

**В. В. Позур<sup>1</sup>, Л. М. Сківка<sup>1</sup>, Г. П. Потебня<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка, просп. Глушкова 2, Київ, 03022, Україна, e-mail: realmed@i.com.ua

<sup>2</sup>Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України, вул. Васильківська, 45, Київ-22, 03022, Україна

## **РЕАКЦІЯ ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНІВ МИШЕЙ НА ПЕПТИДОГЛІКАН *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 В НОРМІ І ПРИ ПУХЛИННОМУ РОСТІ**

*У інтактних мишей та мишей з карциномою легені Льюїс досліджували вплив пептидоглікану (ПГ) Staphylococcus aureus Wood 46 на вагові індекси лімфоїдних органів та вміст у них мононуклеарних клітин. Показано, що найбільш виразні позитивні зміни досліджуваних лімфоїдних органів як у тварин без пухлин, так і у мишей з карциномою легені Льюїса спричиняв ПГ у мінімальній дозі (2 мкг/г). Відмінність реакції органів імунної системи на ПГ в нормі і при пухлинному рості полягала в тому, що у тварин з карциномою легені Льюїс введення препарату не мало достовірного впливу на досліджувані показники тимусу, на відміну від здорових тварин. Більш виразною у мишей-пухлиноносіїв була реакція селезінки. Слід також відмітити, що при пухлинному рості в ряді випадків прослідковувалася чітка дозова залежність впливу пептидоглікану Staphylococcus aureus Wood 46 на досліджувані характеристики лімфоїдних органів, тоді як у тварин без пухлини така залежність була практично відсутньою.*

*К л ю ч о в і с л о в а: пептидоглікан Staphylococcus aureus Wood 46, карцинома легені Льюїс, лімфоїдні органи.*

Субклітинні компоненти та метаболіти бактеріальних клітин — потужні біологічно активні субстанції, які характеризуються імуномодуляторними та ад'ювантними властивостями [12]. Пептидоглікан (муреїн) — головний та невід'ємний компонент клітинної стінки фактично всіх бактерій [7]. Муреїн та його похідні муропептиди вважаються потенційними факторами вірулентності бактерій [5]. Пептидоглікани різних бактерій мають відмінні структурні особливості, однак, всі вони відсутні на поверхні еукаріотних клітин і тому є адекватною мішенню для імунної системи [4,13]. Здатність ПГ ініціювати прозапальну імунну відповідь дозволила розглядати їх як потенційні терапевтичні агенти в лікуванні онкологічних захворювань, перебіг яких, як відомо, супроводжується імуносупресивним станом [14]. ПГ різних видів бактерій відрізняються за амінокислотним складом міжланцюгових пептидних містків [8]. Метою даної роботи була оцінка реакції лімфоїдних органів мишей на введення пептидоглікану *Staphylococcus aureus* Wood 46 в нормі та при пухлинному рості.

### **Матеріали та методи**

В досліджах використовували мишей-самиць лінії C57/Black, масою 18 - 20 г, віком 2,5 місяці розведення віварію біологічного факультету КНУ імені Тараса Шевченка.

© В. В. Позур<sup>1</sup>, Л. М. Сківка<sup>1</sup>, Г. П. Потебня, 2008



Тварини були розділені на 8 груп по 5 мишей в кожній: 1 — контрольні інтактні тварини; 2 — тварини, які отримали ПГ в дозі 8 мкг/г; 3 — тварини, які отримали ПГ в дозі 4 мкг/г; 4 — тварини, які отримали ПГ в дозі 2 мкг/г; 5 — контрольні тварини-пухлиноносії; 6 — тварини-пухлиноносії, які отримали ПГ в дозі 8 мкг/г; 7 — тварини-пухлиноносії, які отримали ПГ в дозі 4 мкг/г; 8 — тварини-пухлиноносії, які отримали ПГ в дозі 2 мкг/г. В якості експериментальної пухлини використовували карциному легенів Льюїса, отриману з Національного банку клітинних культур ІЕПОР імені Р.Є. Кавецького. Пухлину перещеплювали підшкірно в ділянку крижового відділу по 0,2 мл 20 % клітинної суспензії (300 тис. клітин/тварину).

