9. *Maina J., King A., King D.* A morphometric analysis of the lung of a species of bat // Respirat. Physiol. – 1982. – **50**. – P. 1–11.
10. *Mittal A. K., Munshi J. S. D.* A comparative study of the structure of the skin of certain air-breathing fresh-water teleosts // J. Zool. London. – 1971. – **163**. – P. 515–532.
11. *Jakubowski M.* The structure and vascularization of the skin of the eel (*Anguilla anguilla* L.) and the viviparous blenny (*Zoarces viviparus* L.) // Acta biol. crac. Ser. zool. – 1960. – **3**. – P. 1–22.
12. *Czopek J.* The vascularisation of the respiratory surfaces of some salientia // Zool. pol. – 1955. – **6**, fasc. 2. – P. 101–134.
13. *Munshi J. S. D., Singh B. N.* A study of the gill epithelium of certain fresh-water teleostean fishes with special reference to the air breathing fishes // Indian. J. Zool. – 1968. – **9**. – P. 91–107.
14. *Чернух А. М., Фролов Е. П.* Кожа (строение, функции, общая патология и терапия). – Москва: Медицина, 1982. – 336 с.
15. *Шмидт-Ниельсен К.* Размеры животных: почему они так важны?: Пер. с англ. – Москва: Мир, 1987. – 259 с.

Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 06.03.2007

УДК 612.017.1.579.861.2

© **2007**

Л. М. Сківка, В. В. Позур, Н. В. Сенчило, М. П. Рудик, Т. М. Фурзікова

Реакція лімфоїдних органів мишей на тейхоєву кислоту *Staphylococcus aureus* Wood 46 у нормі і при пухлинному рості

(Представлено академіком НАН України В. Ф. Чехуном)

The effects of teichoic acid from cell walls of S. aureus Wood 46 on the weight indices and the cellularity of lymphoid organs in normal mice and mice with Lewis lung carcinoma are investigated. Changes of the cytomorphologic characteristics of immune system organs do not depend on the dose of teichoic acid in intact mice and are inversely proportional to the dose of teichoic acid in tumor-bearing mice. The most immunogenic dose of teichoic acid was $1\mu g/g$ *for intact mice and* $2\mu g/g$ *for mice with Lewis lung carcinoma.*

Тейхоєва кислота — один з основних компонентів клітинної стінки грампозитивних бактерій, який опосередковує адгезію бактерій до клітин макроорганізму [1]. Тейхоєві (ТК), ліпотейхоєві кислоти (ЛТК) та їх похідні в умовах мікробної інфекції та при введенні тваринам спричиняють потужні біологічні ефекти, у тому числі безпосередній токсичний вплив на еукаріотичні клітини [2–4]. Результати досліджень останніх років переконливо доводять імуномодуляторні властивості ТК і ЛТК [5, 6]. Здатність ТК і ЛТК ініціювати прозапальну імунну відповідь дозволила розглядати їх як потенційні терапевтичні агенти в лікувані онкологічних захворювань, перебіг яких, як відомо, супроводжується імуносупресивним станом [7, 8].

Препарати ТК відрізняються за походженням, структурою і, як наслідок, за впливом на імунну систему. Нами здійснена оцінка реакції лімфоїдних органів мишей на введення ТК клітинної стінки *Staphylococcus aureus* Wood 46 у нормі та при пухлинному рості.

У дослідах використовували самиць мишей лінії C57/Black віком 2–3 міс. (середня маса 20–25 г) розводки віварію біологічного факультету Київського національного університету ім. Тараса Шевченка. Карциному легені Льюїс перещеплювали підшкірно в ділянку крижового відділу по 0,2 мл 20% клітинної суспензії (300 тис. клітин на тварину). ТК одержували за методикою Арчібальда [9] шляхом обробки клітинних стінок 10% трихлороцтовою кислотою. Для імунізації тварин використовувались три дози ТК: 2 мкг/г, 1 мкг/г і 0,5 мкг/г маси тіла тварини. ТК вводили підшкірно в ділянку крижового відділу по 0,2 мл одночасно з перещепленням експериментальної пухлини (інтактним тваринам вводили ТК також підшкірно в ділянку крижового відділу в тих же концентраціях). Повторне введення ТК проводили через 7 діб за аналогічною схемою. Реакцію лімфоїдних органів (регіонарних (по відношенню до місця трансплантації пухлинних клітин і введення ТК) пахових лімфовузлів, селезінок та тимусів) оцінювали за масовими індексами [10], які розраховували за відношенням маса органа/загальна маса тварини, а також за відносним вмістом лімфоїдних клітин. Дослідження проводились на момент закінчення експерименту (35-та доба після перещеплення експериментальної пухлини).

