

Сравнительная оценка двух типов молочного бета-казеина (A1 и A2) по Th₂-опосредованной воспалительной реакции в кишечнике мышей

Мохаммад Райес Ул Хак • Раджив Капила •

Рохит Шарма • Вамши Салиганги • Суман Капила

Получено: 19 марта 2013 г. /Принято: 14 октября 2013 г. /Опубликовано в сети: 29 октября 2013 г.
© Издательство «Springer-Verlag», Берлин, Гейдельберг, 2013 г.

Обзор

Цель Не так давно возникло опасение насчёт «гипотезы A1/A2», которая предполагает взаимосвязь между употреблением коровьего бета-казеина типа A1 и различными физиологическими расстройствами. Доступная по этому вопросу информация основывается либо на эпидемиологических данных об употреблении молока людьми, либо на лабораторных исследованиях клеточных линий с БКМ-пептидами. Прямые научные доказательства существования связи между употреблением молока A1/A2 и здоровьем довольно скудны. Поэтому, в рамках настоящего исследования, были проведены физиологические опыты над мышами с целью изучить воздействие трёх генетических вариантов (A1A1, A1A2 и A2A2) коровьего бета-казеина на иммунную систему ЖКТ, поскольку это первая и самая главная область иммунологических взаимодействий.

Методы Мыши были разделены на 4 группы в соответствии с диетами: базовая диета (контрольная) и диета с бета-казеином, полученным от генотипированных (A1A1, A1A2 и A2A2) молочных животных. Иммунный ответ кишечника анализировался с помощью спектрометрической оценки активности МРО, количественного ИФА воспалительных цитокинов (MCP-1 и IL-4) по методу «сэндвич», антител (общее количество IgE, IgG, sIgA, IgG1 и IgG2a) и количественной ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией для Toll-подобных рецепторов (TLR-2 и

TLR-4). Гистологический подсчёт бокаловидных клеток, общего числа лейкоцитов и клеток IgA⁺ также был проведён.

Результаты Было установлено, что диета с A1-подобными типами (A1A1 и A1A2) ведёт к увеличению ($p < 0,01$) в кишечнике МРО, MCP-1, IL-4, общего количества IgE, IgG, IgG1, IgG2a, а также лейкоцитной инфильтрации. Кроме того, A1-подобные типы повышают ($p < 0,01$) экспрессию мРНК рецепторов TLR-2 и TLR-4. Однако, ни один из всех типов бета-казеина не вызывает изменений в sIgA, IgA⁺ и бокаловидных клетках.

Заключение Следует констатировать, что A1-подобные типы бета-казеина вызвали воспалительную реакцию в кишечнике через активацию пути Th₂, чего нельзя сказать о типах A2A2. Таким образом, данное исследование подкрепляет предположения о вредном воздействии A1-подобных типов бета-казеина и представляет возможную причину усиления воспалительной реакции для этиологии различных расстройств.

Ключевые слова Типы бета-казеина • β-казеоморфины • Воспаление • Гуморальный ответ • Цитокины

Введение

Казеин является основным компонентом молочных белков и представлен в трёх формах: альфа, бета и каппа. Согласно многим источникам, биоактивные пептиды казеина обладают антиоксидантными, антимикробными, иммуномодулирующими, минерал-связывающими, антитромботическими и гипотензивными свойствами [1]. Бета-казеин имеет в составе 209 аминокислот как минимум в 12 вариантах, отличающихся разными позициями этих аминокислот [2]. В результате точковой мутации на экзоне VII гена коровьего бета-казеина в хромосоме 6 конверсия цитозина в аденин привела к замене пролина (аллель

М. Р. У. Хак • Р. Капила (@) • Р. Шарма • В. Салиганги • С. Капила

Отделение биохимии, Национальный институт исследования молочных продуктов, г. Карнал, 132001, Харьяна, Индия
e-mail: rkapila69@rediffmail.com

М. Р. У. Хак
e-mail: raies_ulhaq@yahoo.com

С. Капила
e-mail: suman_ndri@yahoo.com

A2, кодон; ССТ) на гистидин (аллель A1, кодон; САТ) в позиции 67 [3]. На основании этой изменчивости молоко делится на две группы — A1-подобный тип и A2-подобный тип — в зависимости от наличия пролина или гистидина в 67-й позиции белка бета-казеина. A1-подобный тип включает бета-казеин с аллелями A1, B, C, F или G, имеющими одинаковую аминокислоту в His67 (-Tyr60-Pro61-Phe62-Pro63-Gly64-Pro65-Phe66-His67-), но разные вариации в других позициях аминокислот. A1-подобный тип (-Tyr60-Pro61-Phe62-Pro63-Gly64-Pro65-Phe66-Pro67) включает бета-казеин с аллелями A2, A3, D, H1, H2 и I, имеющими одинаковый остаток аминокислоты в Pro67, но разные вариации в других позициях [4]. В последнее десятилетие стали появляться эпидемиологические данные, в которых употребление бета-казеина A1 связывают с различными нежелательными биологическими реакциями организма, такими как сахарный диабет 1 типа, сердечные заболевания и неврологические расстройства, в числе которых аутизм и шизофрения, а также синдром внезапной детской смерти [5]. Считается, что опиоидный пептид β -казоморфин-7 (БКМ-7), образующийся в A1-подобных типах бета-казеина, может играть роль в развитии этих заболеваний и, следовательно, является гипотетическим фактором риска. Но с другой стороны, существуют противоречивые данные, связывающие БКМ-7 с физиологическими аспектами, которые положительно влияют на животных, например: защитное воздействие против диабета и оксидантного стресса, модуляция выделения слизи в кишечнике, защита от токсических факторов [6]. Доступная по этому вопросу информация основывается либо на эпидемиологических данных об употреблении молока людьми, либо на лабораторных исследованиях клеточных линий с БКМ-пептидами. Есть несколько исследований, которые доказывают, что из гомозиготных типов бета-казеина A1A1 высвобождается больше БКМ-7, чем из гетерозиготных типов A1A2 и гомозиготных типов A2A2 [7]. В 2000 г. в Новой Зеландии была основана корпорация «A2 Corporation Ltd», которая начала выпускать на рынок Новой Зеландии, Австралии, Азии и США молоко A2 в качестве премиум-бренда. Тем не менее, есть большие сомнения насчёт пользы данного подхода в связи с недостатком подтверждённых доказательств и соответствующего механизма. Учитывая вышеизложенное, были проведены опыты на мышах с целью оценить воздействие различных типов бета-казеина на кишечник, который является самой первой областью иммунных взаимодействий после его попадания в организм.

Материалы и методы

Генотипирование коров и сбор образцов молока

Ранее в нашей лаборатории мы обследовали кроссбредных коров (порода каран фри) с генотипами A1A1, A1A2 и A2A2. Животные были выведены в скотном дворе Национального института исследования молочных продуктов в Индии. ДНК была изолирована из

крови животных методом фенольно-хлороформной экстракции, а генотипирование было проведено с помощью ПЦР путём амплификации сайта рестрикции (ПЦР-АСР) [8]. Соответственно, цельное молоко, необходимое для данного исследования, получено от этих генотипированных коров.

