

В. В. Позур

Вплив пептидоглікану *Staphylococcus aureus* Wood 46 на дозрівання дендритних клітин *in vitro*

(Представлено членом-кореспондентом НАН України Д. М. Говоруном)

Досліджено вплив пептидоглікану *S. aureus* Wood 46 на функціональне дозрівання дендритних клітин *in vitro*. Показано, що обробка незрілих ДК пептидогліканом приводить до підвищення ступеня їх зрілості, що виявляється в зростанні рівня експресії поверхневих маркерів HLA-DR та CD86. Обробка ДК пептидогліканом у концентрації 2 мкг/мл спричиняє посилення здатності цих клітин індукувати проліферацію алогенних лімфоцитів.

Ключову роль у розпізнаванні пухлинного антигену і презентації його специфічним цитолітичним Т-лімфоцитам відіграють дендритні клітини (ДК) [1]. Такі клітини можна розглядати як потужний ендогенний ад'ювант, який при використанні з пухлинним антигеном викликає індукцію специфічної імунної відповіді [2, 3]. Завдяки розробленим останніми роками методикам отримання ДК з моноцитів периферичної крові, їх кістковомозкових попередників або стовбурових клітин і їх культивування *ex vivo* стало можливим використовувати ці клітини як індуктори специфічної протипухлинної імунної відповіді в експериментальних дослідженнях і клінічних випробуваннях [4]. Проте все ще тривають дослідження щодо розробки найбільш ефективних способів вирощування цих клітин *in vitro*. Відомо, що лише зрілі ДК моноцитарного походження здатні ефективно стимулювати розвиток специфічної клітинної імунної відповіді [5].

Для підвищення ступеня зрілості ДК часто, крім стандартного набору цитокінів (ІЛ-4, GM-CSF), на останніх термінах вирощування клітин *in vitro* в середовище культивування додають фактор некрозу пухлин (TNF) або деякі субстанції бактеріального походження — ліпополісахарид, CpG ДНК [6, 7].

Застосування ліпоейхоевої кислоти та мураміл дипептиду (мінімальної структурної одиниці пептидоглікану з імуностимуляторною активністю) призводить до індукції дозрівання моноцитів з периферичної крові людини та продукції прозапальних цитокінів (ІЛ-12, TNF- α , ІЛ-6) [8]. Макрофаги під впливом компонента бактеріального пептидоглікану (N-ацетилглюкозамін-N-ацетилмураміл-пентапептиду) зазнають ряд змін, схожих на процес дозрівання, що описаний для ДК. Для зрілих макрофагів характерне зниження фагоцитозу, що супроводжується збільшенням бактерицидної активності; змінюється експресія поверхневих молекул: зменшується рівень патернрозпізнаючих структур, рецепторів, що опосередковують поглинання мікроорганізмів; збільшується рівень експресії антигенпрезентуючих і костимуляторних молекул [9].

Одними з потужних біологічно активних субстанцій бактеріального походження є структурні елементи клітинної стінки, які характеризуються імуномодуляторними та ад'ювантними властивостями [10, 11]. Універсальним і невід'ємним компонентом клітинної стінки практично всіх бактерій є пептидоглікан (ПГ) [12]. Здатність ПГ ініціювати прозапальну імунну відповідь дозволила розглядати їх як потенційні терапевтичні агенти в лікуванні онкологічних захворювань, перебіг яких супроводжується імуносупресивним станом [13].

Інформація стосовно впливу ПГ золотистого стафілокока на дозрівання ДК в літературі практично відсутня. Тому мета проведеного дослідження полягала у визначенні впливу ПГ *S. aureus* Wood 46 на фенотипові і функціональні властивості ДК, вирощених *in vitro*.

