

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *BIFIDOBACTERIUM* И *LACTOBACILLUS* В ПАТОГЕНЕЗЕ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Киселева Е.П.¹, Цыганова О.В.¹, Михайлопуло К.И.¹,
Свиридов О.В.¹, Демидчик Ю.Е.², Ижик А.В.³,
Книрель Ю.А.⁴, Новик Г.И.³

¹ Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

² Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь

³ Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь

⁴ Институт органической химии РАН, Москва, Россия

Резюме. Обнаружено, что частота встречаемости антител к бесклеточной фракции *Bifidobacterium bifidum* 791 и *Lactobacillus plantarum* B-01 в образцах сыворотки крови больных аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы составляет 71 и 63% соответственно, что в два раза выше соответствующих значений этого показателя в образцах сыворотки крови здоровых доноров. Получены доказательства наличия на поверхности клеток микроорганизмов указанных штаммов компонентов, избирательно взаимодействующих с аутоантителами к тиропероксидазе и тироглобулину и конкурирующих за связывание этих иммуноглобулинов с тироантигенами, а также компонентов, взаимодействующих с тиропероксидазой. Полученные данные позволяют предположить участие пробиотических микроорганизмов рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы по механизму молекулярной мимикрии.

Ключевые слова: бифидобактерии, лактобактерии, тироглобулины, антитела, молекулярная мимикрия.

Kiseleva E.P., Tsyganova O.V., Mikhailopulo K.I., Sviridov O.V., Demidchic Y.E.,
Izhik A.V., Knirel Y.A., Novik G.I.

POSSIBLE ROLE OF PROBIOTIC MICROORGANISMS OF *BIFIDOBACTERIUM*
AND *LACTOBACILLUS* GENUS IN PATHOGENESIS OF AUTOIMMUNE THYROID DISEASES

Abstract. It was revealed, that, in blood samples of the patients with autoimmune thyroid diseases, serum antibodies against cell-free fraction of *Bifidobacterium bifidum* 791 and *Lactobacillus plantarum* B-01 were detected, respectively, in 71 and 63% of cases, that being two-fold higher than appropriate frequencies in healthy blood donors. An evidence was obtained that presence of some components specifically reacting with autoantibodies against thyroid peroxidase and thyroglobulin on the surface of the microorganisms cells

Адрес для переписки:

Киселева Елена Павловна,
Институт биоорганической химии НАН Беларуси
220141, г. Минск, ул. акад. Купревича, 5/2.
Тел.: +375 (017) 263-72-75, +375 (44) 763-79-09.
Факс: +375 (017) 267-87-61.
E-mail: epkiseleva@yandex.ru

and competing for binding of these immunoglobulins with thyroid antigens. One may also suggest a presence of bacterial components, interacting with thyroid peroxidase. The data obtained let us suggest that probiotic microorganisms of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* genus could take part in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases, by means of molecular mimicry mechanisms. (*Med. Immunol.*, vol. 12, N 1-2, pp 71-80)

Keywords: *bifidobacterium, lactobacillus, thyroglobulins, antibodies, molecular mimicry.*

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, в 21 веке хронические неинфекционные заболевания щитовидной железы (ЩЖ) приближаются по частоте встречаемости к наиболее распространенным сердечно-сосудистым заболеваниям и диабету [6, 14]. Среди указанных заболеваний ЩЖ выделяют большую группу аутоиммунных патологий, развивающихся в результате реакции иммунной системы на собственные белки ЩЖ (тироантигены) — тиропероксидазу (ТПО), тироглобулин (ТГ) и рецептор тиротропного гормона [27] и проявляющихся в виде нарушения эндокринной функции ЩЖ и ее деструкции [19]. Аутоантитела (ААТ) к тироантигенам играют важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний ЩЖ (АЗЩЖ) и являются признанными диагностическими маркерами этих заболеваний [12, 19].

Установлено, что в основе патогенеза АЗЩЖ лежит частичный дефект иммунологического контроля, связанный с врожденным дефицитом супрессорной функции Т-лимфоцитов [23], а механизм и клинические проявления этих заболеваний зависят от соотношения различных клонов Т-лимфоцитов-хелперов и их растворимых факторов — цитокинов [24]. Пусковые механизмы развития АЗЩЖ остаются невыясненными. В списке внешних этиологических факторов, потенциально способных приводить к реализации генетической предрасположенности к развитию АЗЩЖ или осложнять протекание этих заболеваний, одно из первых мест занимают инфекционные агенты [21]. Установлено, что бактерии и вирусы, компоненты которых имеют гомологию структуры с собственными белками организма человека (в частности тироантигенами), могут провоцировать развитие АЗЩЖ и других аутоиммунных заболеваний по механизму молекулярной мимикрии [8, 10, 15, 21].

В этой связи представляет интерес выяснение роли в патогенезе АЗЩЖ пробиотических микроорганизмов (ПМ) рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*, являющихся симбионтами желудочно-кишечного тракта человека и животных. Такой интерес связан, в первую очередь, с широким применением живых ПМ и их компонентов в составе традиционных и диетических продуктов питания, а также фармакологических

препаратов профилактического и лечебного действия. Кроме того, он обусловлен информацией о возможности нарушения иммунологической толерантности организма хозяина к антигенам симбиотической микрофлоры [22] в результате проникновения целых клеток ПМ и их компонентов через кишечный эпителий и их последующего поступления в кровь. Вероятность этого возрастает при повреждении слизистой оболочки кишечника в результате воспалительного процесса или цитотоксической химиотерапии, а также при аномальном росте кишечной микрофлоры или увеличении уровня экскреции компонентов бактерий под влиянием антибиотиков [22]. Дополнительными аргументами в пользу необходимости проверки возможной роли ПМ в качестве фактора, провоцирующего развитие АЗЩЖ, являются известные эффекты ПМ, реализующиеся на уровне иммунной системы организма-хозяина — модуляция численности субпопуляций лимфоцитов периферической крови, фагоцитарной активности нейтрофилов, синтеза иммуноглобулинов и медиаторов иммунной системы и др. [21, 27].

