

АССОЦИАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА TLR2, TLR4, TLR9 С ТЕЧЕНИЕМ ОСТРОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* IN VIVO

Буданова Е.В.¹, Свитич О.А.^{1,2}, Шуленина Е.А.^{1,2}, Зверев В.В.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Резюме. Целью данной работы являлось изучение особенности экспрессии генов TLR2, TLR4, TLR9 в течении острой респираторной инфекции в зависимости от времени, прошедшего с момента инфицирования, и дозы заражения. Результаты исследований острой респираторной инфекции, вызванной грамотрицательной бактерией *Klebsiella pneumoniae*, на модели *in vivo* показали, что при дозе заражения 10⁴ КОЕ/мл уровень экспрессии гена TLR4 в эпителии верхних дыхательных путей на 1-е, 3-и, 10-е сутки возрастал в 30 и более раз, при этом полная элиминация возбудителя наблюдалась уже на 3-и сутки. При дозе заражения 10⁷ КОЕ/мл отмечалась персистенция возбудителя в верхних дыхательных путях в течение нескольких суток, что сопровождалось достоверным повышением уровня экспрессии гена TLR9 в эпителии верхних дыхательных путей и уровня TLR4 в легких на 1-е сутки после заражения одновременно с элиминацией возбудителя из нижних дыхательных путей. Таким образом, характерные особенности экспрессии генов TLR4 и TLR9 в верхних дыхательных путях могут рассматриваться как потенциальные диагностические и прогностические факторы в оценке течения ОРИ, вызванной *Klebsiella pneumoniae*.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, TLR, пневмония, *Klebsiella pneumoniae*

ASSOCIATION OF TLR2, TLR4, TLR9 GENE EXPRESSION RELATED TO INNATE IMMUNITY WITH IN VIVO ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS CAUSED BY *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Budanova E.V.^a, Svitich O.A.^{a,b}, Shulenina E.A.^{a,b}, Zverev V.V.^{a,b}

^a Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University)

^b I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. The aim of this work was to study features of gene expression TLR2, TLR4, and TLR9 in the course of acute respiratory infection, depending on the time elapsing since the contamination, and dose of

Адрес для переписки:

Свитич Оксана Анатольевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»
105064, Россия, Москва, Малый Казенный пер., 5а.
Тел.: 8 (926) 148-83-22.
E-mail: svitichoa@yandex.ru

Address for correspondence:

Svitich Oxana A.
I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
105064, Russian Federation, Moscow, Maliy Kazenny lane, 5a.
Phone: 7 (926) 148-83-22.
E-mail: svitichoa@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.В. Буданова, О.А. Свитич, Е.А. Шуленина, В.В. Зверев
«Ассоциация экспрессии генов врожденного иммунитета TLR2, TLR4, TLR9 с течением острой респираторной инфекции, вызванной *Klebsiella pneumoniae* in vivo»
// Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 425–430.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-425-430

© Буданова Е.В. и соавт., 2018

For citation:

E.V. Budanova, O.A. Svitich, E.A. Shulenina, V.V. Zverev
“Association of TLR2, TLR4, TLR9 gene expression related to innate immunity with in vivo acute respiratory infections caused by *Klebsiella pneumoniae*”, *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 425–430.
doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-425-430

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-425-430

infection. The studies of *in vivo* models of acute respiratory infections caused by Gram-negative *Klebsiella pneumoniae* showed that, at infection dose of 10^4 CFU/ml, the TLR4 gene expression levels in epithelium of upper respiratory tract at 1, 3, 10 days were increased 30 times and more, complete elimination of the pathogen was observed at 3 days. At the dose of infection of 10^7 CFU/ml, persistence of the pathogen in upper respiratory tract was observed within a few days, accompanied by a significant increase in the level of TLR9 expression in epithelium of upper respiratory tract, and TLR4 levels in the lungs 1 day after infection, in parallel to elimination of the pathogen from the lower respiratory tract. Thus, the characteristic features of TLR4 and TLR9 gene expression in the upper respiratory tract may be considered a potential diagnostic and prognostic factors in evaluation of the course of acute respiratory infections caused by *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: innate immunity, toll-like receptors (TLR), pneumoniae, *Klebsiella pneumoniae*

