Use of bacteriophages for prophylaxis of colon cancer: assessment of the potential

ბაქტერიოფაგების გამოყენება სწორი ნაწლავის კიბოს პროფილაქტიკისათვის: პოტენციალის შეფასება

Nina Chanishvili, Nata Bakuradze, Ivane Abiatari
ნინა ჭანიშვილი, ნატა ბაკურაძე, ივანე აბიათარი

G.Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology & Virology, Tbilisi, Georgia
Ilia State University

გ.ელიავას სახ. ბაქტერიოფაგიის, მიკრობიოლოგიისა და ვირუსოლოგიის ინსტიტუტი, თბილისი, საქართველო
ილიას სახელმწიფო უნივერსიტეტი

Applied Biosciences and Biotechnology 2019
2nd International School-Conference
გამოყენებითი ბიომეცნიერებები და ბიოტექნოლოგია 2019
მე-2 საერთაშორისო სკოლა-კონფერენცია

თბილისი, 1-5 აპრილი, 2019
Tbilisi 1-5, 2019

Background
აქტუალობა

Statistically lethal outcomes from colon cancer are on the 3rd place in men and women.

მსხვილი ნაწლავის ავთვისებიანი სიმსივნე სიკვდილიანობით მესამე ადგილზეა როგორც კაცებში ისე, ქალებში.

It is known that 20% of the colon cancer cases are associated with chronic carriage of the toxigenic strains related to B.fragilis.

ცნობილია, რომ ნაწლავის კიბოს შემთხვევების 20 % B.fragilis-ის პათოგენური შტამების ქრონიკულ მტარებლობასთან არის დაკავშირებული.

Estimated New Cases*

Males			Females		
Prostate	238,590	28%	Breast	232,340	29%
Lung & bronchus	118,080	14%	Lung & bronchus	110,110	14%
Colorectum	73,680	9%	Colorectum	69,140	9%
Urinary bladder	54,610	6%	Uterine corpus	49,560	6%
Melanoma of the skin	45,060	5%	Thyroid	45,310	6%
Kidney & renal pelvis	40,430	5%	Non-Hodgkin lymphoma	32,140	4%
Non-Hodgkin lymphoma	37,600	4%	Melanoma of the skin	31,630	4%
Oral cavity & pharynx	29,620	3%	Kidney & renal pelvis	24,720	3%
Leukemia	27,880	3%	Pancreas	22,480	3%
Pancreas	22,740	3%	Ovary	22,240	3%
All Sites	**854,790**	**100%**	**All Sites**	**805,500**	**100%**

Estimated Deaths

Males			Females		
Lung & bronchus	87,260	28%	Lung & bronchus	72,220	26%
Prostate	29,720	10%	Breast	39,620	14%
Colorectum	26,300	9%	Colorectum	24,530	9%
Pancreas	19,480	6%	Pancreas	18,980	7%
Liver & intrahepatic bile duct	14,890	5%	Ovary	14,030	5%
Leukemia	13,660	4%	Leukemia	10,060	4%
Esophagus	12,220	4%	Non-Hodgkin lymphoma	8,430	3%
Urinary bladder	10,820	4%	Uterine corpus	8,190	3%
Non-Hodgkin lymphoma	10,590	3%	Liver & intrahepatic bile duct	6,780	2%
Kidney & renal pelvis	8,780	3%	Brain & other nervous system	6,150	2%
All Sites	**306,920**	**100%**	**All Sites**	**273,430**	**100%**

CA: A Cancer Journal for Clinicians
Volume 63, Issue 1, pages 11-30, 17 JAN 2013 DOI: 10.3322/caac.21166
http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21166/full#a1