Цель работы — исследование эффектов ПМ в иммунохимических системах, включающих тироантигены и специфические ААТ, ориентированное на выяснение роли ПМ в механизмах развития АЗЩЖ.

Задачи:

1. Определение частоты встречаемости антител к компонентам ПМ рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в образцах сыворотки крови больных АЗЩЖ и здоровых доноров.
2. Исследование взаимодействия тироантигенов и специфических ААТ с клетками ПМ рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*.

Материалы и методы

Получение суспензии бактериальных клеток. Использовали культуры третьей генерации 3 штаммов ПМ — *Bifidobacterium bifidum* 791 (шт. 1), *B. longum* B379M (шт. 2), *Lactobacillus plantarum* B-01 (шт. 3), а также культуру *Escherichia coli* M17 (шт. 4) из научной коллекции типовых и промышленно-ценных непатогенных микроорганизмов Института микробиологии НАН Беларуси. Осаждали клетки центрифугированием при 5000 g в течение 20 мин и промывали трижды по 30 мл 0,02 М натрий-фосфатным

буфером (НФБ), pH 7,0, содержащим 0,2 М NaCl (буфер 1), суспендируя клетки и осаждая их центрифугированием в указанных выше условиях. Клетки каждого штамма суспендировали в буфере 1, объем которого соответствовал исходному объему культуральной среды (20 мл), и использовали в тот же день для получения бесклеточной фракции (БФ) или непосредственно для иммуноферментного анализа (ИФА).

Получение БФ. Клетки каждого штамма гомогенизировали вручную гомогенизатором («Wheaton», США) в 20 мл буфера 1 и обрабатывали ультразвуком с использованием диспергатора УЗДН-2Т (п/я В-2613, СССР) порциями по 50 мл 6 раз по 30 секунд при частоте 22 кГц. Фракцию клеточных стенок осаждали центрифугированием при 31 000 g в течение 30 мин БФ (супернатант), хранили при -20 °С.

Тироантигены выделяли из послеоперационной ЩЖ человека, полученной из Минского городского онкологического диспансера МЗ РБ. Очистку ТПО проводили методом иммуноаффинной хроматографии из фракции гомогената ЩЖ, оставшейся после удаления центрифугированием ядер, митохондрий и микросом [14]. ТГ получали из той же фракции осаждением сульфатом аммония (60% насыщения) и гель-фильтрацией переработанного осадка на акрилексе Р-200 «Bio-Rad» (США). Чистота тироантигенов по результатам электрофореза в 10% полиакриламидном геле в присутствии 0,2% додецилсульфата натрия соответствовала 95%. Концентрацию тироантигенов определяли спектрофотометрически, используя $D_{280 \text{ нм}, 1 \text{ см}, 1 \text{ мг/мл}} = 1,0$.

Образцы сыворотки крови здоровых доноров, не имеющих клинических проявлений тиреоидных патологий, и больных с диагнозами хронический лимфоцитарный тиреоидит и диффузный токсический зоб (далее — больные АЗЩЖ) с известными концентрациями ААТ к ТПО и ААТ к ТГ, установленными ИФА с использованием наборов реагентов «Хема-Медика» (Россия), получали из БелМАПО МЗ РБ.

Очищенные Ig человека выделяли из препарата, полученного объединением образцов сыворотки крови 10 здоровых доноров, последовательным осаждением альбумина и Ig каприловой кислотой и сульфатом аммония соответственно [25]. Концентрацию Ig определяли спектрофотометрически, используя $D_{280 \text{ нм}, 1 \text{ см}, 1 \text{ мг/мл}} = 1,35$.

ААТ к тироантигенам выделяли из препарата, полученного объединением образцов сыворотки крови 10 больных АЗЩЖ методом антиген-аффинной хроматографии на сорбентах с иммобилизованными ТПО и ТГ [19]. Количественное определение ААТ к ТПО и ТГ в исходных сыво-

ротках и конечных препаратах проводили с использованием наборов реагентов «ИФА-анти-ТПО» и «ИФА-анти-ТГ» (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»). Очищенные ААТ хранили при -20 °С, размораживая не более 1 раза непосредственно перед использованием.

ИФА. ТПО (ТГ), БФ или целые клетки бактерий иммобилизовали методом прямой адсорбции на полистирольных планшетах «Greiner bio-one» (Германия) при 4 °С в течение ночи из расчета 0,1 мл на лунку. Для иммобилизации ТПО использовали раствор 0,1 М гидрокарбонатного буфера, pH 8,3, с концентрацией белка 0,6 мг/л, для иммобилизации ТГ — 0,1 М раствор цитрат-фосфатного буфера, pH 5,5, с концентрацией белка 0,5 мг/л. Непосредственно перед иммобилизацией БФ каждого штамма разводили буфером 1 в 2 раза, а гомогенные суспензии клеток — в 165-500 раз в зависимости от штамма. После иммобилизации и каждой стадии анализа лунки с иммобилизованными клетками промывали трижды по 0,2 мл буфером 1, лунки с иммобилизованными тироантигенами и БФ — буфером 1, содержащим 0,2 % Tween 20.

Для определения содержания антител к компонентам БФ бактерий в сыворотке крови человека в лунки планшетов с иммобилизованными антигенами вносили по 0,1 мл образцов сывороток крови, разведенных в 100 раз буфером 2, содержащим 0,5 % фенол и 3 % казеин, и инкубировали 60 мин при 37 °С.

