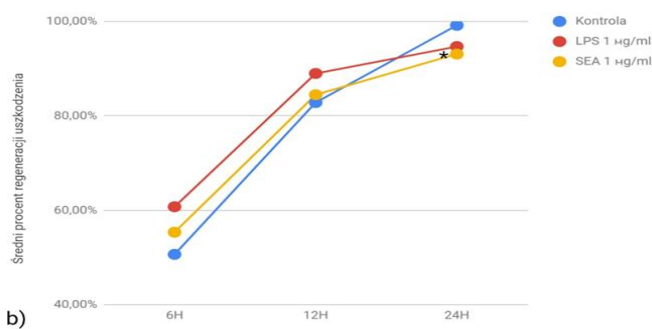
Uwalnianie metabolitów kwasu arachidonowego oceniano w nadśączach po hodowli komórek nabłonka BE-AS-2B przez 2, 4, 6 godzin w obecności bakteriofagów lub toksyn bakteryjnych LPS, SEA. Analiza porównawcza



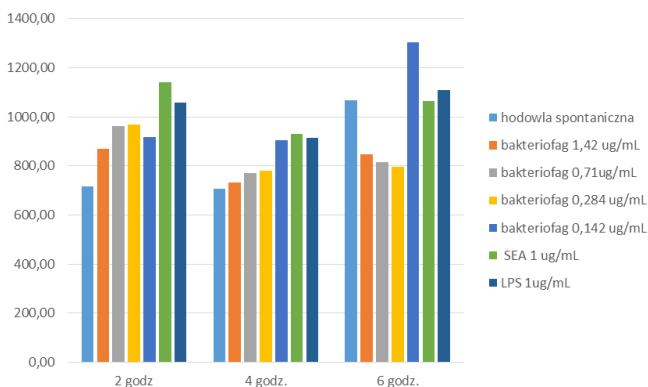
Ryc. 2. Średni procent regeneracji uszkodzenia komórek nabłonka BE-AS-2B w hodowli z lub bez bakteriofagami [0,142-1,42 $\mu$ g/mL].

Tabela I. Średnica strefy zahamowania wzrostu drobnoustrojów referencyjnych względem preparatu bakteriofagów Fersis Bacteriophage.

Gatunek	Strefa zahamowania wzrostu [mm]	
	Gentamycyna 5 µg/mL	Preparat bakteriofagów
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATTC 49619	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	12	-
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13818	25	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 15305	20	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	14	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	16	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 12287	15	7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	13	8
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 21100	10	7
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 33420	12	8

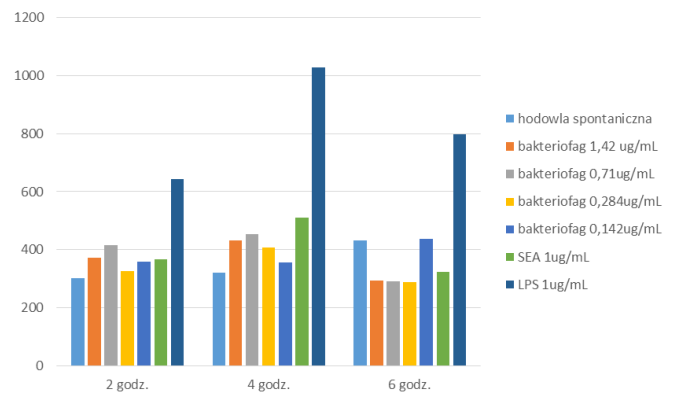


Ryc. 3. Średni procent regeneracji uszkodzenia komórek nabłonka BEAS-2B w hodowli z lub bez bakteryjnymi endotoksynami: LPS [1µg/mL] lub SAE [1µg/mL].

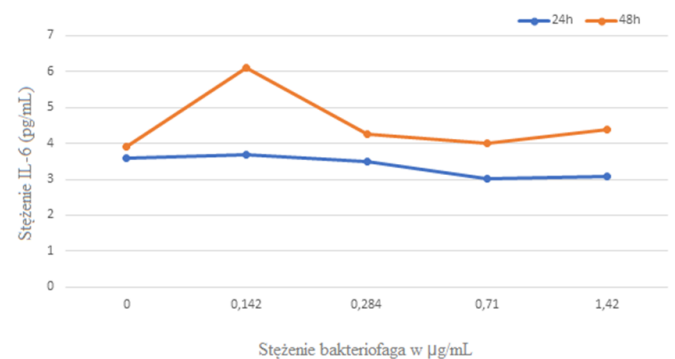


Ryc.4. Średnie stężenie [pg/mL] 15-HETE wydzielonego przez komórki nabłonka BEAS-2B po stymulacji bakteriofagami lub toksynami bakteryjnymi: LPS, SAE.

