

СТРУКТУРНЫЕ КОМПОНЕНТЫ *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* — КАК АКТИВАТОР ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК

¹ Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
г. Минск, Республика Беларусь;

² Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Основные биотопы человека характеризуются разнообразием представителей нормальной, условнопатогенной и патогенной микрофлоры. Для каждого микробиома существуют свои ключевые виды микроорганизмов, обладающие универсальным набором механизмов микробного антагонизма и патогенассоциированных молекулярных паттернов, посредством которых они взаимодействуют с паттернраспознающими рецепторами клеток хозяина и организуют защиту организма хозяина [1]. Среди автохтонной микрофлоры дыхательных путей наиболее важны непатогенные стафилококки, нейссерии, стрептококки. Для кишечного тракта – бифидобактерии и лактобациллы, для женского репродуктивного тракта – лактобациллы. Отмечена важность изучения иммуномодулирующей активности пробиотических бактерий, значительно зависящей от используемого на практике вида и штамма пробиотика, которая в комплексе с данными адгезивной, колонизирующей и антагонистической его активности может определять алгоритм выбора оптимального препарата для конкретного клинического случая.

Бактерии рода *Bifidobacterium* являются представителями нормальной микрофлоры человека и в высоких концентрациях обнаруживаются в ротовой полости, кишечном и вагинальном тракте. Клеточная стенка бифидобактерии является типичной для грамположительных бактерий и представляет собой тонкий слой пептидогликана, который покрыт полисахаридами, белками и тейхоевой кислотой. Липогликан бифидобактерий обладает антигенными и иммуномодулирующими свойствами. Липотейхоевые кислоты клеточной стенки образуют связи с цепочками полисахаридов, а также выполняют роль адгезивных молекул, связываясь с рецепторами мембраны энтероцитов. Естественные муропептиды относятся к иммуномодуляторам мягкого целенаправленного действия, оказывающие иммуностимулирующий эффект посредством взаимодействия с хорошо охарактеризованными рецепторами клеток иммунной системы и сигнальными путями [2].

Терапевтическое действие пробиотических препаратов может быть обусловлено бактериальными клетками, живыми или убитыми, их поверхностными структурными компонентами и ДНК, в основе действия которых лежат лиганд-рецепторное взаимодействие с Toll-подобными рецепторами (TLR) и последующая активация клеточного и гуморального звеньев врожденного иммунитета. Передача сигнала от рецепторов приводит к продукции спектра различных медиаторов: провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, интерферонов, катионных противомикробных пептидов, стимуляции процессов регенерации, апоптозу и т. д.

При распознавании микроорганизмов, особенно через сигнальные рецепторы (TLR), происходит быстрое изменение функции более 1000 генов. Технология микроэррэй основана на принципе гибридизации комплементарных фрагментов ДНК и позволяет изучать огромные массивы генов. Предполагается, что динамика и направление экспрессии гена коррелирует с концентрацией его мРНК. Вектор значений концентрации мРНК одного и того же гена при разных условиях называют профилем экспрессии данного гена [3]. В связи с этим, необходим поиск новых методических подходов по выяснению каскадных взаимодействий между паттернами бактериальных агентов с рецепторными, сигналпроводящими системами клеток хозяина и адресованными генам или их комплексам, изменяющими уровень и направленность экспрессии генов (повышение/снижение/выключение) [4].

Целью данного исследования было выявить изменения в экспрессии генов иммунокомпетентных клеток при взаимодействии со структурными компонентами бифидобактерий методом микроэррэй.

Для активации и роста мононуклеаров периферической крови (МПК) и дендритных клеток (ДК) практически здоровых добровольцев использовались ЛПС *E. coli*, инактивированные бифидобактерии, и их клеточные стенки. Исследована экспрессия генов МПК и ДК под влиянием ЛПС (n=3), бифидобактерий (n=3) и их клеточных стенок (n=3). Total RNA выделена с использованием Tri-Reagent (Sigma, USA). кДНК синтезирована с применением Superscript cDNA Synthesis Kit (Invitrogen, CA). Гибридизация меченной кДНК проводилась на биочипе Arrayit Dendritic & Antigen Presenting Cell Pathways Microarrays и сканировалась на Innoscan 700 (Carbon, France). Для биоинформативного и статистического анализа результатов применялись пакеты программ Expander 6, Statistica 10.0; статистически значимыми различия считали при уровне $p < 0,05$.