Boleij at al. 2015

Goal
კვლევის მიზანი

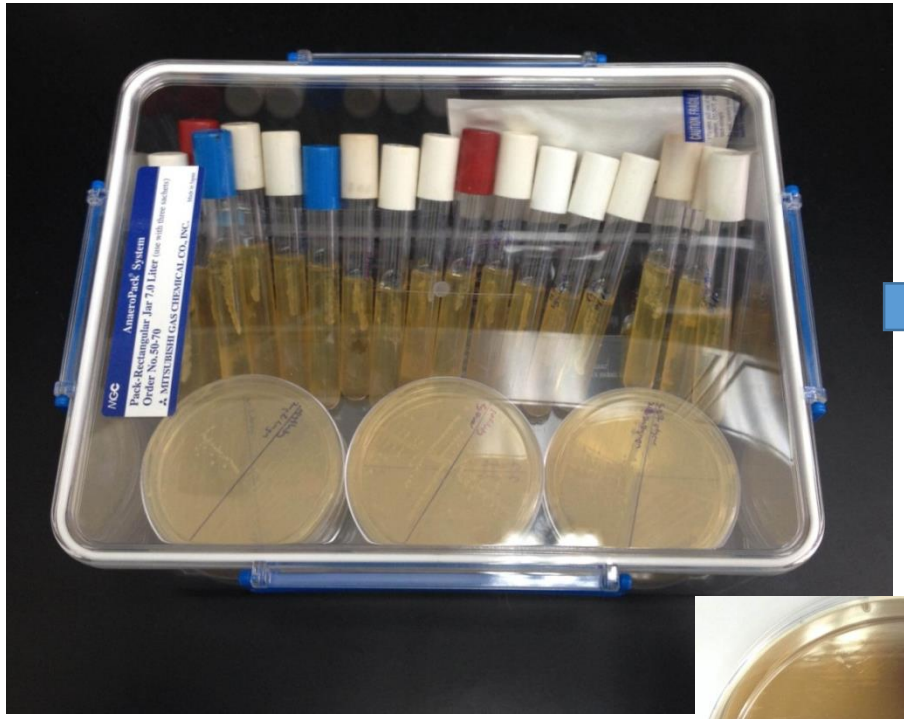
1. To isolate strains of B.fragilis from patient's feces
   B.fragilisშტამების გამოყოფა პაციენტების ფეკალური მასებიდან

2. To select enteropathogenic strains of B.fragilis(ETBF)
   B.fragilisენტეროპათოგენური შტამების სელექცია

3. To isolate specific phages against B.fragilis(ETBF)
   ენტეროპათოგენური B.fragilis(ETBF)-ის მიმართ სპეციფიური ფაგების გამოყოფა

4. Study of antibacterial and immunogenic effects of the phages in *in vitro in ex situ* studies
   ჩვენს მიერ გამოყოფილი ფაგების ანტიბაქტერიული და იმუნოგენური ეფექტურობის დადგენა *in vitro ex situ* ექსპერიმენტებში

Strain isolation and identification
შტამების გამოყოფა და იდენტიფიკაცია



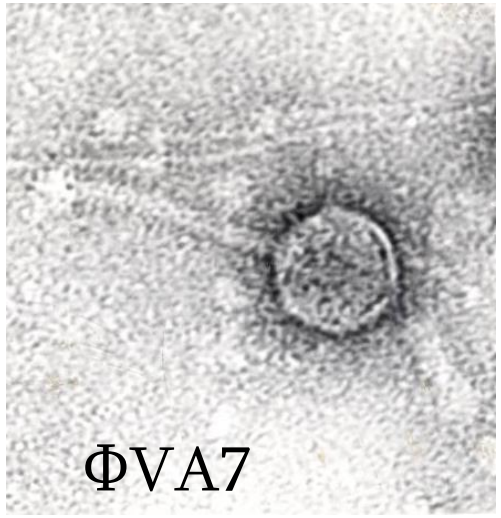
Strain შტამი	Esculine hydrolysis 48h ესკულინის ჰიდროლიზი 48სთ	Catalase test კატალაზა	Indole test ინდოლის ტესტი
ATCC25285	N	?	P
ICI 541/015	P	P	P
A890 1228	P	P	N
A890 1218	P	P	N
A890 1214	P	P	N
A890 1262	P	P	N
A90 00022	P	P	N
A90 00080	P	P	N
A1	P	P	N
A2	N	N	N
A3	N	P	N
A4	N	N	N
A5	P	P	N
A6	P	P	N
A7	P	P	N
A8	P	N	N
B1	P	N	P
B2	P	P	P
B3	P	P	P
B4	P	N	P
B5	N	N	P
B6	P	N	N
B8	P	N	N
B9	*N*	*N*	*N*
B10	N	N	N
C1	P	P	P
C2	P	N	P
C3	P	P	?
D1		N	P
D2		N	P
E1		P	
E2		N	
E3		P	
E4		N	
E5		N	
E6		P	
E7		N	
E8		P	
E9		N	
E10		N	