З периферичної крові 10 практично здорових осіб виділяли мононуклеари методом центрифугування з використанням градієнта щільності фікол-верографіну ($\rho = 1,077$). Отримані мононуклеарні лейкоцити дворазово відмивали центрифугуванням при 150 g протягом 10 хв у розчині Рінгера. На наступному етапі проводили сепарацію моноцитів за їх здатністю адгезувати на пластиковій поверхні. Для цього отримані клітини ресуспендували в 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 в атмосфері з 5% CO₂ протягом 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, доводили до $0,5 \cdot 10^6$ /мл. Клітини культивували протягом 6 діб при 37 °C в атмосфері з 5% CO₂. Після цього для забезпечення функціонального дозрівання ДК у середовище культивування додавали ПГ у концентраціях 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 мкг/мл і інкубували ще 24 год. На 8-му добу культивування аналізували фенотипові властивості клітин, а також їх функціональні властивості в реакції змішаної культури лімфоцитів, для чого до ДК додавали алогенні лімфоцити (ЛЦ) у 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%-м розчином параформальдегіду. Аналізували фенотип ДК з використанням проточного цитофлуориметра FACScan і програми обробки даних CellQuest. Для визначення ДНК-статусу лімфоцити після інкубації з ДК інкубували в 1%-му розчині Triton X-100 у забуференому фізрозчині з додаванням РНКазі (25 мкг/мл) і ДНК-тропного барвника пропідій-йодиду (PI) (5 мкг/мл). Далі клітини відмивали і фіксували 1%-м розчином параформальдегіду. Аналізували проби з використанням проточного цитофлуориметра FACScan і програми обробки даних ModFit.

Аналіз фенотипових властивостей отриманих ДК після їх обробки ПГ показав високий рівень експресії костимуляторної молекули ДК — CD86 та важливої для презентації антигенів поверхневої молекули ДК HLA-DR, що свідчить про фенотипову зрілість оброблених клітин (дані не наведено). Можна припустити, що зрілі за фенотиповими властивостями ДК є також зрілими функціонально.

У міру дозрівання ДК змінюються функції клітини (захват, фіксація і переробка антигену на антигенпрезентацію). Зрештою вони перетворюють антиген в імуногенну форму, експресують костимуляторні молекули і, таким чином, ініціюють розвиток специфічного набутого імунітету. ДК мігрують через аферентні лімфатичні вузли в Т-залежні зони вторинних лімфоїдних органів [14].

Основною функцією ДК є їх унікальна здатність презентувати антигени Т-клітинам, після чого останні активуються, проліферують і далі диференціюються в ефекторні клітини [14]. 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 відсутності активної імунної відповіді проліферативний індекс лімфоцитів периферичної крові практично здорової людини становить до 10% клітин [15].

Таблиця 1. Розподіл клітин за фазами клітинного циклу, %

Варіант досліджу	Апоптоз	$G_0 - G_1$	$G_2 - M + S$
Нестимульований контроль	12,69	73,26	29,35
ФГА	20,41	61,87	42,29
ПГ 0,2 мкг/мл	16,34	62,28	44,09
ПГ 0,5 мкг/мл	15,66	64,47	44,78
ПГ 1,0 мкг/мл	15,62	67,18	43,88
ПГ 2,0 мкг/мл	20,14	51,91	48,07

Як видно з табл. 1, проліферативний індекс лімфоцитів, що інкубували з алогенними ДК, вирощеними за стандартним протоколом (без додавання ПГ), становив 29,4%. Додавання до ДК, що вирощували *in vitro*, ПГ у різних концентраціях спричинило підвищення зрілості цих клітин і стимуляцію ними поділу лімфоцитів. Найефективнішою виявилась концентрація ПГ 2 мкг/мл, при якій проліферативний індекс лімфоцитів становив 48,1%. При інкубації лімфоцитів з поліклональним активатором лімфоцитів фітогемаглютиніном (ФГА) (позитивний контроль проліферації) проліферативний індекс становив 42,29%. Таким чином, можна зробити висновок, що оброблені ПГ ДК є надзвичайно активними стимуляторами проліферації алогенних лімфоцитів на рівні поліклонального активатора лімфоцитів ФГА.

Рівень апоптозу лімфоцитів, що інкубували з ДК, до яких додавали ПГ в концентрації 2 мкг/г, становить 20,14% і є порівняним результатом з ФГА. Це є ще одним свідченням здатності активованих ПГ ДК спричиняти активацію алогенних лімфоцитів.

