

## Вплив тейхоєвої кислоти стафілокока на цитолітичну активність природних кілерних клітин

Н. В. Сенчило, С. В. Олішевський, В. К. Позур

Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01033, Україна

*Вивчено вплив різних концентрацій тейхоєвої кислоти (ТК) Staphylococcus aureus Wood 4b на опосередкований природними кілерними клітинами (ПКК) лізис пухлинних клітин раку Ерліха. Показано, що низькі і середні концентрації ТК стимулюють ПКК-активність, а високі — супресують ПКК-опосередкований цитоліз пухлинних клітин. Встановлено, що одночасне застосування ТК і форболміристатетату має дозозалежну протипухлинну дію із зворотною кореляцією.*

Вступ. Експериментальні дослідження свідчать про те, що різні види мікроорганізмів та їхні окремі складові компоненти здатні безпосередньо чи опосередковано модулювати цитолітичну активність природних кілерних клітин (ПКК) у двох напрямках: антимікробному та протипухлинному [1].

Що стосується тейхоєвих кислот (ТК), то показано, що ТК клітинної стінки ряду бактерій відповідає за підсилення реакції гіперчутливості, у великих концентраціях супресує синтез антитіл і здатна активувати клітинну цитотоксичність [2]. Літературні дані свідчать, що ТК ряду грампозитивних бактерій з поверхневою структурою, яка індукує секрецію моноцитами ІЛ-12 CD14-залежним шляхом. Останнє спричинює активацію ПКК та строго визначене продукування ними  $\alpha$ -ІФН [3]. Окрім того, показано, що ТК, ізольована із штаму ОК-432, стимулює секрецію цитокінів Тх1-типу, які активують Т-лімфоцити та ПКК [4].

Зважаючи на те, що дослідження впливу різних субстанцій мікробного походження на ПКК та їхню взаємодію з пухлинними клітинами відкривають нові можливості для розробки методів підсилення ПКК-активності при імунотерапії раку, метою даної роботи було дослідити вплив тейхоєвої кислоти окремо, а також у поєднанні з форболміристатетатом на цитолітичну активність ПКК.

**Матеріали і методи.** Об'єктом дослідження слугувала фракція лімфоцитів, збагачена ПКК. Спленоцити виділяли із селезінок інтактних нелі-

нейних мишей-самців (віком 2—2,5 місяця). Клітини отримували методом диференційного центрифугування клітинної суспензії при 400 g (40 хв) у градієнті щільності фікол-верографіну («Pharmacia Fine Chemicals», Швеція) (1,077 г/см<sup>3</sup>) [5]. Лімфоцити з інтерфазного кільця двічі відмивали в стерильному ізотонічному фосфатному буферному розчині та ресуспендували в середовищі такого складу: середовище RPMI 1640 («Flow Lab.», США) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки («Flow Lab.»), 50 мкг/мл стрептоміцину сульфату («Київмедпрепарат», Україна) та 50 од/мл бензилпеніциліну («Київмедпрепарат») згідно з рекомендаціями Фільчакова [6]. Фракцію макрофагів видаляли методом адгезії останніх до полістиролової поверхні чашок Петрі [5].

Як клітини-мішені використовували свіжовиділені клітини перещеплюваного асцитного раку Ерліха. Пухлинні клітини ресуспендували у фізіологічному розчині так, щоб їхня кінцева концентрація становила  $1 \cdot 10^6$  клітин в 1 мл фізіологічного розчину. Життєздатність клітин становила не менше 97—99 %. Цитотоксичний тест здійснювали за методикою Шпакової [7].

Підраховували кількість живих та мертвих клітин асцитного раку Ерліха після 20-год інкубації з клітинами-ефекторами. Клітини-мішені підраховували в камері Горяєва за допомогою світлової мікроскопії при 160-кратному збільшенні (окуляр  $\times 20$ , об'єктив  $\times 8$ ). Кількість життєздатних клітин-мішеней визначали в контролі та досліді. Цитолітичну активність ПКК виражали цитолітичним

індексом (ЦІ) у відсотках, який розраховували згідно з загальноприйнятою формулою [7].

Статистичну обробку даних проводили за відомими методами варіаційної статистики, вираховуючи середнє значення (М), середнє квадратичне відхилення ( $\sigma$ ) та середню квадратичну похибку ( $m$ ). Для визначення достовірності відмінностей між показниками дослідних та контрольних лунок використовували  $t$ -критерій Ст'юдента [8].