В дослідях використовували ліофілізований пептидоглікан *S. aureus* Wood 46, люб'язно наданий професором Позуром В. К. ПГ отримувався за методами описаними раніше [1]. Вибір *S. aureus* Wood 46 як об'єкта досліджень мотивований тим, що клітини цього штаму не містять білка А, який широко застосовується в терапії онкологічних захворювань. Фізико-хімічний та хроматографічний аналізи показали наявність в його складі таких амінокислот та аміноцукру: аланіну, глютамінової кислоти, гліцину, лізину і глюкозаміну. ПГ погано розчинний у водних розчинах. В зв'язку з цим, для введення експериментальним тваринам використовували гомогенну суспензію ПГ, створену шляхом ультразвукової обробки протягом 1 - 5 хв. За даними електрофорезу оброблений ультразвуком ПГ містить три фракції з молекулярними масами 100, 92 і 84 кДа [3]. Використовували три дози пептидоглікану: 8 мкг/г, 4 мкг/г та 2 мкг/г. ПГ вводили одночасно з трансплантацією пухлинних клітин. Інтактним контрольним тваринам ПГ вводили також підшкірно в ділянку крижового відділу в тих самих дозах. Реакцію лімфоїдних органів (регіонарних по відношенню до місця трансплантації пухлинних клітин і введення ПГ пахових лімфовузлів, селезінок та тимусів) оцінювали за ваговими індексами, які розраховували за формулою: вага органу/загальна вага тварини, а також за відносним вмістом лімфоїдних клітин, який визначали за формулою: абсолютна кількість мононуклеарних клітин/вага органу [15]. Дослідження проводились на 33-ю добу після перещеплення експериментальної пухлини і введення ПГ.

### Результати та їх обговорення

Організованою лімфоїдною структурою, яка першою залучається в імунну відповідь, є регіонарний, по відношенню до місця введення імуногену, лімфовузол. Як видно з табл. вага пахових лімфовузлів і відносний вміст у них мононуклеарних лейкоцитів у групі тварин, які отримали ПГ в найбільшій дозі (8 мкг/г), достовірно не відрізнялась від контролю. Введення ПГ в дозі 4 мкг/г призводило до зменшення ваги регіонарних лімфовузлів удвічі, порівняно з інтактним контролем при відсутності змін у кількості лімфоїдних клітин. Це може бути свідченням тривалої імунної відповіді у відсутності деструктивно-запальної реакції в тканині лімфатичних вузлів. Введення найменшої дози ПГ (2 мкг/г) призводило також до зменшення ваги регіонарних лімфовузлів в 2,5 рази, за наявності тенденції збільшення вмісту лімфоцитів порівняно з контрольними тваринами.

Сенсибілізовані антигеном клітини мігрують також до інших вторинних лімфоїдних органів, включаючи селезінку. Зростання відносного вмісту мононуклеарів у селезінці, як правило, свідчить про посилену експансію плазматичних антитілопродукувальних клітин [9].



Реакція лімфоїдних органів мишей на пептидоглікан *Staphylococcus aureus* Wood 46 в нормі і при пухлинному рості

Table

The reaction of mice lymphoid organs on peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* Wood 46 in norm and under tumor growth