Для изучения взаимодействия иммобилизованных клеток бактерий с Ig в лунки планшетов вносили по 0,1 мл образцов сывороток крови, предварительно разведенных в 100 раз, или очищенных обших Ig человека, или очищенных ААТ к ТПО (ТГ), или тех же компонентов в присутствии ТПО (ТГ). В отдельных экспериментах на первой стадии анализа инкубировали иммобилизованные клетки с ТПО или ТГ, а на второй стадии — с МАТ клонов А1 или F8 к ТПО [27] или МАТ клона 5Н8 к ТГ соответственно, полученными в Институте биоорганической химии НАН Беларуси. В качестве инкубационной среды в ИФА с иммобилизованными клетками использовали буфер 1, содержащий 0,02% Tween 20 и 1% бычий сывороточный альбумин. Каждая инкубация происходила в течение 1,5-2 ч при 15-20 °С.

Выявляли Ig человека и МАТ к ТПО (ТГ) на твердой фазе с использованием конъюгатов пероксидазы из корней хрена (ПХ) с белком А «Sigma» (США) и антителами овцы против Ig мыши соответственно. Конъюгаты получали методом синтеза, основанным на окислении олигосахаридных цепей ПХ периодатом Na [25]. После проведения и остановки ферментативной

реакции ПХ [27] измеряли значения оптической плотности раствора в лунках при длине волны 450 нм (D_{450}) в многоканальном иммуноферментном анализаторе «АИФ М/340» (Беларусь).

Результаты

Определение частоты встречаемости антител к компонентам ПМ рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в образцах сыворотки крови больных АЗЩЖ и здоровых доноров

С целью установления возможной роли ПМ в патогенезе АЗЩЖ проводили параллельное определение содержания ААТ к ТПО, являющихся серологическими маркерами АЗЩЖ, и антител к компонентам БФ штаммов 1 и 3, представляющих собой компоненты гликокаликса и цитоплазму клеток бактерий, в образцах сыворотки крови человека ($n = 104$) методом ИФА. «Положительными» по содержанию ААТ к ТПО считали образцы с концентрациями Ig указанной специфичности, превышающими 100 МЕ/мл, т.е. значение, принятое в коммерческом наборе «ИФА-анти-ТПО» в качестве верхней границы «нормы». «Положительными» по содержанию антител к компонентам БФ каждого штамма считали образцы, имеющие по результатам ИФА значения D_{450} , превосходящие не менее чем в 2 раза значение фонового связывания в данной тест-системе, соответствующее 0,3.

Установлено, что частота встречаемости антител к БФ *Bifidobacterium bifidum* 791 и *Lactobacillus plantarum* B-01 в образцах сыворотки крови, содержащих ААТ к ТПО ($n = 35$), составляла 71 и 63% соответственно, в то время как вероятность обнаружения антител указанной специфичности в образцах сыворотки крови, не содержащих ААТ к ТПО ($n = 69$), не превышала 36 и 27% соответственно. Двухкратная разница указанных показателей в двух группах исследуемых образцов свидетельствует о зависимости между содержанием в сыворотке крови ААТ к ТПО и антител к компонентам БФ штаммов 1 и 3 и является аргументом в пользу предположения о возможном участии ПМ рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в механизмах развития АЗЩЖ. Следует отметить, что обнаруженное ранее наличие антител к антигенам *Yersinia enterocolitica* у более 70% больных АЗЩЖ явилось основанием для заключения о возможном участии этого микроорганизма в патогенезе данной группы заболеваний [21].

Следует отметить, что в исследуемой выборке корреляция значений D_{450} по результатам ИФА антител к БФ *B. bifidum* 791 и *L. plantarum* B-01 составляет не более 20%, в то время как значение указанного показателя для близкородственных

штаммов *B. bifidum* 791 и *B. longum* B379M равно 97%, что позволяет предположить независимое участие микроорганизмов родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* в патогенезе АЗЩЖ.

Исследование взаимодействия ААТ к тироантигенам с клетками ПМ рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*

Исследования проводили методом твердофазного ИФА, используя клетки бактерий, адсорбированные в лунках полистирольных планшетов. Благодаря такому подходу компоненты клеточной стенки иммобилизованных бактерий, экспонированные в раствор, сохраняют нативную конформацию молекул, поскольку находятся в естественном окружении и не контактируют с пластиком. Обнаружено, что целые клетки штаммов 1-4, в отличие от БФ тех же штаммов, связывали Ig всех исследуемых образцов сыворотки крови человека ($n = 104$) независимо от наличия в них ААТ к ТПО и ААТ к ТГ (данные не представлены). Вероятно, клетки указанных штаммов содержат поверхностные компоненты, взаимодействующие с Ig человека независимо от их специфичности. С учетом этого предварительно «уравнивали» исследуемые штаммы по показателю D_{450} в ИФА связывания общих Ig человека, находящихся в составе объединенного препарата образцов сыворотки крови 10 здоровых доноров. С этой целью исходные суспензии клеток штаммов 1-4 (условная концентрация клеток каждого штамма — 100%) перед иммобилизацией разводили в 50-500 раз. Установлено, что клетки штаммов 1, 2, 3, 4, иммобилизованные из суспензий с концентрациями 0,2, 0,3, 0,5 и 0,6% соответственно, связывали сопоставимые количества Ig. Следует отметить, что в ходе указанной процедуры одновременно нивелировались различия исследуемых штаммов по интенсивности роста в одинаковых условиях культивирования, а также по способности клеток к адсорбции на полистирольных планшетах.

По результатам ИФА с использованием клеток штаммов 1-4, иммобилизованных из суспензий с указанными выше концентрациями, среднее значение D_{450} в группе образцов сыворотки больных АЗЩЖ ($n = 35$), содержащих (100-3200) МЕ/мл ААТ к ТПО и (или) ААТ к ТГ, перекрестно реагирующих с ТПО [17], оказалось только на 10-15 % выше (в зависимости от штамма) по сравнению со значением того же показателя в группе здоровых доноров ($n = 69$). Учитывая установленную нами концентрационную зависимость связывания Ig сыворотки крови человека бактериальными клетками (табл. 1), полученные данные можно объяснить тем, что ААТ к тироантигенам являются минорной фракцией общих Ig сыворотки крови

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИОННАЯ ЗАВИСИМОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА КОМПОНЕНТАМИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК ПМ

Штамм	Сыворотка крови здорового донора, содержащая менее 1 МЕ/мл ААТ к ТПО и ТГ				Сыворотка крови больного АЗЩЖ, содержащая 2200 МЕ/мл ААТ к ТПО и 5000 МЕ/мл ААТ к ТГ			
	Разведение сыворотки							
	1/30	1/100	1/300	1/1000	1/30	1/100	1/300	1/1000
<i>B. bifidum</i> 791	1,02	0,658	0,388	0,22	1,797	1,177	0,699	0,34
<i>L. plantarum</i> B-01	1,241	0,793	0,464	0,269	1,823	1,237	0,765	0,384
<i>E. coli</i> M17	0,713	0,423	0,272	0,17	1,018	0,62	0,412	0,221

Примечание. Представлены значения D_{450} по результатам ИФА.

