

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗВИТИЯ ХЛАМИДИЙНОЙ И САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЙ У ИНБРЕДНЫХ МЫШЕЙ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И УСТОЙЧИВЫХ К *Mycobacterium tuberculosis*

Балунец Д.В., Нестеренко Л.Н., Романова Ю.С.,
Аляпкина Ю.С., Колкова Н.И., Апт А.С.*

ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи РАМН;

* ГУ Центральный НИИ туберкулеза РАМН, Москва, Россия

Резюме. Проведен сравнительный анализ течения инфекционного процесса, вызываемого внутриклеточно паразитирующими бактериями *Salmonella typhimurium* и *Chlamydomphila pneumoniae*, у инбредных линий мышей с генетически детерминированной чувствительностью (I/St) или устойчивостью (A/Sn) к *Mycobacterium tuberculosis*.

Выявлена схожесть течения туберкулезной, сальмонеллезной и хламидийной инфекции у мышей A/Sn и I/St по основным параметрам (разница в сроках жизни и в количестве возбудителей в пораженных органах). Было показано, что животные линии A/Sn по сравнению с линией I/St обладают повышенной устойчивостью к сальмонеллезной и хламидийной инфекциям, несмотря на различные механизмы внутриклеточного паразитирования у *S. typhimurium* и *C. pneumoniae* и различную локализацию поражений, вызываемых этими бактериями, внутри организма хозяина.

Сходство в характере контроля макроорганизмом совершенно разных внутриклеточных инфекций позволяет предположить, что дальнейшее их исследование на мышах линий A/Sn и I/St позволит обнаружить физиологические основы контроля целого класса инфекций и выявить сеть генов, ответственных за их благоприятное и неблагоприятное течение.

Ключевые слова: *M.tuberculosis*, хламидиоз, сальмонеллез, инбредные мыши.

Balunets D.V., Nesterenko L.N., Romanova Yu.S., Alyapkina Yu.S., Kolkova N.I., Apt A.S.

COMPARATIVE ANALYSIS OF DEVELOPMENT OF *CHLAMYDOMPHILA* AND *SALMONELLA* INFECTIONS IN THE INBRED MICE DIFFERENT IN THEIR SENSITIVITES TO *M.TUBERCULOSIS*

Abstract. The course of infections caused by intracellular parasitic bacteria *Salmonella typhimurium* and *Chlamydomphila pneumoniae* was compared for inbred strains of mice with genetically determined susceptibility (I/St) or resistance (A/Sn) to *Mycobacterium tuberculosis*.

Similar differences in dynamics of some common parameters (life span and pathogen numbers in affected organs) between A/Sn and I/St mice have been revealed for tuberculosis, salmonellosis and chlamidiasis. There has been demonstrated that A/Sn animals show increased resistance to *Salmonella* and *Chlamydomphila* infections, as compared to I/St mice, in spite of various mechanisms of intracellular parasitism for *S.typhimurium* and *C.Pneumoniae*,

Адрес для переписки:

Нестеренко Людмила Николаевна,
115211, г. Москва, Борисовские пруды, д. 14, кор.4,
кв.55. Тел./факс: 193-63-54, 190-44-52.
E-mail: mila@riem.ru

and different locations of lesions induced by these bacteria in the host organism.

Similar features of quite different infections at the level of macroorganism allows us to suggest that further investigation in A/Sn and I/St murine model will make it able to discover the basic features of physiolog-

ical control for a lot of infections, and to reveal a genetic network that could be responsible for their favorable or adverse outcomes. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 5-6, pp 583-586)