Фракционирование бета-казеина

Сепарирование всего казеина выполнили методом изоэлектрического осаждения. Полученный осадок сепарировали путём фильтрации через четыре слоя ситовой ткани и промыли 3-4 раза дистиллированной водой, пока pH не достиг 7,0. Изоэлектрический казеин фракционировали на альфа-, бета- и каппа-казеин методом дифференциальной растворимости в мочеvine [9]. Сахара и соли удалили посредством диализа с использованием целлюлозной мембраны с размером пор 8 кДа при температуре 4 °C в течение 24 ч. Бета-казеин отфильтровали из данного экстракта, высушили при комнатной температуре и до момента кормления мышей хранили при -20 °C.

ДСН-ПААГ-электрофорез фракционированного бета-казеина для анализа чистоты

Чистота бета-казеина, фракционированного из всего коровьего казеина, проверялась, как показано на Рис. 1, электрофорезом в 15% полиакриламидном геле в присутствии ДСН по Лэммли [10] после помещения равных доз (20 пг на лунку) фракционированного бета-казеина в каждую лунку. Концентрацию белков оценивали по методу Лоури и его коллег [11].

Мыши

Швейцарские мыши-альбиносы (20-25 гр) держались в небольшом помещении для животных Национального института исследования молочных продуктов в Индии. Мышей держали в пластиковых пропиленовых клетках при комнатной температуре в стерильных условиях. Все процедуры были одобрены Институциональным комитетом этики в отношении животных.

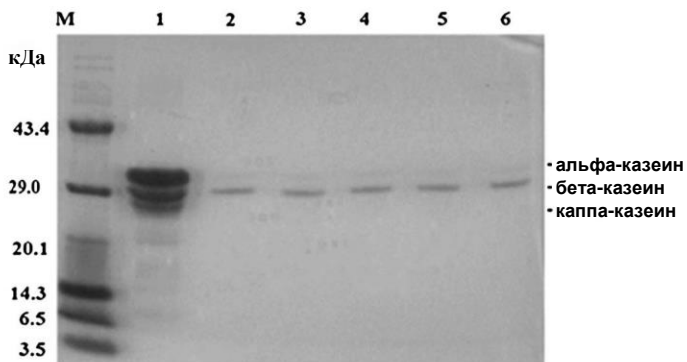


Рис. 1. ДСН-ПААГ фракционированного бета-казеина. Ряд 1 — весь коровий казеин, ряды 2 и 3 — тип A1A1, ряды 4 и 5 — тип A1A2, ряд 6 — тип A2A2, M — маркер молекулярной массы

Экспериментальный план и сбор образцов

Мыши были разделены на 4 группы, по 6 мышей в каждой. Группа отрицательного контроля была на базовой диете (18,4% крахмала, 65% нута, 2,55% масла, 2,05% минеральной смеси, 1% витаминной смеси и 11% клетчатки). Экспериментальные группы получали базовую диету плюс бета-казеин разного типа (A1A1, A2A2 и A1A2) в количестве 85 мг на животное в день, суспендированный в 200 мкл натрий-фосфатного буфера (НФБ). Это количество было подсчитано по формуле пересчёта доз (человек/мышь) с соотношением веса (кг) к площади поверхности тела (m^2) [12]. Мышам в группе отрицательного контроля вливали буфер орально через трубку, чтобы избежать отклонений в показателях вследствие стресса. Во время такого кормления анестезия не применялась. Все типы бета-казеина были получены из молока коров породы каран фри и скармливались мышам орально через трубку в течение 30 дней. Затем мышам не кормили одну ночь и на утро взяли пробы с их кишечника, после чего мыши были умерщвлены.

Сбор кишечной жидкости

Ткани (подвздошная кишка, 2 см) промыли в 2 мл НФБ, затем препарировали стерильными иглами в той же среде, чтобы отделить клетки, и центрифугировали при ускорении в 2000 g в течение 20 минут при температуре 4 °C. Полученную надосадочную жидкость, т.е. кишечную жидкость, хранили при температуре -80 °C до начала измерения биохимических параметров.

Молекулы воспаления

Миелопероксидаза (МРО)

Активность МРО была измерена согласно Брэдли и его коллегам [13] с некоторыми модификациями. Если коротко: ткани кишечника гомогенизировали в 9 объёмах ледяного калий-фосфатного буфера (50 мМ, pH 6,0), содержащего 0,5% цетилтриметиламмония бромид (ЦТАБ), затем разрушили ультразвуком (10 сек) и подвергли 3 циклам заморозания-оттаивания. Суспензию центрифугировали при ускорении в 35 000 g в течение 15 минут, и в полученной надосадочной жидкости была проанализирована активность МРО после смешивания аналитического буфера (50 мМ калий-фосфатного буфера, pH 6,0), содержащего 0,5 мМ дигидрохлорида о-дианизидина, и 0,0005 % H_2O_2 в качестве субстратов. Расщепление H_2O_2 прямо пропорционально окислению дигидрохлорида о-дианизидина, которое было измерено при 460 нм (двухлучевой спектрофотометр УФ- и видимой области, UVD-3500, фирма «Labomed Inc», США). Концентрацию окисленного дигидрохлорида о-дианизидина подсчитали исходя из его молярного коэффициента экстинкции ($1,13 \times 10^4 / \text{см} \cdot \text{моль}$). Одна единица активности МРО определяется как количество

фермента, продуцирующего 1 миллимоль/мин окисленного дигидрохлорида о-дианизидина, при наличии H_2O_2 и температуре 25°C, и выражается в ед/мг белка.

Моноцитарный хемотактический белок (MCP-1) и интерлейкин-4 (IL-4)

Количество MCP-1 и IL-4 в кишечной жидкости мышей определялось с использованием наборов для ИФА по методу «сэндвич» (фирма «eBioscience», г. Сан-Диего, Калифорния, США). Процедуры проводились строго в соответствии с инструкцией производителя. Пластины покрыли 100 мкл 1x иммобилизованного антитела (козий антимышиный MCP-1 / козий антимышиный IL-4). Некоторые образцы разбавили 16 раз для определения MCP-1, остальные неразбавленные образцы добавили в экспериментальные лунки для определения IL-4 соответственно, затем добавили идентифицирующее антитело и 100 мкл авидин-пероксидазы хрена (HRP). Пластины с внесённым ТМБ-субстратом (3,3',5,5'-тетраметилбензидин с содержанием 0,03 % H_2O_2) инкубировали, а затем остановили реакцию с помощью 50 мкл 2 М H_2SO_4 . Пластины анализировали при 450 нм.

Гуморальный ответ

Общее количество IgE, IgG и IgA

Общее количество IgE, IgG и IgA в кишечной жидкости определялось с помощью наборов для ИФА по методу «сэндвич» (фирма «Koma Biotech», г. Сеул, Корея). Чтобы определить эти антитела, пластины покрыли 1 пг/мл козьих антимышиных IgE, IgG и IgA. Перед тем как поместить образцы в экспериментальные лунки, их разбавили 8 (IgE), 300 (IgG) и 1000 (IgA) раз и добавили к ним 100 мкл козьих антимышиных IgE, IgG и IgA соответственно, конъюгированных с пероксидазой хрена. Пластины с внесённым ТМБ-субстратом инкубировали, а затем остановили реакцию с помощью 100 мкл 2 М H_2SO_4 . Пластины анализировали при 450 нм.