больных АЗЩЖ (концентрации 0,05-1,4 г/л [23] и 7-16 г/л [25] соответственно).

В этой связи далее исследовали связывание клетками штаммов 1-4 очищенных ААТ к ТПО (ТГ) и общих Ig, выделенных из сыворотки крови здоровых доноров (рис. 1). Наблюдаемая пропорция значений D_{450} , отражающая связывание клетками Ig, находящихся в составе 5 препаратов, соответствует пропорции концентраций иммунореактивных ААТ к ТПО (ТГ), а не общих Ig. Следует отметить, что препарат, содержащий 5 МЕ/мл ААТ к ТПО, был получен в результате 3-кратной процедуры замораживания и последующего размораживания препарата, содержащего 50 МЕ/мл ААТ к ТПО. Такая процедура не могла изменить концентрацию общих Ig, но привела к 10-кратному снижению концентрации иммунореактивных ААТ к ТПО, по-видимому,

в результате нарушения нативной конформации их молекул. Данные рисунка 1 свидетельствуют о наличии в клетках штаммов 1-4 компонентов, предпочтительно связывающих ААТ к тироантигенам (вероятно, за участки варибельной области Fab-фрагментов).

Полученные данные позволяют предположить сходство пространственной структуры компонентов бактериальных клеток, избирательно связывающих ААТ к ТПО (ТГ), и эпитопов тироантигенов, непосредственно взаимодействующих с ААТ. С целью проверки этого предположения изучали связывание Ig сыворотки крови больных АЗЩЖ и здоровых доноров (контроль) с клетками штаммов 1-4 в присутствии ТПО (ТГ), находящихся в жидкой фазе в концентрации 10^{-7} М (рис. 2). Обнаружено снижение связывания Ig сыворотки крови больных АЗЩЖ с клетками

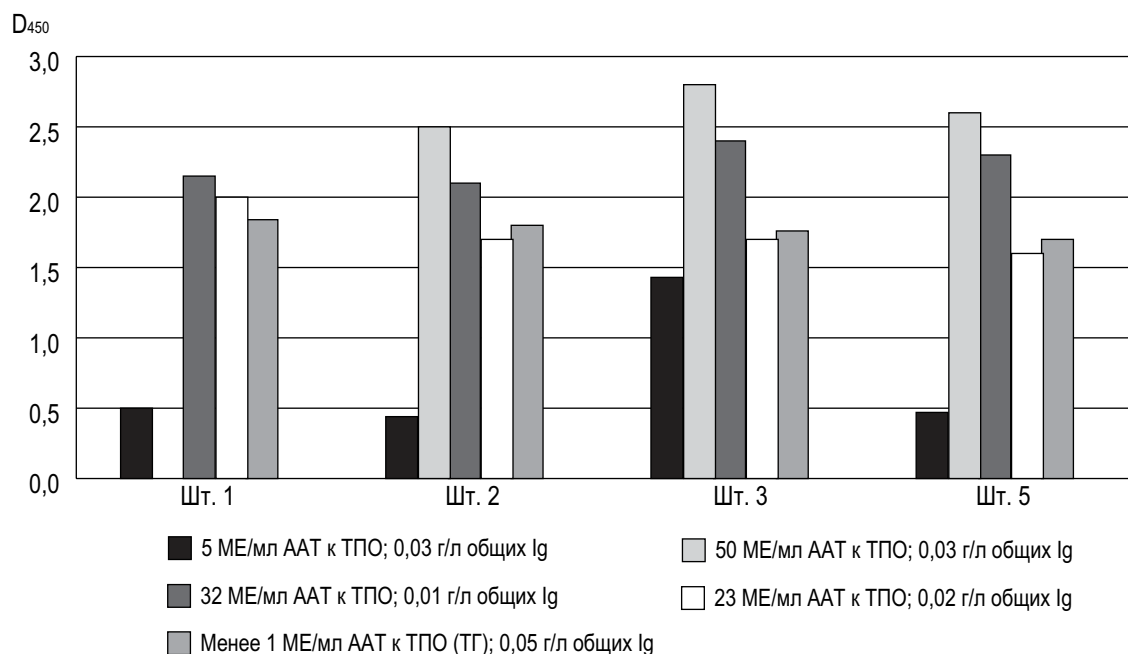


Рисунок 1. Связывание очищенных Ig человека с иммобилизованными клетками *B. bifidum* 791 (шт. 1), *B. longum* B379M (шт. 2), *L. plantarum* B-01 (шт. 3) и *E. coli* M17 (шт. 4)

штаммов 1 и 3 (но не штамма 4) в присутствии ТГ (в меньшей степени — в присутствии ТПО) (рис. 2Б). Как и следовало ожидать, ТГ не вызывал значимых изменений в контрольных пробах, однако ТПО увеличивала связывание Ig сыворотки крови здоровых доноров с иммобилизованными клетками штаммов 1, 3 и особенно штамма 4 (рис. 2А). Данные рисунка 2Б свидетельствуют о конкуренции ТПО и ТГ с компонентами ПМ штаммов 1 и 3 за связывание ААТ и свидетельствуют в пользу сходства пространственной структуры компонентов ПМ, избирательно связывающих ААТ к ТПО (ТГ), и эпитопов тироантигенов. Вероятно, в составе клеток *E. coli* M17 отсутствуют компоненты, имеющие структурное сходство с эпитопами тироантигенов.

