

УДК 571.27; 578.224

Активация TLR2-зависимого сигнального пути в клетках WEHI-3В миеломоноцитарного лейкоза мышей приводит к подавлению развития в них апоптоза и к стимуляции прогрессии опухоли в условиях *in vivo*

Д. В. Щебляков*, Д. Ю. Логунов, И. В. Раковская, М. М. Шмаров, Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург

Федеральное государственное бюджетное учреждение Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ и СР РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

*E-mail: sdmitryv@yahoo.com

Поступила в редакцию 26.08.2011 г.

РЕФЕРАТ Толл-подобные рецепторы (TLR) являются главными компонентами системы врожденного иммунитета, которые выполняют важные функции в формировании реакций иммунной защиты организма против развивающейся бактериальной или вирусной инфекции. Связывание TLR с собственными лигандами приводит к активации ряда адапторных белков и протеинкиназ, которые участвуют в индукции ключевых провоспалительных факторов. В итоге такой индукции развивается как врожденный иммунный ответ, обусловленный усилением экспрессии ряда провоспалительных цитокинов, антибактериальных белков, так и приобретенный иммунный ответ через созревание дендритных клеток, презентации антигенов и т.д. Благодаря своей способности усиливать специфические и неспецифические иммунные реакции агонисты Толл-подобных рецепторов нашли применение не только в терапии инфекционных заболеваний, но и в химиотерапии различных злокачественных новообразований. Однако различные агонисты TLR могут обладать как противоопухолевым действием (липополисахарид, имиквимод, CpG), так и, напротив, в определенных условиях повышать устойчивость опухолевых клеток к апоптозу и стимулировать их пролиферацию (липополисахарид, липопептид). Нами показано, что активация TLR2-зависимого сигнального пути в клетках миеломоноцитарного лейкоза мышей WEHI-3В при добавлении агониста TLR2 – синтетического липопептида Pam2CSK4, или инфицировании опухолевых клеток *Mycoplasma arginini* приводит к конститутивной активации в них фактора транскрипции NF-κB, подавлению развития апоптоза, а также к усилению прогрессии миеломоноцитарного лейкоза в условиях *in vivo*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Толл-подобный рецептор 2, синтетический диациллипептид Pam2CSK4, миеломоноцитарный лейкоз мыши WEHI-3В, фактор транскрипции NF-κB, апоптоз, прогрессия опухолей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ TLR2 – Толл-подобный рецептор типа 2; NF-κB – ядерный фактор транскрипции κB; PAMP – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны; DAMP – молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением; оцРНК – одноцепочечная рибонуклеиновая кислота; ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; TNFα – фактор некроза опухолей α; IL – интерлейкин; MCP1 – фактор хемотаксиса моноцитов 1.

ВВЕДЕНИЕ

Как известно, Толл-подобные рецепторы (TLR) – это основные компоненты системы врожденного иммунитета, участвующие в распознавании консервативных молекулярных структур различных патогенов (PAMP), а также молекул, ассоциированных с по-

вреждением (DAMP) [1, 2]. При этом взаимодействие бактериальных структур или DAMP со специфическими Толл-подобными рецепторами инициирует развитие реакций как врожденного, так и приобретенного иммунного ответа, приводя в конечном итоге к элиминации возбудителя из организма [3, 4].

В настоящее время известно 13 Толл-подобных рецепторов человека (TLR1–13), большинство из которых представлены на поверхности различных клеток иммунной системы (макрофаги, дендритные и тучные клетки, нейтрофилы, В- и Т-клетки, натуральные киллеры), а также на таких неиммунных клетках, как фибробласты, эпителиальные клетки, кератиноциты и т.д. [5–7]. Взаимодействие Толл-подобных рецепторов со специфическими лигандами инициирует каскад сигналов, берущих начало от цитоплазматических TIR-доменов TLR [8]. Сигнал от TIR-домена через адапторные молекулы MyD88 (myeloid differentiation factor 88), TIRAP (TIR-доменсодержащие адапторы), TICAM1 (TRIF), TICAM2 (TIR-containing adapter molecule) передается на соответствующие киназы (ТАК, IKK, ТВК, MAPK, JNKs, p38, ER K, Akt и др.), которые дифференциально активируют факторы транскрипции (NF- κ B, AP-1 и IRF), ответственные за экспрессию различных провоспалительных и антимикробных факторов (IL-6, IL-8, TNF, IL-1 β) и активацию антигенпредставляющих клеток [7, 9].

Показано, что Толл-подобные рецепторы играют центральную роль в регуляции адаптивного иммунного ответа. Так, TLR-зависимая активация антигенпредставляющих дендритных клеток является определяющим моментом в нескольких принципиальных для развития адаптивного иммунитета процессах: активации зрелых Т-клеток; процессинга и презентации микробных антигенов; повышении экспрессии костимуляторных молекул (CD80, CD86), необходимых для активации наивных CD4⁺-Т-клеток; подавлении регуляторных Т-клеток посредством продукции IL-6 [8, 10]. Известно также, что TLR-зависимая активация важна для созревания В-клеток во время инфекции [11]. Таким образом, TLR выполняют в организме важную роль, которая заключается в развитии воспалительных реакций (активации врожденного иммунитета) в ответ на попадание в организм самых разных патогенов (простейших, грибов, бактерий, вирусов) [12].

В настоящее время широко обсуждается влияние экспрессии и активации Толл-подобных рецепторов на прогрессию опухолей. Показано, что в зависимости от различных факторов (типа TLR и лиганда, типа опухоли, способа введения, концентрации лигандов) Толл-подобные рецепторы могут оказывать на опухолевые клетки двойственный эффект [13]. Показано, что TLR способны активировать противоопухолевый иммунитет [14, 15]. Сейчас проводятся клинические испытания многих агонистов TLR в качестве противоопухолевых средств. Так, природные (оцРНК) и синтетические (имиквимод) агонисты TLR7 и -8 показали высокую активность в отношении хрониче-

ческого лимфоцитарного лейкоза и опухолей кожи [16]. Лиганд TLR9 – CpG, способен подавлять рост лимфом, опухолей головного мозга, почек, кожи [14]. А лиганд TLR3 – poly(IC), обладает проапоптотическим действием не только в отношении опухолевых клеток, но и клеток, окружающих опухоль (например, эндотелиальных).

Однако, несмотря на данные о противоопухолевой активности агонистов TLR, в последнее время появляется большое число публикаций, показывающих, что лиганды TLR способны стимулировать прогрессию опухолей различного типа [15–17]. Известно, что уровень TLR повышен в клетках различных опухолей, а у мышей с нокаутом генов *TLR* снижена частота образования индуцируемых опухолей [18]. Более того, повышение экспрессии TLR на поверхности клеток опухолей предстательной железы или опухолей головы и шеи может стимулировать пролиферацию этих клеток [19, 20]. Huang и соавт. [20] показали, что *Listeria monocytogenes* обладает прямым опухолестимулирующим действием, связанным со способностью активировать TLR2-зависимые сигнальные пути в клетках рака яичника. Более того, TLR2-зависимая активация NF- κ B, вызванная *L. monocytogenes*, повышала устойчивость опухолевых клеток к действию химиотерапевтических средств [16]. Взаимосвязь TLR2 с прогрессией опухолей подтверждена в работе Karin и соавт. [21], в которой доказана ключевая роль этого рецептора в метастазировании рака легкого.