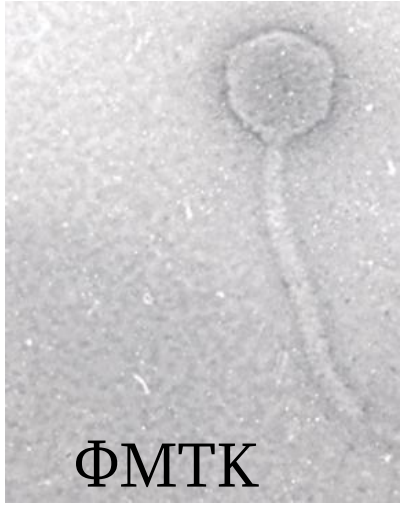
MALDI-TOF spectrometry

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
A1 (+++) (A)	1=1 (standard)	Bacteroides fragilis	2.43	Bacteroides fragilis	2.42
A2 (+++) (A)	2=1 (standard)	Bacteroides fragilis	2.42	Bacteroides fragilis	2.40
A3 (+++) (A)	3=1 (standard)	Bacteroides fragilis	2.52	Bacteroides fragilis	2.48
A4 (+++) (A)	4=1 (standard)	Bacteroides fragilis	2.40	Bacteroides fragilis	2.43
A5 (+++) (A)	5=1 (standard)	Enterococcus faecium	2.43	Enterococcus faecium	2.38
A6 (+++) (A)	6=1 (standard)	Bacteroides fragilis	2.49	Bacteroides fragilis	2.48
A7 (+++) (A)	7=1 (standard)	Hafnia alvei	2.38	Hafnia alvei	2.32

Result overview table--continued on next page

Isolation of bacteriophages
ბაქტერიოფაგების გამოყოფა





Phage	Place of isolation	Source of isolation	Titer pfu/ml	Colony Morphology	Dimensions of Phage	
					Head	Tail
ΦVA-7	Tbilisi, Georgia	Waste water	10^8	Ø 2mm, clear regular edged	60 nm	100nm
ΦMTK	Tbilisi, Georgia	Waste water	10^{11}	Ø 2,5mm, clear regular edged	42 nm	166nm

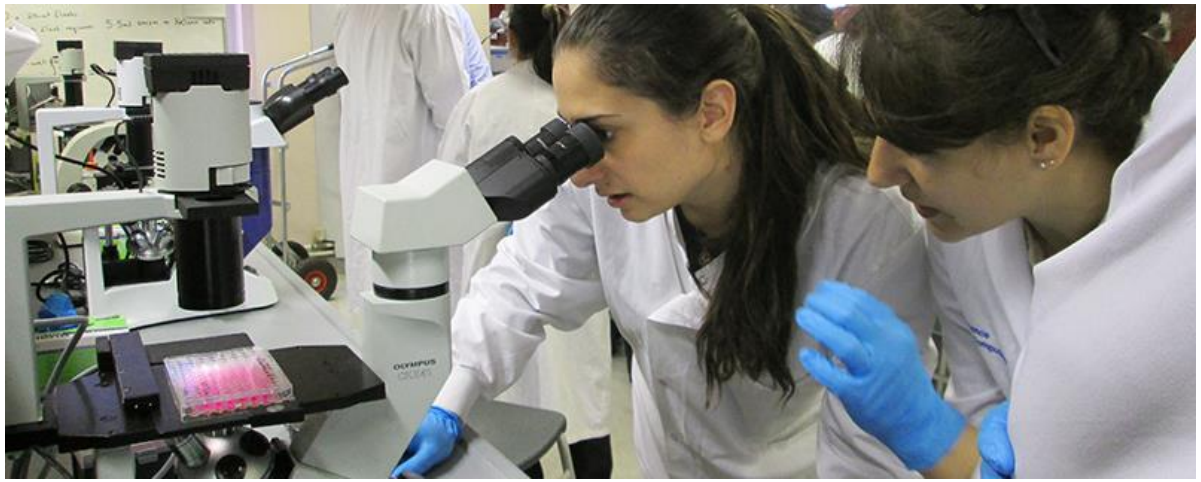
Colon tissue cultures used for development of *ex situ in vitro* model

Murine and human colon tissue cultures were provided by the Munich Technology University Sepsis Center