Введение

В настоящее время острые респираторные инфекции (ОРИ) занимают одно из ведущих мест в структуре заболеваемости во всем мире. Основными трудностями для диагностики ОРИ на ранних стадиях являются наличие латентного периода в их развитии и неспецифические проявления этих заболеваний. Снизить частоту осложнений и повысить эффективность проводимой терапии может ранняя диагностика, основанная на выявлении характерных изменений в состоянии иммунной системы на молекулярном уровне, что позволит предпринять меры по профилактике и лечению респираторных инфекций еще до начала клинических проявлений [1].

Среди бактерий-возбудителей респираторных инфекций в условиях стационара *Klebsiella pneumoniae* является одной из наиболее распространенных. За последние десять лет в разных странах, в том числе в России, были установлены случаи массового заражения штаммами *K. pneumoniae*, обладающими множественной антибиотикорезистентностью [2, 7, 10].

Известно, что реснитчатый эпителий, выстилающий дыхательные пути, служит барьером на пути проникновения различных микроорганизмов, включая *K. pneumoniae*, в организм. Благодаря наличию большого числа рецепторов, способных узнавать патогенные микроорганизмы и запускать иммунные реакции, эпителиальные клетки выполняют функцию иммунной защиты. В частности, Toll-подобные рецепторы (TLRs), которые являются одним из ключевых факторов врожденного иммунитета, широко представлены на эпителиальных клетках верхних и нижних дыхательных путей. Их роль в защите организма от возбудителей респираторных инфекций уже неоднократно была продемонстрирована в работах отечественных и зарубежных авторов [4, 8].

Целью данной работы являлось определение динамики экспрессии генов TLR2, TLR4 и TLR9 в эпителиальных клетках слизистой оболочки верхних дыхательных путей и ткани легких при экспериментальной инфекции, вызванной

K. pneumoniae, при инфицировании средней и высокой дозами этих бактерий *in vivo*.

Материалы и методы

В экспериментах были использованы мыши двух линий: BALB/c и C57Bl/6 (питомник «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России, Москва); для работы с животными было получено разрешение этического комитета. Для заражения использовали штамм K-6 ATCC 700603 *K. pneumoniae* (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского).

Эксперимент *in vivo* проводили путем интраназального заражения животных суспензией бактерий *K. pneumoniae* в объеме 50 мкл. Первая группа лабораторных животных ($n = 12$) получала среднюю дозу *K. pneumoniae* (10^4 КОЕ/мл), вторая группа ($n = 30$) – высокую дозу заражения (10^7 КОЕ/мл). Контрольной группе 1 ($n = 15$) интраназально вводили стерильный физиологический раствор натрия хлорида. Контрольную группу 2 ($n = 16$) составили интактные мыши. На 1-е, 3-и, 7-е и 10-е сутки после заражения проводился сбор материала из верхних дыхательных путей (ВДП) и легких. Полученный материал исследовали бактериологическим методом с целью обнаружения в образцах тест-штаммов бактерий и оценки эффективности введенной дозы возбудителя. Для посева использовали дифференциально-диагностическую плотную питательную среду МакКонки (Pronadisa, Испания), обладающую также селективными свойствами: клебсиеллы образуют на этой среде темно-розовые крупные мукоидные колонии.

