

EXPRESIA CHEMOKÍNOV PO IN VITRO APLIKÁCIÍ PROBIOTICKÝCH KMEŇOV A SALMONELLA ENTERICA (SE147)

Husáková E., Kolesárová M., Levkutová M., Herich R., Spišáková V., Levkut M.
Katedra patologickej anatómie a patologickej fyziológie, UVLF Košice

ABSTRAKT

Cieľom tejto štúdie bolo sledovať účinok vybraných probiotických kmeňov na hladinu expresie zápalových chemokínov K60 a MIP1 β , v kultúre periférnych krvných mononukleárných buniek izolovaných z kurčiat, po ovplyvnení *S. enterica* serovar *Enteritidis* (SE147). Hladina expresie K60 a MIP1 β bola stanovená metódou kvantitatívnej real-time PCR. Najvyššia expresia K60 a MIP1 β nastala po 24h kultivácii v kultúrach buniek vystavených pôsobeniu SE 147. Zvýšená expresia chemokínov nastala aj v skupine SE147+E. *faecium* AL41 po 48h kultivácii a taktiež v skupine obsahujúcej *E. faecium* H31 po 24h kultivácii. V skupine obsahujúcej SE147+*L. fermentum* AD1 sme zaznamenali najvyššiu expresiu K60 a MIP β po 24h kultivácii. V porovnaní s kontrolami, sú dynamické zmeny v expresii chemokínov reakciou na bakteriálnu infekciu *S. enterica* serovar *Enteritidis* (SE147). Tieto výsledky naznačujú, že probiotické kmene ovplyvňujú expresiu zápalových chemokínov MIP1 β , K60 a majú potenciálnu úlohu v modulácii aktivácie imunitného systému.

ÚVOD

Chemokíny predstavujú skupinu približne 50 malých peptidov, ktoré sú účinnými aktivátormi a chemoatraktantmi leukocytov. Okrem ich úlohy v zápalových a imunitných reakciách participujú na procesoch angiogenézy, hematopoézy a zvyšujú antitumorové obranné mechanizmy. Sú efektorovými molekulami prirodzenej a získanej imunity. Indukujú a koordinujú imunitnú odpoveď zameranú na široké spektrum patogénov (Swaggerty a kol., 2008). Detekcia vtáčích chemokínov je limitovaná nedostatkom špecifických protilátok, avšak dostupnosť ich génových sekvencií umožňuje kvantifikovať hladinu expresie mRNA využitím kvantitatívnej real-time RT-PCR metódy. Súčasné štúdie poukazujú na vysokú citlivosť RT-PCR metódy a schopnosť kvantifikovať rozsiahle spektrum chemokínov (Beal a kol., 2004; Smith a kol., 2005). MIP1 β (macrophage inflammatory protein) a K60 sú účinné atraktanty pre Th1 CD4+ lymfocyty a makrofágy a indukujú migráciu heterofilov a lymfocytov (Mantovani a kol., 2003). Celkovo možno konštatovať, že charakter imunitnej odpovede reprezentovaný jednotlivými bunkovými populáciami, je časovo regulovaný proces nadviazaný na dynamiku produkcie chemokínov. Cieľom našej práce bolo sledovať vplyv vybraných probiotických kmeňov na expresiu zápalových chemokínov v kultúre periférnych krvných mononukleárných buniek, po ovplyvnení salmonelovou infekciou.

MATERIÁL A METODIKA

Izolácia a kultivácia PMBC z periférnej krvi sliepok

Z klinicky zdravej hydiny bola krv odobratá z *vena cutanea ulnaris* do 1,5% EDTA, nariadená pomocou PBS v pomere 1:2 a prenesená do skúmaviek s obsahom histopaque-u 1077 (Sigma-Aldrich, UK). Po centrifugácii bol vzniknutý prstenec buniek prenesený do 1ml PBS a 2-krát premytý pri 14000rpm 5min. Izolované bunky boli nasadené na 12-jamkovú kultivačnú platničku v počte 1×10^7 buniek/mL a kultivované cez noc (39°C, 5% CO₂) v médiu RPMI 1640 obohatené o 10mM HEPES a 10% bovinného fetálneho séra. Po kultivácii bolo do príslušných jamiek pridané 200 μ l *S. Enteritidis* SE147 (poskytnuté: Doc. Rychlík, VÚVEL, Brno, Česká republika) v počte 1×10^8 CFU/ml a 200 μ l probiotických kmeňov: *E. faecium* AL41, *E. faecium* H31, *L. fermentum* AD1 (poskytnuté: Dr. Lauková, IAP SAS,

Košice, Slovensko) v počte 1×10^9 CFU/ml. Po pridaní baktérií boli PMBC kultivované počas 24 a 48 hodín.