Як показали результати досліджень (табл. 1), під впливом найбільшої дози ТК (2 мкг/г) розміри лімфовузлів у мишей були зменшені на 38% у порівнянні з інтактним контролем. Слід зазначити, що така доза ТК виявляла значну токсичність, яка позначилася на життєздатності дослідних тварин. Введення ТК у дозі 1 мкг/г призводило до підвищення масових індексів лімфовузлів. При цьому відносна кількість лейкоцитів була майже на 50% нижчою в порівнянні з контролем. У тварин, що отримали ТК у дозі 0,5 мкг/г, досліджувані показники лімфовузлів практично не відрізнялись від інтактного контролю. Зважаючи на те, що основна функція лімфоїдних клітин регіонарних лімфовузлів у процесі імунної відповіді — антигенпрезентація, можна припустити, що найбільш результативним було введення ТК у дозі 1 мкг/г.

Сенсибілізовані антигеном лімфоїдні клітини мігрують також до інших вторинних лімфоїдних органів, включаючи селезінку. Мікрооточення селезінки сприяє міжклітинним контактам і генерації імунної відповіді. Головні події, які відбуваються в селезінці, — індукція Т-залежної В-клітинної імунної відповіді, генерація антитілопродукуючих В-лімфоцитів і проліферація $CD8^+$ Т-лімфоцитів. Весь цей час селезінка перебуває у стані транзиторної спленомегалії, рівень якої пропорційний рівню активації імунної відповіді [11]. Як видно з табл. 1, введення максимальної дози ТК мишам без пухлин призводило до збільшення маси селезінки в середньому у 3 рази. Однак відносний вміст лімфоїдних клітин був нижчий у порівнянні з інтактним контролем майже в 4 рази. Введення меншої дози ТК також призводило до значної спленомегалії при помірному в порівнянні з контролем зниженні відносного вмісту лімфоїдних клітин.

Одним із ключових лімфоїдних органів у розвитку імунної відповіді є тимус, який регулює рівень як клітинного, так і гуморального імунітету шляхом експорту на периферію ефекторних і регуляторних клітин, а також біологічно активних медіаторів [12]. Введення ТК у дозі 2 мкг/г мишам без пухлин призводило до значної тимомегалії на фоні зменшення відносної кількості тимічних лейкоцитів майже вдвічі. Зменшені дози ТК достовірно не впливали на масу тимуса. При цьому максимальне зростання відносного вмісту лімфоїдних клітин у тимусі спостерігалось при введенні ТК у дозі 1 мкг/г.

Таблиця 1. Реакція лімфоїдних органів мишей на тейхоєву кислоту *S. aureus* Wood 46 у нормі і при пухлинному рості

Доза ТК, мкг/г	Лімфовузли		Селезінка		Тимус	
	Масовий індекс, $n \cdot 10^3$	Відносна клітинність, $n \cdot 10^4$	Масовий індекс, $n \cdot 10^3$	Відносна клітинність, $n \cdot 10^4$	Масовий індекс, $n \cdot 10^3$	Відносна клітинність, $n \cdot 10^4$
			Інтактні тварини			
Контроль	$0{,}8 \pm 0{,}02$	$6{,}7 \pm 0{,}21$	$1{,}7 \pm 0{,}06$	$13{,}8 \pm 1{,}85$	$1{,}4 \pm 0{,}07$	$2{,}3 \pm 0{,}01$
2	$0{,}5 \pm 0{,}01^{*}$	$5{,}9 \pm 0{,}21^{*}$	$4{,}7 \pm 0{,}16^{*}$	$3{,}1 \pm 0{,}11^{*}$	$3{,}7 \pm 0{,}07^{*}$	$1{,}3 \pm 0{,}02^{*}$
1	$1{,}4 \pm 0{,}04^{*}$	$3{,}6 \pm 0{,}13^{*}$	$3{,}6 \pm 0{,}12^{*}$	$12{,}2 \pm 0{,}43$	$1{,}5 \pm 0{,}03$	$3{,}4 \pm 0{,}04^{*}$
0,5	$1{,}0 \pm 0{,}03^{*}$	$6{,}7 \pm 0{,}24$	$4{,}6 \pm 0{,}15^{*}$	$6{,}3 \pm 0{,}19^{*}$	$1{,}7 \pm 0{,}06$	$1{,}4 \pm 0{,}03^{*}$
			Тварини з перещепленою пухлиною			
Контроль	$1{,}2 \pm 0{,}04^{*}$	$3{,}0 \pm 0{,}09^{*}$	$4{,}2 \pm 0{,}13^{*}$	$6{,}6 \pm 0{,}09^{*}$	$1{,}9 \pm 0{,}02^{*}$	$1{,}5 \pm 0{,}01^{*}$
2	$0{,}6 \pm 0{,}02^{**}$	$17{,}9 \pm 2{,}0^{*,**}$	$2{,}7 \pm 0{,}09^{*,**}$	$2{,}3 \pm 0{,}08^{*,**}$	$1{,}3 \pm 0{,}01^{**}$	$1{,}9 \pm 0{,}06^{*,**}$
1	$1{,}3 \pm 0{,}04^{*}$	$5{,}0 \pm 0{,}19^{*,**}$	$4{,}7 \pm 0{,}18^{*}$	$2{,}2 \pm 0{,}03^{*,**}$	$1{,}6 \pm 0{,}01^{**}$	$0{,}9 \pm 0{,}01^{*,**}$
0,5	$1{,}6 \pm 0{,}05^{*,**}$	$3{,}7 \pm 0{,}15^{*,**}$	$10{,}8 \pm 0{,}38^{*,**}$	$6{,}6 \pm 0{,}24^{*}$	$2{,}2 \pm 0{,}03^{*}$	$2{,}2 \pm 0{,}02^{*,**}$