Таким образом, двойственный эффект TLR говорит о его более сложной функциональной роли в биологии опухоли и требует системного изучения на различных моделях.

В нашей работе проведен анализ экспрессии TLR2 в различных опухолевых линиях. На модели миеломоноцитарного лейкоза мышей (WENI-3B) показано, что активация TLR2-зависимого сигнального пути в результате добавления синтетического диациллипептида Pam2CSK4 приводит к подавлению апоптоза, а также к усилению опухолевого роста в условиях *in vivo*. При этом подобный эффект наблюдался и при заражении клеток WENI-3B *Mycoplasma arginini*. Нами установлено, что микоплазменная инфекция или добавление к клеткам WENI-3B агониста TLR2 – диациллипептида Pam2CSK4, приводит к TLR2-зависимой активации фактора транскрипции NF- κ B в опухолевых клетках и к подавлению развития апоптоза, вызванного действием различных противоопухолевых средств. Более того, на модели миеломоноцитарного лейкоза мышей *in vivo* нами показано, что внутримышечное введение Pam2CSK4 приводило к повышению устойчивости опухоли к действию 5-фторурацила, усилению опухолевого

роста и к сокращению продолжительности жизни мышей. Анализ механизма описанного эффекта агониста TLR2 на клетки WENI-3B показал, что ключевую роль в стимуляции прогрессии опухоли играет активация фактора NF- κ B, а также стимуляция секреции ряда провоспалительных цитокинов, являющихся факторами роста и прогрессии опухолей миеломоноцитарного происхождения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии

Экспрессию TLR2 анализировали в клетках миеломоноцитарного лейкоза мышей WENI-3B, в трансформированных макрофагах мышши B10M, фибробластах мышши L929, в клетках моноцитарной лимфомы человека U937, в клетках рака легкого человека линий A549 и H460, клетках H1299 немелкоклеточного рака легкого человека, HCT116 рака толстой кишки человека и MCF-7 – рака молочной железы человека. Активность NF- κ B, каспаз-3/7, жизнеспособность, уровень трансмембранного митохондриального потенциала, скорость пролиферации анализировали в клетках WENI-3B.

Клетки WENI-3B культивировали в среде RPMI с добавлением 10 об.% фетальной бычьей сыворотки (кат. номер SV30160.03, «Hyclone», США), 1 мг/мл глутамина (кат. номер. Ф032, «ПанЭко», Россия), 50 Ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (кат. номер А065, «ПанЭко», Россия) при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. Клетки рассеивали в отношении 1 : 6 на вторые сутки.

Бактериальные штаммы

В работе использовали штамм микоплазмы *Mycoplasma arginini*, любезно предоставленный И.В. Раковской (лаборатория микоплазм и Л-форм бактерий ГУНИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН).

Реактивы

В работе использовали синтетический диациллипептид Pam2CSK4 («Invivogen», США). Концентрацию хемокинов и цитокинов определяли с использованием набора для проточной цитофлуориметрии FlowCytomix BenderMedsystems (Австрия).

Реакция обратной транскрипции

Экспрессию генов *TLR2* в различных линиях клеток человека/мышши определяли методом ОТ-ПЦР. Суммарную РНК выделяли с помощью реагента TRIZOL («Invitrogen»). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов RT System («Promega»). кДНК генов *TLR2* и *GAPDH* человека/мышши амплифицировали методом ПЦР

с использованием следующих праймеров: ген *TLR2* мышши – прямой праймер 5'-gtttctctctgaccaggatc-3', обратный праймер 5'-gaataaaaaggcgtctcctc-3'; ген *TLR2* человека – прямой праймер 5'-acctgtgtgactctccatcc-3', обратный праймер 5'-gcagcatcattgtctcttc-3'; ген *GAPDH* человека – прямой праймер 5'-tctagacggcaggcagggtccacc-3', обратный праймер 5'-ccaccatggcaaatccatggca-3'; ген *GAPDH* мышши – прямой праймер 5'-gcattctctgtgcagtgc-3', обратный праймер 5'-tcacaccatcacaacaacatg-3'.

Измерение активности β -галактозидазы

Через 24 ч после добавления исследуемых препаратов к клеткам культуральную среду удаляли и добавляли лизирующий буфер с субстратом для β -галактозидазы (1 мМ MgCl₂; 0.25 М Трис-НСl рН 7.4; 0.02% NP40; 2 г/л о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид (кат. номер 102473, «MP Biomedicals», США)). Активность β -галактозидазы определяли спектрофотометрически (414 нм) по превращению субстрата – о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид, в окрашенный продукт о-нитрофенол.

Анализ жизнеспособности клеток

Выживаемость клеток оценивали по соотношению (%) интенсивности окраски метиленовым синим клеток, обработанных цисплатином, таксоллом, фторурацилом в различных концентрациях, и контрольных необработанных клеток (метиленовый синий экстрагировали 0.1% SDS, его количество определяли спектрофотометрически).

Измерение активности каспаз-3/7

Уровень каспаз-3/7 измеряли, используя специфичный для каспазы-7 флуорогенный субстрат Ac-DEVD-AMC (30 мкМ в лизирующем буфере рН 7.0, содержащем 10 мМ HEPES, 0.4 мМ EDTA, 0.1% CHAPS, 2% глицерин, 2 мМ DTT). После 16 ч инкубации клеток с препаратами, индуцирующими апоптоз, измеряли флуоресценцию в точке 0 и спустя 6 ч после добавления субстрата, используя мультиспектрофотометр Wallac 1420 plate reader («Perkin Elmer»).

Измерение уровня митохондриального трансмембранного потенциала ($\Delta\psi_m$)

Уровень трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$) оценивали по связыванию флуорогенного красителя DioC6 («Sigma», США), степень специфического связывания которого с мембранами митохондрий зависит от величины $\Delta\psi_m$. Клетки, инфицированные *M. arginini*, вносили в 24-луночный планшет (10⁵ клеток/луночка). После индукции

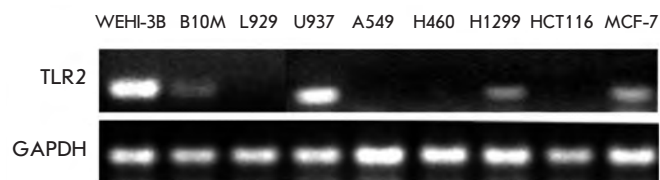


Рис. 1. Анализ экспрессии Толл-подобного рецептора 2 в различных опухолевых клеточных линиях.

апоптоза к клеткам добавляли DioC6 в концентрации 40 нМ. Клетки инкубировали в течение 30 мин при +37°C, после чего дважды промывали фосфатным буфером. Затем измеряли флуоресценцию при помощи мультиспектрофотометра Wallac 1420 plate reader.

