

**В.В. Позур**

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, просп. Глушкова, 2,  
Київ, 03022, Україна

## **ОСОБЛИВОСТІ ДОЗРІВАННЯ ДЕНДРИТНИХ КЛІТИН ПІД ВПЛИВОМ ТЕЙХОЄВОЇ КИСЛОТИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 *IN VITRO***

*Досліджували вплив тейхоєвої кислоти (ТК) зі Staphylococcus aureus Wood 46 на фенотипові властивості та функціональне дозрівання дендритних клітин (ДК) in vitro. Показано, що обробка незрілих ДК приводить до підвищення ступеня їх зрілості, що проявляється у зростанні рівня експресії поверхневих маркерів HLA-DR та CD80, CD86. Обробка ДК ТК у концентрації 2 мкг/мл спричиняла підсилення здатності цих клітин індукувати проліферацію алогенних лімфоцитів.*

*Ключові слова: тейхоєва кислота, Staphylococcus aureus Wood 46, дендритні клітини, проліферація, лімфоцити.*

Бактерії та їх субклітинні компоненти вже близько 100 років застосовуються в терапії хворих зі злоякісними пухлинами, зокрема як додаткові компоненти, що посилюють імуногенність вакцинних препаратів. [9, 15]. Серед них найбільш дослідженим є стафілококовий білок А, який використовується у клінічних дослідженнях [11, 13]. Крім того, бактерії та їх компоненти останнім часом застосовуються в терапії онкологічних захворювань як ад'юванти і високоімуногенні компоненти протипухлинних вакцин [8, 5].

Тейхоєві кислоти (ТК) — одні із важливих компонентів клітинної стінки грампозитивних мікроорганізмів. Результати досліджень останніх років переконливо доводять імунomodulatory властивості ТК [16]. Здатність ТК ініціювати прозапальну імунну відповідь дозволила розглядати їх як потенційні терапевтичні агенти в лікуванні онкологічних захворювань, перебіг яких, як відомо, супроводжується імуносупресивним станом [10].

Унікальними антигенпрезентуючими клітинами, які поглинають антиген (АГ), процесують його та презентують Т-лімфоцитам, є дендритні клітини (ДК). [6]. Такі клітини можна розглядати як ендogenous ад'ювант, який при використанні з пухлинним антигеном викликає індукцію специфічної протипухлинної імунної відповіді [12]. Функціональна активність цих клітин у онкологічних хворих значно знижена, і однією з причин цього являється нездатність диференціювання ДК в зрілі форми. Відомо, що



лише зрілі ДК моноцитарного походження здатні ефективно стимулювати розвиток специфічної клітинної імунної відповіді [4]. Для забезпечення дозрівання ДК як правило використовують стандартний набір цитокінів IL-4, GM-CSF, TNF, або деякі субстанції бактеріального походження — ліпополісахарид (ЛПС), CpG ДНК [3].

З літератури відомо, що застосування мураміддипептида та тейхоевої кислоти, призводить до індукції дозрівання моноцитів з периферичної крові людини та продукції прозапальних цитокінів (IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6) [7].

Препарати тейхоевих кислот відрізняються за походженням, структурою і, як наслідок, за впливом на імунну систему. Метою даної роботи було дослідити вплив ТК *S. aureus* Wood 46 на фенотипові і функціональні властивості ДК, вирощених *in vitro*.

### Матеріали та методи

Тейхоеву кислоту отримували із клітинних стінок бактерій штаму *Staphylococcus aureus* Wood 46 за методикою Арчібальда [1], шляхом обробки клітинних стінок 10% трихлороцтовою кислотою.

З периферичної крові 10-ти практично здорових осіб отримували мононуклеари методом центрифугування з використанням градієнту щільності фікол-верографіну ( $\rho$ -1,077). Отримані мононуклеарні лейкоцити дворазово відмивали центрифугуванням при 150 g упродовж 10 хвилин у розчині Рінгера. На наступному етапі проводили сепарацію моноцитів за їх здатністю адгезувати на пластиковій поверхні. Для цього отримані клітини ресуспендували у середовищі культивування (середовище RPMI-1640 з 2 mM L-gly, 100 мкг/мл стрептоміцину та 100 од/мл пеніциліну) та інкубували в пластикових чашках Петрі при 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> упродовж 3 год. Після інкубації клітини м'яко струшували та видаляли ті, що не прикріпилися, шляхом їх змивання попередньо прогрітим до 37 °C середовищем RPMI-1640. Концентрацію клітин, що адгезували, довели до 0,5 · 10<sup>6</sup> /мл. Клітини культивували впродовж 6 діб при 37 °C в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub>. Після цього для забезпечення функціонального дозрівання ДК в середовище культивування додавали ТК в концентраціях 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 мкг/мл і інкубували ще 24 години. На 8 добу культивування аналізували фенотипові властивості клітин, а також їх функціональні властивості в реакції змішаної культури лімфоцитів (ЗКЛ), для чого до ДК додавали алогенні лімфоцити (ЛЦ) в співвідношенні ДК/ЛЦ — 1/10 і інкубували протягом 3 діб. Після цього визначали ДНК-статус лімфоцитів, що проліферували, з використанням методу проточної цитофлуориметрії. Для визначення фенотипових властивостей ДК обробляли моноклональними антитілами анти-CD86-FITC та анти-HLA-DR-PE, фіксували 1% розчином параформальдегіду. Аналізували фенотип ДК з використанням проточного цитофлуориметру FACScan і програми обробки даних CellQuest. Для визначення ДНК статусу лімфоцити після інкубації з ДК інкубували у 1% розчині Triton X-100 у