Кроме того, материал, полученный из ВДП и легких, был использован для детекции и количественного определения копий генов TLR2, TLR4 и TLR9. Для оценки экспрессии генов TLRs применялся метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Из ткани легких и соскобов верхних дыхательных путей выделяли общую РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля, используя набор для выделения РНК «АмплиПРАЙМРибосорб» (ИнтерЛабСервис, РФ) по инструкции

производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием «Набора для проведения реакции обратной транскрипции» (Синтол, Россия) для синтеза первой цепи ДНК на матрице РНК интересующего гена для последующего определения числа копий с помощью ПЦР-РВ [5, 6]. Реакцию проводили с применением «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBRGreenI» и праймеров, синтезированных на фирме «Синтол», Россия. Количество копий кДНК исследуемых генов рассчитывалось относительно актина. Реакцию проводили в амплификаторе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия). Подсчет копий кДНК исследуемого гена проводили относительно 1000 копий гена β -актина. Статистическая обработка проводилась с использованием программы Statsoft Statistica v. 6.0. Достоверность полученных результатов оценивалась с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни [3].

Результаты

На первом этапе исследования проводили контрольные высевы образцов из ВДП и легких на 1-е, 3-и, 7-е и 10-е сутки после заражения для обнаружения *K. pneumoniae* и оценки динамики накопления или элиминации возбудителя в этих биотопах. По результатам бактериологического исследования было установлено, что у мышей из группы, зараженной 10^4 КОЕ/мл *K. pneumoniae*, тест-штамм не высевался из обоих образцов ни в один из контрольных дней. В группе с дозой заражения 10^7 КОЕ/мл в материале из ВДП возбудитель обнаруживался на 1-е и 3-и сутки у мышей линии BALB/c (25%), у мышей линии C57Bl/6 – на протяжении всего эксперимента (25%). В легких мышей линии BALB/c этой группы возбудитель обнаруживался только на 1-е сутки (25%) (рис. 1).

Далее проводилось определение динамики экспрессии генов TLR2, TLR4, TLR9 в материале ВДП и легких у мышей обеих линий. Показатели экспрессии гена TLR2 в эпителии ВДП у мышей, получивших как среднюю, так и высокую дозу заражения, статистически значимо не отличались от показателей контрольных групп (рис. 2А, Б).

Согласно результатам наших исследований, уровень экспрессии гена TLR4 в эпителии ВДП в группе мышей линии BALB/c с дозой заражения 10^4 КОЕ/мл был достоверно повышен (более чем в 30 раз) на 3-и и 10-е сутки после заражения относительно аналогичных показателей в контрольных группах. Уровень экспрессии гена TLR4 в легочной ткани у группы инфицированных мышей со средней дозой заражения и здоровых мышей не различался. Экспрессия гена TLR4 в материале ВДП у животных обеих линий

при введении большой дозы *K. pneumoniae* была увеличена в 3 раза на 3-10-е сутки, однако эти данные статистически недостоверны (рис. 2В, Г). Вместе с тем, у мышей линии BALB/c из той же группы в ткани легких отмечалось достоверное повышение уровня экспрессии гена TLR4 на 3-и сутки после инфицирования.

Уровень экспрессии гена TLR9 в эпителии ВДП у мышей линии BALB/c, получивших среднюю дозу заражения 10^4 КОЕ/мл, не отличался от показателей контрольных групп. Тогда, как у животных с высокой дозой заражения (10^7 КОЕ/мл) в материале из ВДП было выявлено достоверное повышение уровня экспрессии гена TLR9 на 3-и и 7-е сутки: в 1,8 и 3,3 раза для линий BALB/c и C57Bl/6 соответственно (рис. 2Д, Е).

Обсуждение

Toll-подобные рецепторы (TLRs) являются ключевыми факторами врожденного иммунитета в отношении вирусов и бактерий, что объясняет повышенный интерес к изучению их экспрессии на протяжении инфекционного процесса. Исследование динамики экспрессии генов TLRs в эпителии ВДП может служить инструментом для разработки диагностических критериев, отражающих эффективность местного мукозального иммунитета дыхательных путей против инфекции, вызванной *K. pneumoniae*.

