

## ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ У МЫШЕЙ, ИНФИЦИРОВАННЫХ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* И *B. THAILANDENSIS*

**С. В. Перепелицына, В. В. Алексеев, И. Б. Захарова, Н. Г. Плеханова, Д. В. Викторов**

*Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Волгоградский государственный медицинский университет*

С использованием техники ОТ-ПЦР были исследованы различия в экспрессии генов цитокинов у мышей, инфицированных штаммами *Burkholderia pseudomallei* и *B. thailandensis*. Максимальный уровень мРНК IFN- $\gamma$  и IL-12, цитокинов Th1-типа иммунного ответа был выявлен у животных, инфицированных авирулентным *B. thailandensis*. Острая инфекция, вызванная штаммом *B. pseudomallei* 100, напротив, характеризовалась прекращением продукции цитокинов IFN- $\gamma$  и IL-12 и возрастанием количества мРНК IL-10 к поздним срокам наблюдения. Транскрипционные профили цитокиновых генов мышей, зараженных аттенуированным мутантом *B. pseudomallei* 56770 99/10, был более близок случаю с *B. thailandensis*, однако выраженное сходство наблюдалось лишь в течение ранних сроков инфекции. Полученные результаты демонстрируют четкие отличия иммунного ответа при инфекции, вызванной *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, а использование данного методического подхода может быть полезно для изучения особенностей патогенеза буркхольдериозов на молекулярном уровне.

*Ключевые слова:* *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, цитокины, мРНК, дифференциальная экспрессия.

## DIFFERENTIAL EXPRESSION OF CYTOKINE GENES IN MICE INFECTED BY *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* AND *B. THAILANDENSIS*

**S. V. Perepelitsyna, V. V. Alekseev, I. B. Zakharova, N. G. Plekhanova, D. V. Viktorov**

Using RT-PCR technique, the differences in cytokine genes expression in mice infected by *Burkholderia pseudomallei* и *B. thailandensis* strains were investigated. The maximal mRNA level of IFN- $\gamma$  and IL-12, belongs to Th1-type cytokine profile of immune response, was revealed in mice infected by avirulent *B. thailandensis*. The acute melioidosis caused by *B. pseudomallei* 100, contrastly, was characterized by termination of IFN- $\gamma$  and IL-12 production and increase of IL-10 mRNA quantity in latest stages of observation. The transcription profiles of cytokine genes in mice infected by attenuated mutant *B. pseudomallei* 56770 99/10 was more related to case of *B. thailandensis*, however apparent similarity was matched in early stages of infection only. The obtained results demonstrate clear differences in immune response during infection caused by *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, and a given approach may be useful to investigate the traits of *Burkholderia* pathogenesis on molecular level.

*Key words:* *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia thailandensis*, cytokine, mRNA, differential expression.

Цитокины как средства межклеточных взаимодействий интенсивно изучаются в последнее время. Известно, что отдельные цитокины являются важнейшими иммунорегуляторными детерминантами, во многом определяющими характер течения различных инфекционных заболеваний. Гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ ), факторы некроза опухолей (TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ ) и некоторые интерлейкины (IL) следует относить к ключевым компонентам межклеточных сигнальных каскадов, определяющим уровень резистентности иммунной системы макроорганизма при развитии заболевания [2, 3, 9]. Известны два основных типа цитокинового ответа при развитии инфекции. Th1-цитокиновый профиль, ключевыми компонентами которого являются IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 и TNF- $\beta$ , в результате приводит к активации макрофагов и возрастанию резистентности макроорганизма к инфекционному агенту, тогда как Th2-цитокиновый ответ, характеризующийся преимущественной продукцией IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13, напротив, ведет к снижению активности клеточного звена иммунитета [4].