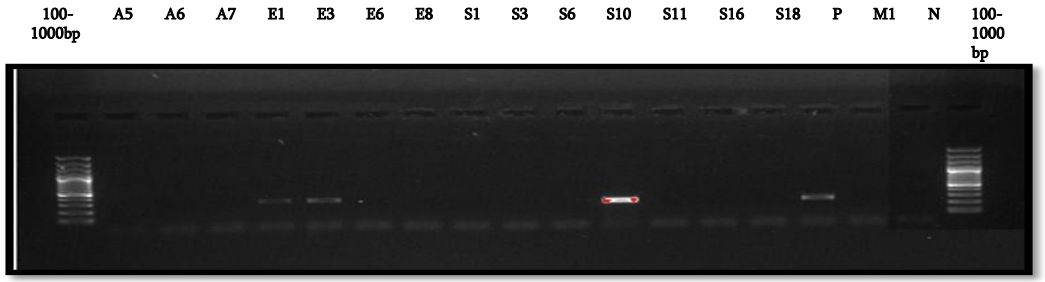
მიუნხენის ტექნოლოგიური უნივერსიტეტის, სეფსისის ცენტრის მიერ მოწოდებული იქნა თაგვის და ადამიანის მსხვილი ნაწლავის კიბოს უჯრედული ხაზები

- HCT116
- CTL6
- HT29

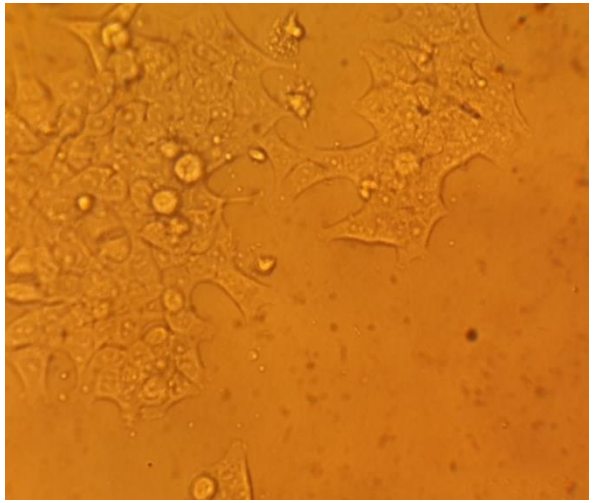
.



Citotoxisity test
ციტოტოქსიურობის ტესტი

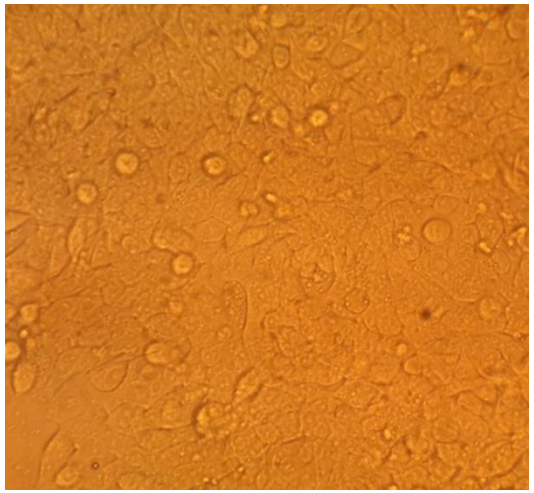


Detection of *bft* gene in clinical *B.fragilis* strains by PCR
bft **გენის დეტექცია პჯრ მეთოდით B.fragilis კლინიკურ შტამებში**



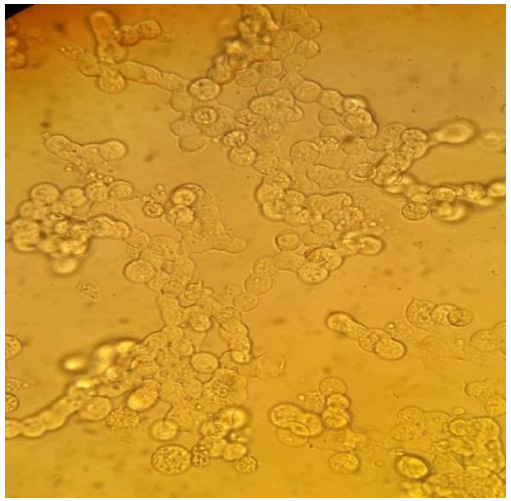
A. Growth of the tissue culture HCT116 in RPMI media ; Magnification X 400

უჯრედული კულტურის HCT116 ზრდა საკვებ არეში (RPMI) - სწყისი სტადია გადიდება: X 400-ჯერ



B. . Growth of the tissue culture HCT116 in RPMI media with addition of sterile bacteriology media (BHI) – negative control; Magnification X 400