Введение

Инбредные линии мышей I/StSnEgYCit (I/St) и A/SnYCit (A/Sn), проявляющие повышенную чувствительность или резистентность к туберкулезной инфекции, были выявлены в ЦНИИТ РАМН при сравнении более 30 линий мышей. Эти оппозитные линии были охарактеризованы по выживаемости, динамике потери веса, высеваемости из органов микобактерий на различных стадиях инфекции и по степени патоморфологических изменений в тканях легкого [3]. Путем анализа расщепления чувствительности и устойчивости в потомстве от скрещивания этих линий, были выявлены хромосомные участки (QTL), участвующие в контроле тяжести экспериментального туберкулеза. Соответствующие локусы находятся в дистальной части хромосомы 3, проксимальной части хромосомы 9 и средне-проксимальной части хромосомы 17 [5]. Линии I/St и A/Sn были исследованы по ряду основных параметров противотуберкулезного иммунитета [1, 2]. Полученные данные позволили частично объяснить разницу в фенотипах линий I/St и A/Sn, однако, почти наверняка некоторые из механизмов, обуславливающие их, обнаружить не удалось.

S. typhimurium - микроорганизм со схожим с *M. tuberculosis* механизмом паразитирования внутри макрофагов, поражающий паренхиматозные органы (печень, селезенку). *Chl. pneumoniae* - патоген, вызывающий поражения эпителия дыхательных путей - также как другие хламидии, имеет сложный жизненный цикл, который включает переход от элементарных телец к ретикулярным тельцам через промежуточные формы. Также как и многие другие внутриклеточные патогены (*M. tuberculosis*, *M. avium*, *L. pneumophila*, *S. typhimurium*, *T. gondii*), хламидии паразитируют внутри вакуолей (фагосом) макрофагов и препятствуют их слиянию с лизосомами [4, 6]. Общим для микобактерий, сальмонелл и хламидий является длительное персистирование внутри макрофагов хозяина. Тем не менее, остается неизвестным, имеются ли общие механизмы контроля инфекций, вызываемых внутриклеточными паразитами, или для каждой инфекции имеется особая цепь генетически детерминированных защитных реакций.

Целью работы является сравнительное изучение восприимчивости и течения инфекционных процессов, вызванных микроорганизмами с внутриклеточным типом паразитизма (*Salmonella typhimurium* - системная инфекция, *Chlamydomphila pneumoniae* - легочная инфекция), на модели линейных мышей, несущих частично охарактеризованные мутации, обуславливающие повышенную резистентность или чувствительность к легочной инфекции, вызванной

Mycobacterium tuberculosis. Задачами работы являются изучение уровня резистентности к сальмонеллезной и хламидийной инфекциям у мышей линий A/Sn и I/St по оценке динамики выживаемости мышей при заражении различными микробными дозами и степени пораженности органов.

Материалы и методы

Исследования выполнены на мышках инбредных линий, поддерживаемых в питомнике ЦНИИТ РАМН путем инбридинга по общепринятым правилам.

Для изучения сальмонелльной инфекции мышей заражали внутрибрюшинно введением 0,5 мл культуры умеренно вирулентного штамма С53 *S. typhimurium*. В каждой серии опыта использовали по 10 мышей обоего пола каждой линии, весом 16-18 или 10-13 г. Высевы из селезенки и печени мышей производили на различных сроках инфекции на SS-агар. Колонии подсчитывали через 12 часов инкубирования при 37°C.

Для изучения хламидийной инфекции мышей весом 8-10 г заражали интерназально дозой $1,2 \times 10^4$ ВОЕ/мышь суспензии элементарных телец штамма *C. pneumoniae* Kajjani 6. Оценку количества хламидий в легких производили методом ПЦР в реальном времени. Выделение ДНК из суспензии легких зараженных животных производили с помощью набора QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN). Праймеры и зонды для проведения ПЦР в реальном времени были выбраны в пределах гена, кодирующего 16S рРНК в соответствии с правилами молекулярного дизайна программы «Primer Express» (Applied Biosystems) для зондов типа «Taqman probes» (<http://sequest.niboch.nsc.ru/Manuals/tagman.pdf>). Для проведения ПЦР в реальном времени использовали систему iCycler IQ производства фирмы Biorad.