В данном исследовании экспрессия генов TLRs изучалась на модели респираторной ин-

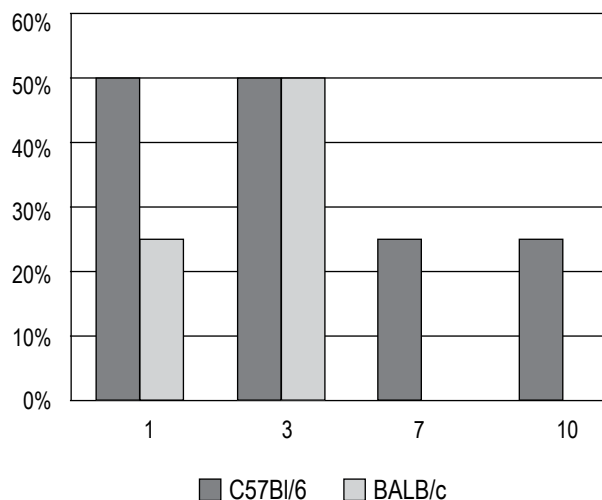


Рисунок 1 Динамика персистенции *K. pneumoniae* в верхних дыхательных путях инфицированных мышей линий BALB/c и C57Bl/6

Примечание. По оси абсцисс – время (сутки), по оси ординат – проценты.

Figure 1. Dynamics of *K. pneumoniae* persistence in the upper respiratory tract of infected BALB/c and C57Bl/6 mice

Note. The abscissa shows time (days), Y-axis shows the percentage.