wskazywała na tendencje wzrostowe po indukcji komórek nabłonka bakteriofagami w odniesieniu do próby spontanicznej (komórki hodowane bez obecności bakteriofagów), jednak dla przyjętego poziomu istotności  $p \leq 0,05$  różnice te nie były istotne statystycznie (Ryc. 4-5).



Ryc. 5. Średnie stężenie [pg/mL] PGE2 wydzielonego przez komórki nabłonka BEAS-2B po stymulacji bakteriofagami lub toksynami bakteryjnymi: LPS, SAE.



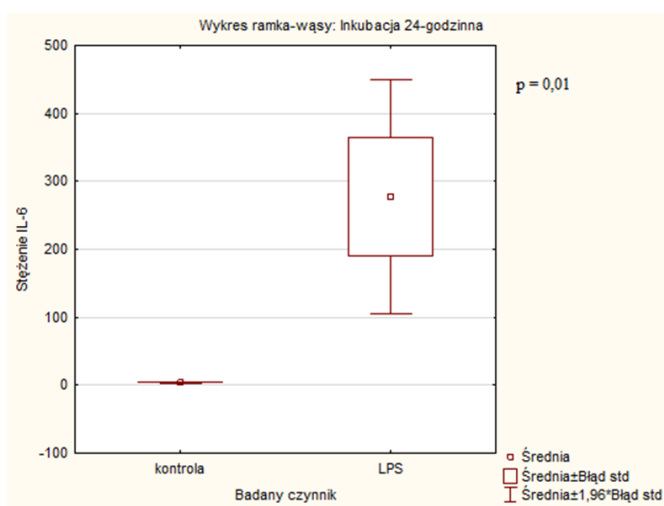
Ryc. 6. Stężenie IL-6 produkowanej przez komórki nabłonka BEAS-2B po 24 i 48 godzinnej stymulacji bakteriofagami [0,142-1,42 µg/mL].

## Ocena uwalniania IL-6

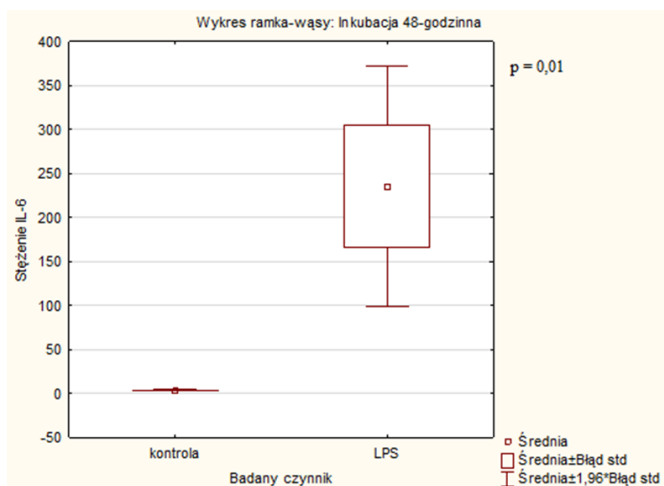
Stężenie IL-6 oznaczono w nadsączach po 24 i 48 godzinach hodowli komórek nabłonka BEAS-2B w obecności lub bez bakteriofagów lub toksyn bakteryjnych: LPS, SAE.

Tabela 2.

Komercyjny zestaw ELISA	Zakres
15(S)-HETE ELISA Kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, Stany Zjednoczone)	78 – 10 000 pg/mL
Prostaglandin E2 Express ELISA Kit (Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, Stany Zjednoczone)	15,6 – 2000 pg/mL
Human Interleukin-6 ELISA (Biovendor R&D, Czechy)	1,25 – 80 pg/mL



Ryc. 7. Stężenie IL-6 (pg/mL) w hodowlach komórek nabłonka BEAS-2B po 24 godzinnej stymulacji LPS.



Ryc. 8. Stężenie IL-6 (pg/mL) w hodowlach komórek nabłonka BEAS-2B po 48 godzinnej stymulacji LPS.