$^{*}P < 0{,}05$ у порівнянні з контрольними здоровими тваринами.
$^{**}P < 0{,}05$ у порівнянні з контрольними тваринами-пухлиноносіями.

Реакція лімфоїдних органів на ТК у мишей на фоні пухлинного росту була дещо іншою. У контрольних пухлиноносіїв розміри регіонарних лімфовузлів перевищували такі у інтактних тварин на 31%, що пояснюється постійною присутністю антигенних стимулів у складі первинної пухлини. Введення ТК мишам з пухлиною в дозі 2 мкг/г викликало зменшення маси пахових лімфовузлів на 56% у порівнянні з контролем пухлини і на 42% у порівнянні з інтактним контролем. Однак відносний вміст лімфоїдних клітин у лімфовузлах цих тварин значно перевищував аналогічний показник у контрольних пухлиноносіїв і інтактних мишей. Подібний результат може вказувати на те, що вказана доза ТК токсична в першу чергу для тканини пухлини і здатна зумовлювати посилену експозицію пухлинних антигенів внаслідок ушкодження клітин пухлини. Посилений вихід у русло пухлинних антигенів і спричинив активацію антигенпрезентації в пахових лімфовузлах, що позначилось на їх відностій клітинності. Введення менших доз ТК (1 мкг/г, 0,5 мкг/г) призводило до значного збільшення маси лімфовузлів мишей з карциномою Льюїс як у порівнянні з контролем пухлини (на 6 і 31% відповідно), так і в порівнянні з інтактними тваринами (на 68 і 107% відповідно) при помірному підвищенні відносного вмісту лімфоїдних клітин.

Маса селезінки у контрольних мишей-пухлиноносіїв більше ніж у 2 рази перевищувала таку у інтактних тварин. При цьому відносний вміст спленічних мононуклеарних лейкоцитів був нижчий, ніж у інтактних мишей. Введення ТК тваринам з пухлинами в максимальній дозі приводило до нормалізації маси селезінок при зниженні відносного вмісту спленічних лімфоїдних клітин. При зменшенні дози препарату маса селезінки обернено пропорційно зростала, тоді як відносний вміст мононуклеарних лейкоцитів у них залишався нижчим у порівнянні з контролем. Згідно з даними літератури [13], збільшення маси селезінки на фоні зменшення відносного вмісту в ній лімфоїдних клітин може відбуватися при розростанні червоної пульпи і інволюції білої пульпи (особливо маргінальної зони), що відображує мобілізацію імунокомпетентних клітин у процесі імунної відповіді.

Пухлинний ріст, як відомо, супроводжується морфологічними змінами тимуса, що спричиняють пухлиноопосередковану імуносупресію [14, 15]. В наших дослідженнях, при практично незміненій масі, відносна клітинність тимусів у контрольних тварин-пухлиноносіїв була на 33% меншою в порівняні зі здоровим контролем. Введення ТК у максимальній дозі нормалізувало цитоморфологічні показники тимусів мишей. При зменшенні дози препарату спостерігалась картина, подібна до такої при дослідженні цитоморфологічних характеристик селезінок: обернено пропорційно зростала маса тимусів, тоді як відносний вміст мононуклеарних лейкоцитів у них залишався нижчим у порівнянні з контролем.