ЗФР з додаванням РНК-ази (25мкг/мл) і ДНК-тропного барвника пропідій-йодиду (PI) (5 мкг/мл). Далі клітини відмивали і фіксували 1% розчином параформальдегіду. Аналізували проби з використанням проточного цитофлуориметру FACSscan і програми обробки даних ModFit.

### Результати та їх обговорення

Після обробки ТК отриманих ДК аналіз їх фенотипових властивостей показав високий рівень експресії коstimуляторних молекул ДК — CD80 і CD86, та важливої для презентації антигенів поверхневої молекули ДК HLA-DR, що свідчить про фенотипову зрілість оброблених клітин (дані не представлені). Можна припустити, що зрілі за фенотиповими властивостями ДК є також зрілими функціонально.

Основною функцією ДК є їх унікальна здатність презентувати антигени Т-клітинам, після чого останні активуються, проліферують і далі диференціюються в ефекторні клітини [14]. Здатність стимулювати проліферацію лімфоцитів за допомогою ДК *in vitro*, як правило, вивчають з використанням реакції змішаної культури лімфоцитів (ЗКЛ). На наступному етапі ми досліджували проліферативну активність лімфоцитів шляхом встановлення їх ДНК-статусу, а саме проліферативного індексу.

Проліферативним індексом вважають відсоток клітин, які активно діляться і знаходяться в S- та G2-M-фазах клітинного циклу. Як відомо, за умов відсутності активної імунної відповіді проліферативний індекс лімфоцитів периферичної крові практично здорової людини становить до 10% клітин [2].

Як видно з таблиці, проліферативний індекс лімфоцитів, що інкубували з алогенними ДК, вирощеними за стандартним протоколом (без додавання ТК), становив 32,2%.

Таблиця

Розподіл клітин згідно фаз клітинного циклу (%).

Table

Cell division according to the cell cycle phases (%).

Варіанти досліджу	G0-G1	G2-M+S	Апоптоз
Нестимульований контроль	73,26	32,21	11,03
ФГА	57,12	53,25	16,37
ТК 0,1 мкг/мл	61,52	31,23	12,76
ТК 0,2 мкг/мл	61,08	47,7	16,0
ТК 0,5 мкг/мл	61,93	46,06	14,15
ТК 1,0 мкг/мл	60,72	46,14	12,91
ТК 2,0 мкг/мл	62,55	55,8	14,01



Додавання до ДК, що вирощували *in vitro*, ТК у різних концентраціях призводило до підвищення зрілості цих клітин і стимуляції ними поділу лімфоцитів. Найефективнішою виявилась концентрація ТК 2 мкг/мл при якій проліферативний індекс лімфоцитів становив 55,8%. При інкубації лімфоцитів з поліклональним активатором лімфоцитів ФГА (позитивний контроль проліферації), проліферативний індекс становив 53,25%.

Таким чином, можна вважати, що оброблені ТК ДК є надзвичайно активними стимуляторами проліферації алогенних лімфоцитів на рівні поліклонального активатора лімфоцитів ФГА.

Рівень апоптозу лімфоцитів, що інкубували з ДК до яких додавали ТК в концентрації 0,2 мкг/г, становить 16,0% і є порівняним результатом з ФГА. Це є ще одним свідченням здатності активованих ТК-ю ДК спричиняти активацію алогенних лімфоцитів.

Інкубація дендритних клітин *in vitro* з тейхоевою кислотою зі *S. aureus* Wood 46 приводить до підвищення ступеня зрілості цих клітин.

На поверхні ДК зростає рівень експресії коstimуляторних молекул CD80 і CD86 та важливої для презентації антигенів CD4+Т-лімфоцитам молекули HLA-DR.

При додаванні до ДК ТК в найбільшій концентрації (2 мкг/мл) спостерігали найбільш виразний активаторний вплив на проліферацію Т-лімфоцитів.

Показано, що тейхоеву кислоту *S. aureus* Wood 46 можна використовувати як альтернативний стимулятор дозрівання ДК при вирощуванні їх *in vitro*.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Арчибальд А.Р. Методы исследования углеводов. М: Выс. школа, 1975. — 350 с.
2. Меньшиков В.В. Клиническая лабораторная диагностика // Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. — М.: Лабинформ-РАМЛД. — 1999. — С. 170–177.
3. Askew D., Chu R.S., Krieg A.M., Harding C.V. CpG DNA Induces Maturation of Dendritic Cells with Distinct Effects on Nascent and Recycling MHC II Antigen-Processing Mechanisms // The Journal of Immunology. — 2000. — V. 165 — P. 6889–6895.
4. Gilboa E. DC-based cancer vaccines // The Journal of Clinical investigation. — 2007. — № 5. — P. 1195–1203.
5. Hara I., Sato N., Miyake H., Muramaki M., Hikosaka S., Kamidono S. Introduction of 65 kDa antigen of Mycobacterium tuberculosis to cancer cells enhances anti-tumor effect of BCG therapy//Microbiol Immunol. — 2004. — 48(4). — P. 289–95.