Дополнительное подтверждение конкурентного вытеснения тироантигенами специфических ААТ из комплекса с компонентами ПМ получено в экспериментах с использованием «искусственных сывороток больных», приготовленных в результате добавления очищенных ААТ к ТГ или ААТ к ТПО к сыворотке крови здоровых доноров. Контрольные пробы содержали вместо ААТ буферный раствор. Такой подход позволял устранить эффекты, обусловленные возможными различиями индивидуальных образцов сывороток крови как по содержанию общих Ig, так и по содержанию компонентов, способных оказывать влияние на взаимодействие Ig с бактериальными клетками. Типичные данные представлены на рисунке 3.

Исследование взаимодействия тироантигенов с клетками ПМ рода *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*

Данные рисунка 2А, свидетельствующие об увеличении связывания Ig сыворотки крови здоровых доноров с иммобилизованными клетками штаммов 1 и 3 в присутствии ТПО (но не ТГ), позволяют предположить формирование на твердой фазе с иммобилизованными клетками комплексов, компонентами которых являются ПМ, Ig и ТПО. Основанием для такого предположения является способность ТПО к образованию гидрофобных агрегатов с другими природными биополимерами, в частности Ig, отмеченная в ряде работ, посвященных разработке методов очистки этого белка [14, 6]. В составе таких комплексов ТПО может взаимодействовать с клетками ПМ непосредственно (ПМ – ТПО (– Ig)_n) или через Ig, связавшиеся с обнаруженными нами компонентами ПМ (ПМ – Ig – ТПО (– Ig)_{n-1}). В обоих случаях присутствие ТПО в растворе приводит к увеличению количества Ig на твердой фазе по сравнению с контрольными пробами, содержащими комплексы ПМ – Ig.

С целью проверки предположения о возможности непосредственного взаимодействия ТПО с ПМ изучали связывание Ig образцов сыворотки крови здоровых доноров, «искусственных сывороток больных» и очищенных ААТ к ТПО и ТГ с планшетами, в лунках которых последовательно инкубировали бактериальные клетки и ТПО или ТГ; в качестве контроля использовали планшеты с иммобилизованными клетками,

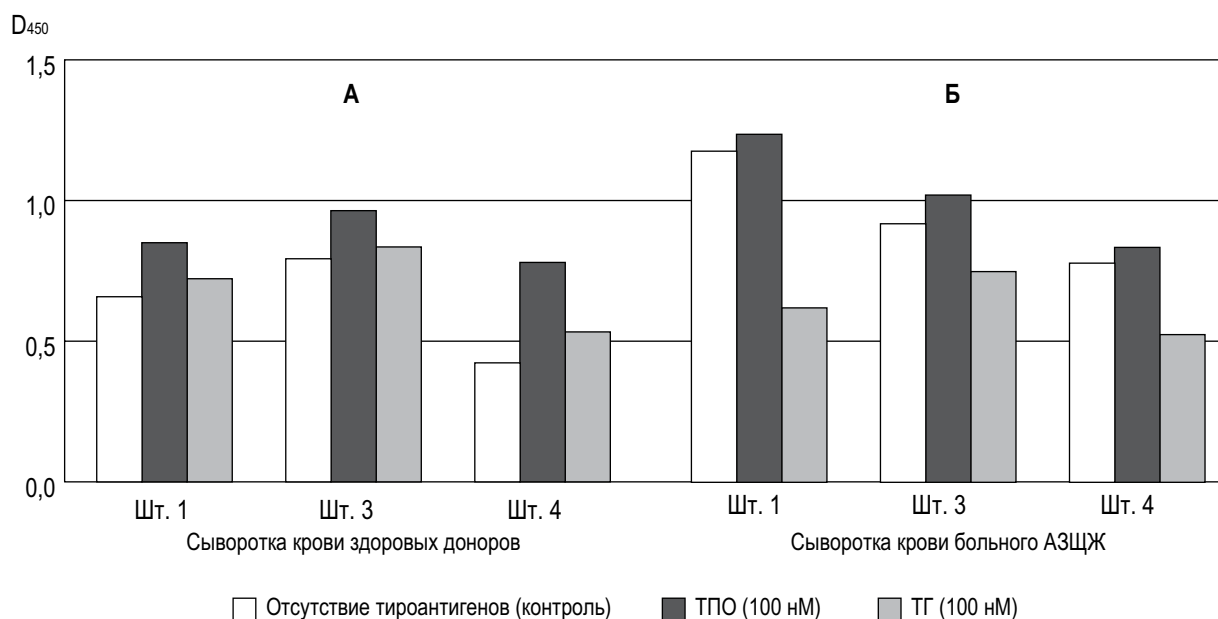


Рисунок 2. Влияние тироантигенов на связывание Ig человека с иммобилизованными клетками *B. bifidum* 791 (шт. 1), *L. plantarum* B-01 (шт. 3) и *E. coli* M17 (шт. 4)