Измерение концентрации цитокинов

Мышам линии BALB/c внутримышечно вводили по 5 мкг Pam2CSK4. У мышей отбирали кровь и в полученной сыворотке методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора FlowCytomix BenderMedSystems (Австрия) определяли концентрации 14 хемокинов и цитокинов (IL-1, -2, -4, -5, -6, -10 и -12, TNF α , MCP-1 и -3, MIP-1a, -1b, RANTES, интерферона- γ).

Лабораторные животные

В работе использовали 6-недельных (к началу экспериментов) самок мышей линии BALB/c, а также бестимусных мышей линии D2&I.

Анализ выживаемости мышей линии BALB/c

Для оценки влияния диацилллипопептида Pam2CSK4 на скорость прогрессии опухолевого роста мышам линии BALB/c, разделенным на различные группы, вводили внутрибрюшинно клетки WENI-3B по 2×10^6 клеток/мышь. Через 1, 3, 5 сут после перевивания опухоли мышам вводили по 5 мкг Pam2CSK4. Через 20 сут мышей безболезненно умерщвляли с помощью диэтилового эфира и извлекали печень и селезенку, которые использовали для макроскопического и гистологического исследования. Дополнительно в каждой экспериментальной группе определяли средний вес селезенки.

Влияние совместного введения Pam2CSK4 и клеток опухоли на выживаемость животных изучали на мышах линии BALB/c, которым внутрибрюшинно прививали клетки WENI-3B (2×10^6 клеток/мышь), а через 24 ч системно вводили синтетический диацилллипопептид (Pam2CSK4) в дозе 5 мкг/мышь. Спустя 2 сут мышам в течение 3 дней также вводили Pam2CSK4, а мыши из групп, подвергнутых химио-

терапии, получали еще и по 0.6 мг 5-фторурацила. В контрольные группы вошли животные, которым отдельно вводили Pam2CSK4 и 5-фторурацил. Каждая группа состояла из 10 мышей. Животных наблюдали до момента гибели последней мыши (32 дня), регистрируя их общее состояние.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ экспрессии Толл-подобных рецепторов 2 и 6 в различных опухолевых линиях клеток

Модель для изучения влияния TLR2 на пролиферацию опухолевых клеток, а также на прогрессию опухоли в условиях *in vivo* мы выбирали, анализируя экспрессию Толл-подобного рецептора 2 в различных линиях опухолевых клеток (WENI-3B, B10M, L929, U937, A549, H460, H1299, HCT116, MCF-7) методом обратной транскрипции с последующей ПЦР на ген *TLR2* (рис. 1).

Показано, что в пяти из девяти проанализированных клеточных линий (WENI-3B, B10M, U937, H1299 и MCF-7) экспрессируется Толл-подобный рецептор 2. При этом наибольшая экспрессия этого рецептора наблюдалась в клетках миеломоноцитарного лейкоза мыши (WENI-3B), которые и были выбраны в качестве модели для использования в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Агонист TLR2 активировал NF-kB и подавляет развитие апоптоза в опухолевых клетках WENI-3B, экспрессирующих Толл-подобный рецептор 2

На следующем этапе работы для оценки влияния агонистов TLR2 на апоптоз, вызванный действием химиотерапевтических препаратов, в клетках WENI-3B, экспрессирующих Толл-подобный рецептор 2, измеряли следующие параметры: определяли активность фактора NF-kB (рис. 2), выживаемость клеток, уровень каспаз-3/7 (рис. 3), а также величину трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$) (рис. 4). Клетки WENI-3B инфицировали *M. arginini* или добавляли агонист TLR2 – синтетический диацилллипопептид (Pam2CSK4), после чего обрабатывали цисплатином, таксолом или фторурацилом. После инкубации в течение 16–18 ч измеряли указанные параметры.

Нами показано, что микоплазменная инфекция опухолевых клеток WENI-3B, содержащих Толл-подобный рецептор 2, вела к активации в них фактора транскрипции NF-kB (рис. 2). Аналогичные результаты получены при добавлении синтетического диацилллипопептида Pam2CSK4.

На рис. 2А приведены полученные методом проточной цитофлуориметрии с использованием специфических антител к TLR2 данные, подтвержда-

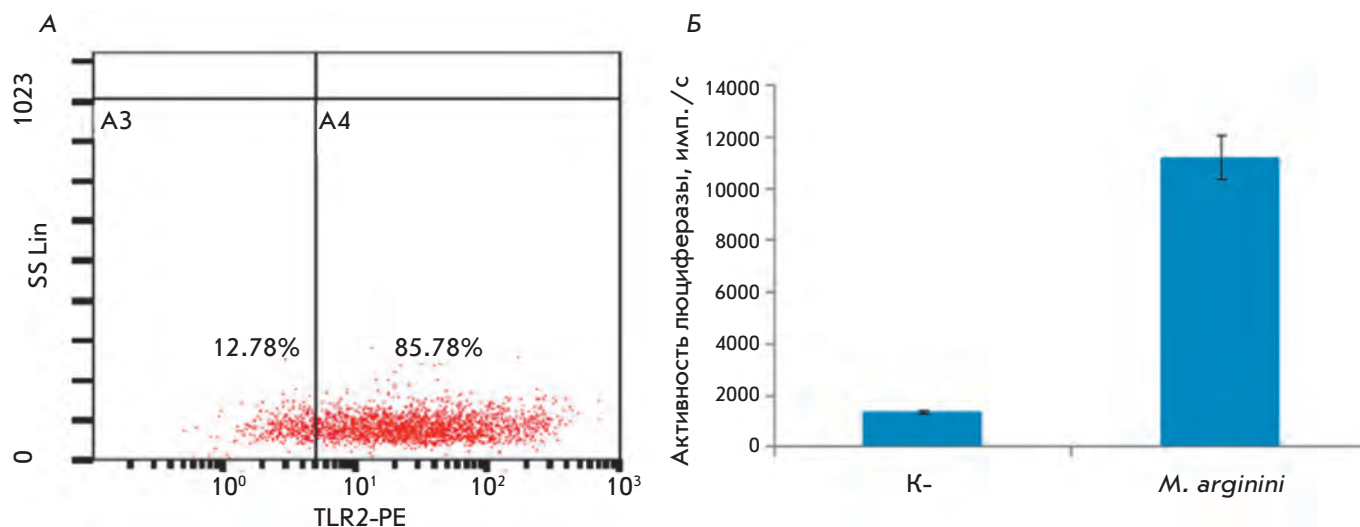


Рис. 2. Активация NF- κ B в клетках WEHI-3B в ответ на микоплазменную инфекцию или добавление диациллипопептида Pam2CSK4. **А** — Экспрессия TLR2 в клетках WEHI-3B. Экспрессия основного рецептора диациллипопептидов микоплазмы подтверждена методом проточной цитофлуориметрии. Клетки WEHI-3B инкубировали с антителами, специфичными к TLR2 («eBioscience», США). Контрольные клетки инкубировали с изотипическим контролем (анти-IgG). Исходя из фоновой флуоресценции отрицательного контроля определен процент TLR2-позитивных клеток (измерение TLR2 проведено в полном соответствии с рекомендациями производителя). **Б** — NF- κ B-зависимая экспрессия гена люциферазы. В клетки WEHI-3B методом лентивирусной трансфекции был введен элемент, реагирующий на NF- κ B, под контролем которого находится ген люциферазы. Клетки инфицировали *M. arginini* или добавляли синтетический диациллипопептид Pam2CSK4, после чего в инфицированных и контрольных (неинфицированных) клетках, используя стандартную методику, определяли уровень NF- κ B-зависимой экспрессии гена люциферазы.