Тейхоєву кислоту одержували з клітинної стінки *Staphylococcus aureus* Wood 46 за методикою Арчібальда [9]. Лімфоїдні та пухлинні клітини обробляли ТК у таких кількостях, що кінцеві концентрації ТК в лунці становили: 0,005; 0,05 та 0,5 мкг/мл. Розчином форболмірестатацетату («Sigma», США) обробляли ПКК з розрахунку 250 нг на 1 мл клітинної суспензії (середня його доза) за методикою Міллера та ін. [10].

Результати і обговорення. Здійснили ряд цитотоксичних тестів з варіацією кількісного складу клітин-ефекторів у кожній лунці, причому кількість клітин-мішеней залишалася постійною і складала  $1 \cdot 10^6$  клітин в 1 мл.

Далі визначали залежність цитолітичного індексу (ЦІ) ПКК від співвідношення клітин-мішеней (КМ) до клітин-ефекторів (КЕ) в інкубаційній системі. Дані наведено нижче:

Співвідношення КМ до КЕ	ЦІ, %
1:1	4,0±0,01
1:3	15,0±0,02
1:6	36,0±0,02
1:12	54,0±0,1

Найвищу цитолітичну активність ПКК мають у тій системі КЕ:КМ, де співвідношення між ними складає 1:12. Нами обрано співвідношення КМ:КЕ 1:3, за якого кількість пухлинних клітин, що зберігають життєздатність, залишається досить великою, щоб вираження супресуючої чи стимуляторної дії різних модифікуючих факторів на цитолітичну активність ПКК було чітко помітним. Дослідження впливу різних концентрацій ТК на цитолітичну активність ПКК умовно можна поділити на два етапи. Перший етап полягав у вивченні впливу різних концентрацій ТК на цитолітичну активність ПКК та впливу ТК у таких концентраціях на життєздатність пухлинних клітин. Як показують отримані результати, сама ТК у жодній з досліджених концентрацій, згідно з даними табл. 1 та рисунка, не впливає на життєздатність пухлинних клітин.

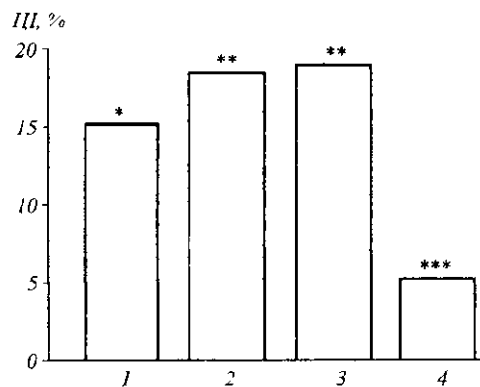
Показники життєздатності пухлинних клітин після двогодинної інкубації з різними концент-

Таблиця 1

Модифікуючий вплив тейхоєвої кислоти (ТК), одержаної з клітинної стінки *S. aureus* Wood 46, на цитолітичну активність (ЦІ) природних кілерних клітин (ПКК)

Умови досліду	Кількість пухлинних клітин ( $\cdot 10^5$ ) (М±m)		ЦІ, %
	Живих	Мертвих	
Контроль <sub>ПК</sub> (ПК + ПС)	2,95±0,01	0,05±0,03	—
Контроль <sub>ТК0,005</sub> (ПК + ТК <sub>0,005</sub> )	2,98±0,05	0,02±0,02	—
Контроль <sub>ТК0,05</sub> (ПК + ТК <sub>0,05</sub> )	2,90±0,06	0,10±0,01	—
Контроль <sub>ТК0,5</sub> (ПК + ТК <sub>0,5</sub> )	2,85±0,03	0,15±0,05	—
Контроль <sub>ПКК</sub> (ПК + + ПКК) (1:3)	2,49±0,01	0,51±0,05	15,60±0,03
ПК + [ПКК + ТК <sub>0,005</sub> ]	2,38±0,01	0,62±0,03	19,30±0,03**
ПК + [ПКК + ТК <sub>0,05</sub> ]	2,36±0,01	0,64±0,02	20,00±0,02**
ПК + [ПКК + ТК <sub>0,5</sub> ]	2,95±0,01	0,25±0,00	6,30±0,01***

Примітка. ПК — пухлинні клітини перещеплюваного асцитного раку Ерліха; ПС — поживне середовище; індексом позначено концентрацію ТК у мкг/мл; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  та \*\*\* $p < 0,001$  відносно контролю.