Молекулярные основы иммунного ответа макроорганизма при мелиоидозе, опасном инфекционном заболевании человека и животных, на сегодняшний день изучены крайне недостаточно и являются интенсивно развивающимся направлением исследований. В работах Ulett G. C. с соавт. [5, 6, 7, 8] был проведен анализ особенностей экспрессии различных групп цитокинов при экспериментальном мелиоидозе мышей линий BALB/c и C57BL/6 с использованием полуквантитативного метода оценки уровня соответствующих матричных РНК в реакции обратной транскрипции и последующей амплификации (ОТ-ПЦР). Авторами были отмечены различия используемых экспериментальных моделей по уровню продукции цитокинов как проинфламаторной, так и антиинфламаторной групп. Вместе с тем было установлено, что при инфицировании вирулентным штаммом *B. pseudomallei* ни у чувствительных к мелиоидозу мышей BALB/c, ни у более резистентной линии C57BL/6 не формировалась классическая поляризация Th1 и Th2 — клеточного ответа, а отсутствие значимого

уровня экспрессии IL-12 и превалирование продукции проинфламаторных цитокинов IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  в поздние сроки инфекции свидетельствовало о развитии острой формы заболевания с неблагоприятным прогнозом [6, 7].

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследование различий в экспрессии цитокинов Th1 (IFN- $\gamma$ , IL-12) и Th2 (IL-4, IL-10) — профилей иммунного ответа при экспериментальной инфекции белых мышей, вызванной штаммами возбудителя мелиоидоза и *B. thailandensis* различной вирулентности.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы вирулентный штамм *B. pseudomallei* 100, Tn9-индуцированный мутант *B. pseudomallei* 56770 99/10 со сниженной вирулентностью, дефектный по протеолитической активности и продукции отдельных мембранных белков, и природный изолят *B. thailandensis* E299 (LD50 для белых мышей  $1 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^6$  и более  $1 \times 10^8$  мк/мл соответственно).

Белых мышей массой 18—20 г заражали путем введения 0,5 мл суспензий суточных культур бактерий внутрибрюшинно. Дозы заражения составляли  $1 \times 10^3$  мк/мл для мелиоидозных штаммов и  $1 \times 10^6$  мк/мл в случае *B. thailandensis*. У животных опытных групп асептически забирали селезенку через 6 часов, 1, 3 и 6 суток после заражения. Фрагмент органа объемом 3—5 мм<sup>3</sup> помещали в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку с лизирующим буфером, содержащим гуанидинтиоцианат (Интерлабсервис, Россия). Пробы инкубировали в течение 40 мин. при 65 °C, далее тотальную РНК выделяли с использованием набора реагентов «Рибо-сорб» (Интерлабсервис, Россия) согласно рекомендациям производителя. Для очистки от примесей геномной ДНК образцы обрабатывали ДНКазой RQ1 (Promega, США), свободной от РНКаз.

Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили при 37 °C в течение 60 мин. с использованием набора «Реверта» (Интерлабсервис, Россия). 5 мкл продуктов реакции ОТ амплифицировали в ПЦР на программируемом термоциклере «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Реакция амплификации состояла из 35 циклов (денатурация 95 °C 30 с, отжиг праймеров 60 °C 30 с, синтез комплементарной цепи 72 °C 40 с) с финальным удлинением цепи при 72 °C в течение 4 мин. Реакционная смесь включала 50 пмоль специфических праймеров, 2,5 mM каждого dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, безмагниевого ПЦР-буфер и Taq полимеразу (Интерлабсервис, Россия). Олигонуклеотидные праймеры, использованные при постановке ПЦР, и размеры специфических ампликонов приведены в табл. Все праймеры синтезированы в НПФ «Литех» (Россия) по последовательностям, приведенным в работе [6].

Продукты амплификации анализировали в денатурирующем 6%-м полиакриламидном геле (ПААГ) с 7,0 M мочевины. Гели окрашивали нитратом серебра по Bassam B. J., et al. [1].

## Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

кДНК	Праймер	Последовательность (5' – 3')	Размер ампликона, п.н.
$\beta$ -actin	bact-s	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	348
	bact-a	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	
IFN- $\gamma$	ifng-s	AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG	243
	ifng-a	GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG	
IL-12	il12-s	GCAAGAGACACAGTCCTGGG	618
	il12-a	TGCATCAGCTCATCGATGGC	
IL-4	il4-s	CGAAGAACACCACAGAGAGTGAGCT	180
	il4-a	GACTCATTTCATGGTGCAGCTTATCG	
IL-10	il10-s	ACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA	237
	il10-a	CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAA	

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электрофореграмма ПЦР-ампликонов — фрагментов кДНК цитокиновых генов и гена  $\beta$ -актина показана на рис. 1. Размеры полученных нами фрагментов транскриптов соответствовали как ранее опубликованным данным [6], так и результатам проведенной предварительной оценки размеров продуктов ПЦР по последовательности транскриптов мРНК мыши, представленных в GenBank NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

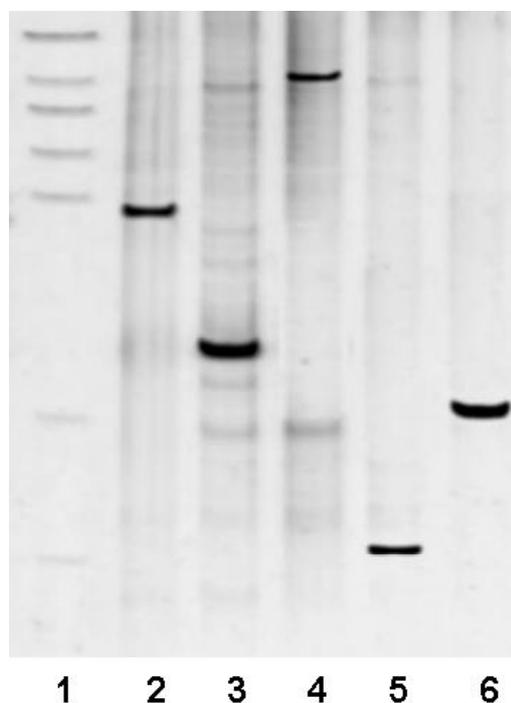


Рис. 1. Амплификация фрагментов транскриптов гена  $\beta$ -актина и цитокиновых генов мыши:

1 — маркерная ДНК (сверху вниз: 676, 517, 460, 396, 350 п.н.); 2 —  $\beta$ -актин; 3 — IFN- $\gamma$ ; 4 — IL-12; 5 — IL-4; 6 — IL-10. Размеры ампликонов приведены в табл.

$\beta$ -актин принадлежит к обязательным структурным компонентам цитоскелета эукариотических клеток. Уровень экспрессии  $\beta$ -актина, в отличие от цитокинов различных групп, является постоянным и довольно удобен как в качестве сравнительного эталона, так и в качестве положительного контроля прохождения этапов ОТ и ПЦР. Таким образом, ОТ-ПЦР с праймерами к фрагменту мРНК мышинового  $\beta$ -актина использовалась нами при исследовании всех серий препаратов РНК, выделенных из клеток селезенки в различные сроки инфекции.

Профили экспрессии цитокиновых генов в различные сроки экспериментальной инфекции мышей показаны на рис. 2. Из приведенных результатов видно, что уровень экспрессии гена  $\beta$ -актина оказался примерно одинаков в разные сроки забора материала

у животных, инфицированных вирулентным *B. pseudomallei* 100, слабовирулентным *B. pseudomallei* 56770 99/10 и авирулентным *B. thailandensis* E299.

Уровень экспрессии гена IFN- $\gamma$  у животных, зараженных мутантом *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, оказался высоким и приблизительно одинаковым в 1—3-и сутки инфекции. На 6-е сутки у мышей, инфицированных *B. pseudomallei* 56770 99/10, мы наблюдали снижение количества мРНК IFN- $\gamma$ , что является показателем уменьшения продукции данного цитокина. Вирулентный штамм возбудителя мелиоидоза вызвал увеличение экспрессии IFN- $\gamma$  лишь в течение 1 суток наблюдения, тогда как в дальнейшем продукция этого цитокина снизилась до первоначального уровня и фактически прекратилась к 6-м суткам.