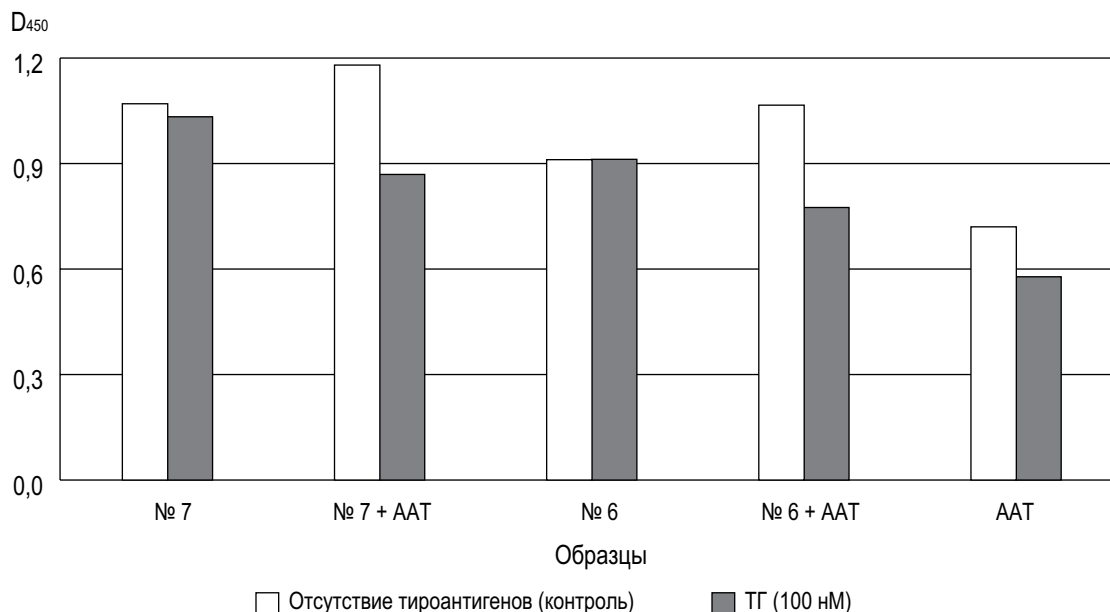


Рисунок 3. Связывание Ig человека с иммобилизованными клетками *L. plantarum* B-01 в отсутствие и в присутствии 100 нМ ТГ в жидкой фазе

не находившимися в контакте с тироантигенами (рис. 4). Установлено, что инкубация иммобилизованных клеток штаммов 1 и 3 с ТПО приводила к увеличению связывания с твердой фазой Ig только тех образцов, в составе которых присутствовали ААТ к этому антигену. В параллельно используемой модельной системе, содержащей ТГ вместо ТПО, аналогичный эффект не наблюдался (клетки штамма 1) или был выражен в су-

щественно меньшей степени (клетки штамма 3). Полученные данные являются убедительным доказательством взаимодействия ТПО (но не ТГ) с бактериальными клетками штаммов 1 и 3, а также свидетельствуют в пользу нашего объяснения разницы в эффектах, оказываемых находящимися в жидкой фазе ТГ и ТПО на взаимодействие Ig с иммобилизованными ПМ (рис. 2А).

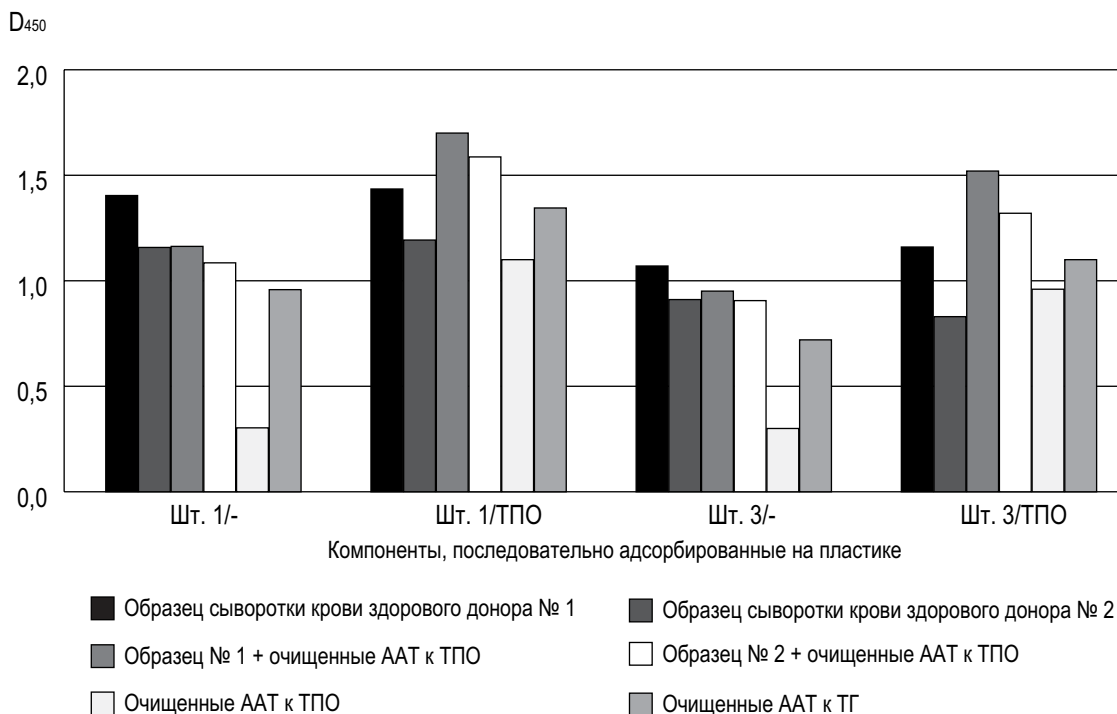


Рисунок 4. Связывание Ig человека с иммобилизованными клетками *B. bifidum* 791 (шт. 1) и *L. plantarum* B-01 (шт. 3) до и после инкубации ПМ с ТПО в концентрации 5 мг/л