Модифікуючий вплив тейхоєвої кислоти (ТК) на значення цитолітичного індексу (ЦІ) природних кілерних клітин (ПКК). Умови інкубації клітин-мішеней з клітинами-ефекторами: 1 — контроль (ПКК); 2 — поживне середовище + ПКК + ТК у концентрації 0,005 мкг/мл; 3 — те саме + ТК у концентрації 0,05 мкг/мл; 4 — 0,5 мкг/мл; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  та \*\*\* $p < 0,001$  відносно контролю

раціями ТК майже не відрізняються від таких у контролі пухлинні клітини + поживне середовище. Лише при обробці пухлинних клітин ТК у концентрації 0,5 мкг/мл життєздатність клітин-мішеней є дещо нижчою від контрольного значення, чим, зважаючи на стандартну похибку вибраного методу обліку результатів тесту, можна знехтувати.

Щодо впливу ТК на цитолітичну активність ПМК, то, як показують дані рисунка, ТК в концентраціях 0,005 та 0,05 мкг/мл підвищує приблизно на 25 та 28 % відповідно цитолітичну активність ПМК відносно контролю, що підтверджується значеннями цитолітичного індексу. При підвищенні концентрації ТК до 0,5 мкг/мл рівень цитолітичної активності ПМК знижується приблизно в 3 рази порівняно з контрольним, що свідчить про значну супресію, яку чинить ТК в такій концентрації.

З огляду на літературні дані [11] про механізми супресії ефекторних функцій лімфоїдних клітин певними субстанціями мікробного походження, зокрема, стосовно імуносупресії, пов'язаної з імунізацією стафілококовою інфекцією, нами зроблено припущення, що згадану імуносупресію можна пояснити блокуванням ТК в концентрації 0,5 мкг/мл певних поверхневих структур ПМК, які несуть відповідальність за виконання ними ефекторних функцій, а також індукцією ТК в такій концентрації стану анергії лімфоїдних клітин.

Другий етап включав дослідження поєднаного впливу різних концентрацій ТК з форболміристат-ацетатом (ФМА) в різних комбінаціях. Як свідчать дані табл. 2, застосування ФМА як чинника, що модифікує поверхню клітинну мембрану лімфоцитів, значно підвищувало здатність останніх лізувати пухлинні клітини. Цитолітичний індекс оброблених ФМА ПМК зростає більше ніж в 1,5 рази в порівнянні з контролем. За літературними даними, застосування ФМА в залежності від його концентрації посилює здатність лімфоцитів продукувати супероксидні радикали. Відомо, що після інкубації ПМК та лімфокінтивованими кілерами з форболовими ефірами вони активуються і на них експресується CD69, що відповідає за передачу сигналів у клітинах на ранніх етапах активації [12], зростає експресія молекул міжклітинної адгезії (ICAM-1),  $\alpha_2$ -інтегрину (LFA-1), комплементарно-регуляторного клітинного мембранного протеїну (CD59) та загального лейкоцитарного антигену (CD45) [13]. Деякі форболові ефіри (наприклад, тетрадеканолфорболацетат) у високих концентраціях значно посилюють плинність ліпідів поверхневої мембрани клітин [14] та зменшують ступінь мембранної сіалізації. Окрім того, форболові ефіри можуть високоспецифічно взаємодіяти з фосфоліпідзалежною протсінкіназою C, яка відіграє важливу роль у трансдукції сигналів у клітинах [15].

Обробка ПМК ФМА, а потім ТК в будь-якій концентрації, як видно з табл. 3, призводить до зниження рівня цитолітичної активності ПМК у порівнянні з контрольним значенням. Наведені да-

Таблиця 2

Модифікуючий вплив форболміристатацетату (ФМА) в поєднанні з тейхосовою кислотою (ТК), на протипухлинну активність природних кілерних клітин (ПМК)

Умови дослідження	Кількість пухлинних клітин ( $\cdot 10^5$ ) (M $\pm$ m)		ЦІ, %
	Живих	Мертвих	
ПК + [ПМК + ФМА]	2,23 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,04	24,40 $\pm$ 0,03**
ПК + [(ПМК + ФМА) + ТК <sub>0,005</sub> ]	2,67 $\pm$ 0,00	0,33 $\pm$ 0,01	9,50 $\pm$ 0,02**
ПК + [(ПМК + ФМА) + ТК <sub>0,05</sub> ]	2,60 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,01	12,00 $\pm$ 0,03**
ПК + [(ПМК + ФМА) + ТК <sub>0,5</sub> ]	2,54 $\pm$ 0,00	0,46 $\pm$ 0,00	14,00 $\pm$ 0,01*

Примітка. ЦІ — цитолітичний індекс; ПК — пухлинні клітини перещеплюваного асцитного раку Ерліха; індексом позначено концентрацію ТК у мкг/мл; \*p < 0,05 та \*\*p < 0,01 відносно контролю.