дающие экспрессию TLR2, основного рецептора диациллипопептидов микоплазмы, а также данные по активации NF- κ B TLR2-зависимым способом в клетках WEHI-3B (рис. 2Б).

На рис. 3 показана выживаемость и уровень активности основных эффекторных каспаз-3/7 при индукции апоптоза химиотерапевтическими средствами в клетках WEHI-3B, инфицированных *M. arginini* или при добавлении к ним Pam2CSK4. Уровень каспаз-3/7 измеряли спектрофотометрически, используя специфический флуорогенный субстрат Ac-DEVD-AMC. Как видно из представленных результатов, микоплазменная инфекция или добавление липопептида Pam2CSK4 приводили к статистически значимому ($p < 0.005$) повышению выживаемости клеток WEHI-3B и снижению уровня активации каспаз-3/7 на 25–30% при различных внутриклеточных повреждениях по сравнению с неинфицированными клетками (белые столбцы).

В клетках WEHI-3B измеряли также величину трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$), падение которого в ответ на различные стрессорные воздействия служит основным маркером апоптоза.

С этой целью на инфицированные или обработанные Pam2CSK4 клетки воздействовали цисплатином в различной концентрации и через 16 ч измеряли уровень трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$) (рис. 4).

Уровень $\Delta\psi_m$ оценивали по связыванию флуорогенного красителя DioC6, степень специфического связывания которого с мембранами митохондрий зависит от величины $\Delta\psi_m$.

Как видно из представленных результатов, в обработанных цисплатином инфицированных *M. arginini* клетках WEHI-3B величина трансмембранного митохондриального потенциала была на 25–30% выше, чем в неинфицированных клетках (белые столбцы), что свидетельствует о подавлении апоптоза в инфицированных клетках. Аналогичные результаты получены и при использовании синтетического диациллипопептида Pam2CSK4.

Таким образом, в первой части экспериментов *in vitro* показано, что микоплазменная инфекция или добавление структурных компонентов микоплазмы к клеткам WEHI-3B, экспрессирующим Толл-подобные рецепторы 2 и 6, приводит к активации в них фактора транскрипции NF- κ B и подавлению апоптоза при различных внутриклеточных повреждениях.

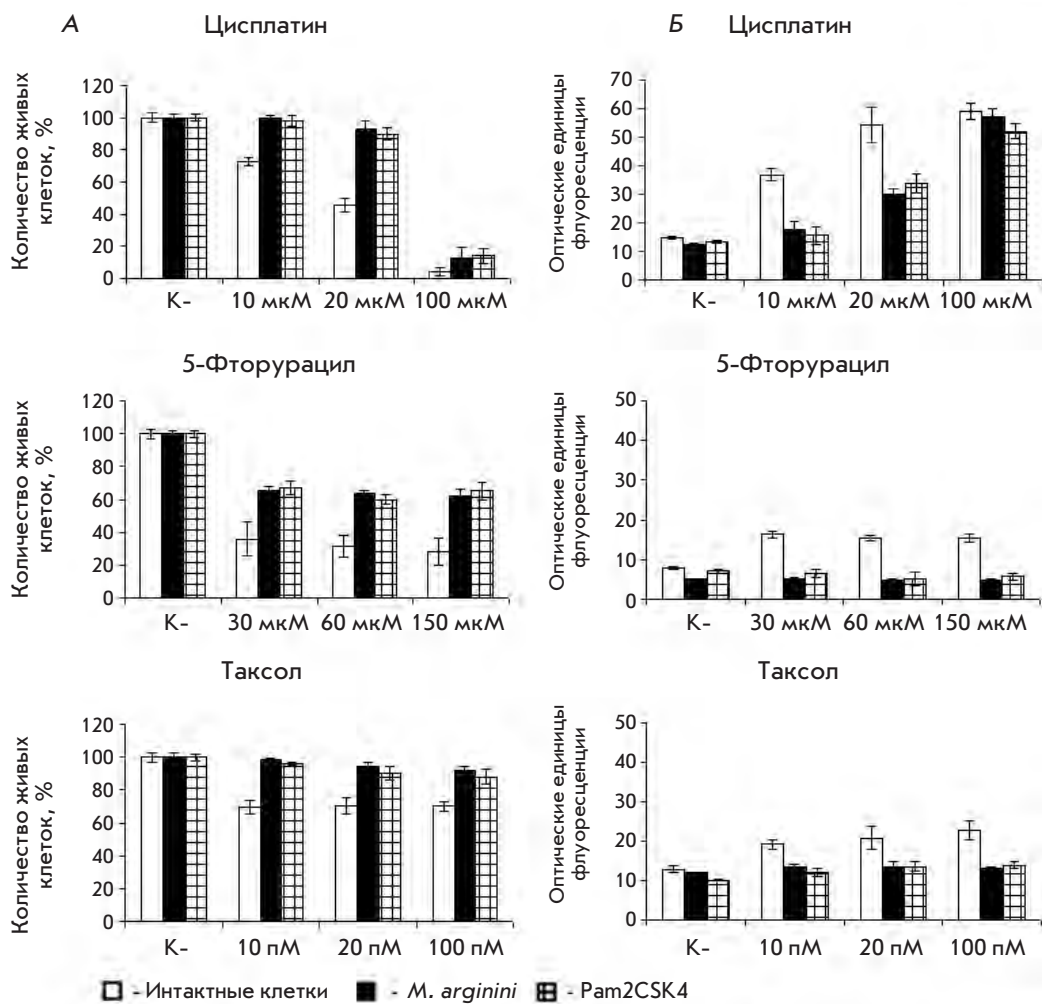


Рис. 3. Выживаемость и активность каспаз-3/7 в клетках WENI-3В миеломоноцитарного лейкоза мышей, подвергнутых воздействию химиотерапевтических средств в различных концентрациях. А – Выживаемость клеток WENI-3В; Б – активность каспазы-3/7. Данные по каждой точке получены в результате трех независимых опытов ($p < 0.005$).

Кинетика роста опухолевых клеток WENI-3В при инфекции *M. arginini* или добавлении диациллипептида Pam2CSK4 в эксперименте *in vitro*

Фактор транскрипции NF-κB участвует в регуляции экспрессии целого ряда белков, среди которых белки, контролирующие клеточную пролиферацию и апоптоз [19].

На следующем этапе работы мы решили посмотреть как микоплазменная инфекция или структурные компоненты микоплазмы наряду с антиапоптотической активностью могут влиять на кинетику и скорость пролиферации опухолевых клеток WENI-3В в норме и/или при индукции в этих клетках апоптоза.