Zaobserwowano tendencję wzrostową w porównaniu do próby spontanicznej po 48 godzinach stymulacji komórek bakteriofagami (w przeliczeniu na białko) dla 0,142  $\mu\text{g/mL}$  (Ryc. 6).

Natomiast istotne statystycznie różnice ( $p=0,01$ ) w uwalnianiu IL-6 zaobserwowano po 24 i 48 godzinnej hodowli komórek nabłonka BEAS-2B w obecności LPS (Ryc. 7-8).

## Dyskusja

Nabłonek oddechowy, w skład którego wchodzi wiele wyspecjalizowanych komórek, stanowi istotny element budowy dróg oddechowych człowieka. Warunkuje prawidłowe funkcjonowanie mechanizmów odpowiadających za zachowanie homeostazy. Odpowiada za regulację równowagi płynów płucnych, metabolizm i/lub klirens środków wziewnych, chemotaksję i aktywację komórek zapalnych w odpowiedzi na bodźce (zarówno fizyczne jak i zapalne czynniki środowiskowe), a także funkcję mięśni gładkich dróg oddechowych poprzez wydzielanie licznych mediatorów. Uszkodzenie nabłonka może przyczyniać się do rozwoju zapalenia, zwężenia oskrzeli oraz obrzęku obserwowanych w astmie oskrzelowej i innych przewlekłych chorób dróg oddechowych [8,9,10].

Regeneracja nabłonka jest odpowiedzią na szkodliwe działanie czynników takich jak dym papierosowy, wirusy, alergeny oraz patogeny. Upośledzenie procesów regeneracji prowadzi do powstawania i nasilania się reakcji zapalnej oraz zaostrzenia stanu chorobowego dróg oddechowych. W zastosowanym modelu doświadczalnym wykazano, że bakteriofagi w bezpośredni, różnicowany sposób mogą wpływać na regenerację nabłonka dróg oddechowych. W zależności od stężenia bakteriofagów oraz czasu działania na komórki, regeneracja nabłonka ulegała przyspieszeniu. Wyniki tych badań są pierwszymi, wskazującymi na możliwy bezpośredni wpływ wirusów bakteryjnych na regenerację komórek nabłonka i otwierają drogę do następnych poszukiwań dotyczących bakteriofagów. Górski i wsp. [11] sugerują immunomodulujący wpływ bakteriofagów na komórki układu odpornościowego. Immunomonitoring pacjentów poddanych terapii fagowej wskazywał na fluktuacje w obrębie reaktywności populacji limfocytów T, B oraz komórek NK, a także ich zmiany ilościowe. Cao i wsp. sugerują hamowanie tkankowej ekspresji cytokin zapalnych [12]. Inni, na mysim modelu infekcji płuc, opisali obniżenia parametrów czynników zapalnych ocenianych w BAL po podaniu fagów. [13]

W naszych badaniach przeprowadziliśmy wstępną analizę poziomu cytokin IFN-lambda2, CCL2, CCL11, IFN-gamma, IL-10, IL-17/IL-17A, IL-22, IL-28B, TNF-alfa, CCL5, IFN-beta, IL-5, IL-12 p70, IL-17E/IL-25, IL-33 metodą Multiplex a także IL-6 met. ELISA. Uzyskane wyniki nie potwierdzają jednak wpływu stosowanych bakteriofagów na syntezę tych cytokin przez komórki nabłonka oddechowego.

Aktywacja nabłonka w odpowiedzi na bodźce prowadzi do uruchomienia mechanizmów związanych z pobudzeniem fosfolipidów błony komórkowej i wydzielaniem licznych mediatorów – w tym metabolitów kwasu arachi-

donowego takich jak prostaglandyny i 15-HETE. Regulują one szereg procesów począwszy od reakcji zapalnych po przewlekłą przebudowę tkanek, astmę czy zaburzenia autoimmunologiczne.[14] W przeprowadzonych przez nas badaniach wskazaliśmy na zróżnicowaną – w zależności od czasu działania i stężenia bakteriofagów – syntezę kwasu 15-HETE, ale nie PGE2. Bakteriofagi w stężeniach 0,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 0,28  $\mu\text{g}/\text{mL}$  i 0,142  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zwiększały ilość wygenerowanego 15-HETE w porównaniu do próby kontrolnej (komórki hodowane bez bakteriofagów). Wcześniejsze badania Brunnstrom i wsp. dotyczące m.in. wpływu uszkodzenia mechanicznego komórek na generację 15-HETE wskazały na zależność pomiędzy uszkodzeniem, a zwiększeniem syntezy tego metabolitu. Autorzy postulowali, że jednym z czynników była IL-4 [15].