Подклассы IgG (IgG1 и IgG2a)

Количество IgG1 и IgG2a в кишечной жидкости мышей определялось с использованием наборов для ИФА по методу «сэндвич» (фирма «eBioscience», г. Сан-Диего, Калифорния, США). Пластины покрыли 100 мкл 1x иммобилизованных антител (козий антимышиный gG1 и IgG2a). Перед тем как поместить образцы в экспериментальные лунки, их разбавили 40 (IgG1) и 16 (IgG2a) раз соответственно и добавили к ним 50 мкл антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (идентифицирующих антител). Пластины с внесённым ТМБ-субстратом инкубировали в течение 3 часов при комнатной температуре, а затем остановили реакцию с помощью 50 мкл 2 М H_2SO_4 . Пластины анализировали при 450 нм.

Гистологические параметры

Бокаловидные клетки и общее количество лейкоцитов

Два сантиметра ткани из тонкой кишки мышей (подвздошная кишка) использовались для гистопрепаратов, чтобы выявить бокаловидные клетки и определить общее количество лейкоцитов по методу Кирнана [14]. Участки тканей в 3 мкм отрезали с помощью ротационного микротомы (фирма «Radical», RMT-30, г. Амбала, Индия). Срезы окрасили гематоксилином и эозином. Количество бокаловидных клеток и общее количество лейкоцитов посчитали в 7 полях зрения (200x) и 10 полях зрения (400x) соответственно инвертированного светового микроскопа (фирма «Olympus», СКХ41, Япония). Результаты выражены количеством бокаловидных клеток на 5 кишечных ворсинках и общим количеством лейкоцитов на 5 полях зрения.

Клетки IgA⁺

Неокрашенные гистопрепараты подготовили для прямого ИФА клеток IgA⁺, как описывалось выше. После депарафинирования ксилолом и регидратации этанолом нисходящей крепости срезы поместили в 2% бычий сывороточный альбумин (БСА) на 1 час. Срезы промыли 2-3 раза в НФБ, инкубировали в растворе 1:100 моноспецифического антитела А-цепи, конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) («Саупан Chemical», Мичиган, США), в течение 1 часа и исследовали флуоресцентным световым микроскопом (фирма «Olympus», СКХ41, Япония). Количество флуоресцентных клеток подсчитали в 30 полях зрения при 200-кратном увеличении. Результаты выражены количеством положительных флуоресцентных клеток на 5 полях зрения.

Экспрессия Toll-подобных рецепторов (TLRs) методом ПЦР в реальном времени

Изоляция РНК и подготовка кДНК

Ткань из кишечника мышей препарировали иглой в НФБ и центрифугировали при ускорении 2000 g в течение 20 минут при температуре 4 °С. Перед тем как проводить выделение РНК, осадок (клетки) промыли 3 раза в НФБ.

Общее количество РНК выделили с помощью Tri-реагента («Sigma», г. Сент-Луис, Миссури, США) согласно инструкции производителя. Концентрацию РНК подсчитали с помощью планшета NanoQuant (фирма «Тесап», Германия), а целостность РНК проверили агарозой 1,4%. Концентрации РНК были доведены до 500 нг/мкл для синтеза кДНК. Два микрограмма РНК подвергли обратной транскрипции при 65 °С в течение 5 минут, после чего инкубировали при 42 °С в течение 1 часа в 25 мкл смеси, состоящей из 200 единиц обратной транскриптазы RevertAid M-MuLV, 20 единиц ингибитора

RiboLock RNase, 0,5 пг олиго (dT)₁₈, 4 мкл 5x рабочего буферного раствора и 0,8 мМ смеси дНТФ. Реакцию останавливали при 70 °С в течение 5 минут.

Аmplификация фрагментов TLR-2 и TLR-4

Чтобы амплифицировать фрагменты длиной 199, 201 и 200 п.о. целевых генов TLR-2 и TLR-4 и референсного гена GAPDH соответственно, проведена ПЦР на термоциклере в реальном времени (Biorad CFX96™, C1000™) с использованием смеси Maxima SYBR Green/Fluorescein Master Mix («Thermo Scientific», Литва), а также прямых и обратных праймеров для: GAPDH, 5' TCAAGAAGGTGGTGAAGCAG3' и 5'AAAGATGGAAGCTAAGACCC3'; TLR-2, 5' AAGAG GAAGCCCAAGAAAGC3' и 5'CGATGGAATCGAT GATGTTG3'; TLR-4, 5'ACCTGGCTGGTTTACAC GTC3' и 5'CTGCCAGAGACATTGCAGAA3'. Один микролитр кДНК использовался для ПЦР в конечном объеме 20 мкл, где содержалось: 10 мкл 2x смеси SYBER Green master mix; 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров; и 8 мкл свободной от нуклеаз воды. Амплификацию ПЦР проводили с одним циклом начальной денатурации при 94 °С в течение 5 минут, 35 циклами денатурации (94 °С, 30 сек), отжигом (53 °С, 30 сек), достраиванием (72 °С, 45 сек) и финальным достраиванием при 72 °С в течение 4 минут. После амплификации пороговые (C_t) значения обеих групп, контрольной и экспериментальной, с референсными генами были взяты для подсчета кратности изменения в экспрессии целевых генов.

Статистический анализ

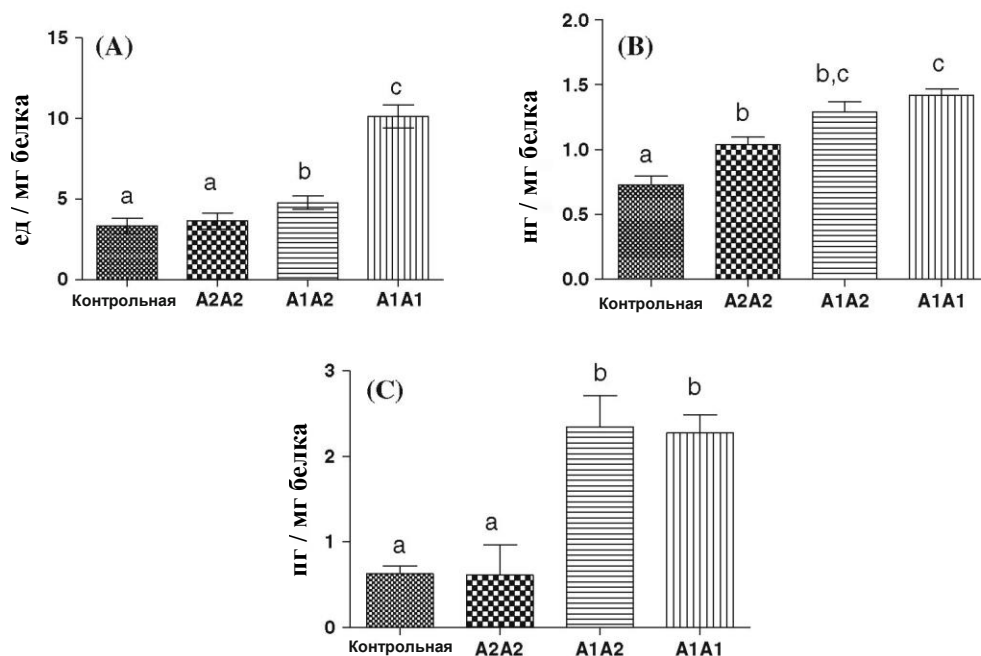
Данные проанализировали с помощью программы GraphPad Prism (версия 5.01). Экспериментальные результаты представлены в виде: средние значения ± с.с.о. (средняя стандартная ошибка). Данные были подвергнуты дисперсионному анализу ANOVA, а тест Тьюки был использован для отбора тех значений ($p < 0,05$), которые являются статистически значимыми.