С этой целью к клеткам WENI-3В, выбранной в качестве модели, добавляли *M. arginini* или Pam2CSK4, после чего подтверждали активацию NF-κB в этих клетках. Далее клетки высаживали на 96-луночный планшет (10³ клеток на лунку) и добавляли апоптоз-индуцирующие препараты – цисплатин и таксол. Ки-

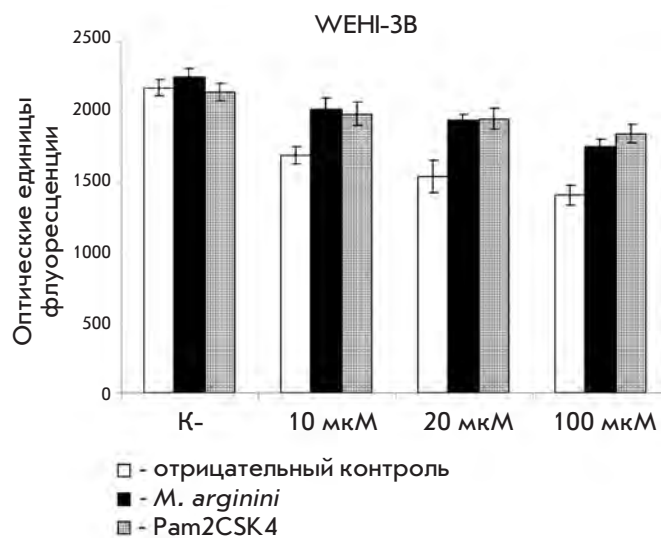


Рис. 4. Уровень трансмембранного митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$) в клетках WENI-3В, обработанных цисплатином в различных концентрациях. Данные по каждой точке получены в результате трех независимых опытов ($p < 0.005$).

нетику роста клеток определяли по накоплению клеточной биомассы (окрашивание метиленовым синим) в течение 72 ч в отсутствие или при наличии стимула апоптоза.

Из рис. 5 видно, что в клетках, инфицированных микоплазмой и/или при добавлении Pam2CSK4, наблюдалось блокирование апоптоза и не наблюдалось повышения скорости пролиферации.

Таким образом, показано, что обусловленное активацией фактора транскрипции NF-κB подавление апоптоза в клетках, инфицированных микоплазмой, не приводило к повышению скорости пролиферации клеток *in vitro*.

Влияние агониста TLR2 – диациллипептида Pam2CSK4 – на пролиферацию и резистентность клеток WEHI-3В к химиотерапевтическим средствам в эксперименте *in vivo*

Нами изучено влияние циркулирующих в организме мышей антигенов – агонистов TLR2, на пролиферацию и устойчивость клеток миеломоноцитарного лейкоза мышей WEHI-3В к химиотерапевтическим средствам *in vivo*.

На первом этапе мы оценили влияние диациллипептида Pam2CSK4 на скорость опухолевой прогрессии. В эксперименте участвовало 40 животных (мыши линии BALB/с, самки) массой 18–20 г. Животных разделили на четыре группы по 10 особей в каждой. Контрольную группу (первую) составили интактные мыши. Во вторую группу вошли мыши, которым трехкратно внутримышечно вводили Pam2CSK4. Третья группа состояла из мышей, которым перевели клетки WEHI-3В (2×10^6 клеток/мышь). Мышам четвертой группы внутрибрюшинно перевели клетки WEHI-3В в той же дозе. Мышам этой группы через 1, 3, 5 сут после перевивания опухоли вводили по 5 мкг Pam2CSK4. Для оценки прогрессии опухоли через 20 сут мышей безболезненно умерщвляли с помощью диэтилового эфира и извлекали печень и селезенку, которые использовали для макроскопического и гистологического исследования. В каждой экспериментальной группе определяли средний вес селезенки (рис. 6А–В). По данным макроскопического исследования у мышей из групп 1 и 2 отсутствовали видимые патологические изменения (рис. 6А), но наблюдалось незначительное увеличение среднего веса селезенки у животных группы 2 (рис. 6Б). Макроскопическое исследование печени и селезенки мышей, которым был перевит миеломоноцитарный лейкоз (группа 3), выявило характерные для лейкоза изменения: увеличение селезенки и некоторое увеличение печени. На поверхности печени и селезенки обнаружены редкие опухолевые образования. При макроскопическом исследовании печени и селезенки мышей, которым

был перевит лейкоз и введен Pam2CSK4 (группа 4), также обнаружены характерные для лейкоза изменения. Селезенка была сильно увеличена. На поверхности селезенки и печени обнаружены рыхлые образования (которые при гистологическом исследовании оказались лейкозными миелоцитарными клетками).

Измерение средней массы селезенки показало значимое увеличение веса этого органа у мышей с лейкозом (группы 3 и 4) по сравнению с мышами контроль-

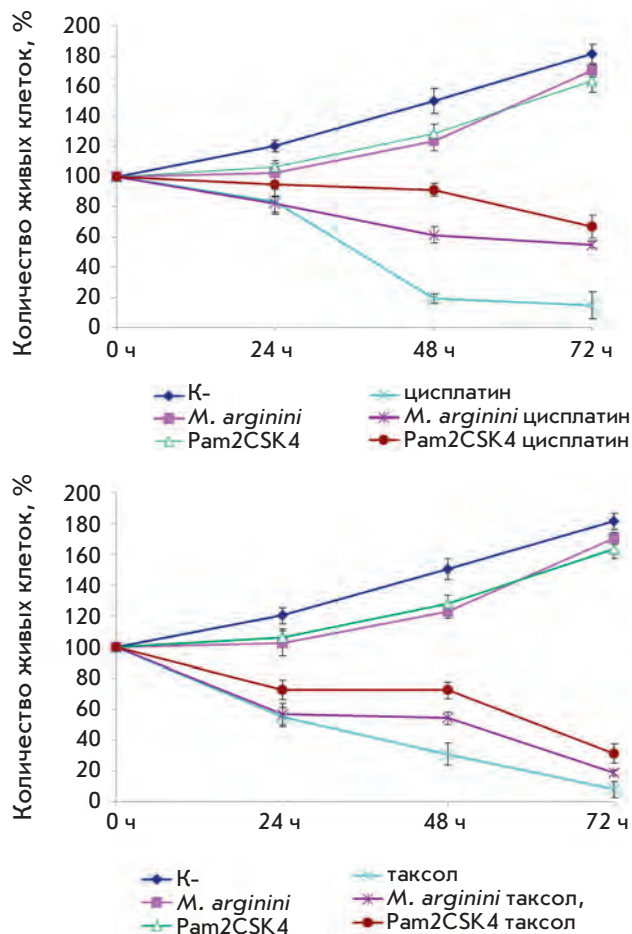


Рис. 5. Кинетика роста клеток WEHI-3В. К – контрольные клетки; *M. arginini* – клетки, инфицированные *M. arginini*; Pam2CSK4 – клетки, обработанные диациллипептидом микоплазмы; цисплатин – контрольные клетки, обработанные цисплатином; *M. arginini* цисплатин – инфицированные *M. arginini* клетки, обработанные цисплатином; Pam2CSK4 цисплатин – последовательно обработанные диациллипептидом микоплазмы и цисплатином клетки; таксол – контрольные клетки, обработанные таксолом; *M. arginini* таксол – инфицированные *M. arginini* клетки, обработанные таксолом; Pam2CSK4 таксол – обработанные диациллипептидом микоплазмы и таксолом клетки ($p < 0.005$).