უჯრედული კულტურის **HCT116** გაზრდილი საკვებ არეში **(RPMI),** რომელსაც დამატებული აქვს სტერილური ბაქტერიოლოგიური არე **(BHI) -** ნეგატიური კონტროლი. გადიდება: **X 400-**ჯერ



C. . Growth of the tissue culture HCT116 in RPMI media with addition of the supernatant of overnight B.fragilis A90 (ETBF) culture grown on bacteriology media (BHI) - positive result (intercellular cleavage)

უჯრედული კულტურა HCT116 გაზრდილი არეში (RPMI), რომელსაც დამატებული აქვს BHI არეში გაზრდილი ბაქტერიული შტამის **B. fragilis A90** სუპერნატანტი **- პოზიტიური** შედეგი. ჩანს უჯრედშორისი ბმების წყვეტა და ადჰეზიურობის კარგვა. გადიდება: **X 400-ჯერ**

Tissue culture experiment / ექსპერიმენტი უჯრედულ კულტურაზე

Experimental groups/ექსპერიმენტული ჯგუფები:

Group **ჯგუფი** **1**	**Phage/ფაგი** **VA7** **10*7**	**Group** **ჯგუფი** **5**	**Strain/ შტამი** **B.Fragilis E3** **+ ფაგი VA7**
Group **ჯგუფი** **2**	**Phage/ფაგი** **MTK** **10*7**	**Group 6**	**Strain/შტამი B.Fragilis E3** **+ ფაგი MTK**
Group **ჯგუფი** **3**	**Strain/შტამი** **B.Fragilis E3** **10*8**	**Group 7**	**Strain/შტამი** **B.Fragilis E3 შტამი** **+ phage mixture/ფაგის** **ნარევი**
Group **ჯგუფი** **4**	**Phage mixture** **ფაგის ნარევი** **10*7**	**Group 8**	**Sterile medium** **სტერილური არე**