Результаты

Молекулы воспаления

Миелопероксидаза высвобождается из стимулированных полиморфоядерных нейтрофилов (ПМН), которые вырабатывают оксидантную гипохлористую кислоту с мощной бактерицидной активностью и склонностью к повреждению тканей, выраженному, например, в острых или хронических воспалениях. Следовательно, она служит маркером воспаления. Данное исследование показало, что в сравнении с контрольной группой, при употреблении бета-казеинов A1A1 и A1A2 в кишечнике мышей ($p < 0,01$) миелопероксидаза повышается на 204,20 и 43,54 % соответственно. Это повышение также

Рис. 2. Воздействие различных типов бета-казеина на маркёры воспаления в кишечнике мышей. **A** — кишечная миелопероксидаза; **B** — моноцитарный хемотактический белок-1; и **C** — интерлейкин-4. Результаты представлены в виде: среднее значение \pm с.с.о. (6 мышей). Буквами выражается разница значимости ($p < 0,05$).



значимо ($p < 0,01$) при сравнении с A2A2 (179,06 и 31,68 %). Кроме того, вышеуказанные результаты чётко показывают, что рост активности МРО гораздо выше при употреблении A1A1, чем при употреблении A1A2. Однако, в группе A2A2 никаких изменений в активности МРО не наблюдается, если сравнивать с контрольной группой мышей (Рис. 2А).

МСР-1 — это сильный хемоаттрактант, который высвобождается из моноцитов. Он регулирует миграцию и инфильтрацию базофилами, моноцитами и макрофагами в ответ на воспаление. Данное исследование показало увеличение ($p < 0,01$) уровня МСР-1 в кишечнике мышей после употребления всех трёх типов бета-казеина независимо от их генетических вариантов. Больше всего это увеличение наблюдается после употребления A1A1 (95,83 %), на втором месте A1A2 (79,16 %) и на третьем — A2A2 (43,05 %), если сравнивать с контрольной группой мышей. Если сравнивать A1A1 с A2A2, увеличение уровня МСР-1 выше ($p < 0,01$) на 36,89 % (Рис. 2В).

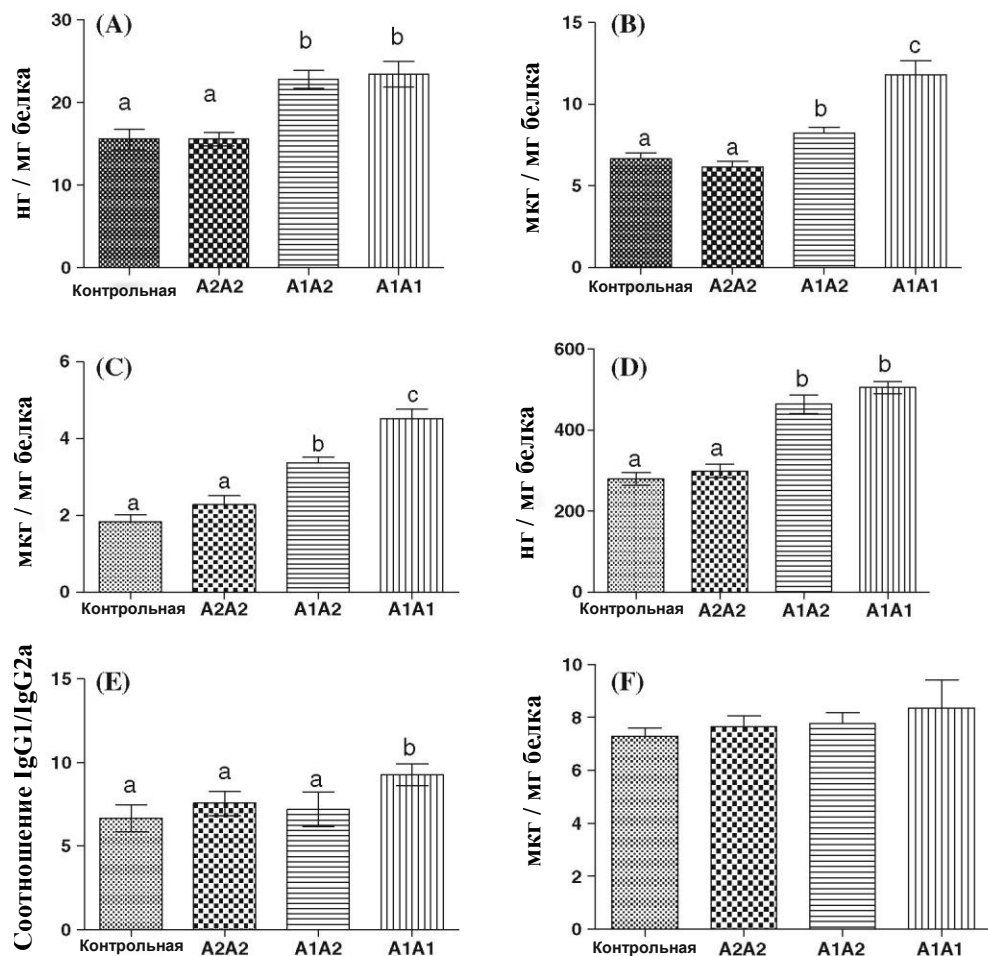
Клетки CD4 Т выделяют IL-4, который дифференцирует клетки Th₀-Th₂ и индуцирует рекомбинацию переключения классов на изотопы IgG и IgE. Данное исследование показало увеличение ($p < 0,01$) IL-4 в кишечной жидкости мышей при употреблении бета-казеина типов A1A1 и A1A2 на 266,12 и 277,41 %, если сравнивать с контрольной группой мышей. Также результаты указывают на увеличение ($p < 0,01$) IL-4 при употреблении A1A1 и A1A2 на 272,13 и 282,29 % соответственно, если сравнивать с употреблением A2A2. Однако, при употреблении A2A2 никаких изменений не наблюдается, если сравнивать с контрольной группой мышей (Рис. 2С).

Гуморальный ответ

Выработка IgE происходит при гиперчувствительности I типа и вызывает различные аллергические заболевания, включая аллергию на продукты питания, и, следовательно, играет важную роль в аллергических реакциях. Данное исследование показало значительное увеличение ($p < 0,001$) IgE в кишечной жидкости мышей при употреблении бета-казеина типов A1A1 и A1A2 на 50,67 и 46,75 % соответственно, если сравнивать с контрольной группой мышей. Также было установлено, что при употреблении бета-казеина A1A1 и A1A2 значительно увеличивается ($p < 0,001$) общий уровень IgE на 50,38 и 46,46% соответственно, если сравнивать с употреблением A2A2. Однако, у мышей, которых кормили бета-казеином A2A2, наблюдаются незначительные изменения уровня IgE в сравнении с контрольной группой (Рис. 3А).

Антитела IgG имеются во всех жидкостях организма и относятся к самым важным антителам в борьбе с различными инфекциями. Предположительно, этот класс антител, борющийся с пищевыми антигенами, вызывает неспецифичное воспаление слизистой оболочки кишечника. Данное исследование показало значительное увеличение ($p < 0,05$) общего количества IgG в кишечной жидкости мышей при употреблении бета-казеина типов A1A1 и A1A2 на 77,56 и 24,09 % соответственно, если сравнивать с контрольной группой мышей. Также было установлено, что уровень IgG в кишечной жидкости вырос при употреблении бета-казеина типов A1A1 и A1A2 на 91,08% ($p < 0,001$) и 33,54 % ($p < 0,01$) соответственно, если сравнивать с употреблением A2A2. Кроме того, употребление A1A1 вызывает увеличение ($p < 0,01$) общего количества IgG на 43,08 % по сравнению с A1A2. Однако, у мышей, которых кормили бета-казеином A2A2, наблюдаются незначительные изменения в сравнении с контрольной группой (Рис. 3В).