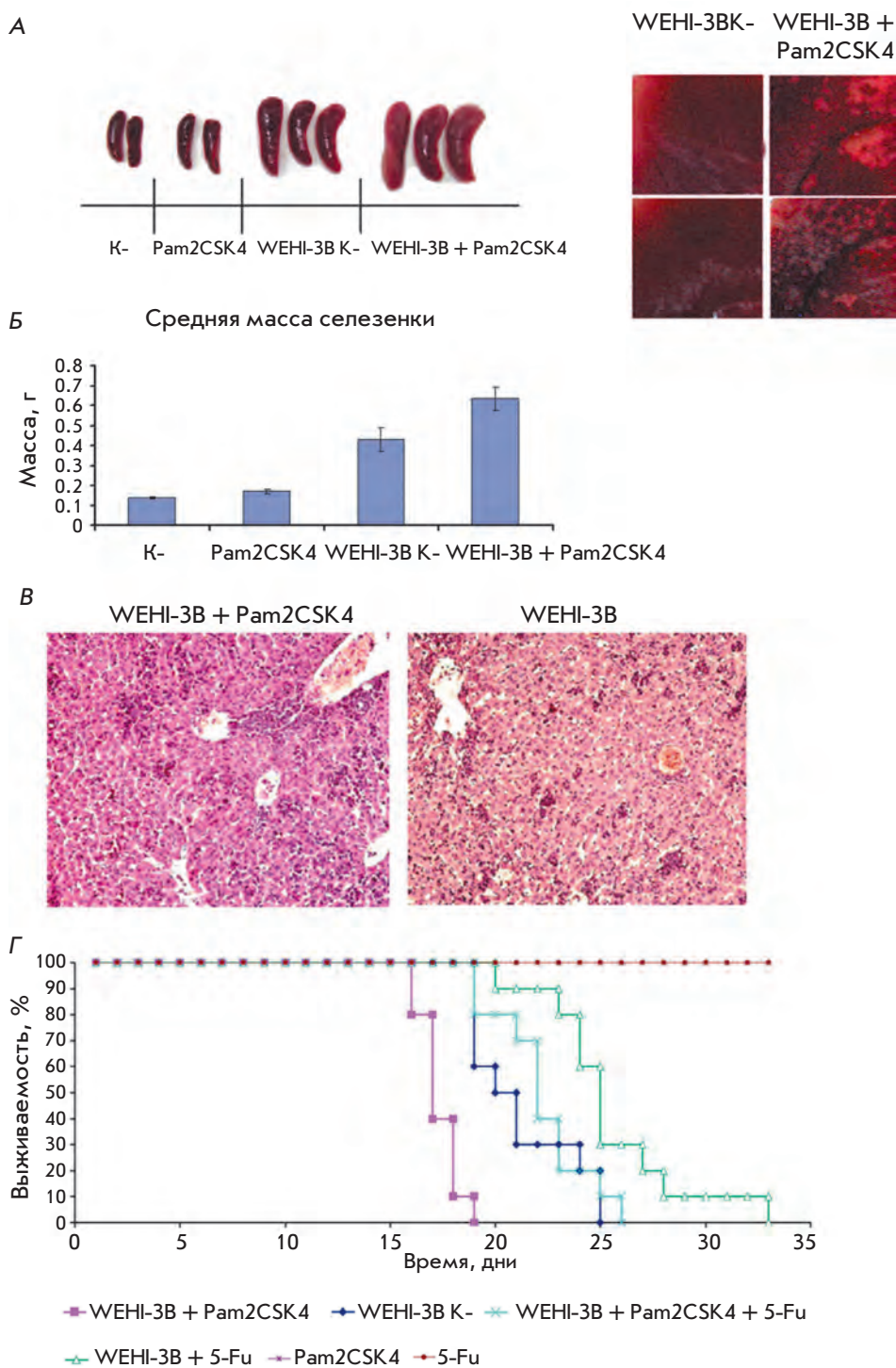


Рис. 6. Влияние диациллипептида Pam2CSK4 на пролиферацию опухолевых клеток WEHI-3B и их резистентность к химиотерапевтическим средствам. **А** – Макрофотографии органов мышей. Слева представлены макрофотографии селезенки, справа – участков печени с инфильтратами. **К** – группа intactных мышей, инъецированных фосфатно-солевым буфером; **Pam2CSK4** – группа мышей, инъецированная диациллипептидом Pam2CSK4; **WEHI-3B** – группа мышей с перевитыми клетками WEHI-3B; **WEHI-3B + Pam2CSK4** – группа мышей с перевитыми клетками WEHI-3B, инъецированная диациллипептидом Pam2CSK4. **Б** – Средняя масса селезенки. Селезенки извлекали из анестезированных мышей. Экспериментальные группы мышей идентичны описанным выше. Для определения средней массы использовали селезенку пяти мышей из каждой группы. **В** – Микрофотографии срезов печени. Извлеченные образцы печени помещали в 10% формалин для фиксации. Далее по стандартной методике образцы заключали в парафин, срезы окрашивали гематоксилин-эозином. **Г** – Диаграмма выживаемости мышей линии BALB/c. **WEHI-3B K-** – группа мышей, которым внутрибрюшинно ввели клетки WEHI-3B; **WEHI-3B + Pam2CSK4** – группа мышей, которым внутрибрюшинно ввели клетки WEHI-3B и внутримышечно – Pam2CSK4; **WEHI-3B + 5-Fu** – группа мышей с внутрибрюшинным введением клеток WEHI-3B, получавших 5-фторурацил; **WEHI-3B + Pam2CSK4 + 5-Fu** – группа мышей с внутрибрюшинным введением клеток WEHI-3B и внутримышечным введением Pam2CSK4, получавших 5-фторурацил. ($p < 0.001$ по лог-ранговому тесту.)

ных групп 1 и 2. Введение Pam2CSK4 мышам группы 4 еще более увеличивало среднюю массу селезенки ($p < 0.05$) по сравнению с массой у животных группы 3 (рис. 6Б).

Гистологическое исследование селезенки и печени мышей из групп 1 и 2 не выявило патологических изменений. В селезенке мышей из групп 3 и 4 картина была сходной. Наблюдалась диффузная плотная инфильтрация пульпы лейкозными миелоцитарными элементами; лимфатические фолликулы были атрофированы. Наибольшими были отличия между образцами печени мышей из групп 3 и 4. В печени мышей из группы 3 присутствовали многочисленные мелкие лейкозные миелоцитарные инфильтраты, тогда как в группе 4 инфильтраты были значительно крупнее (рис. 6В) Инфильтраты располагались преимущественно по ходу синусоидов. Скопления лейкозных клеток обнаруживались также в отдельных кровеносных сосудах. У мышей группы 4, в отличие от группы 3, наблюдалась выраженная поверхностная инфильтрация печени лейкозными клетками.

Проведенные макро- и микроскопическое исследования образцов селезенки и печени мышей, которым внутрибрюшинно перевивали клетки WEHI-3В, позволили сделать заключение о том, что диациллипептид микоплазмы способствует прогрессии опухолевого заболевания.