Результаты и обсуждение

Был проведен начальный сравнительный анализ течения инфекционного процесса, вызываемого внутриклеточно паразитирующими бактериями *Salmonella typhimurium* и *Chlamydomphila pneumoniae*, у инбредных линий мышей с генетически детерминированной чувствительностью (I/St) или устойчивостью (A/Sn) к туберкулезу. Оказалось, что мыши I/St по сравнению с мышами A/Sn обладают также повышенной чувствительностью к сальмонеллезной и хламидийной инфекциям, несмотря на различные механизмы внутриклеточного паразитирования у *S. typhimurium* и *C. pneumoniae* и различную локализацию поражений, вызываемых этими бактериями в организме хозяина. В качестве контроля при саль-

монельной инфекции использовали высокочувствительную линию мышей BALB/c (*Nramp1^s*).

Оценку показателей уровня резистентности к *S. typhimurium* осуществляли по:

- динамике выживаемости мышей при заражении различными дозами;

- высеваемости сальмонелл из органов зараженных животных на различных стадиях инфекции.

Анализ динамики выживаемости мышей при заражении дозами 100 и 10 микробных клеток (м.к.) выявил повышенную резистентность к инфекции животных линии A/Sn по сравнению с линиями I/St и BALB/c. При заражении 10 КОЕ продолжительность жизни мышей линии BALB/c составила в среднем 5 дней, мышей линии I/St - 7,5 дней, мышей линии A/Sn - 16 дней ($P < 0,01$). Около 5 % зараженных животных линии A/Sn переживали инфекцию (срок жизни более 21 дня).

Гибриды от скрещивания двух чувствительных линий (I/St x BALB/C) F1 оказались высоко резистентными к сальмонелльной инфекции: при заражении дозами 10 и 20 м.к./мышь все зараженные мыши переживали инфекцию (срок жизни более 21 дня). Высевы из селезенки и печени мышей (I/St x BALB/C)F1 через 35 дней после заражения выявили низкий титр бактерий (300-1000 КОЕ/мышь). Количество сальмонелл, высеваемых из органов мышей A/Sn, переживших инфекцию через 35 дней после заражения, было на порядок выше. Таким образом, обнаружена комплементация между *Nramp*-зависимой (BALB/c) и *Nramp*-независимой чувствительностью к сальмонеллам.

При оценке высеваемости сальмонелл из селезенки животных I/St и A/Sn на 4, 6, 8, 10 и 12 сутки инфекции оказалось, что при заражении в дозе 10 КОЕ/мышь у мышей A/Sn количество высеваемых бактерий постепенно снижалось, а у мышей I/St оставалось стабильным. Количество высеваемых бактерий из селезенки мышей A/Sn на 12 сутки инфекции было примерно в 1000 раз ниже, чем на 4 сутки.

Таким образом, мыши линии A/Sn, характеризующейся генетически обусловленной повышенной устойчивостью к туберкулезу, более резистентны и к сальмонелльной инфекции. Важно, что генетический механизм этой устойчивости не связан с геном *Nramp1*, поскольку обе исследуемые линии мышей несут один и тот же аллель *Nramp1^r*.

Сравнительный анализ течения инфекционного процесса, вызываемого *Chl. pneumoniae*, у мышей линий A/Sn и I/St позволил оценить, имеются ли межлинейные различия в контроле нетуберкулезной инфекции с легочной локализацией, вызываемой микроорганизмом с иным типом внутриклеточного паразитирования (внутри эпителиальных клеток и макрофагов). Мышей линий A/Sn и I/St заражали интраназально дозой $1,2 \times 10^4$ ВОЕ/мышь суспензии элементарных телец штамма *Chl. pneumoniae* Kajjani 6. В качестве контроля использовали мышей

обеих линий, которым вводили суспензию незараженных клеток HL. Оценку показателей уровня резистентности к инфекции осуществляли:

- по динамике выживаемости мышей линий A/Sn и I/St;

- по количественной оценке клеток *C. pneumoniae* в тканях легких методом ПЦР в реальном времени (real-time PCR).