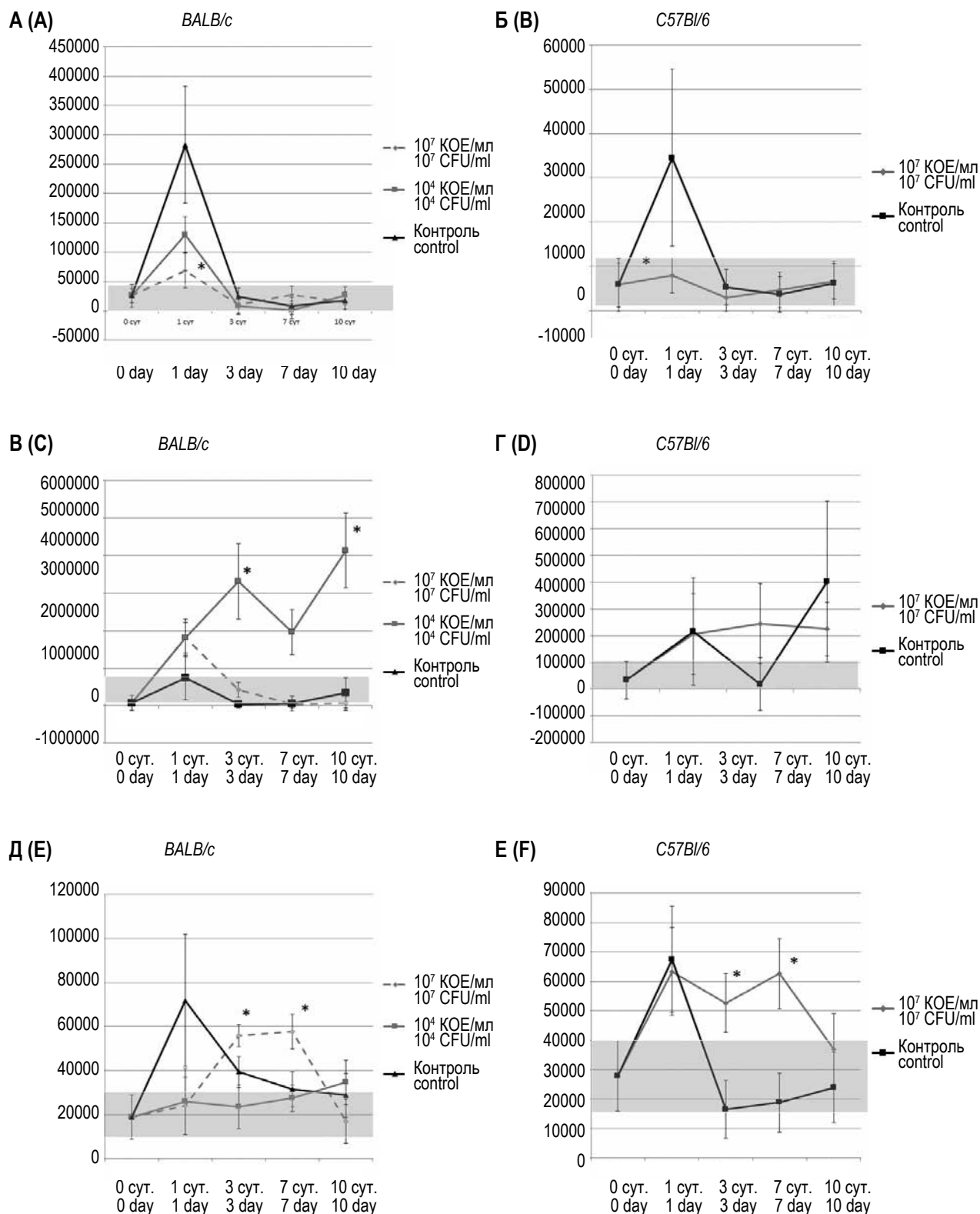


Рисунок 2. Динамика экспрессии генов TLR2 (А, Б), TLR4 (В, Г), TLR9 (Д, Е) эпителиальными клетками ВДП мышей линий BALB/c и C57Bl/6

Примечание. По оси абсцисс – время (сутки), по оси ординат – ОЕ (относительные единицы – число копий исследуемого гена относительно экспрессии гена актина).

Figure 2. Dynamics of TLR2 (A, B), TLR4 (C, D), TLR9 (E, F) gene expression in epithelial cells of the upper respiratory tract of BALB/c and C57Bl/6 mice

Note. X-axis, time post-infection (days), Y-axis, OE (relative units: number of copies of the analyzed gene relative to gene expression of actin).

фекции, вызванной грамотрицательными бактериями вида *K. pneumoniae*. Представленная работа, на наш взгляд, представляет большой интерес с научной и клинической точки зрения. Так, нами было установлено, что невысокая доза заражения, равная 10^4 КОЕ/мл, является недостаточной для персистенции возбудителя в ВДП и его распространения по респираторному тракту в легкие. Экспериментальная инфекция у мышей протекала субклинически, без признаков воспаления. Однако стоит отметить, что, несмотря на отсутствие внешних признаков заболевания, уровень экспрессии генов TLR4 повышался многократно уже на первые сутки после заражения, и эти высокие показатели сохранялись на протяжении всего периода проведения эксперимента. Это позволяет предположить, что мощная активация TLR4 в ранние сроки после заражения и сохраняющийся повышенный уровень в течение нескольких суток (до десяти) способствуют сдерживанию возбудителя во «входных воротах» инфекции и его эффективной элиминации в кратчайшие сроки.

Нами также было установлено, что инфекция, вызванная высокой дозой заражения (10^7 КОЕ/мл), приводила к кратковременной персистенции возбудителя в ВДП (до нескольких суток) и легких (одни сутки). Несмотря на то, что экспрессия генов TLR4 в ВДП в этой группе повышалась статистически недостоверно, у животных было отмечено достоверное увеличение уровня экспрессии генов TLR9, причем у мышей линии BALB/c оно по времени совпадало с полной элиминацией возбудителя из ВДП.

Стоит отметить, что, благодаря высокой чувствительности мышей линии BALB/c к *K. pneumoniae*, эту линию следует считать оптимальной моделью для экспериментальной ОРИ, индуцированной *K. pneumoniae*. Вместе с тем, неспособность *K. pneumoniae* проникать из ВДП в легкие мышей линии C57Bl/6 представляет большой интерес для дальнейших исследований ОРИ в опытах *in vivo*, поскольку этот феномен может свидетельствовать о полиморфизме генов рецепторов врожденного иммунитета.