На следующей стадии мы оценили влияние диациллипептида Pam2CSK4 на скорость прогрессии опухоли. Одновременно определяли каким образом Pam2CSK4 влияет на резистентность перевиваемых клеток к химиотерапевтическим средствам. Этот опыт проводили по схеме, приведенной в разделе «Экспериментальная часть». На рис. 6Г представлена диаграмма выживаемости мышей, участвующих в эксперименте.

Анализ кривых выживаемости Каплана–Мейера показал, что мыши, получавшие синтетический диациллипептид, хуже отвечали на 5-фторурацил, чем мыши, не получавшие Pam2CSK4. Последняя мышь из группы, получавшей химиотерапию, пала на 33 день, в то время как мыши, одновременно с химиотерапией получавшие Pam2CSK4, пали уже на 26 день.

Выживаемость мышей *in vivo* полностью соответствовала результатам, полученным ранее на культурах клеток. Более того, как видно из диаграммы, все мыши, которым одновременно вводили клетки WEHI-3В и Pam2CSK4, умерли уже на 19 день, в то время как мыши, не получавшие Pam2CSK4, прожили 25 дней. Все это свидетельствует о том, что внутримышечное введение Pam2CSK4 приводило к усилению прогрессии опухоли и сокращению сроков жизни мышей. Примечательно, что результаты

этого эксперимента не согласовывались с данными, полученными на культуре клеток, где добавление Pam2CSK4 в культуральную среду не приводило к повышению скорости пролиферации клеток WEHI-3В.

Влияние диациллипептида Pam2CSK4 на продукцию факторов, стимулирующих пролиферацию клеток WEHI-3В миеломоноцитарного лейкоза мышей *in vivo*

Принимая во внимание основное отличие в скорости роста клеток WEHI-3В *in vitro* и *in vivo* в присутствии Pam2CSK4, мы предположили, что в организме экспериментальных животных после введения диациллипептида может происходить выработка факторов, существенных для пролиферации клеток WEHI-3В, определяя тем самым кинетику их роста *in vivo*.

Для подтверждения выдвинутой гипотезы мы изучили как влияет сыворотка мышей, получавших Pam2CSK4, на скорость пролиферации клеток WEHI-3В. Для этого мышам линии BALB/с внутримышечно вводили по 5 мкг диациллипептида Pam2CSK4. Через 24 ч после инъекции проводили отбор крови мышей для получения сыворотки. В качестве контроля использовали сыворотку мышей, получавших фосфатно-солевой буфер. Сыворотки использовали для приготовления 5% среды культивирования клеток WEHI-3В (RPMI). Среда добавляли к клеткам WEHI-3В, которые высаживали на 96-луночный планшет в концентрации 10^3 клеток/луночку. Кинетику роста клеток определяли по накоплению клеточной биомассы в реакции с субстратом МТТ в течение 72 ч (рис. 7).

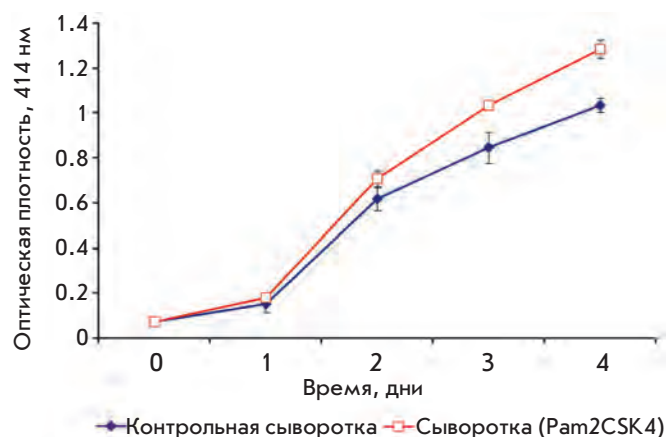


Рис. 7. Кинетика роста клеток WEHI-3В миеломоноцитарного лейкоза мышей, к которым добавили сыворотку мышей, получавших Pam2CSK4 ($p < 0.005$).