Mirzaei at al. 2016; Martin at al.2004

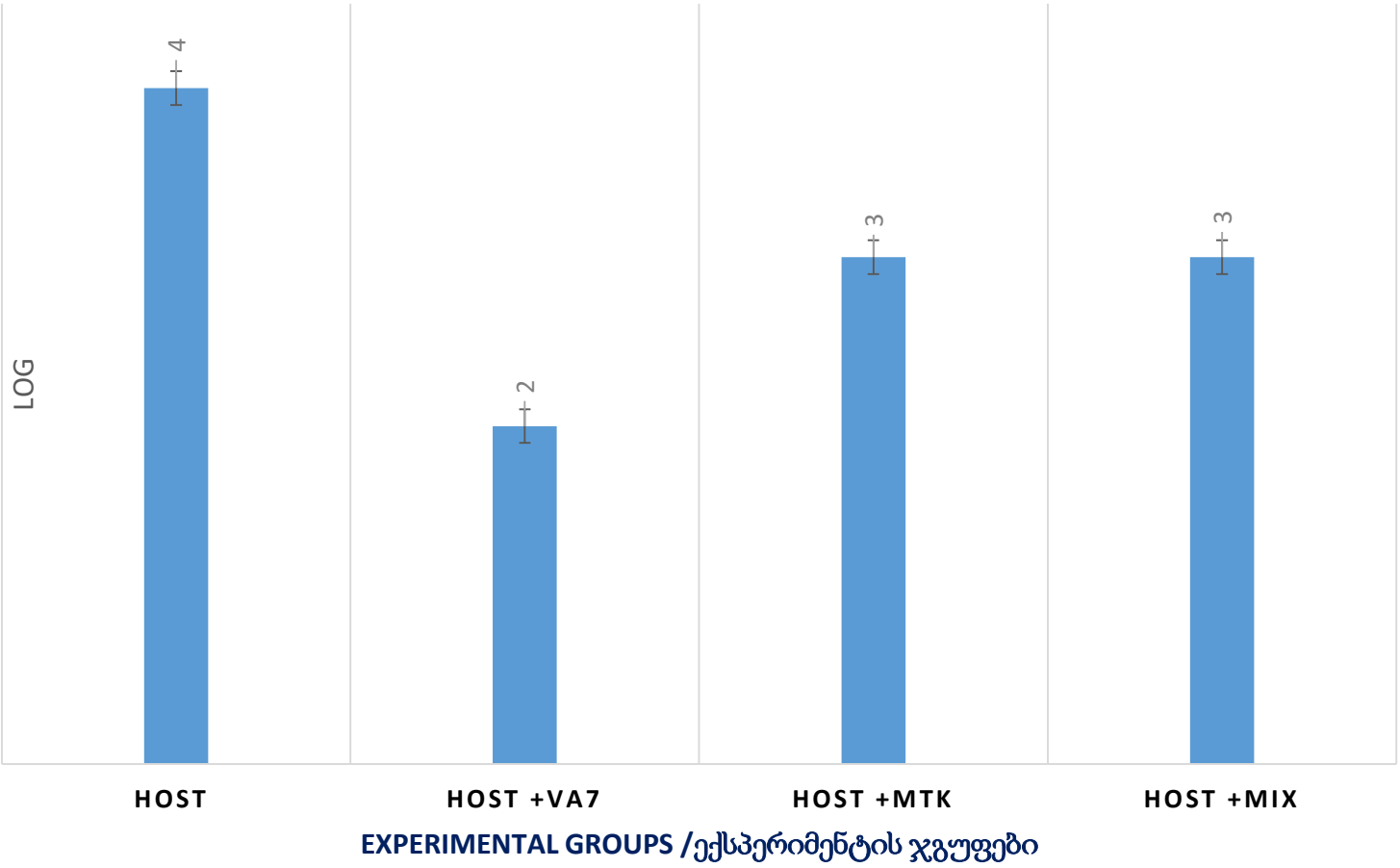
Method
მეთოდი

- **Growth of the cell line until 90% confluence was not achieved**
- **Inoculation of the cell line with phages: VA7, MTK or their mixture /bacteria (Gr:1, 2, 3 & 4)**
- **After 3 h of incubation addition of the phage(s) or their mixture onto the cell line pre-infected with bacteria (Gr: 5, 6 & 7)**
- **Control – cell line without any addition**
- **Total incubation period - 6 hours**

- უჯრედული კულტრის კულტივაცია 90%-იანი კონფლუენტური ზრდის მიღწევამდე
- უჯრედული კულტურის ინოკულაცია ფაგებით: **VA7, MTK** ან მათი ნარევით/ბაქტერიით (ჯგ:1, 2, 3 & 4)
- ფაგების დამატება ბაქტერიით დასნებოვნებულ უჯრედულ კულტურაზე 3-საათიანი ინკუბაციის შემდეგ
- კონტროლი - სუფთა უჯრედული კულტურა
- ინკუბაციის სრული პერიოდი -6 საათი