Рис. 3. Влияние различных типов коровьего бета-казеина на гуморальный ответ в кишечнике мышей. **A** — общий уровень IgE, **B** — общий уровень IgG, **C** — IgG1, **D** — IgG2a, **E** — соотношение IgG1/IgG2a и **F** — общий уровень IgA в кишечной жидкости мышей. Результаты представлены в виде: среднее значение \pm с.с.о. (6 мышей). Буквами выражается разница значимости ($p < 0,05$).



Последующий анализ подклассов IgG (IgG1 и IgG2a) показал результаты, схожие с результатами по общему IgG. В сравнении с контрольной группой, употребление бета-казеина типов A1A1 и A1A2 ведёт к увеличению ($p < 0,01$) уровня IgG1 (145,65 и 82,60 %) и уровня IgG2a (81,07 и 66,23 %) соответственно. Это увеличение в двух подклассах IgG является статистически значимым ($p < 0,01$) (IgG1 98,24 и 47,36 %) и (IgG2a 68,96 и 55,11 %) в группах A1A1 и A1A2 соответственно, если сравнивать с группой A2A2 (Рис. 3C, D). Так, соотношение IgG1/IgG2a значительно выросло ($p < 0,05$) в группе A1A1 по сравнению с контрольной группой. Тем не менее, подобные изменения не наблюдаются в группах A1A2 и A2A2, если сравнивать с контрольной группой (Рис. 3E).

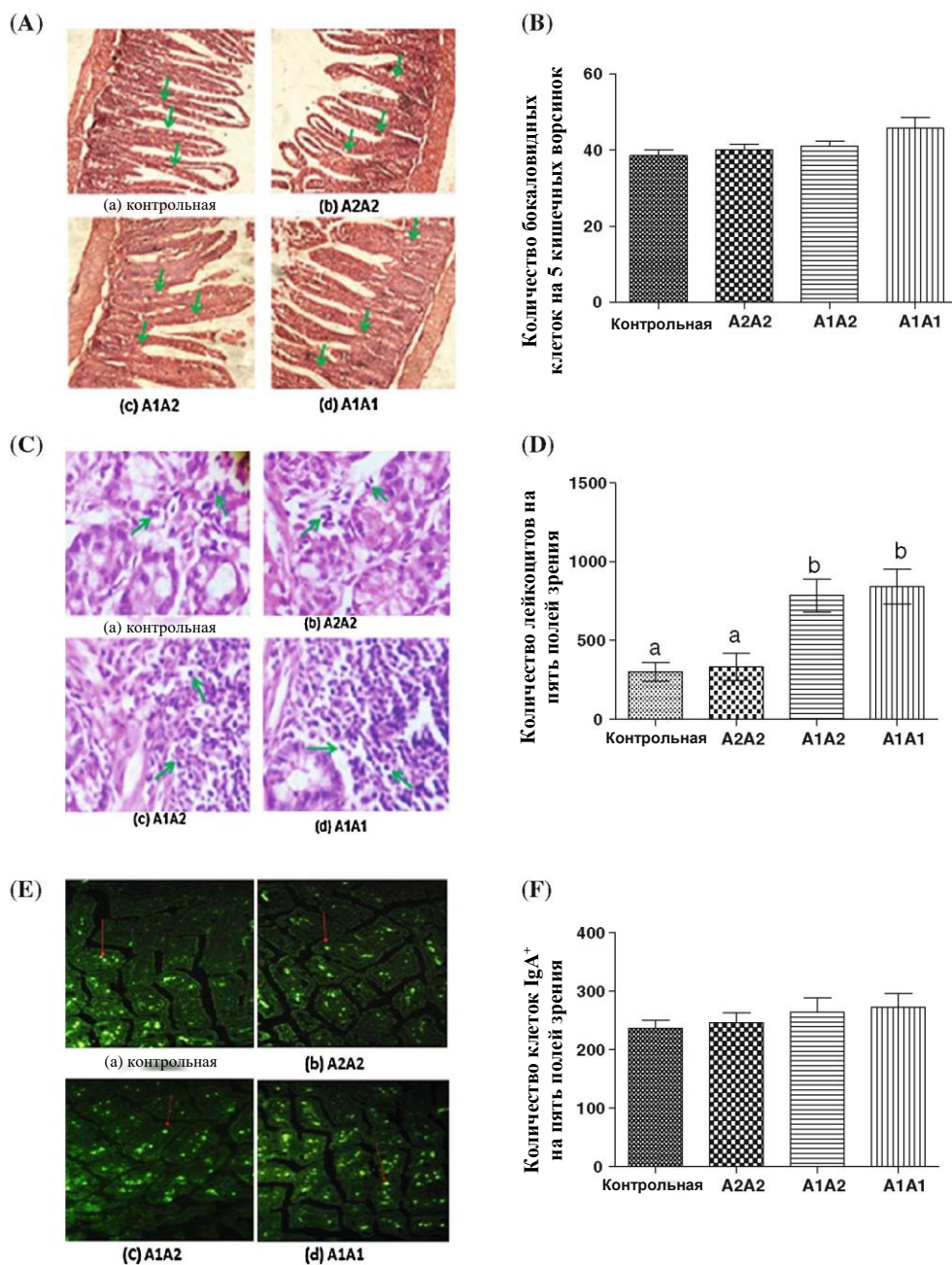
С другой стороны, IgA является самым распространённым антителом, которое продуцируется в слизистой кишечника. Он играет важную роль в борьбе с патогенами, попавшими в организм через ЖКТ, и оказывает тормозящий эффект на воспалительные реакции благодаря другим иммуноглобулинам. Результаты данного исследования не показали изменений ($p > 0,05$) уровня IgA в кишечной жидкости мышей, которых кормили бета-казеином типов A1A1, A1A2 и A2A2 (Рис. 3F).

Гистологические параметры

Желудочно-кишечный тракт (ЖКТ) защищён слизью, которая состоит преимущественно из муцинов, секретируемых бокаловидными клетками. Изменения в работе бокаловидных клеток и выработке муцина свидетельствует о наличии дисфункций ЖКТ, сопровождающихся изменениями здоровой микрофлоры, а также о наличии пищевой аллергии. В рамках данного исследования было определено, что употребление всех трёх типов бета-казеина (A1A1, A2A2 и A1A2) не изменяет ($p > 0,05$) количество бокаловидных клеток в кишечнике мышей (Рис. 4A, B). С другой стороны, употребление бета-казеина типов A1A1 и A1A2 значительно увеличивает ($p < 0,001$) общее количество лейкоцитов на 178,51 и 159,50 % соответственно, если сравнивать с контрольной группой. Также значительное увеличение ($p < 0,001$) замечено при употреблении A1A1 и A1A2 на 153 и 135,73 % соответственно, если сравнивать с употреблением A2A2. Но в группе A2A2 не наблюдается изменений, если сравнивать с контрольной группой (Рис. 4C, D).

В кишечнике мышей плазматические клетки IgA⁺ выполняют целый ряд защитных функций, в основном они являются результатом секреции антител IgA и синтеза антимикробных медиаторов.