Список литературы / References

1. Володин Н.Н. Неонатология. Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 749 с. [Volodin N.N. Neonatology. National manual]. Moscow: GEOTAR-Media. 2008. 749 p.
2. Воробьев А.А., Быков А.С., Буданова Е.В., Бойченко М.Н. Исследования по микроэкологии человека на кафедре микробиологии с вирусологией и иммунологией // Вестник РАМН, 2001. № 1. С. 27-31. [Vorobyev A.A., Bykov S.A., Budanova E.V., Boychenko M.N. Studies of human microecology in the Department of Microbiology with Virology and immunology. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2001, no. 1, pp. 27-31. (In Russ.)]
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с. [Glantz S. Biomedical statistics. Transl. from English]. Moscow. Transl. from English: Practice, 1998. 459 с.
4. Ковальчук Л.В., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Мироншиченкова А.М., Ганковский В.А. Роль TOLL-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2012. № 2. С. 147-153. [Kovalchuk L.V., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Miroshnichenkova A.M., Gankovsky V.A. The role of TOLL-like receptors in the pathogenesis of human infectious diseases. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik "Chelovek i ego zdorovye" = Kursk Scientific and Practical Bulletin "The Man and his Health"*, 2012, no. 2, pp. 147-153. (In Russ.)]
5. Лабжинов П.А., Свитич О.А., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Оценка экспрессии генов компонентов врожденного иммунитета в лейкоцитах мышей при действии синтетических лигандов *in vivo* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2013. № 6. С. 76-80. [Labzhinov P.A., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Zverev V.V. The assessment of gene expression of components of innate immunity in the white blood cells of mice under the action of synthetic ligands *in vivo*. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 6, pp. 76-80. (In Russ.)]
6. Сомова О.Ю., Ганковская О.А., Лавров В.Ф., Ганковская Л.В., Зверев В.В. Динамика экспрессии молекул TLR9-опосредованного сигнального пути эпителиальными клетками цервикального канала под действием вируса простого герпеса 2 типа *in vitro* // Российский иммунологический журнал, 2011. Т. 5, № 2 (14). С. 129-134. [Somova O.Yu., Gankovskaya O.A., Lavrov V.F., Gankovskaya L.V., Zverev V.V. The dynamics of expression of molecules TLR9-mediated signaling pathway by epithelial cells of cervical canal under the influence of herpes simplex virus type 2 *in vitro*. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2011, Vol. 5, no. 2 (14), pp. 129-134. (In Russ.)]
7. Шеина Н.И., Буданова Е.В. Значение оценки антибиотикорезистентных свойств бактериальных штаммов-продуцентов в системе гигиенического нормирования // Гигиена и санитария, 2010. № 5. С. 45-47.

[Sheina N.I., Budanova E.V. Value assessment of the properties of antibiotic-resistant bacterial strains-producers in the system of hygienic regulation. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2010, no. 5, pp. 45-47. (In Russ.)]

8. Baral P., Batra S., Zemans R.L., Downey G.P., Jeyaseelan S. Divergent functions of Toll-like receptors during bacterial lung infections. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2014, Vol. 190, no. 7, pp. 722-732.

9. Barbieri F., Bajetto A., Thellung S., Würth R., Florio T. Drug design strategies focusing on the CXCR4/CXCR7/CXCL12 pathway in leukemia and lymphoma. *Expert Opin. Drug Discov.*, 2016, Vol. 11, no. 11, pp. 1093-1109.

10. Li B., Zhao Y., Liu C., Chen Z., Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.*, 2014, Vol. 9, no. 9, pp. 1071-1081.

Авторы:

Буданова Е.В. — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Шуленина Е.А. — студент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», Москва, Россия

Зверев В.В. — д.б.н., профессор, академик РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

Authors:

Budanova E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Professor, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Shulenina E.A., Student, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Zverev V.V., PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; Head, Department of Microbiology, Virology and Immunology, Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russian Federation

Поступила 15.08.2017
Принята к печати 25.09.2017

Received 15.08.2017
Accepted 25.09.2017