Доза ПГ	Лімфовузли		Селезінки		Тимуси	
	Ваговий індекс · 10 <sup>3</sup>	Відносна клітинність · 10 <sup>4</sup>	Ваговий індекс · 10 <sup>3</sup>	Відносна клітинність · 10 <sup>4</sup>	Ваговий індекс · 10 <sup>3</sup>	Відносна клітинність · 10 <sup>4</sup>
<b>Інтактні тварини</b>						
Контр.	5,2 ± 0,5	0,1 ± 0,05	2,8 ± 0,3	22,0 ± 0,04	1,1 ± 0,1	0,2 ± 0,03
8 мкг/г	6,2 ± 0,8	0,2 ± 0,06	5,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	30,0 ± 0,03 <sup>a</sup>	4,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,04 <sup>a</sup>
4 мкг/г	2,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,05	7,6 ± 0,8 <sup>a</sup>	13,0 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,7 ± 0,4	1,7 ± 0,06 <sup>a</sup>
2 мкг/г	1,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	32,0 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,4 ± 0,01 <sup>a</sup>
<b>Тварини з перещепленою пухлиною</b>						
Контр.	2,8 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,1 ± 0,01	4,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	53,0 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,1 ± 0,3 <sup>a</sup>
8 мкг/г	1,6 ± 0,1 <sup>a,b</sup>	0,1 ± 0,09	3,4 ± 0,8 <sup>b</sup>	58,0 ± 0,05 <sup>a,b</sup>	0,7 ± 0,2 <sup>a,b</sup>	0,6 ± 0,04 <sup>a,b</sup>
4 мкг/г	2,6 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,05 <sup>a,b</sup>	7,7 ± 1,2 <sup>a,b</sup>	50,0 ± 0,06 <sup>a,b</sup>	2,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,01 <sup>a,b</sup>
2 мкг/г	1,2 ± 0,3 <sup>a,b</sup>	0,3 ± 0,07 <sup>a,b</sup>	8,9 ± 1,2 <sup>a,b</sup>	16,0 ± 0,1 <sup>a,b</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,2 ± 0,09 <sup>a,b</sup>

Примітка: <sup>a</sup> – p<0,05 достовірно в порівнянні з контрольними здоровими тваринами, <sup>b</sup> – p<0,05 достовірно в порівнянні з контрольними тваринами-пухлиноносіями.

Note: <sup>a</sup> – statistically significant p<0,05 in comparison with intact control, <sup>b</sup> – statistically significant p<0,05 in comparison with tumor control.

Як видно з табл. введення максимальної дози ПГ мишам без пухлин приводило до збільшення ваги селезінки в 1,5 рази, а також до помірного зростання відносного вмісту в ній лімфоїдних клітин порівняно з інтактним контролем. У тварин, які отримали ПГ у дозі 4 мкг/г, вага селезінки була майже в 2,5 рази більшою за контрольні зразки. Однак, відносний вміст лімфоїдних клітин був нижчий у порівнянні з інтактним контролем майже в 2 рази. Введення найменшої дози ПГ спричиняло незначну спленомагалію, при цьому відносний вміст лімфоїдних клітин в селезінках цих тварин був найбільшим. Ймовірно, найефективнішим для стимуляції антитілогенезу є введення ПГ у дозі 2 мкг/мл.

Одним з ключових лімфоїдних органів у розвитку імунної відповіді є тимус, який спричиняє регуляторний вплив на рівень як клітинного, так і гуморального імунітету шляхом експорту на периферію ефекторних та регуляторних клітин [10]. Відносна вага тимусу при введенні тваринам найбільшої дози ПГ, була майже в 5 разів більшою порівняно з контрольними тваринами, при незначному збільшенні

вмісту тимічних мононуклеарних лейкоцитів. Введення ПГ в дозі 4 мкг/г достовірно не впливало на вагу тимусів і спричиняло істотне збільшення вмісту лейкоцитів. Введення найменшої дози ПГ спричиняло одночасне зростання ваги і клітинності тимусів дослідних тварин.

Реакція лімфоїдних органів на ПГ у мишей на фоні пухлинного росту була дещо іншою. Вага пахових лімфатичних вузлів у мишей з пухлиною була в 2 рази меншою порівняно з контролем. Введення ПГ в максимальній дозі призводило до зменшення розмірів пахових лімфовузлів як в порівнянні з інтактним контролем, так і в порівнянні з контролем пухлини при незмінному відносному вмісті мононуклеарних клітин. Введення середньої дози препарату не позначилося на показниках лімфовузлів дослідних тварин. В групі тварин, що отримали ПГ у найменшій дозі, відносна вага лімфовузлів була найменшою, а клітинність найбільшою, як порівняно з інтактним контролем, так і порівняно з контролем пухлини. Спостерігалась чітка дозова залежність: чим менша доза ПГ, тим більший відносний вміст мононуклеарних клітин у регіонарних лімфатичних вузлах. Найменша доза ПГ спричиняла істотне (на 58 %) зменшення ваги лімфатичних вузлів при одночасному зростанні вмісту клітин у 3 рази, що, ймовірно, є свідченням тривалої імунної відповіді.