Таблиця 3

Модифікуючий вплив тейхосової кислоти (ТК), в поєднанні з форболміристат ацетатом (ФМА) на протипухлинну активність природних кілерних клітин (ПМК)

Умови дослідження	Кількість пухлинних клітин ( $\cdot 10^5$ ) (M $\pm$ m)		ЦІ, %
	Живих	Мертвих	
ПК + [ПМК + ФМА]	2,23 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,05	15,60 $\pm$ 0,03
ПК + [(ПМК + ТК <sub>0,005</sub> ) + ФМА]	2,38 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,03	19,30 $\pm$ 0,03**
ПК + [ПМК + ТК <sub>0,05</sub> ] + ФМА]	2,36 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,02	11,20 $\pm$ 0,03
ПК + [ПМК + ТК <sub>0,5</sub> ] + ФМА]	2,95 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,00	6,30 $\pm$ 0,01**

Примітка. Див. табл. 2.

ні демонструють дозозалежне пригнічення цитолітичного потенціалу ПМК, яке має зворотний зв'язок: чим менша концентрація ТК, тим більше проявляється інгібуючий вплив, зумовлений обробкою ПМК спочатку ФМА, а потім ТК.

Обробка ПМК тейхосовою кислотою в різних концентраціях, а потім ФМА (табл. 3) виявляє такий же ефект, але дещо з більшим пригніченням рівня природної цитотоксичності лімфоцитів.

В обох випадках поєднаного застосування ТК та ФМА (в різних комбінаціях) значення цитолітичного індексу є нижчими, ніж навіть у контролі, не кажучи вже про цитолітичну активність ПМК при обробці окремо ТК в низьких та середніх концентраціях або окремо ФМА. Одночасно за умов поєднаного впливу ФМА і ТК в концентрації 0,5 мкг/мл показники цитолітичної активності

ПКК значно вищі ( $p < 0,05$ ), ніж при застосуванні лише ТК в аналогічній концентрації, тобто імуносупресивна дія ТК нівелюється. Це може свідчити про справді значний стимуляторний вплив, які чинять форболові ефіри, зокрема ФМА, на функціональну активність лімфоїдних клітин.

Причини зниження неспецифічної цитотоксичності ПКК при поєднаному впливі ТК та ФМА важко пояснити, можливо, такий пригнічуючий ефект зумовлений занадто великою стимуляцією з боку застосованих нами модифікуючих чинників, яка призводить до зниження цитолітичного потенціалу ПКК чи до індукції в деякій частині лімфоїдних клітин стану анергії.

Вірогідно, що при застосуванні інших (менших) концентрацій обох чинників або використанні їх в іншому співвідношенні можна буде одержати стимулюючий ефект.

**Висновки.** Вплив модифікуючих чинників мікробної етіології на лімфоїдні клітини різнобічно відображається на цитотоксичній активності ПКК, що залежить від якісних та кількісних характеристик досліджуваних чинників: їхньої хімічної природи, спрямованості впливу та концентрацій, у яких вони застосовуються.

Тейхоева кислота, виділена з клітинної стінки *S. aureus* Wood 46, дозозалежно модулює цитолітичну ПКК-активність: у низьких і середніх концентраціях чинить стимулюючий вплив, а у високих — пригнічує таку активність. При поєднаній дії ТК з ФМА спостерігається дозозалежна інгібуюча дія, що має зворотний зв'язок з концентрацією ТК.

*N. V. Senchilo, S. V. Otishevskyy, V. K. Pozur*

The influence of teichoic acid of *Staphylococcus aureus* Wood 46 on cytolytic activity of natural killer cells

#### Summary

The influence of different concentrations of teichoic acid (TA) *Staphylococcus aureus* Wood 46 on NK-mediated lysis of tumor cells of Erlich carcinoma has been investigated. Low and moderate TA concentrations have been shown to enhance the NK-activity, whereas high concentrations are suppressive for NK-mediated tumor lysis. The simultaneous usage of TA and phorbolmyristateacetate causes dose-dependent inhibition with inverse correlation.