Zróżnicowaną aktywację komórek nabłonka, wyrażaną współczynnikiem regeneracji oraz uwalnianiem mediatorów obserwowano także pod wpływem działania toksyn bakteryjnych. W przypadku SEA odnotowano wyhamowanie procesu regeneracji, natomiast LPS nie wpłynął istotnie na ten proces. Podobnie w odniesieniu do syntezy cytokin. W 24 i 48 godzinie hodowli w obecności LPS (ale nie SEA), zaobserwowano zwiększenie syntezy tylko IL-6. Interleukina-6 jest wytwarzana przez różne typy komórek (limfocyty T, B, monocyty, fibroblasty, osteoblasty, keratynocyty, komórki śródbłonka czy niektóre komórki nowotworowe). Stymuluje wytwarzanie białek ostrej fazy, nasila leukocytozę i angiogenezę.

Nabłonek dróg oddechowych jest pierwszym miejscem kontaktu i stanowi pierwszą linię obrony przeciwko egzogennie inhalowanym antygenom czy czynnikom infekcyjnym. Komórki te mogą inicjować, a także amplifikować lokalną reakcję zapalną. Jako komórki efektorowe, mogą wytwarzać cały szereg cytokin, a tym samym uczestniczyć bezpośrednio lub pośrednio w rozwoju zapalenia poprzez rekrutację i aktywację a także przeżywalność zapalnych komórek w drogach oddechowych. Aktywowane komórki nabłonka również syntetyzują i uwalniają cały szereg lipidowych mediatorów włączając prostaglandyny m.in. PGE2

czy kwas 15-HETE. Niektórzy badacze sugerują, że PGE2 moduluje ekspresję genów IL-6 co może prowadzić do wzrostu syntezy i uwalniania IL-6 przez komórki BEAS-2B. [16]

Niewiele jest danych dotyczących wpływu wirusów bakteryjnych na funkcje komórek eukariotycznych. Z uwagi na występowanie tychże w środowisku, można założyć ich potencjalną rolę także w aktywacji komórek nabłonka dróg oddechowych człowieka.

Najnowsze odkrycia naukowe dostarczają dowodów na niedocenienie bakteriofagów jako ludzkich patogenów, stanowiących istotny element w wyzwalaniu i pogarszaniu się chorób u ludzi. Bakteriofagowa koncepcja chorób zakłada bezpośrednią interakcję fagów z makroorganizmem gospodarza (komórki eukariotyczne i białka) oraz pośrednią interakcję z makroorganizmem poprzez powodowanie szkodliwych zmian mikrobioty i rozwój chorób uwarunkowanych infekcją bakteryjną. [17]

W badaniach *in vitro* wykazano, że liza bakterii indukowana fagami, prowadzi do uwolnienia bakteryjnego DNA z biofilmów bakterii zasiedlających jelita człowieka. Autorzy postulują, że podobny proces może zachodzić *in vivo* i liza bakterii spowodowana fagami litycznymi lub indukcja infekcji lizygenicznej prowadzi do przemieszczania się uwolnionego DNA do krwiobiegu. Bakteryjne DNA jest znane jako ważne źródło PAMP co może powodować zmienioną odpowiedź immunologiczną z powodu podwyższonego poziomu PAMP [18, 19]. Ponadto, kwasy nukleinowe fagów (DNA i RNA) same w sobie są ważnym źródłem PAMP [20] a rozpoznawane są przez wiele receptorów TLR – w tym TLR3, TLR7, TLR8 i TLR9 – które indukują wytwarzanie IFN typu I odgrywającego istotną rolę w rozwoju wielu chorób. Wcześniejsze badania Lewandowskiej-Polak i wsp. wykazały, że regeneracja nabłonka dróg oddechowych jest modulowana przez czynniki mikrobiologiczne poprzez receptory TLR. [21]. Wydaje się zatem, że konieczne jest nowatorskie podejście do patogenezы wielu chorób w tym także dotyczących dróg oddechowych.