На завершення аналізу отриманих результатів слід зазначити, що реакція лімфоїдних органів мишей на введення ТК золотавого стафілокока в нормі і при пухлинному рості відрізняється. У мишей без пухлин була відсутня чітка дозова залежність реакції органів імунної системи при імунізації ТК, тоді як у мишей з карциномою Льюїс маса лімфоїдних органів змінювалась обернено пропорційно дозі введеного препарату. У здорових мишей ТК у дозі 2 мкг/г у більшості випадків призводила до максимального збільшення масових індексів лімфоїдних органів на фоні значного зниження їх клітинності, що свідчить про токсичну дію. При пухлинному рості ТК у тій же концентрації виявляла меншу токсичність і в більшості випадків сприяла нормалізації маси лімфоїдних органів при істотному збільшенні їх відносної клітинності. Позитивні зміни в структурі органів імунної системи при цьому супроводжувались значним гальмуванням пухлинного росту на всіх його етапах (дані не наведено). Введення ТК у дозі 1 мг/г приводило до найменш виразних змін у структурі досліджених лімфоїдних органів у мишей-пухлиноносіїв, тоді як у здорових

тварин введення саме цієї дози імуногена було найбільш результативним. Введення ТК здоровим тваринам у мінімальній дозі (0,5 мг/г) у більшості випадків істотно не змінювало цитоморфологічні критерії органів імунної системи. У мишей з карциномою Льюїс введення такої дози препарату обумовлювало позитивні зміни у лімфоїдних органах у порівнянні з контрольними пухлиноносіями, однак не гальмувало ріст самої пухлини.

Імовірно, ТК здатна спричиняти гальмування пухлинного росту не лише за рахунок активації імунної системи, а і завдяки безпосередній токсичній дії на клітини пухлини. Перевірка такого припущеня потребує додаткових досліджень.

1. *Thiemermann C.* Interactions between lipoteichoic acid and peptidoglycan from Staphylococcus aureus: a structural and functional analysis // Microbes Infect. – 2002. – **4**, No 9. – P. 927–935.
2. *Ginsburg I.* Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation // Lancet Infect. Dis. – 2002. – **2**, No 3. – P. 171–179.
3. *Heumann D., Glauser M. P., Calandra T.* Molecular basis of host-pathogen interaction in septic shock // Curr. Opin. Microbiol. – 1998. – **1**, No 1. – P. 49–55.
4. *Nau R., Eiffert H.* Minimizing the release of proinflammatory and toxic bacterial products within the host: a promising approach to improve outcome in life-threatening infections // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2005. – **44**, No 1. – P. 1–16.
5. *Danforth J. M., Strieter R. M., Kunkel S. L. et al.* Macrophage inflammatory protein – 1 alpha expression in vivo and in vitro: the role of lipoteichoic acid // Clin. Immunol. and Immunopathol. – 1995. – **74**, No 1. – P. 77–83.
6. *Wang J. E., Jørgensen P. F., Almlöf M. 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. Vitro // Surg. Infect. (Larchmt). – 2003. – **4**, No 2. – P. 181–191.
7. *Okamoto M., Ohe G., Oshikawa T. et al.* Enhancement of anti-cancer immunity by a lipoteichoic-acid-related molecule isolated from a penicillin-killed group A Streptococcus // Cancer Immunol. Immunother. – 2001. – **50**, No 8. – P. 408–416.
8. *Okamoto M., Ohe G., Furuichi S. et al.* 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**, No 6A. – P. 3229–3239.
9. *Арчибальд А. Р.* Методы исследования углеводов. – Москва: Высш. шк., 1975. – 350 с.
10. *Kozlowska E., Kopec-Szlezak J., Drela N. et al.* Sensitivity of mouse lymphoid and nonlymphoid organs to Silesian air pollutants // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 1997. – **37**, No 1. – P. 10–16.
11. *Jeneway C. A., Travers P., Walport M., Shlomchik M.* Immunology: the immune system in health and disease: Fifth edition. – New York; London: Garland Publishing, 2002. – 732 p.
12. *Yarilin A. A., Belyakov I. M.* Cytokines in the thymus: production and biological effects // Curr. Med. Chem. – 2004. – **11**, No 4. – P. 447–464.
13. *Grossi C. E., Ciccone E., Tacchetti C. et al.* Anatomy of the immune system: facts and problems // Ital. J. Anat. Embryol. – 2000. – **105**, No 4. – P. 97–124.
14. *Fu Y., Paul R. D., Wang Y., Lopez D. M.* Thymic involution and thymocyte phenotypic alterations induced by murine mammary adenocarcinomas // J. Immunol. – 1989. – **143**, No 12. – P. 4300–4307.
15. *Mandal D., Bhattacharyya A., Lahiry L. et al.* Failure in peripheral immuno-surveillance due to thymic atrophy: importance of thymocyte maturation and apoptosis in adult tumor-bearer // Life Sci. – 2005. – **77**, No 21. – P. 2703–2716.

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 15.02.2007