*H. B. Сенчило, С. В. Олишевский, В. К. Позур*

Влияние тейхоевой кислоты стафилококка на цитолитическую активность природных киллерных клеток

#### Резюме

Изучено влияние разных концентраций тейхоевой кислоты (ТК) *Staphylococcus aureus* Wood 46 на опосредованный природными киллерными клетками (ЕКК) лизис опухолевых клеток рака Эрлиха. Показано, что низкие и средние концентрации ТК

стимулируют ЕКК-активность, а высокие — супрессируют ЕКК-опосредованный цитоллиз опухолевых клеток. Установлено, что одновременное применение ТК и форболмирилатацетата имеет дозозависимое ингибирующее действие с возвратной корреляцией.

#### PERELIK LITERATURY

1. Robertson M. J., Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells // *Blood*.—1990.—N 76.—P. 2421—2438.
2. Ломакін М. С., Бочко Г. М. Естественные киллеры и микроорганизмы: взаимоотношенность // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*.—1989.—№ 10.—С. 102—108.
3. Cleveland M. G., Gorham J. D., Murphy T. L., Tuomanen E., Murphy K. N. Lipoteichoic acid preparations of gram-positive bacteria induce interleukin-12 through a CD14-dependent pathway // *Infect. Immunol.*—1996.—64, N 6.—P. 1906—1912.
4. Okamoto M., Ohe G., Oshikawa T., Nishikawa K., Furuichi S., Yoshida H., Matsuno T., Saito M., Sato M. Induction of Th1-type cytokines by lipoteichoic acid-related preparation isolated from OK-432, penicillin-killed streptococcal agent // *Immunopharmacology*.—2000.—3, N 49.—P. 363—376.
5. Лимфоциты. Методы / Под ред. Дж. Клауса.—М.: «Мир», 1990.—395 с.
6. Фільчаков Ф. В., Малиновська Т. П., Гриневич Ю. Я., Близнюк І. А. Мікроскопічний варіант методу визначення цитотоксичної активності лімфоцитів // *Лаб. діагностика*.—1998.—3, № 1.—С. 28—30.
7. Шапова А. П., Павлова К. С., Бульчева Т. И. МТГ — колориметрический метод определения цитотоксической активности естественных киллерных клеток // *Клин. и лаб. диагностика*.—2000.—№ 2.—С. 20—23.
8. Лакін Г. Ф. Биометрия.—М.: Высш. шк., 1990.—352 с.
9. Арчибальд А. Р. Тейхоевые кислоты. Методы исследования углеводов.—М.: Мир, 1975.—С. 130—138.
10. Miller F., Rollag H., Froland S. S. Nitroblue tetrasolium reduction in monocytes and monocyte-derived macrophages // *Acta pathol., microbiol. et immunol. scand.*—1989.—97.—P. 490—496.
11. Афонина Г. Б., Брюзгина Т. С., Кравченко Э. Я. Изменения липидов мембран лимфоцитов при иммунизации и стафилококковой инфекции // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*.—1991.—№ 6.—С. 73—75.
12. Александров А. В., Джексон А. М., Мудтхофф Г., Ботзлер К. ЕК-клетки, протеины теплового шока, клеточная адгезия — структура и молекулярные механизмы (Обзор докл. на 12-й Евр. иммунол. конф. в Барселоне, 14—17.06.94) // *Иммунология*.—1996.—4.—С. 70—71.
13. Hunakova L., Sedlak, Klobusicka M., Sulikova M., Chorvuth B. Phorbol ester (TPA)-induced differential modulation of cell surface antigens in human pluripotential leukemia (K562) cell line: effects of protein kinase inhibitors with broad-and PKC selective inhibitory activity // *Neoplasma*.—1995.—42, N 5.—P. 249—253.
14. Jiang J., Yu B., Wu Y. Effects of superoxide anion, B(alpha)P and TPA on the membrane fluidity of NIH3T3 cells // *Chung Kuo I Hsueh Ko Hsueh Yuan Hsueh Pao*.—1997.—19, N 3.—P. 217—221.
15. Левицкий Д. О. Кальций и биологические мембраны.—М.: Высш. шк., 1990.—124 с.

УДК 612.44:616.98

Надійшла до редакції 24.05.02