Рис. 4. Гистология кишечника мышей после кормления различными типами бета-казеина. **A** — оптическая микроскопия (200x) кишечных ворсинок из групп: *a* контрольной, *b* A2A2, *c* A1A2 и *d* A1A1; **B** — количество бокаловидных клеток в кишечных ворсинках; **C** — оптическая микроскопия (400x) кишечных ворсинок с изображением общего количества лейкоцитов; **D** — общее количество лейкоцитов в кишечнике; **E** — флуоресцентная микроскопия (200x) кишечных ворсинок с ФИТЦ-меченым кроличьим антимышиным IgA для клеток IgA⁺; **F** — количество клеток IgA⁺ в кишечнике. Результаты представлены в виде: среднее значение ± с.с.о. (6 мышей). Буквами выражается разница значимости ($p < 0,05$).



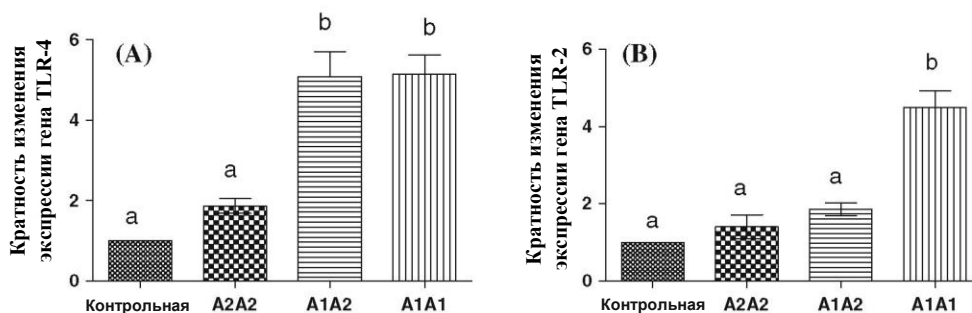
Локализацию IgA⁺ в кишечной ткани мышей провели с помощью прямого ИФА, как показано на Рис. 4E. После скормливания всех трёх типов бета-казеина (A1A1, A2A2 и A1A2) мы не увидели никаких изменений ($p > 0,05$) количества клеток IgA⁺ в кишечнике мышей, Рис. 4F.

Экспрессия мРНК Toll-подобных рецепторов (TLR)

Функциональная реакция мышинных рецепторов TLR-4 и TLR-2 на разные типы бета-казеина показана на Рис. 5A и B соответственно. Результаты демонстрируют то, что употребление бета-казеина типов A1A1 и A1A2

повысило ($p < 0,001$) экспрессию TLR-4 аж на 414 и 408% соответственно, если сравнивать с контрольной группой. Также значительное увеличение ($p < 0,001$) TLR-4 наблюдается при употреблении A1A1 и A1A2 — на 176,34 и 173,11 % соответственно, если сравнивать с употреблением A2A2. Подобным образом бета-казеин A1A1 увеличивает ($p < 0,001$) экспрессию TLR-2 — на 141,39, на 220,71 и на 349 %, если сравнивать с A1A2, A2A2 и контрольной группой соответственно. Однако, при употреблении бета-казеина A2A2 и A1A2 изменений не было по сравнению с контрольной группой.

Рис. 5. Влияние разных типов бета-казеина на экспрессию Toll-подобных рецепторов, **A** — TLR-4 и **B** — TLR-2. Результаты представлены в виде: среднее значение \pm с.с.о. (6 мышей). Буквами выражается разница значимости ($p < 0,05$).



Обсуждение

Коровье молоко и другие молочные продукты уже долгое время являются важными составляющими нашего рациона, выполняя как питательную, так и физиологическую роль. Это самая первая еда, которую получают новорождённые млекопитающие. Казеины, основные молочные белки, считаются важными компонентами, регулирующими состояние здоровья человека. Несмотря на пользу, употребление коровьего молока внимательно изучается, поскольку есть подозрение на его связь с рисками хронических заболеваний. Негативные взаимосвязи не всегда доказывают причинность и требуют тщательных исследований. Изначально эти риски связали с пастеризацией и гомогенизацией, которые впоследствии, как считалось, стали причиной наличия гормона роста и антибиотиков в магазинных молочных продуктах. Однако позднее установили потенциальную взаимосвязь между основными молочными белками, т.е. казеинами, и хроническими заболеваниями [15]. Сначала белки коровьего молока считались диабетогенными [16], но потом возникло предположение о возможной связи между диабетом 1-го типа и высвобождением гексапептида из бета-казеина, а не белком в целом [17]. С одной стороны, Вонг и коллеги [18] выявили ингибирующее действие коровьего бета-казеина на хемотаксическую активность нейтрофилов у овец, которое объяснили увеличением выработки супероксида в культуре клеток, но никаких предположений насчёт аллелей, ответственных за выработку опиоидов, не было. А с другой стороны, весь казеин считается хемоаттрактантом для нейтрофилов и моноцитов у человека [19]. В данном исследовании мы видим увеличение ($p < 0,01$) активности МРО и уровня МСР-1 в кишечных клетках / жидкости параллельно с инфильтрацией лейкоцитов в ворсинках при употреблении А-подобных типов бета-казеина. Увеличение количества воспалительных молекул может быть связано с высвобождением БКМ из бета-казеинов А1-подобного типа, поскольку и тип А1А1, и тип А1А2 являются источниками БКМ [20]. Установлено, что инкубация мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) с коровьим БКМ-7 в нано- и пикомолярных концентрациях приводит к выделению IL-8 [21]. Интерлейкин-8 это сильный хемоаттрактант для нейтрофилов, который стимулирует активацию G-белков, серинкиназ или треонинкиназ и отвечает за хемотаксис, дегрануляцию и выработку супероксидного аниона во время фагоцитоза [22]. Предшествующие наблюдения отчётливо подтверждают результаты нашего исследования. Насколько нам известно, проводилось только два исследования на живых организмах для выявления связи

между употреблением бета-казеина А1/А2 и физиологическими симптомами. Все остальные результаты были получены либо с использованием порошкообразных кислотных казеинов (независимо от их генетических вариантов), либо в лабораторных условиях с использованием химически синтезированных БКМ. Первое исследование на животных (кроликах) с применением генетических вариантов бета-казеина послужило ярким свидетельством того, что, при отсутствии пищевого холестерина, употребление бета-казеина А1, по сравнению с бета-казеином А2, ведёт к сильному повышению холестерина в сыворотке, ЛПНП, ЛПВП, триглицерида, процента липидных полосок на поверхности аорты и увеличению толщины участков аортальной дуги, поражённых липидными полосками [23]. В связи с этим была установлена прямая корреляция между употреблением бета-казеина типов А1/А2 и прогрессированием очагов артериальных поражений, которая позволяет сделать клинически важные выводы насчёт влияния бета-казеина А1 на сердечно-сосудистые заболевания. Однако, Каминский и коллеги [24] установили, что добавление молока А1 и А2 в корм единокровных свиней приводит к незначительным изменениям морфологии кровяных клеток, липидограммы (триглицерид, ЛПНП, ЛПВП), ферментов печени (аланин-трансаминаза и аспартатаминотрансфераза), креатинина и мочи в связи с повышением активности дипептидилпептидазы-4. Так что исследования на живых организмах пока остаются противоречивыми и служат основанием для дальнейших исследований. Ранее было установлено, что коровий БКМ-7 при высоких концентрациях (выше фемтомолярных) снижает выработку интерферона- γ (IFN- γ), но индуцирует высвобождение IL-4 из МКПК [21]. Наблюдаемое нами увеличение ($p < 0,01$) уровня IL-4 при употреблении А1-подобных типов бета-казеина также подтверждает предшествующие результаты и допускает существование механизма, по которому может происходить дифференциация наивных Т-хелперов в клетки Th₂ для возбуждения гуморального иммунного ответа на усиленную выработку иммуноглобулинов с переключением классов [25]. Действительно, по сравнению с А2-подобными типами бета-казеина, значительное увеличение ($p < 0,01$) IgE, IgG, IgG1 и IgG2a в кишечной жидкости наблюдается при употреблении А1-подобных бета-казеинов, что связано с высвобождением БКМ. Увеличение соотношения