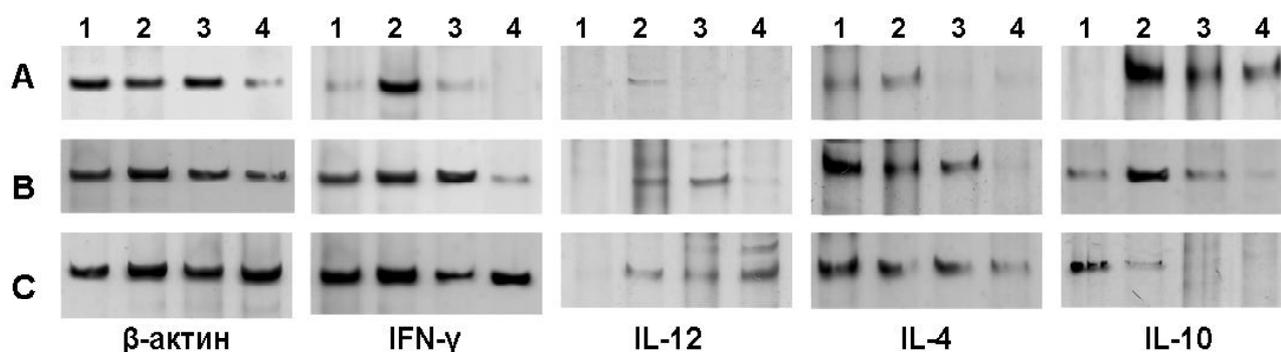


Рис. 2. Уровни мРНК  $\beta$ -актина и цитокиновых генов при инфицировании мышей *B. pseudomallei* (А — штамм 100; В — штамм 56770 99/10) и *B. thailandensis* (С — штамм E299). Забор материала через: 1—6 часов; 1—2 суток; 3—3 суток; 4—6 суток

Экспрессия IL-12 оказалась наиболее выраженной у мышей, зараженных *B. thailandensis*, начиная с первых суток инфекции, причем наблюдалось постепенное незначительное увеличение количества транскриптов IL-12 к поздним срокам наблюдения, тогда как в случае слабовирулентного мутанта *B. pseudomallei* увеличение продукции цитокина было отмечено лишь в течение 3-х суток инфекции. У животных, зараженных вирулентным штаммом мелиоидозного микроба, синтез IL-12 отмечался на довольно низком уровне лишь в первые сутки наблюдения.

Продукция IL-4, по данным исследования, начиналась с первых часов инфекционного процесса у всех трех опытных групп животных, причем максимальный уровень экспрессии соответствующих генов был зарегистрирован до 3 суток включительно у мышей, зараженных мутантом возбудителя мелиоидоза и *B. thailandensis*, тогда как при инфицировании *B. pseudomallei* 100 продукция данного цитокина прекращалась к 3-м суткам.

Максимальный уровень продукции IL-10 был обнаружен у животных, зараженных вирулентным штаммом, начиная с 24 часов. В группе, инфицированной *B. pseudomallei* 56770 99/10, экспрессия IL-

10 имела максимальный показатель в первые сутки исследования и постепенно снижалась в более поздние сроки. У мышей, зараженных *B. thailandensis*, мы наблюдали более раннее уменьшение уровня мРНК IL-10 и фактическое прекращение продукции данного цитокина к 3-м суткам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты, таким образом, свидетельствуют о существенных различиях в экспрессии генов цитокинов различных групп при инфекции мышей, вызванной штаммами буркхольдерий, отличающихся по вирулентности. Профили экспрессии цитокиновых генов, характерные для Th1-типа клеточного ответа, при котором происходит активация профессиональных фагоцитов, наблюдались лишь у животных, инфицированных *B. thailandensis*, и, в меньшей мере, при использовании мутантного штамма возбудителя мелиоидоза. Инфекционный процесс, вызванный *B. pseudomallei* 100, напротив, характеризовался прекращением продукции цитокинов, стимулирующих клеточное звено иммунитета (IFN- $\gamma$ , IL-12), и возрастанием количества мРНК IL-10 к поздним срокам наблюдения, что, по-видимому, свидетельствует

об ингибировании различных звеньев межклеточных взаимодействий и процессов фагоцитоза. Результаты исследования, по нашему мнению, достаточно показательны характеризуют отличия механизмов иммунного ответа при инфекционных процессах, вызванных различными штаммами возбудителя мелиоидоза и *B. thailandensis*, а использование данного методического подхода перспективно для изучения особенностей патогенеза буркхольдерииозов и иммунитета на молекулярном уровне.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Bassam B. J., Caetano-Anolles G., Gresshoff P. M. // *Anal Biochem.* — 1991. — Vol. 196. — P. 80—83.
2. Freeman M. M., Ziegler H. K. // *J. Immunol.* — 2005. Vol. 175. — P. 394—403.
3. Giacomini E., Iona E., Ferroni L., et al. // *J. Immunol.* — 2001. — Vol. 166. — P. 7033—7041.

4. Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., et al. // *J. Immunol.* — 1986. — Vol. 136. — P. 2348—2357.
5. Ulett G. C., Ketheesan N., Clair T. W., et al. // *Infect. Immun.* — 2002. — Vol. 70. — P. 3953—3958.
6. Ulett G. C., Ketheesan N., Hirst R. G. // *Infect. Immun.* — 2000. — Vol. 68. — P. 2034—2042.
7. Ulett G. C., Ketheesan N., Hirst R. G. // *Acta Trop.* — 2000. — Vol. 74. — P. 229—234.
8. Ulett G. C., Labrooy J. T., Currie B. J., et al. // *Microbes Infect.* — 2005. — Vol. 7. — P. 1263—1275.
9. Xue M. L., Thakur A., Lutze-Mann L., et al. // *Clin. Experiment. Ophthalmol.* — 2000. — Vol. 28. — P. 197—200.

## Контактная информация

Перепелицына Светлана Валерьевна — научный сотрудник лаборатории аэрогенного заражения ФГУЗ ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru

УДК 616.12-008.331.1

## ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СПОСОБНОСТЬ ЭНДОТЕЛИЯ И ПРОЦЕССЫ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОГО РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ У ПАЦИЕНТОВ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

*Е. А. Григоричева, Л. В. Сигидова*

*Челябинская государственная медицинская академия*

Проведено ультразвуковое исследование сердца и сосудов у 105 пациентов с артериальной гипертензией (АГ) и у 20 практически здоровых лиц. Нормальная функция эндотелия обнаружена у 26 пациентов (24 %), признаки дисфункции эндотелия — у 79 пациентов (76 %). Нарушенная способность плечевой артерии к релаксации соответствовала снижению кровотока в среднемозговой артерии и паренхиматозного почечного кровотока (с повышением уровня креатинина). У пациентов с гипертрофией левого желудочка наблюдалась реакция эндотелия в виде повышения сдвига на эндотелии (прирост скорости без прироста диаметра сосуда), замедления времени восстановления диаметра сосуда и снижения гемостатической способности сосудистой стенки.

*Ключевые слова:* артериальная гипертензия, функция эндотелия, ремоделирование сердца.

## ENDOTHELIAL FUNCTION AND CARDIOVASCULAR REMODELING IN ARTERIAL HYPERTENSION

*E. A. Grigorieva, L. V. Sigidiyova*

Ultrasound study of the heart and vessels was performed in 105 patients with arterial hypertension and 20 apparently healthy individuals. Normal endothelial function was noted in 26 patients (24 %), signs of endothelial dysfunction — in 79 patients (76 %). A disrupted ability of the brachial artery to relax corresponded to decreased blood flow in the medial cerebral artery and parenchymatous renal blood flow (with an increased creatinin level). Patients with left ventricular hypertrophy revealed an endothelial reaction in the form of increased endothelial shift (increased velocity without an increase in vascular diameter), slowed-down time of vascular diameter restoration and decreased hemostatic ability of the vascular wall.

*Key words:* arterial hypertension, endothelial function, heart remodeling.

Артериальная гипертензия (АГ) вызывает ряд адаптивных структурных изменений в сосудистой стенке, которые могут предрасполагать к раннему развитию атеросклероза [1]. В физиологических условиях эндотелий сосудов обеспечивает адекватную

вазодилатацию, угнетает активизацию и адгезию тромбоцитов, подавляет свертывающую систему крови, препятствует воспалительным процессам. АГ нарушает естественные механизмы защиты эндотелия, что приводит к воспалительным изменениям в стен-