Вага селезінки у контрольних мишей-пухлиноносіїв майже вдвічі перевищувала таку у інтактних тварин, відносний вміст спленоцитів також був вдвічі більшим за контроль. Вплив ПГ на вагу селезінок мишей-пухлиноносіїв носив зворотнопропорційний дозозалежний характер: чим меншою була доза ПГ, тим більшою була відносна вага органу. Що стосується впливу на вміст клітин, то лише у мінімальній дозі (2 мкг/г) ПГ спричиняв істотне збільшення відносної їх кількості, яке сягало значень, властивих тваринам без пухлин.

Пухлинний ріст, як відомо, може супроводжуватися морфологічними змінами тимусу [6,11]. За результатами наших досліджень вага тимусу у контрольних тварин-пухлиноносіїв достовірно не відрізнялася від інтактного контролю, а відносний вміст тимоцитів був у 5,5 разів більшим. Введення ПГ в максимальній дозі спричиняло помірне зниження відносної ваги тимусів й істотного (на 50 %) зниження вмісту мононуклеарних клітин. При зменшені дози ПГ відносна вага тимусів мала тенденцію до збільшення, а вміст тимоцитів не зазнавав достовірних змін.

Таким чином, найбільш виразні позитивні зміни досліджуваних лімфоїдних органів як у тварин без пухлин, так і у мишей з карциною легені Льюїса спричиняв ПГ у мінімальній дозі (2 мкг/г). Відмінність реакції органів імунної системи на ПГ у нормі і при пухлинному рості полягала в тому, що у тварин з карциною легенів Льюїса введення препарату не мало достовірного впливу на досліджувані показники тимусу, на відміну від здорових тварин. Більш виразною у мишей-пухлиноносіїв була реакція селезінки. Слід також відмітити, що при пухлинному рості в ряді випадків прослідковувалася чітка дозова залежність впливу пептидоглікану *Staphylococcus aureus* Wood 46 на досліджувані характеристики лімфоїдних органів, тоді як у тварин без пухлини така залежність була практично відсутня.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Вершигора А.Є., Аверкиев А. А., Пастер Є. У., Позур В. К., Холодна Л. С. Инфракрасные спектры некоторых фракций стафилококка // Микробиол. журн. — 1981. — № 4. — С. 482-486.



2. Позур В. В., Сківка Л. М., Потебня Г. П. Динаміка росту експериментальних пухлин у мишей під впливом аутовакцини з пептидогліканом // IV Міжнародна конференція студентів і аспірантів "Молодь і поступ біології" (Львів, 7-10 квітня, 2008 р.): тез. доп. — "Львів", 2008. — С. 332.
3. Позур В. К., Михальський Л. А. Гетерогенність бактеріальних пептидогліканів // Укр. біохім. журн. — 1995. — № 1. — С. 96-100.
4. Позур В. К. Імунобіологічна активність бактеріальних пептидогліканів. — К.: Фітосоціоцентр, 2002. — 236 с.
5. Vonesca I. G. The role of peptidoglycan in pathogenesis // *Curr. Opin. Microbiol.* — 2005. — V. 1, № 8. — P. 46-53.
6. Fu Y. *at. all.* Thymic involution and thymocyte phenotypic alterations induced by murine mammary adenocarcinomas // *J. Immunol.* — 1989. — № 12. — P. 4300-4307.
7. Jacobs-Wagner C. *Bacterial cell shape* // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2005. — V. 8, № 3. — P. 601-610.
8. Jean van Heijenoort Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial **peptidoglycan** // *Glycobiology.* — 2001. — V. 3, № 11. — P. 25-36.
9. Jeneway C. A. *at. all.* Immunology: the immune system in health & disease. — N. Y.: Garland Publishing, 2002. — 732 p.
10. Kozłowska E., Kopes-Szlezak J. Sensitivity of mouse lymphoid and nonlymphoid organs to Silesian air pollutants // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 1997. — V. 1, № 37. — P. 10-16.
11. Mandal D., Bhattacharyya A., Lahiry L. *at. all.* Failure in peripheral immuno-surveillance due to thymic atrophy: importance of thymocyte maturation and apoptosis in adult tumor-bearer // *Life Sci.* — 2005. — V. 21, № 77. — P. 2703-2716.
12. Moreillon P., Majcherczyk P. A. Proinflammatory activity of cell-wall constituents from gram-positive bacteria // *Scand. J. Infect. Dis.* — 2003. — V. 9, № 35. — P. 632-641.
13. Rosenthal R. S., Dziarski R. Isolation of **peptidoglycan** and soluble **peptidoglycan** fragments // *Methods Enzymol.* — 1994. — № 235. — P. 253-285.
14. Traub S. *at. all.* MDP and other muropeptides — direct and synergistic effects on the immune system // *J. Endotoxin. Res.* — 2006. — № 12. — P. 69-85.
15. Yarilin A. A., Belyakov I. M. Cytokines in the thymus: production and biological effects // *Curr Med Chem.* — 2004. — № 11. — P. 447-464.