Дополнительным доказательством непосредственного взаимодействия ТПО и клеток бактерий является связывание с твердой фазой, последовательно обработанной суспензией клеток и растворами ТПО с концентрациями белка 0,5-5 мг/л, ТПО-специфичных МАТ клонов F8 и A1 (табл. 2). Известно, что эти МАТ взаимодействуют с $K_a \sim 10^8 \text{ M}^{-1}$ с пространственно изолированными конформационными эпитопами антигена, находящимися в иммунодоминантной области ТПО (эпитоп МАТ F8), являющейся преимущественным местом связывания ААТ, и за пределами этой области (эпитоп МАТ A1) [27]. Как видно из таблицы 2, значения D_{450} , отражающие количества МАТ на твердой фазе, находятся в прямой зависимости от концентраций ТПО в растворе, что свидетельствует о связывании этих Ig с эпитопами тироантигена, а не с компонентами микроорганизмов. Полученные данные подтверждают, что ТПО после взаимодействия с клетками сохраняет нативную конформацию молекулы и экспонирует эпитопы связывания МАТ двух клонов в раствор. Вероятно, конформационные эпитопы иммунодоминантной области ТПО, находящейся на твердой фазе с иммобилизованными клетками *B. longum* B379M, менее доступны для взаимодействия с МАТ F8, а следовательно, и сывороточными ААТ большинства клонов по сравнению с аналогичными эпитопами ТПО, находящейся на твердой фазе с иммобилизованными клетками других штаммов. Аналогичные эксперименты с использованием ТГ и МАТ 5Н8, специфичных к этому тироантигену, показали, что ТГ не взаимодействует с клетками бактерий штаммов 1-4 (данные не представлены). Не исключено, что взаимодействие ТПО с клетками микроорганизмов обусловлено не пассивной адсорбцией этого гидрофобного белка, а наличием на поверхности клеток бактерий компонентов, взаимодействующих с ТПО с относительно высоким сродством.

Обсуждение

Таким образом, нами получены доказательства наличия на поверхности клеток ПМ компонентов, избирательно взаимодействующих с ААТ к ТПО (ТГ) и способных к конкуренции за связывание этих Ig с соответствующими антигенами, а также компонентов, взаимодействующих с ТПО. Кроме того, установлена зависимость между наличием в сыворотке крови человека ААТ к ТПО и антител к компонентам БФ *Lactobacillus plantarum* B-01 и *Bifidobacterium bifidum* 791. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии ПМ в патогенезе АЗЩЖ.

Известно, что в норме ТПО присутствует на апикальной мембране тироцитов, обращенной в коллоид фолликула [27], и не попадает в кровь. Аномальная локализация ТПО на базальной мембране тироцитов [26] или поступление этого белка в кровь в результате деструкции ЩЖ, например, при воспалительном процессе тироидной локализации, является одним из пусковых факторов иммунного ответа на ТПО [19], лежащего в основе патогенеза АЗЩЖ. Не исключено, что компоненты исследуемых нами бактерий, предпочтительно связывающие ААТ к ТПО и имеющие структурное сходство с эпитопами этого гликопротеина, при поступлении в кровь могут провоцировать иммунный ответ на ТПО по механизму молекулярной мимикрии. Такой механизм участия в патогенезе АЗЩЖ был доказан для вируса гепатита С, РНК которого обнаружена в ЩЖ и лимфоцитах периферической крови больных указанным заболеванием, а белки имеют 60 % гомологии с другим аутоантигеном ЩЖ — рецептором тиреотропного гормона [21]. Ранее методами структурно-гомологичного анализа с использованием программы BLAST (<http://www.expasy.org/tools/blast/>) нами была обнаружена гомология аминокислотных последовательностей ТГ и ряда белков *B. adolescentis*, *B. longum* и *B. animalis* [12]. Максимальный интерес вызывает участок NAD-зависимой ДНК-лигазы *B. animalis*,

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИОННАЯ ЗАВИСИМОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ ТПО КОМПОНЕНТАМИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ КЛЕТОК ПМ

Штамм	МАТ F8, 5 мг/л			МАТ A1, 5 мг/л		
	Концентрация ТПО, мг/л					
	0,5	2,0	5,0	0,5	2,0	5,0
<i>B. bifidum</i> 791	0,42	1,1	1,7	0,7	1,3	1,7
<i>B. longum</i> B379M	0,23	0,7	1,17	1,17	1,4	1,7
<i>L. plantarum</i> B-01	0,42	1,18	1,55	0,8	1,3	1,7
<i>E. coli</i> M17	0,34	1,28	1,57	0,62	1,37	1,57

Примечание. Представлены значения D_{450} по результатам ИФА.

гомологичный аминокислотной последовательности 967-1005 ТГ (ID: 51 % и Pos: 53 %), расположенной в непосредственной близости от иммунодоминантной области этого тироантигена (а.о. 1149-1250 ТГ). Согласно данным базы данных Syfpeithi (www.syfpeithi.de), указанный фрагмент белка *B. animalis* является потенциальным лигандом широкого спектра молекул главного комплекса гистосовместимости I и II классов и, следовательно, способен участвовать в неспецифической активации иммунной системы, предшествующей развитию специфического иммунного ответа на ТГ.

Допуская наличие в клетках исследуемых бактерий компонентов, взаимодействующих с ТПО с относительно высоким родством, и исходя из принципа комплиментарности структур антигенных детерминант и эпитопов соответствующих антител, можно предположить, что поступление таких компонентов в кровь человека будет сопровождаться выработкой антител, имеющих общие с ТПО элементы структуры. Такие антитела могут провоцировать аутоиммунный ответ на ТПО, подобно тому как это происходит при поступлении ТПО в кровь [19] или аномальной локализации этого белка на базальной мембране тироцитов [26].

Продолжение исследований возможной роли ПМ в патогенезе АЗЩЖ может состоять в выяснении химической природы компонентов бактерий, связывающих ТПО и ААТ к тироантигенам. Актуальность таких исследований обусловлена высокой частотой встречаемости АЗЩЖ, отсутствием однозначных представлений о механизмах и пусковых факторах этих заболеваний, а также широким использованием населением продуктов питания, содержащих до 10^7 - 10^8 КОЕ ПМ [15], и фармакологических препаратов профилактического и лечебного действия на основе клеток ПМ или их компонентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 08-04-90055-Bel_a) и Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант Х08Р-072).