Homogenizácia buniek PMBC a izolácia RNA

Po uplynutí kultivačnej doby boli bunky odsaté a scentrifugované pri 12900 rpm 1min. K vzniknutému peletu buniek bol pridaný lyzačný pufer s obsahom β -merkaptoetanolu (Qiagen, USA). K celobunkovému lyzátu bol pridaný v pomere 1:1 70% etanol a celá zmes bola homogenizovaná pomocou vortex mixéra (Labnet, USA) 1min. Izolácia RNA sa uskutočnila použitím RNeasy mini kitu podľa inštrukcií od výrobcu (Qiagen, USA). Čistota a výsledná koncentrácia RNA bola stanovená spektrofotometricky pomocou Nanodropu. Získaná RNA bola prepísaná použitím Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, UK). Výsledná cDNA bola 10x zriedená destilovanou vodou a použitá ako templát pre RT-PCR.

Real-time PCR

Pomocou RT-PCR bola stanovená relatívna expresia chemokínov K60 a MIP1 β . Stupeň expresie cieľových génov bol normovaný voči 2 housekeepingovým génom: glyceraldehyd – 3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH) a ubikvitín (UB). Detekcia špecifických produktov RT-PCR prebiehala na CFX 96 Real time systéme (Bio-Rad, USA) pomocou Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoScientific, UK) podľa preddefinovaného programu: počiatočná denaturácia 15 minút pri 95°C a 45 cyklov: denaturácia pri 95°C 20 sekúnd, anelácia pri 60°C 30 sekúnd, extenzia pri 72°C 30 sekúnd a finálna elongácia 72°C 10min. Celkový objem reakčného mixu bol 25 μ l a pozostával z 12,5 μ l Supermix-u, 10 μ l primerov a 2,5 μ l templátu cDNA.

Na štatistickú analýzu dát bola použitá jednocestná ANOVA, Bonferoniho test (GraphPad InStat).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Bunkové kultúry vystavené pôsobeniu *S. enterica* serovar *Enteritidis* SE147, vykazovali najvyššiu expresiu prozápalových chemokínov K60 a MIP1 β po 24h kultivácii. Avšak v kultúrach, ktoré obsahovali SE147 a *E. faecium* AL41 bola expresia K60 výrazne znížená po 24h kultivácii. Expresia MIP1 β bola zvýšená po 48h kultivácii po pôsobení *E. faecium* AL41. Probiotický kmeň *E. faecium* H31 pôsobil v smere zníženej expresie K60 a MIP1 β po 24h aj 48h kultivácii, v porovnaní s kultúrami so samotnou infekciou SE147. **Najsilnejší stimulačný účinok na expresiu K60 a MIP1 β mal probiotický kmeň *L. fermentum* AD1, po 24h kultivácii.** V súčasnosti sa viaceré štúdie zaoberajú účinkami probiotík v imunitnej odpovedi v priebehu rôznych ochorení. V našej práci sme sledovali účinky rôznych probiotických kmeňov na imunologické mechanizmy v kultúre periférnych krvných mononukleárných buniek izolovaných z kurčiat, po infekcii *S. enterica* serovar *Enteritidis* SE147. Zhang a kol. (2012) vo svojej práci sledovali *in vitro* účinky baktérií rodu *Lactobacillus* na indukciu prozápalových chemokínov. Podobné výsledky zaznamenal Amit-Romach a kol. (2010), ktorý poukázal na využitie baktérií rodu *Lactobacillus* ako probiotík v kontrole kolonizácie črevnými patogénmi. Naše výsledky naznačujú, že **aplikácia probiotického kmeňa *L. fermentum* AD1 pôsobí stimulačne na expresiu prozápalových chemokínov K60 a MIP1 β . Táto prozápalová odpoveď je kľúčovým miestom v iniciácii imunitnej odpovede hostiteľa na prítomnosť patogénov. Tieto výsledky tiež naznačujú, že zvýšená expresia chemokínov môže mať kľúčovú úlohu v migrácii buniek do miesta zápalu. Probiotické kmene zosilňujú imunitný status hostiteľa prostredníctvom špecifickej a nešpecifickej imunitnej odpovede.**

POUŽITÁ LITERATÚRA

- Beal, R.K., Powers, C., Wigley, P., Barrow, P.A., Smith, A.L. Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Avian Pathol.* 2004; 33:25–33.
- Smith, C.K., Kaiser, P., Rothwell, L., Humphrey, T., Barrow, P.A., Jones, M.A. *Campylobacter jejuni*-induced cytokine responses in avian cells. *Infect. Immun.* 2005; 73:2094–2100
- Swaggerty, L.CH, Igal Y. Pevzner, Kaiser P., Michael H. Kogut. Profiling pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA expression levels as a novel method for selection of increased innate immune responsiveness. *Vet. Immun. and Immunopathol.* 2008; 8:1-8.
- Mantovani, A., Locati, M., Sozzani, S. *The Cytokine Handbook*, 4th ed., Academic Press, San Diego, CA. 2003; 2:1083–1100.
- Zhang, J.L., Xie, Q.M., Ji, J., Yang, W.H., Wu, Y.B., Li, C., Ma, J.Y., Bi, Y.Z. Different combinations of probiotics improve the production performance, egg quality, and immune response of layer hens. *Poult. Sci.* 2012; 91:2755-2760.
- Amit-Romach, E., Uni, Z., & Reifen, R. Multistep mechanism of probiotic bacterium, the effect on innate immune system. *Molecular Nutrition & Food Research.* 2010; 54(2): 277–284