Assessment of antibacterial effect
ანტიბაქტერიული ეფექტის შეფასება

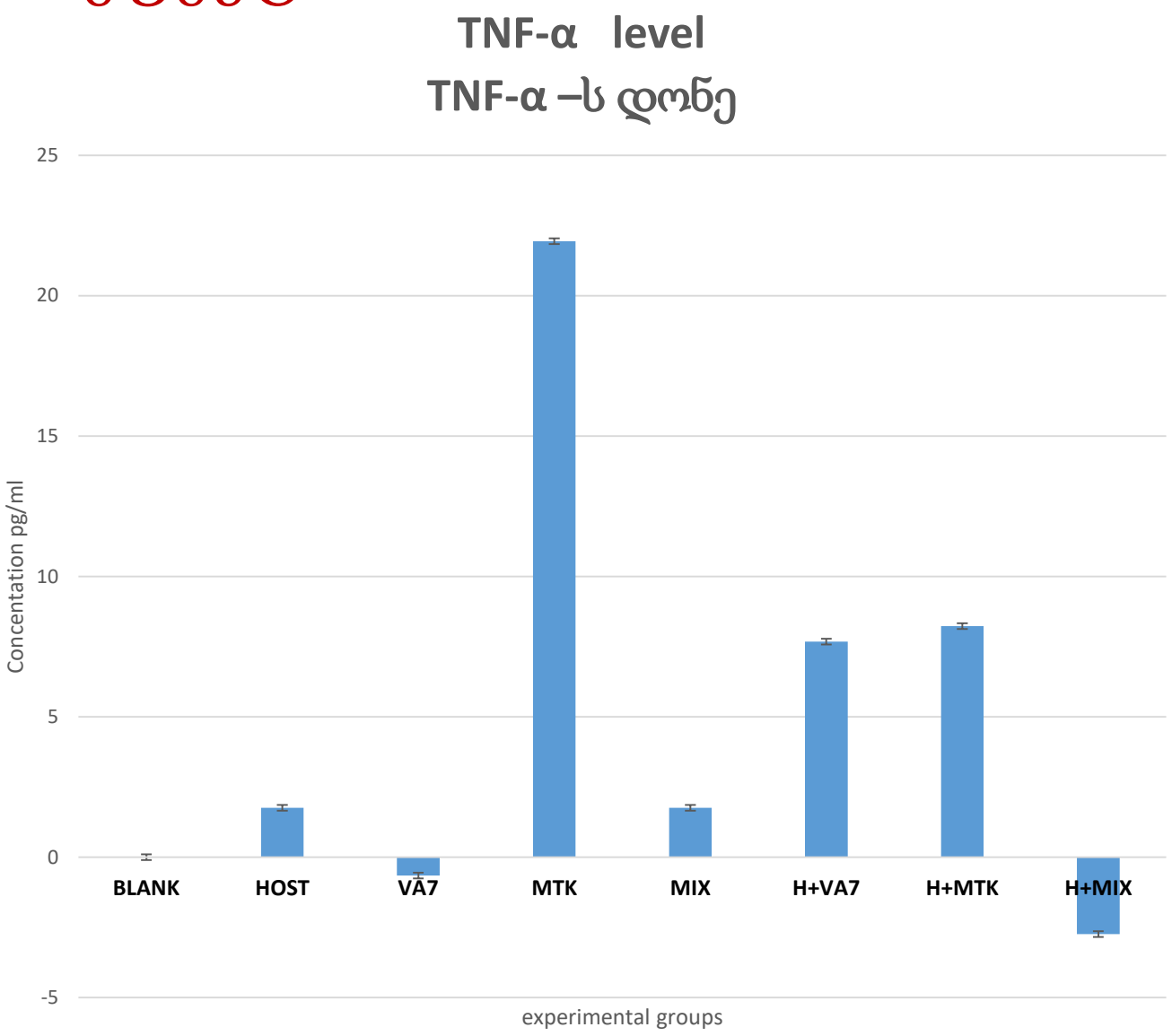
BACTERIAL TITER ბაქტერიის ტიტრი



Immunogenic effect
იმუნოგენური ეფექტი

Elevated levels of circulating **TNF-α** have been linked to **a** wide variety of diseases, including arthritis, diabetes, Crohn's disease, and cachexia associated with terminal cancer and AIDS.

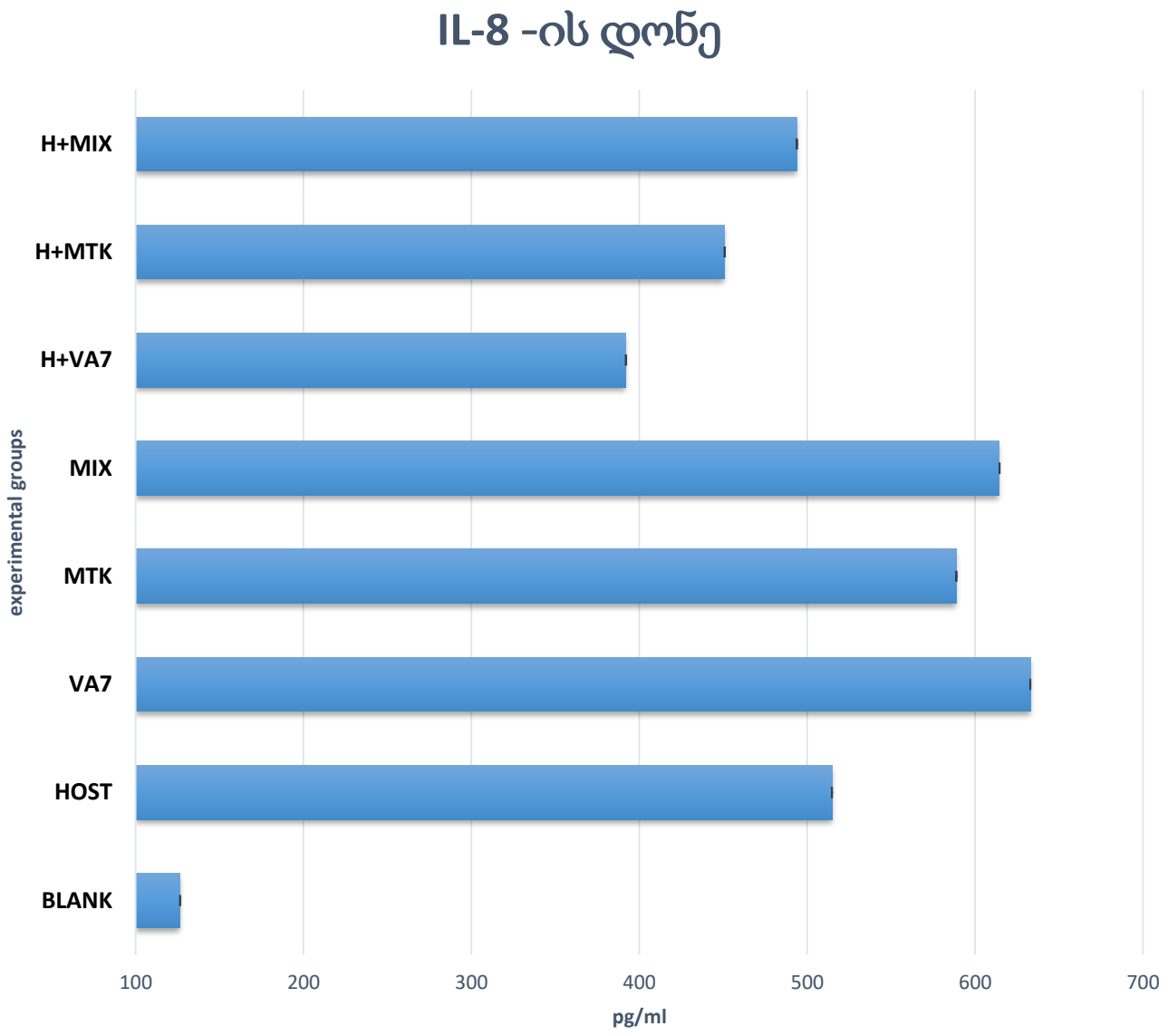
TNF-α -ს მაღალი დონეები აღინიშნება სხვადასხვა დაავადებებისშემთხვევაში, როგორიცაა ართრიტი, დიაბეტი, კრონის დაავადება, კიბოს და შიდსის ტერმინაურლი სტადიით გამოწვეული კახექსია.