Отже, інкубація ДК *in vitro* з ПГ *S. aureus* Wood 46 приводить до підвищення ступеня зрілості цих клітин. На поверхні ДК зростає рівень експресії коstimуляторної молекули CD86 та важливої для презентації антигенів CD4 + Т-лімфоцитам молекули HLA-DR. При додаванні до ДК ПГ у найвищій концентрації (2 мкг/мл) спостерігається найбільш виразний активаторний вплив на проліферацію Т-лімфоцитів.

Для створення аутологічних протипухлинних вакцин на основі ДК, що застосовуються в комплексному лікуванні хворих на злоякісні новоутворення, використовують зрілі ДК моноцитарного походження. Нами показано, що ПГ *S. aureus* Wood 46 можна використовувати як альтернативний стимулятор дозрівання ДК при вирощуванні їх *in vitro*.

- Hottl L., Zelle-Reiser C., Gander H. et al. Immunotherapy of metastatic renal carcinoma with tumor lysate-pulsed autologous dendritic cells // Clin. Cancer Res. – 2002. – No 8. – P. 3369–3376.
- Schuler G. Dendritic cells in cancer immunotherapy // Eur. J. Immunol. – 2010. – 40, No 8. – P. 2123–2130.
- Coosemans A., Wölfl M., Berneman Z.N. et al. Immunological response after therapeutic vaccination with WT1 mRNA-loaded dendritic cells in end-stage endometrial carcinoma // Anticancer Res. – 2010. – 30, No 9. – P. 3709–3714.
- Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А. и др. Адаптирование методики культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения // Рос. биотерапевт. журн. – 2000. – № 3. – С. 56–63.
- Gilboa E. DC-based cancer vaccines // J. Clin. Invest. – 2007. – No 5. – P. 1195–1203.
- 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 // J. Immunol. – 2000. – 165. – P. 6889–6895.
- Thoma-Uszynski, Kiertscher S.M., Ochoa M.T. et al. Activation of Toll-Like Receptor 2 on Human Dendritic Cells Triggers Induction of IL-12, But Not IL-10 // Ibid. – 2000. – 165. – P. 3804–3810.
- Kim H.J., Yang J.S., Woo S.S. et al. Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines // J. Leukoc. Biol. – 2007. – 81, No 4. – P. 983–989.

9. Пинегин Б. В., Львов В. Л., Ильинская А. Н. и др. Компонент бактериального пептидогликана как фактор созревания макрофагов // Иммунология. – 2005. – № 1. – С. 12–15.
10. Hammer J. H., Mynster T., Rosendahl S. et al. Bacterial antigen-induced release of white cell – and platelet-derived bioactive substances in vitro // Int. J. Gastrointest. Cancer. – 2002. – No 31. – P. 165–179.
11. Hesse C., Anderson B. Immunological activity of cell wall antigens of *S. aureus* // J. Immunol. – 2000. – No 68. – P. 3581–3586.
12. Boneca I. G. The role of peptidoglycan in pathogenesis // Curr. Opin. Microbiol. – 2005. – No 1. – P. 46–53.
13. Wang E., Jørgensen P. F., Foster S. J. et al. 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 // J. Infection and Immunity. – 2000. – No 7. – P. 3965–3970.
14. Steinman R. The dendritic cell system and its role in immunogenicity // Ann. Rev. Immunol. – 1999. – No 9. – P. 271–296.
15. Меньшиков В. В. Клиническая лабораторная диагностика // Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. – Москва: Лабинформ-РАМЛД, 1999. – С. 170–177.

ННЦ “Інститут біології” Київського національного
університету ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 25.10.2010

V. V. Pozur

The effect of peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* Wood 46 on the maturation of dendritic cells *in vitro*

The effect of peptidoglycan from Staphylococcus aureus Wood 46 on DC maturation in vitro is investigated. It is shown that the treatment of immature DC with peptidoglycan results in an increase of DC maturation and in a high level of HLA-DR and CD86 expression. The treatment of immature DC with 2 mkg/ml of peptidoglycan causes an increase of its ability to stimulate the allogenic lymphocyte proliferation in vitro.