### В. В. Позур<sup>1</sup>, Л. М. Сківка<sup>1</sup>, Г. П. Потебня<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, просп. Глушкова 2, Киев, 03022, Украина, e-mail: realmed@i.com.ua

<sup>2</sup>Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии имени Р. Е. Кавецкого НАН Украины, ул. Васильковская, 45, Киев-22, 03022, Украина

## РЕАКЦИЯ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ МЫШЕЙ НА ПЕПТИДОГЛІКАН *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 В НОРМЕ И ПРИ ОПУХОЛЕВОМ РОСТЕ

### Реферат

У интактных мышей и мышей с карциномой легкого Льюиса исследовали влияние пептидогликана (ПГ) *Staphylococcus aureus* Wood 46 на весовые индексы лимфоидных органов и содержание в них мононуклеарных клеток. Показано, что наиболее выразительные позитивные изменения исследуемых лимфоидных органов как у животных без опухолей, так и у мышей с карциномой легких Льюиса имело введение ПГ в минимальной дозе (2 мкг/г). Отличие реакции органов иммунной системы на ПГ в норме и при опухолевом росте заключалась в том, что у животных



с карциномой легких Льюиса введение препарата не имело достоверного влияния на исследуемые показатели тимуса, в отличие от здоровых животных. Более выраженной у мышей-опухоленосителей была реакция селезенки. Следует также отметить, что при опухолевом росте в ряде случаев была видна четкая дозовая зависимость влияния пептидогликана *Staphylococcus aureus* Wood 46 на исследуемые характеристики лимфоидных органов, тогда как у животных без опухоли такая зависимость практически отсутствовала.

**К л ю ч е в ы е с л о в а:** пептидогликан *Staphylococcus aureus* Wood 46, карцинома легкого Льюиса, лимфоидные органы.

**V. V. Pozur<sup>1</sup>, L. M. Skivka<sup>1</sup>, G. P. Potebnya<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>T. Shevchenko Kyiv National University, Kyiv 03022, Ukraine, realmed@i.com.ua  
<sup>2</sup>R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology NAS of Ukraine, Kyiv, 03022, Ukraine

## **THE REACTION OF MICE LYMPHOID ORGANS ON PEPTIDOGLYCAN OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 IN NORM AND UNDER TUMOR GROWTH**

### **Summary**

The effects of peptidoglycan (PG) of *Staphylococcus aureus* Wood 46 on the weight indexes and the cellularity of lymphoid organs in normal mice and mice with Lewis lung carcinoma were investigated. It was shown, that most immunogenic doze of PG both for intact animals, and for animals with experimental tumors was 2 µg/g though character of reaction of immune system organs on PG introduction in healthy mice and tumor bearing mice was different. Unlike healthy mice PG had no effect on thymus weight and relative amount of lymphocytes in mice with Lewis lung carcinoma. In addition in tumor bearing mice the reaction on PG administration was more significant. It is necessary to note that under the tumor growth dose-dependence of PG of *Staphylococcus aureus* Wood 46 on studied lymphoid organs was observed in the number of cases.

**К е у w o r d s:** peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* Wood 46, Lewis lung carcinoma, lymphoid organs.