Анализ динамики выживаемости мышей выявил повышенную устойчивость к инфекции животных линии A/Sn по сравнению с линией I/St: продолжительность жизни мышей составила, соответственно 22 и 9 дней ($P < 0,01$). Животные контрольной группы не погибали.

Оценку количества клеток *Chl. pneumoniae* в тканях легких методом ПЦР в реальном времени (real-time PCR) осуществляли с использованием флуоресцентных зондов типа «Taqman». Праймеры и зонды были выбраны в пределах гена, кодирующего 16S рРНК *Chl. pneumoniae*, в соответствии с правилами молекулярного дизайна программы «Primer Express» (Applied Biosystems).

Было показано, что среднее количество хламидийной ДНК в легких мышей линии A/Sn составляло $3,8 \times 10^4$ ГЭ/мг, а у мышей линии I/St - $4,2 \times 10^5$ ГЭ/мг, то есть было на порядок выше, чем у мышей линии A/Sn.

Таким образом, была выявлена схожесть течения туберкулезной, сальмонелльной и хламидийной инфекции у мышей A/Sn и I/St по основным параметрам (разница в сроках жизни и в количестве возбудителей в пораженных органах). Было показано, что животные линии A/Sn по сравнению с линией I/St обладают повышенной устойчивостью к сальмонеллезной и хламидийной инфекциям, несмотря на различные механизмы внутриклеточного паразитирования у *S. typhimurium* и *Chl. pneumoniae* и различную локализацию поражений, вызываемых этими бактериями, внутри организма хозяина.

Такое сходство в характере контроля макроорганизмом совершенно разных внутриклеточных инфекций позволяет предположить, что дальнейшее их исследование на мышах линий A/Sn и I/St позволит обнаружить физиологические основы контроля целого класса инфекций и выявить сеть генов, ответственных за их благоприятное и неблагоприятное течение. Дальнейшие исследования линий A/Sn и I/St в отношении чувствительности или резистентности к инфекциям, вызываемым *S. typhimurium* и *Chl. pneumoniae*, позволит прояснить молекулярно-генетические и физиологические особенности проявления соответствующих генотипов.

Список литературы

1. Eruslanov E.B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K., Majorov K.B., Scheglov I.V., Orlova M.O., Apt A.S.

2005. Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice. Infect. Immun., 73: 1744 - 1753.

2. Majorov K.B., Lyadova I.V., Kondratieva T.K., Eruslanov E.B., Rubakova E.I., Orlova M.O., Mischenko V.V., Apt A.S. 2003. Different innate ability of I/St and A/Sn mice to combat virulent Mycobacterium tuberculosis: phenotypes expressed in lung and extrapulmonary macrophages. Infect. Immun., 71: 697 - 707.

3. Nikonenko B.V., Averbakh M.M., Lavebratt C., Schurr E., Apt A.S. 2000. Comparative analysis of mycobacterial infections in susceptible I/St and resistant

A/Sn inbred mice. Tuber. Lung. Dis., 80: 15-25.

4. Pal S., Peterson E.M., de la Maza L.M. 2000. Role of Nramp1 deletion in chlamydia infection in mice. Infect. Immun., 68: 4831-4833.

5. Sanchez F., Radaeva T.V., Boris V. Nikonenko B.V., Persson A-S., Sengul S., Schalling M., Schurr E., Apt A.S., Lavebratt C. 2003. Multigenic control of disease severity after virulent Mycobacterium tuberculosis infection in mice. Infect. Immun., 71: 126-131.

6. Skamene E., Schurr E., Gros P. 1998. Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. Ann.Rev.Med., 49: 275-287.

поступила в редакцию 05.02.2005

отправлена на доработку 22.09.2005

принята к печати 17.10.2005