6. *Hottl L., Zelle-Reiser C., Gander H.* Immunotherapy of metastatic renal carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells // *Clin Cancer Res.* — 2002. — № 8. — P. 3369–76.

7. *Kim H.J., Yang J.S., Woo S.S.* Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines // *J Leukoc Biol.* — 2007. — № 81(4). — P. 983–9.

8. *Lycke N.* From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM // *Cell Microbiol.* — 2004. — 6(1). — P. 23–32.

9. *Maeda H., Akaike T., Wu J., Noguchi Y., Sakata Y.* Bradikinin and nitric oxide in infectious disease and cancer // *Immunopharmacology.* — 1996. — 33(1–3). — P. 222–30.

10. *Okamoto M., Ohe G., Furuichi S., Nishikawa H., Oshikawa T., Tano T., Ahmed S.U., Yoshida H., Moriya Y., Matsubara S., Ryoma Y., Saito M., Sato M.* Enhancement of anti-tumor immunity by lipoteichoic acid-related molecule isolated from OK-432, a streptococcal agent, in athymic nude mice bearing human salivary adenocarcinoma: role of natural killer cells // *Anticancer Res.* — 2002. — 22. — 6A: P. 3229–39.

12. *Quan W.D. Jr., Palackdharry C.S.* Common cancers-immunotherapy and multidisciplinary therapy: Parts III and IV. — *Dis Mon.* — 1997. — 43(11). — P. 745–808.

12. *Schuler G.* Dendritic cells in cancer immunotherapy // *Eur J. Immunol.* — 2010. — № 40(8). — P. 2123–30.

13. *Shimizu M., Matsuzawa A., Takeda Y.* A novel method for modification of tumor cells with bacterial superantigen with a heterobifunctional cross-linking agent in immunotherapy of cancer // *Mol Biotechnol.* — 2003. — 25(1). — P. 89–94.

14. *Steinman R.* The dendritic cell system and its role in immunogenicity // *Ann Rev Immunol.* — 1999. — № 9. — P. 271–296.

15. *Terman D.S.* Protein A and staphylococcal products in neoplastic disease // *Crit Rev Oncol Hematol.* — 1985. — 4(2). — P. 103–24.

16. *Wang J.E., Jurgensen P.F., Almlöf M., Thiernemann C., Foster S.J., Aasen A.O., Solberg R.* Peptidoglycan and Lipoteichoic Acid from *Staphylococcus aureus* Induce Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin 6 (IL-6), and IL-10 Production in Both T Cells and Monocytes in a Human Whole Blood Model. // *Surg Infect (Larchmt).* — 2003. — 4:2: P. 181–91.



**В.В. Позур**

Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, просп. Глушкова, 2,  
Киев, 03022, Украина

**ОСОБЕНОСТИ СОЗРЕВАНИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПОД  
ВОЗДЕЙСТВИЕМ ТЕЙХОЕВОЙ КИСЛОТЫ  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 *IN VITRO***

**Реферат**

Исследовали влияние тейхоевой кислоты (ТК) *Staphylococcus aureus* Wood 46 на фенотипические свойства и функциональное дозревание дендритных клеток (ДК) *in vitro*. Показано, что обработка незрелых ДК приводит к повышению степени их зрелости, которая проявляется в росте уровня экспрессии поверхностных маркеров HLA-DR и CD80, CD86. Обработка ДК ТК в концентрации 2 мкг/мл приводила к усилению способности этих клеток индуцировать пролиферацию аллогенных лимфоцитов.

**К л ю ч е в ы е с л о в а :** тейхоевая кислота, *Staphylococcus aureus*, дендритные клетки, пролиферация, лимфоциты.

**V.V. Pozur**

T.G. Shevchenko Kyiv National University, 2, Glushkova ave.,  
Kyiv, 03022, Ukraine

**THE EFFECT OF TEICHOIC ACID FROM  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* WOOD 46 ON THE  
DENDRITIC CELLS MATURATION *IN VITRO***

**Summary**

The effect of teichoic acid from *Staphylococcus aureus* Wood 46 on DC maturation *in vitro* was investigated. It was shown that treatment of immature DC with teichoic acid resulted in increasing of DC maturation. Treated with teichoic acid DC demonstrated the high level of HLA-DR and CD80, CD86 markers expression. Treatment of immature DC with 2 mkg/ml of teichoic acid caused increase of its ability to stimulate allogenic lymphocyte proliferation *in vitro*.

**Key words:** teichoic acid from *Staphylococcus aureus*, dendritic cells, proliferation, lymphocyte.