IgG1/IgG2a ведёт к последующему усилению иммунной Th₂-реакции на употребление бета-казеина A1A1, что способствует увеличению уровня IgE, поскольку последний также участвует в возбуждении пищевых аллергических иммунных ответных реакций Th₂ [26]. Однако, мы не выявили каких-либо значительных колебаний уровня sIgA, что было подкреплено недостаточной изменчивостью в клетках IgA⁺ в кишечнике. Это можно объяснить тем, что в основном переключение классов происходит в отношении IgG, IgG1, IgG2a и IgE, а они напрямую связаны с нежелательными воспалительными реакциями. В совокупности эти данные демонстрируют усиленную Th₂-реакцию, опосредованную увеличением IL-4 и выработкой иммуноглобулина. Активация пути Th₂ при употреблении бета-казеинов также описывается в наблюдениях Рунгкат-Закарии и коллег [27], они установили, что кормление мышей казеином (100 мг в день) приводит к усиленной выработке гистамина из брюшинных мастоцитов как следствию формирования казеин-производных пептидов. Гистамин это фармакологически активная воспалительная молекула, которая побуждает цитокины Th₂ к выработке антител [28]. Курек и коллеги [29] также наблюдали зависимую от концентрации выработку гистамина из лейкоцитов периферической крови с БКМ-7, которая позже была подтверждена сыпью и покраснениями на коже здоровых детей [30]. Также в нашей лаборатории было установлено, что инкубация БКМ-5 с тучными клетками костномозгового происхождения приводит к увеличению гистамина [31]. Все эти исследования указывают на гистамин-опосредованное отклонение Th₂ в результате высвобождения БКМ-7 из бета-казеина A1-подобных типов. При различных воспалительных заболеваниях, таких как атеросклероз, диабет и рак, MCP-1 играет жизненно важную роль в качестве хемокина, секретируемого из моноцитов, Т-клеток и эндотелиальных клеток, который инициирует воспаление путём рекрутинга моноцитов [32-34]. Эпидемиологически эти заболевания коррелировали с употреблением A1-подобных типов бета-казеина, что подтверждает наши данные. Как уже было сказано выше, в лабораторных условиях MCP-1 вырабатывается в различных типах клеток цитокинами, TNF-α, IL-1 и IL-4 [35-38]. Выявленное нами увеличение IL-4 и MCP-1 указывает на возникновение Th₂-опосредованного воспаления кишечника при употреблении скорее A1-подобных типов бета-казеина, нежели A2A2. В ЖКТ находятся бокаловидные клетки, которые вырабатывают секреторные и мембраносвязанные муцины с различными физиологическими или патологическими проявлениями [39]. При большинстве кишечных инфекций острая фаза воспаления подразумевает возбуждение бокаловидных клеток, в то время как хроническая фаза подразумевает их подавление [40]. Однако, настоящее исследование показывает, что ни один из трёх типов бета-казеина не вызывает сильных изменений количества бокаловидных клеток. Существуют исследования, демонстрирующие секрецию gMuc2 и gMuc3 в крысиных клеточных линиях DHE, MUC5AC в

человеческих клеточных линиях HT29-MTX и отделение слизи от изолированной перфузируемой тонкой кишки крыс с БКМ-7 [41, 42]. Но нет исследований, которые устанавливают корреляцию между количеством бокаловидных клеток, разными генетическими типами бета-казеина и химически синтезированными БКМ. Поэтому возникновение воспалительной реакции, скорее всего, происходит из-за A1-подобного бета-казеина вследствие выработки слизи, но независимо от количества бокаловидных клеток. С другой стороны, при исследованиях на живых организмах наблюдается слабая экспрессия мРНК рецепторов TLR-2 и TLR-4 в здоровых кишечных эпителиальных клетках (IEC) и мононуклеарных клетках собственной пластинки слизистой оболочки (LPMNC), но в воспалительных реакциях эти рецепторы не контролируются [43]. И лабораторные опыты, и исследования на животных показывают, что гистамин высвобождается из брюшинных мастоцитов, тучных клеток и лейкоцитов периферической крови при инкубации с БКМ-7, БКМ-5 и казеином [27-30]. Предыдущими исследованиями установлено, что в культуре *in vitro* человеческих десневых фибробластов (HGF) и человеческих эндотелиальных клеток пупочной вены (HUVEC) со 100 и 10 пм гистамина соответственно повышается экспрессия TLR-2 и TLR-4, и дальнейшая стимуляция HGF липотейхоевой кислотой или липополисахаридом вызывает повышение экспрессии циклооксигеназы-2 и простагландина E2 [44, 45]. Кроме того, обнаружено, что морфин (агонист БКМ) участвует в активации глиальных клеток (основные иммунные воспалительные клетки центральной нервной системы) и в воспалении через TLR-2 и TLR-4 [46, 47]. Эти данные подтверждают тот факт, что при употреблении бета-казеина A1-подобных типов увеличивается ($p < 0,01$) экспрессия TLR-2 и TLR-4.

В заключение следует сказать, что все представленные в настоящем документе данные свидетельствуют о том, что A1-подобные типы бета-казеина (A1A1 и A1A2), в отличие от A2A2, вызывают воспалительные иммунные реакции в кишечнике мышей, скорее всего вследствие высвобождения Th₂. Это подтверждается активацией воспалительных молекул (MPO, MCP-1 и IL-4), гуморальным иммунным ответом (IgE, IgG, IgG1, IgG2a и IgG1/IgG2a), инфильтрацией лейкоцитов в кишечных ворсинках и экспрессией Toll-подобных рецепторов (TLR-2 и TLR-4). Тем не менее, требуются дополнительные исследования для установления молекулярных механизмов, имеющих отношение к взаимосвязям между кишечными опиоидными рецепторами и пептидами бета-казеина, которые генерируют массу сигнальных воспалительных ответов. Если в будущем клеточная информация подтвердит причастность молока A1-подобного типа к воспалительным расстройствам, необходимо будет минимизировать риск на глобальном уровне, снизив его производство путём принятия постановлений здорового разведения скота.

Спонсорство Авторы благодарны директору Национального института исследования молочных продуктов (ICAR, г. Карнал) за финансирование и предоставление лабораторного оборудования для проведения данной работы.