## Piśmiennictwo

1. Duerkop BA. Bacteriophages shift the Focus on the mammalian microbiota. *PLoS Pathog.* 2018; 14: e1007310
2. Nguyen S, PadmanBS, Patwa R, and al. BacteriophageTranscytosisProvides a Mechanism to Cross Epithelial Cell Layers. *MBio* 2017; 21:8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01874-17>
3. Górski A, Miedzybrodzki R, Weber-Dąbrowska B, i wsp. PhageTherapy: Combating Infec-tions with Potential for Evolving from Merely a Treatment for Complications to Targetting-Diseases. *Frontiers in Microbiology* 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01515>
4. Nir-Paz R, GelmanD, Khouri A, et al. Successful treatment of antibioticresistantpoly-microbialbone infections with bacteriophages and antibioticscombination. *ClinInfectDis* 2019. Availablefrom:<http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciz222>
5. Lewandowska-Polak A, Jarzębska M, Brauncajs M, i wsp. Uszkodzenie i regeneracja na-błonka górnych i dolnych dróg oddechowych – walidacja doświadczalnych metod oceny. *AlergiaAstmImmunologia.* 2016; 21: 162-8
6. Koff JL, Shao MXG, Kim S, et al. Pseudomonaslipopolysaccharideaccelerateswoundrepair via activation of novelepithelial cell signalngcascade . *J Immunol.* 2006; 15: 177(12): 8693-700.
7. Lewandowska-Polak A, Brauncajs M, Jarzębska M, i wsp. Toll-Like Receptor Agonists-ModulateWoundRegeneration in AirwayEpithelialCells. *Int J Mol Sci* 2018, 19, 2456; doi:10.3390/ijms19082456
8. Xiao H, Li DX, Liu M. Knowledge translation: airwayepithelial cell migration and respira-tory disease. *Cell Mol Life Sci.* 2012; 69: 4149-62
9. Rock JR, Randell SH, Hogan BLM. Airwaybasal stem cells: a perspective on theirroles in epithelialhomeostasis and remodeling. *Dis Model Mech.* 2010; 3: 545-56
10. Knight DA, Holgate ST. The airwayepithelium: structural and functionalproperties in health and disese. *Respirology.* 2003; 8: 432 46
11. Górski A, Dabrowska K, Międzybrodzki R, et al. Phages and immunomodulation. *Future-Microbiology* 2017. 905-14. Available from: <http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2017-0049>
12. Cao F, Wang X., Wang L., et al.: Evaluation of the efficacy of a bacteriophage in the treatment of pneumonia induced by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in mice. *Bio-med Res. Int.* 2015; 752930
13. Pabaty R., Singh C., Morales S., et al.: Antipseudomonalbacteriophagereducesinfective-burden and inflammatoryresponse in murinelung. *Antimicrob. AgentsChemother.* 2015; 60 (2): 744 - 751
14. Harizi H, Corcuff JB, GualdeN.:Arachidonic – acid – derivededicosanoides: rolesibbiology and immunopathology. *Trends in Molecular-Medicine.* 2008; 14, 10: 461
15. Brunnstrom A et al.: On the biosynthesis of 15-HETE and eoxin C4 by humanairwayepi-thelialcells. *Prostaglandins&other Lipid Mediators* 2015; 121: 83 – 90

16. Tavakoli S, Cowan M.J., Benfield T., et al. Prostaglandin E2- induced interleukin -6 re-lease by humanairwayepithelial cell line. *Am J PhysiolLung Cell Mol Physiol* 2001; 280: 127 – 135
17. Tetz G., Tetz V.: Bacteriophages as New Human ViralPathogens. *Microorganisms* 2018; 6, 54; doi: 10.3390/microorganisms6020054
18. Tetz G., ArtemenkoN., Tetz V.: Effect of DNase and Antibiotics on BiofilmCharacteris-tics. *Antimicrob. AgentsChemother.* 2008; 53: 1204 – 1209
19. Anunobi R., Boone B., Cheh N., et al.: Extracellular DNA promote colorectal tumor cell survivalaftercytotoxicchemotherapy. *J. Surg. Res.* 2018; 226: 181 – 191.
20. De Paepe M., Leclerc M., Tinsley C., Petit M.: Bacteriophages: Anunderestimated role in human and animalHealth ? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; 4: 39
21. Lewandowska – Polak A., Brauncajs M., Jarzębska M., et al.: Toll-Like Receptor Ago-nistsModulateWoundRegeneration in AirwayEpithelialCells. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19: 2456; doi: 10.3390/ijms19082456