Immunogenic effect
იმუნოგენური ეფექტი

Interleukin-8 (IL8) is a member of the CXC chemokine family. Interleukin-8 (IL8) is proinflammatory cytokin, which has been demonstrated to be a mediator for angiogenesis.

ინტერლეიკინი IL-8 CXC ქემოკინების ჯგუფის წარმომადგენელია. ინტერლეიკინი IL-8 პროინფლომატორიული ციტოკინია, რომელიც მედიატორის როლს ასრულებს ანგიოგენეზში.



Conclusions
დასკვნები

- Phage ΦVA7 is characterized with high antibacterial effectiveness and relatively low immunogenic activity in comparison with the phage MTK, however their combined action gives different results.
- Stimulation of IL-8 production may have dual positive and negative sides, as this cytokine is known to facilitate tumor development . Therefore, treatment with these phages may not be reasonable in patients with developed tumors.
- Analysis of the obtained data is not yet finalized. Careful interpretation of the results is required, since immunogenic response depends on level variations of a greater number of mediators. Measurements of other mediators are required to make a competent conclusion.
-

- ფაგი ΦVA7 ხასიათდება, მაღალი ანტიბაქტერიული ეფექტურობით და დაბალი იმუნოგენობით ფაგ ΦMTK-თან შედარებით. თუმცა, მათი კომბინირებული მოქმედება განსხვავებულ სურათს იძლევა.
- IL-8-ს წარმოქმნის სტიმულაცია, შესაძლოა, დადებით და უარყოფით მხარეებს ატარებდეს. ვინიდან ეს ციტოკინი სიმსივნის განვითარების ხელშემწყობ ფაქტორს წარმოადგენს, შესაძლოა, ფაგების დანიშვნა უკვე განვითარებული სიმსივნის ფონზე არ იყოს მიზანშეწონილი.
- მიღებული მონაცემების ანალიზი ჯერ კიდევ მიმდინარეობს. საჭიროა მათი ფრთხილი ინტერპრეტაცია, რადგან იმუნოლოგიური პასუხი, მრავალი სხვა მედიატორის დონის ცვლილებით ხასიათდება. კომპეტენტური დასკვნისათვის საჭიროა სხვა მედიატორების გაზომვა.

Thank you for attention!

გმადლობთ ყურადღებისათვის!

შოთა რუსთაველის ეროვნული
სამეცნიერო ფონდი

SHOTA RUSTAVELI NATIONAL
SCIENCE FOUNDATION

ელიავას
ფონდი