Конфликт интересов Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

References

1. FitzGerald RJ, Meisel H (2000) Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *Br J Nutr* 84(S1):S33–S37
2. Farrell HM Jr, Jimenez-Flores R, Bleck GT, Brown EM, Butler JE, Creamer LK, Hicks CL, Hollar CM, Ng-Kwai-Hang KF, Swaisgood HE (2004) Nomenclature of the proteins of cow's milk—sixth revision. *J Dairy Sci* 87(6):1641–1674
3. Groves ML (1969) Some minor components of casein and other phosphoproteins in milk. A review. *J Dairy Sci* 52(8):1155–1165
4. Roginski H (2003) Encyclopedia of dairy sciences. Academic Press, London
5. Woodford K, Cowan T (2009) Devil in the milk: illness, health and the politics of A1 and A2 milk. Chelsea Green Press, USA
6. Raies MH, Kapila R, Shandilya UK, Kapila S (2012) Impact of milk derived β -casomorphins on physiological functions and trends in research. A review. *Int J Food Prop* (in press)
7. Jinsmaa Y, Yoshikawa M (1999) Enzymatic release of neocasomorphin and β -casomorphin from bovine β -casein. *Peptides* 20(8):957–962
8. Raies MH, Kapila R, Shandilya UK, Dang AK, Kapila S (2012) Detection of A1 and A2 genetic variants of β -casein in Indian crossbred cattle by PCR-ACRS. *Milchwissenschaft* 67(4):396–398
9. Fox PF, Guiney J (1972) A procedure for the partial fractionation of α S-casein complex. *J Dairy Sci* 39(1):49–53
10. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265–275
12. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N (2007) Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 22(3):659–661
13. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G (1982) Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78(3):206–209
14. Kiernan JA (2008) Histological and histochemical methods theory and practice, 4th edn. Scion, Bloxham
15. Bell SJ, Grochoski GT, Clarke AJ (2006) Health implications of milk containing β -casein with A2 genetic variant. *Crit Rev Food Sci Nutr* 46(1):93–100
16. Elliot RB, Martin JM (1984) Dietary protein: a trigger of insulin-dependent diabetes in the BB rat? *Diabetologia* 26(4):297–299
17. Elliott RB, Wasmuth H, Hill J (1997) Immunosuppressing effects of cow milk β -casomorphins in prediabetic mice and humans. In: 16th IDF congress, Helsinki
18. Wong CW, Seow HF, Liu AH, Husband AJ, Smithers GW, Watson DL (1996) Modulation of immune responses by bovine β -casein. *Immunol Cell Biol* 74(4):323–329
19. Lewis SL, Van Epps DE (1983) Demonstration of specific receptors for fluoresceinated casein on human neutrophils and monocytes using flow cytometry. *Inflammation* 7(4):363–375
20. De Noni I (2008) Release of β -casomorphins-5 and -7 during simulated gastro-intestinal digestion of bovine β -casein variants and milk-based infant formulas. *Food Chem* 110(4):897–903
21. Fiedorowicz E, Jarmołowska B, Iwan M, Kostyra E, Obuchowicz R, Obuchowicz M (2011) The influence of μ -opioid receptor agonist and antagonist peptides on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). *Peptides* 32(4):707–712
22. Waugh DJ, Wilson C (2008) The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14(21):6735–6741
23. Tailford KA, Berry CL, Thomas AC, Campbell JH (2003) A casein variant in cow's milk is atherogenic. *Atherosclerosis* 170(1):13–19
24. St Kaminski, Kostyra E, Cieslinska A, Fiedorowicz E (2012) Consumption of bovine β -casein variants (A1 or A2) does not affect basic hematological and biochemical indices. *Milchwissenschaft* 67(3):238–241
25. Kashiwada M, Levy DM, McKeag L, Murray K, Schröder AJ, Canfield SM, Traver G, Rothman PB (2010) IL-4-induced transcription factor NFIL3/E4BP4 controls IgE class switching. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(2):821–826
26. Dupont C, Heyman M (2000) Food protein-induced enterocolitis syndrome: laboratory perspectives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30S:S50–S57
27. Rungkat-Zakaria F, Belleville F, Nabet F, Linden G (1992) Allergenicity of bovine casein. I: specific lymphocyte proliferation and histamine accumulation in the mastocyte as a result of casein feeding in mice. *Food Agric Immunol* 4(1):41–50
28. Schneider E, Rolli-Derkinderen M, Arock M, Dy M (2002) Trends in histamine research: new functions during immune responses and hematopoiesis. *Trends Immunol* 23(5):255–263
29. Kurek M, Przybilla B, Hermann K, Ring J (1992) A naturally occurring opioid peptide from cow's milk, β -casomorphine-7, is a direct histamine releaser in man. *Int Arch Allergy Immunol* 97(2):115–120
30. Kurek M, Czerwionka-Szaflarska M, Doroszewska G (1995) Pseudoallergic skin reactions to opiate sequences of bovine casein in healthy children. *Rocz Akad Med Białymst* 40(3):480–485
31. Reddi S, Kapila R, Dang AK, Kapila S (2011) Evaluation of allergenic response of milk bioactive peptides using mouse mast cell. *Milchwissenschaft* 67(2):117–121
32. Conti P, DiGioacchino M (2001) MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc* 22(3):133–137
33. O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allens SJ (2008) Chemokines and cancer: migration, intracellular signaling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochem J* 409(3):635–649
34. Yadav A, Saini V, Arora S (2010) MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta* 411(21–22):1570–1579
35. Proost P, Wuyts A, Van Damme J (1996) Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J Leukoc Biol* 59:67–74
36. Rollins BJ, Pobert JS (1991) Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am J Pathol* 138(6):1315–1319
37. Thornhill MH, Kyan-Aung U, Haskard DO (1990) IL-4 increases human endothelial cell adhesiveness for T cells but not for neutrophils. *J Immunol* 144(8):3060–3065
38. Rollins BJ, Sunday ME (1991) Suppression of tumor formation in vivo by expression of the JE gene in malignant cells. *Mol Cell Biol* 11(6):3125–3131
39. Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS (2001) Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci* 6:D1321–D1357
40. Dharmani P, Srivastava V, Kissoon-Singh V, Chadee K (2009) Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun* 1(2):123–135
41. Zoghbi S, Trompette A, Claustre J, El Homsy M, Garzon J, Jourdan G, Scazec JY, Plaisancie P (2006) β -Casomorphin-7 regulates the secretion and expression of gastrointestinal mucins through a μ -opioid pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290(6):G1105–G1113

42. Trompette A, Claustre J, Caillon F, Jourdan G, Chayvialle JA, Plaisancie P (2003) Milk bioactive peptides and β -casomorphins induce mucus release in rat jejunum. *J Nutr* 133(11):3499–3503
43. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spöttl T, Andus T, Schölmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G (2002) Toll-like receptors-2 and -4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 122(7):1987–2000
44. Gutiérrez-Venegas G, Cruz-Arrieta S, Villeda-Navarro M, Méndez-Mejía JA (2011) Histamine promotes the expression of receptors TLR-2 and TLR-4 and amplifies sensitivity to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid treatment in human gingival fibroblasts. *Cell Biol Int* 35(10):1009–1017
45. Talreja J, Kabir MH, Filla MB, Stechschulte DJ, Dileepan KN (2004) Histamine induces toll-like receptor-2 and -4 expression in endothelial cells and enhances sensitivity to gram-positive and gram-negative bacterial cell wall components. *Immunology* 113(2):224–233
46. Hutchinson MR, Zhang Y, Shridhar M, Evans JH, Buchanan MM, Zhao TX, Slivka PF, Coats BD, Rezvani N, Wieseler J, Hughes TS, Landgraf KE, Chan S, Fong S, Phipps S, Falke JJ, Leinwand LA, Maier SF, Yin H, Rice KC, Watkins LR (2010) Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain Behav Immun* 24(1):83–95
47. Zhang L, Li L, Zhang G (2011) A *Crassostrea gigas* toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish Shellfish Immunol* 30(3):653–660