Были проведены опыты по сокультивированию иммунокомпетентных клеток с компонентами *Bifidobacterium adolescentis*; выполнены исследования по оценке экспрессии 96 генов зрелыми ДК и МПК в ответ на стимуляцию на 9 биочипах. В ходе исследования была проанализирована экспрессия генов мононуклеаров и зрелых ДК, полученных из 3 образцов донорской крови. Исследована экспрессия 96 генов на биочипах Arrayit Dendritic & Antigen Presenting Cell Pathways Microarrays (каждый ген представлен тремя спотами) зрелых ДК и МПК под влиянием ЛПС кишечной палочки и под воздействием инактивированных бифидобактерий, а также их клеточных стенок.

Перед началом обработки данные представляют собой цифровое изображение интенсивности флуоресценции геноспецифичных точек микрочипа. Предобработка подразумевает три последовательных стадии: фоновую поправку, нормализацию и группировку данных. На первом этапе необходимо вычесть значение флуоресценции подложки (фона) из значения интенсивности флуоресценции каждой пробы. При этом используют два подхода: а) из значения флуоресценции каждой точки вычитают сигнал подложки непосредственно рядом с ней; б) определяют среднюю интенсивность флуоресценции подложки и вычитают ее из интенсивности каждой точки. Проводят также нормирование интенсивностей флуоресценции красителей. Данный тип нормализации выполняют, основываясь на интенсивности флуоресценции проб, соответствующих генам домашнего хозяйства.

Числовые данные значения флуоресценции спотов были переведены в программу Microsoft Excel 2013 и представлены в виде таблицы (базы данных). Первоначально находили значение интенсивности свечения фона. Интенсивность свечения фона принимали за среднее арифметическое интенсивности свечения спотов контрольных генов (BLANK). Затем, от значения интенсивности свечения спотов отнимали среднее арифметическое данных контрольных генов с целью получения «чистой» интенсивности свечения спотов. Нормирование интенсивности флуоресценции красителей проводили относительно значения интенсивности свечения спотов, соответствующих гену домашнего хозяйства Actin beta.

В дальнейшем весь массив данных классифицировался для выявления групп генов и функциональных связей. Существуют разнообразные подходы к кластеризации и группировке генов при анализе результатов микроэррей-исследований. Первым способом является группировка генов по выполняемым функциям. Есть математический подход к выполнению кластеризации, когда гены группируются на основании их уровня экспрессии, высокой или низкой вариабельности признака.

В качестве значения экспрессии был принят натуральный логарифм отношения уровней экспрессии. Изменение экспрессии оценивали путём нахождения логарифма отношения интенсивности опытного образца (ДК под влиянием инактивированных бифидобактерий) к контрольному (базовому) уровню (ДК под влиянием ЛПС кишечной палочки). Положительные значения соответствовали повышению экспрессии, а отрицательные – её подавлению.

1. Характеристика экспрессии генов рецепторов хемокинов, интерферонов и интерлейкинов в ответ на воздействие инактивированных бифидобактерий.

Для анализа были выбраны значения экспрессии групп генов рецепторов хемокинов, интерферонов, интерлейкинов (рис.).

Из представленной на рисунке диаграммы можно отметить почти равное значение экспрессии генов рецепторов хемокинов. Достоверных различий между суммарной экспрессией генов активированных клеток и контрольных образцов выявлено не было (значение показателя p -value колебалось от 0,06 до 0,4). Исключение составило значение экспрессии гена рецептора ИЛ8 ($p = 0,043$). ИЛ8 является одним из сильнейших факторов хемотаксиса нейтрофилов. Его связывание с рецептором вызывает G-белок-опосредованную активацию фосфатиди-

линозитол-кальциевой системы вторичных посредников и усиливает проведение внутриклеточных активационных сигналов.