Список литературы

1. Вашкевич И.И., Ермоленко М.Н., Киселева Е.П., Михайлопуло К.И., Свиридов О.В. Выделение интактной и обработанной трипсином тиропероксидазы для технологии иммуноанализа // Биотехнология. — 1999. — Т. 3. — С. 43-55.
2. Цыганова О.В., Киселева Е.П., Вашкевич И.И., Прядко А.Г., Свиридов О.В. Характеристика иммуноаффинной хроматографии и новый метод получения тиропероксидазы из субклеточных фракций щитовидной железы // Прикладная биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42. — С. 236-246.
3. Цыганова О.В., Киселева Е.П., Вашкевич И.И., Прядко А.Г., Свиридов О.В. Характеристика моноклональных антител к тиропероксидазе человека для использования в иммуноаффинной хроматографии и иммуноанализе // Прикладная биохимия и микробиология. — 2006. — Т. 42. — С. 98-105.
4. Цыганова О.В., Киселева Е.П., Вашкевич И.И., Свиридов О.В. Выделение аутоантител к тиропероксидазе человека антиген-аффинной хроматографией и их применение в иммуноанализе // Вес. Нац. акад. наук. Беларусі. Сер. хім. навук. — 2006. — Т. 1. — С. 64-71.
5. Цыганова О.В., Киселева Е.П., Здоровенко Э.Л., Новик Г.И. Роль молекулярной мимикрии в этиологии и патогенезе аутоиммунных заболеваний щитовидной железы: антигены микроорганизмов и тироглобулин // Материалы конференции «Молодежь в науке — 2009». — Мн., 2009 (в печати).
6. Alberti G. Noncommunicable diseases: tomorrow's pandemics // Bull. World health organ. — 2001. — Vol. 79. — P. 907.
7. Beever K., Bradbury J., Phillips D., McLachlan S.M., Pegg C., Goral A., Overbeck W., Feifel G., Smith B.R. Highly sensitive assays of autoantibodies to thyroglobulin and to thyroid peroxidase // Clin. Chem. — 1989. — Vol. 35. — P. 1949-1954.
8. Ebringer A., Rashid T., Wilson C. Bovine spongiform encephalopathy, multiple sclerosis, and creutzfeldt-jakob disease are probably autoimmune diseases evoked by *Acinetobacter* bacteria // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 2005. — Vol. 1050. — P. 417-428.
9. Gill H.S., Rutherford K.J., Prasad J., Gopal P.K. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) // Br. J. Nutr. — 2000. — Vol. 83. — P. 167-176.
10. Grogan J.L., Kramer A., Nogai A., Dong L., Ohde M., Schneider-Mergener J., Kamradt T. Cross-reactivity of myelin basic protein-specific T cells with multiple microbial peptides: experimental autoimmune encephalomyelitis induction in TCR transgenic mice // J. Immunol. — 1999. — Vol. 163. — P. 3764-3770.
11. Kaufmann P., Pfefferkorn A., Teuber M., Meile L. Identification and quantification of *Bifidobacterium* species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR // Appl. Environ. Microbiol. — 1997. — Vol. 63. — P. 1268-1273.

12. Marocchi C., Chiovato L. The epidemiology of thyroid diseases // *The thyroid: a fundamental and clinical text*. — Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. — P. 414-431.
13. Mennink-Kersten M.A., Ruegebrink D., Klont R.R., Warris A., Gavini F., Op den Camp H.J., Verweij P.E. Bifidobacterial lipoglycan as a new cause for false-positive platelia *Aspergillus* enzyme-linked immunosorbent assay reactivity // *J. Clin. Microbiol.* — 2005. — Vol. 43. — P. 3925-3931.
14. Napalkov N. Prevention and Control of Noncommunicable diseases // *Encyclopedia of Life Support Systems*. — UNESCO, 2002.
15. Oleszak E.L., Chang J.R., Friedman H., Katsetos C.D., Platsoucas C.D. Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2004. — Vol. 17. — P. 174-207.
16. Rapoport B., McLachlan S.M. Thyroid autoimmunity // *J. Clin. Invest.* — 2001. — Vol. 108. — P. 1253-1259.
17. Ruf J., Feldt-Rasmussen U., Hegedus L., Ferrand M., Carayon P. Bispecific thyroglobulin and thyroperoxidase autoantibodies in patients with various thyroid and autoimmune diseases // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* — 1994. — Vol. 79. — P. 1404-1409.
18. Shakib F., Stanworth D.R. Human IgG subclasses in health and disease (A review) // *Ric. Clin. Lab.* — 1980. — Vol. 10. — P. 561-580.
19. Stassi G., De Maria R. Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity // *Nat. Rev. Immunol.* — 2002. — Vol. 2. — P. 195-204.
20. Steinbuch M., Audran R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1969. — Vol. 134. — P. 279-284.
21. Tomer Y., Davies T.F. Infection, thyroid disease, and autoimmunity // *Endocr. Rev.* — 1993. — Vol. 14. — P. 107-120.
22. Vinderola C.G., Medici M., Perdigon G. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria // *J. Appl. Microbiol.* — 2004. — Vol. 96. — P. 230-243.
23. Volpe R. Immunology of human thyroid disease // *Autoimmune diseases of the endocrine system*. — Boca Raton: CRC. Press, 1990. — P. 73-239.
24. Weetman A.P., McGregor A.M. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding // *Endocr. Rev.* — 1994. — Vol. 15. — P. 788-830.
25. Wilson M.B., Nakane P.K. Immunofluorescence and related staining techniques. — Amsterdam, 1978. — P. 215.
26. Zimmer K.P., Scheumann G.F., Bramswig J., Bocker W., Harms E., Schmid K.W. Ultrastructural localization of IgG and TPO in autoimmune thyrocytes referring to the transcytosis of IgG and the antigen presentation of TPO // *Histochem. Cell. Biol.* — 1997. — Vol. 107. — P. 115-120.
27. Zhou J.S., Gill H.S. Immunostimulatory probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium lactis* HN019 do not induce pathological inflammation in mouse model of experimental autoimmune thyroiditis // *Int. J. Food Microbiol.* — 2005. — Vol. 103. — P. 97-104.
- поступила в редакцию 10.09.2009*
отправлена на доработку 30.09.2009
принята к печати 03.11.2009