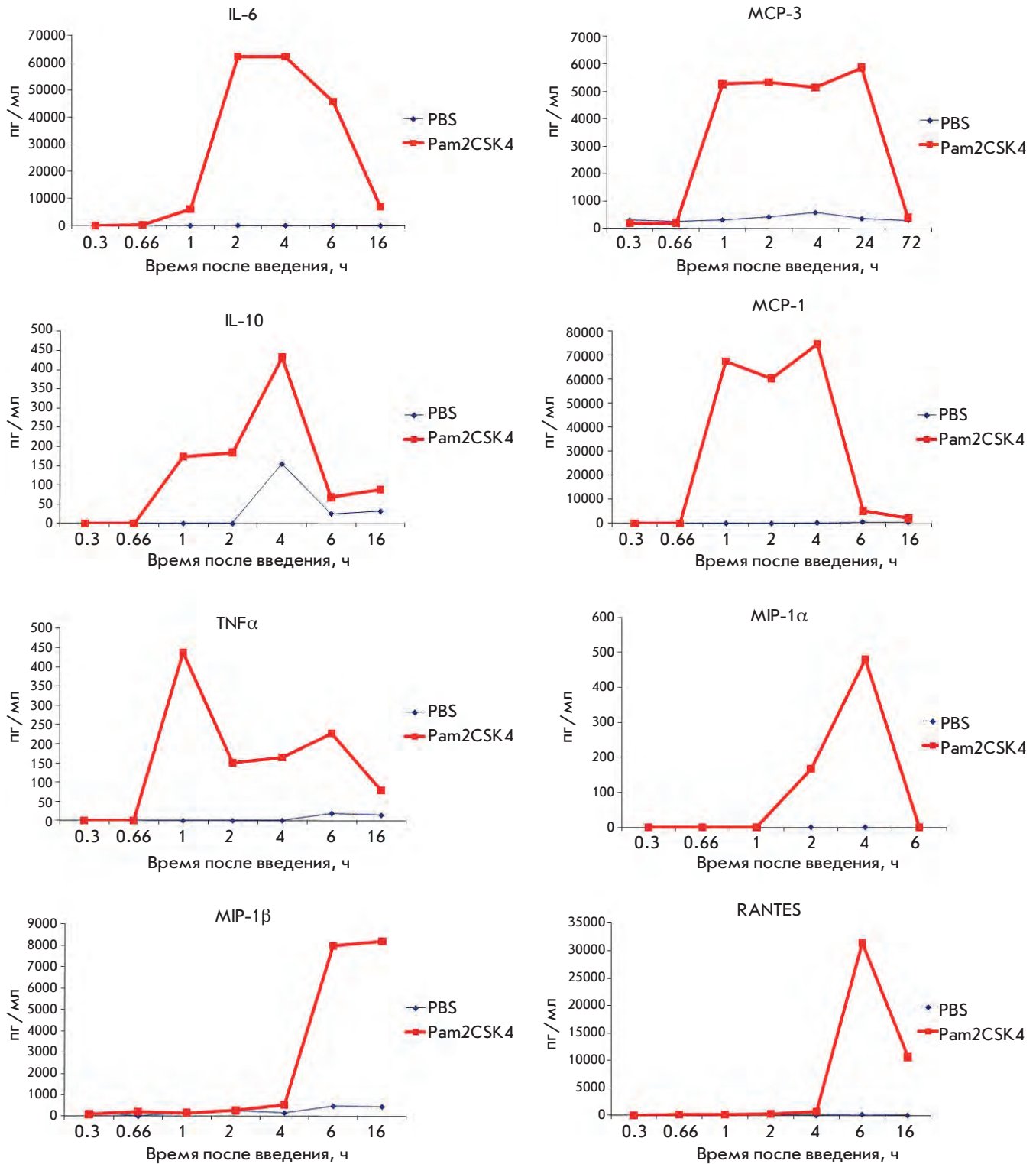


Рис. 8. Определение концентрации цитокинов в сыворотках крови мышей, инъецированных Pam2CSK4. Мышам линии BALB/с вводили диациллипептид Pam2CSK4 или фосфатно-солевой буфер (PBS), после чего через указанные интервалы времени отбирали кровь и приготавливали сыворотку. Образцы сыворотки использовали для определения уровня экспрессии цитокинов. Каждая точка представляет собой среднее значение из трех независимых повторов.

Как видно из *рис. 7*, добавление к клеткам WENI-3В сыворотки крови мышей, получавших внутримышечно Pam2CSK4, способствовало увеличению скорости их пролиферации. Результаты этого опыта подтвердили высказанное ранее предположение о возможной выработке фактора, индуцирующего рост клеток миеломоноцитарного лейкоза мышей, в ответ на введение Pam2CSK4.

На следующем этапе была предпринята попытка идентификации факторов, способствующих усилению роста клеток WENI-3В.

С этой целью мы проанализировали синтез хемокинов и цитокинов в организме в ответ на введение диациллипептида (*рис. 8*). Экспрессию цитокинов определяли по методике, описанной в «Экспериментальной части». На *рис. 8* представлены данные для цитокинов, уровень экспрессии которых изменялся в ответ на введение Pam2CSK4. Видно, что в ответ на введение Pam2CSK4 изменялась экспрессия восьми из 14 цитокинов. Анализ опубликованных данных показал, что пять из этих цитокинов способны прямо или опосредованно стимулировать рост опухолей – IL-6, MCP-1, MCP-3, RANTES, TNF α [21].

Таким образом, нами показано, что активация TLR2-зависимого сигнального пути в клетках WENI-3В после добавления диациллипептида Pam2CSK4 или клеток *M. arginini* ведет к конститутивной активации в клетках WENI-3В фактора транскрипции NF-kB. В свою очередь, активация NF-kB приводит к повышению резистентности таких клеток к различным повреждениям, индуцируемым химиотерапевтическими средствами (цисплатином, таксолом, фторурацилом).

В экспериментах *in vitro* было показано, что подавление апоптоза в инфицированных *M. arginini* клетках, обусловленное активацией фактора транскрипции NF-kB, не влияло на скорость пролиферации клеток. Однако другие результаты получены *in vivo*: внутримышечное введение Pam2CSK4 стимулировало рост клеток WENI-3В миеломоноцитарного лейкоза мыши в организме экспериментальных животных. Главным образом этот факт связывается со способностью Pam2CSK4 стимулировать экспрессию факторов (IL-6, MCP-1, MCP-3, RANTES, TNF α), усиливающих рост опухолевых клеток.

Результаты, полученные нами на модели клеток WENI-3В, показывают, что активация Толл-подобного рецептора 2 в опухолевых клетках миеломоноцитарного происхождения, обусловленная микоплазменной инфекцией или прямым действием агониста TLR2 (диациллипептида), стимулирует рост этих клеток. При этом изучение воздействия микоплазмы и ее структурного компонента диациллипептида Pam2CSK4 на течение опухолевого процесса позволяет сделать заключение о том, что микоплазменная инфекция может не только влиять на скорость прогрессии заболевания, но и на эффективность противоопухолевой терапии. Представленное наблюдение может быть верным не только в отношении микоплазм, но и других патогенов, вызывающих различные инфекции у больных со злокачественными новообразованиями. При этом очевидно, что проведение эффективной терапии в случае лейкозов миеломоноцитарного происхождения возможно только при отсутствии стимуляции заболевания факторами патогенных микроорганизмов или их антигенами, циркулирующими в организме. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Medzhitov R. // Nat. Rev. Immunol. 2001. V. 1. P. 135–145.
- Pasare C., Medzhitov R. // Nature. 2005. V. 438. № 7066. P. 364–368.
- Uematsu S., Akira S. // Handb. Exp. Pharmacol. 2008. V. 183. P. 1–20.
- Bianchi M.E. // J. Leukoc. Biol. 2007. V. 81. P. 1–5.
- Diebold S.S. // Handb. Exp. Pharmacol. 2009. V. 188. P. 3–30.
- West A.P., Koblansky A.A., Ghosh S. // Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 2006. V. 22. P. 409–437.
- Тухватулин А.И., Логунов Д.Ю., Щербинин Д.Н., Шмаров М.М., Народицкий Б.С., Гудков А.В., Гинцбург А.Л. // Биохимия. 2010. Т. 75. № 9. С. 1224–1243.
- Aravind L., Dixit V.M., Koonin E.V. // Science. 2001. V. 291. P. 1279–1284.
- Kawai T., Akira S. // Semin. Immunol. 2007. V. 19. P. 24–32.
- Iwasaki A., Medzhitov R. // Nat. Immunol. 2004. V. 5. № 10. P. 987–995.
- Pasare C., Medzhitov R. // Adv. Exp. Med. Biol. 2005. V. 560. P. 11–18.
- Palm N.W., Medzhitov R. // Immunol. Rev. 2009. V. 227. № 1. P. 221–233.
- Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Тухватулин А.И., Шмаров М.М., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. // Acta Naturae. 2010. Т. 2. № 3 (6). С. 14–23.
- Krieg A.M. // J. Clin. Invest. 2007. V. 117. P. 1184–1194.
- Chicoine M.R., Zahner M., Won E.K. // Neurosurgery. 2007. V. 60. P. 372–381.
- Stockfleth E., Trefzer U., Garcia-Bartels C. // Br. J. Dermatol. 2003. V. 149 (Suppl. 66). P. 53–56.
- Logunov D., Scheblyakov D., Zubkova O., Shmarov M., Rakovskaya I., Gurova K., Tararova N., Burdelya L., Naroditsky B., Ginzburg A., Gudkov A. // Oncogene. 2008. V. 27. № 33. P. 4521–4531.
- Harmey J.H., Bucana C.D., Lu W. // Int. J. Cancer. 2002. V. 101. P. 415–422.
- Hayden M.S., Ghosh S. // Genes Dev. 2004. V. 18. P. 2195–2224.
- Huang B., Zhao J., Shen S. // Cancer. Res. 2007. V. 67. P. 4346–4352.
- Karin M., Yamamoto Y., Wang Q.M. // Nat. Rev. Drug. 2004. V. 3. P. 17–26.