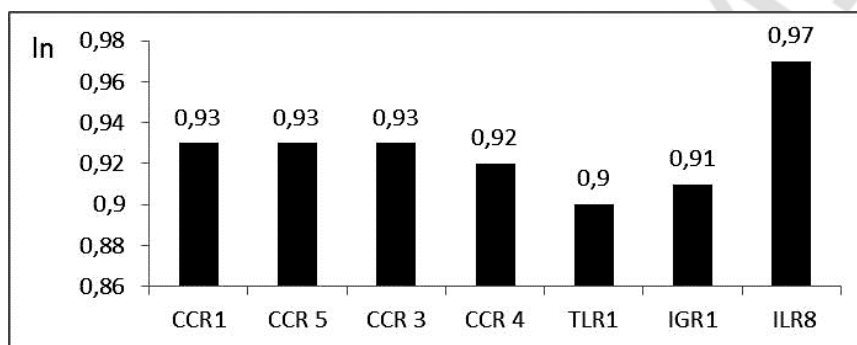


Рис. Значения данных экспрессии генов рецепторов хемокинов, интерферонов, интерлейкинов после проведения нормализации

2. Характеристика экспрессии генов CD молекул в ответ на воздействие инактивированных бифидобактерий.

Анализируя полученные данные повышенной экспрессии генов костимуляторных CD молекул (*CD40*, *CD80*, *CD86*) и генов молекул семейства *CD1* (*CD1a*, *CD1b*, *CD1c*, *CD1d*), можно отметить относительно равные значения экспрессии генов CD молекул (интервал значений от 0,88 до 0,97). Максимальные значения экспрессии продемонстрировали гены молекул *CD1c* и *CD1a* – 0,97 и 0,96 соответственно ($p = 0,033$ и $p = 0,04$). В настоящее время отводят важную роль *CD1* - системе дендритных клеток в презентации антигенов и в защите организма от бактерий с липидобогащенной капсулой и опухолей. Возможность экспрессии молекул семейства *CD1* (в частности *CD1a*) на поверхности дендритных клеток зависит от многих факторов, и чем она меньше, тем слабее возможности иммунной системы отвечать на соответствующие липидные антигены.

При сравнительном анализе экспрессии генов проб под влиянием ЛПС с пробами иммунокомпетентных клеток сокультивированных с компонентами пробиотических микроорганизмов, геном, значение экспрессии которого максимально варьируемо (up regulated), оказался *CCL7* (лиганд хемокина) является аттрактантом моноцитов и регулятором макрофагов; наименее варьируемым (down regulated) – ген *CD44* играет важную роль в межклеточных взаимодействиях, клеточной адгезии и миграции. Выявлена также повышенная ($p < 0,05$) экспрессия генов *CCL13*, *IFNG*, *IFNGR1*, *IL8RA*, *CDC42*, в ответ на используемые активаторы.

В данном исследовании компоненты бактерий (ЛПС *E. coli*, клеточные стенки бифидобактерий), а также сами инактивированные микроорганизмы оказывают стимулирующее действие на иммунокомпетентные клетки (выявлена повышенная экспрессия генов *CCL13*, *IFNG*, *IFNGR1*, *IL8RA*, *CDC42*, *CD1c*, *CD1a*, *ILR8*), тем самым индуцируя их созревание и активацию. Оценка экспрессии генов иммунокомпетентных клеток позволяет получить новую информацию о дифференцированном ответе на активаторы различных типов, что в свою очередь может определять характер (толерантность/иммунный ответ/аллергия) и тип иммунного ответа (клеточный или гуморальный).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Титов, Л. П.* Медицинская геномика: организация генома, регуляция экспрессии генов, генетическая вариабельность / Л. П. Титов // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. 2015. № 4. С. 97-113.
2. *Взаимодействие* бифидобактерий и их компонентов с полинуклеарами и моонуклеарами крови человека / Л. П. Титов [и др.] // Изв. НАН Беларуси. Сер. мед. наук. 2013. № 2. С. 10-18.
3. *Pneumolysin-dependent and –independent gene expression identified by cDNA Microarray analysis of THP-1 human mononuclear cells stimulated by Streptococcus pneumonia* / P. D. Rohers [et al.] // Infect. Immun. 2003. Vol. 71. P. 2087-2094.
4. *Collaborative association study of genome-wide scan reveals association of psoriasis with IL-23 and NF-kappa B pathways* / R. P. Nair [et al.] // Nat. Genet. 2009. Vol. 41. P. 199-204.