

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В
СЕЛЕЗЕНКЕ И ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ
СТРЕССИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ И ВВЕДЕНИЯ ДЕФЕНСИНА
КРЫСЫ RATNP-3**

Алешина Г. М.¹,
Филатенкова Т. А.¹,
Шустов М. В.²

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

**EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTOR GENES IN RAT SPLEEN AND
HYPOTHALAMUS UNDER CONDITIONS OF STRESS EXPOSURE AND
ADMINISTRATION OF RAT DEFENSIN RATNP-3**

Aleshina G. M. ^a,
Filatenkova T. A. ^a,
Shustov M. V. ^b

^a FSBSI Institute of Experimental Medicine.

^b Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University.

Резюме

Инфекционные заболевания и иммунные расстройства веками являлись проблемой для человечества. Для борьбы с различными заболеваниями и инфекциями крайне важно получить глубокое понимание того, как запускаются и модулируются иммунные ответы. В этом отношении Toll-подобные рецепторы (TLR) стали одной из основных тем биомедицинских исследований, поскольку это семейство белков действует как одна из ранних детерминант активации иммунного ответа. Стресс - один из наиболее частых факторов, влияющих на иммунный ответ. Он вызывает перераспределение лейкоцитов в крови, изменение уровня гормонов и выработку цитокинов. Также показано, что в условиях стрессирующего воздействия увеличивается экспрессия гена *TLR4*. Известно, что Toll-подобные рецепторы могут активироваться эндогенными молекулярными факторами, связанными с повреждением (DAMP, или алармины). Можно предположить, что среди эндогенных соединений, концентрация которых увеличивается при неблагоприятных условиях, могут быть и антагонисты TLR, задачей которых является не допустить излишнюю экспрессию этих рецепторов. Целью исследования было определить, как превентивное введение эндогенного антимикробного пептида дефенсина RatNP-3 влияет на экспрессию генов *TLR3* и *TLR4* в гипоталамусе и селезёнке крыс после острого эмоционально-физического стресса, вызванного принудительным плаванием в холодной воде в течение двух минут. Через три часа после аппликации стресса крыс у животных извлекали селезенку и гипоталамус, выделяли РНК и проводили реакцию обратной транскрипции для получения кДНК. Экспрессию генов *TLR3* и *TLR4* оценивали относительно экспрессии гена «домашнего хозяйства» *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) методом ПЦР в режиме реального времени. В результате исследования показано, что через три часа после стрессового воздействия в гипоталамусе и селезёнке увеличивается экспрессия генов *TLR3* и *TLR4*. Однако предварительное внутрибрюшинное введение дефенсина снижает уровень экспрессии этих генов только в спленоцитах, но не влияет на их экспрессию в гипоталамусе. Выводы: получены данные, указывающие на системную активацию Toll-подобных рецепторов в гипоталамических структурах мозга и селезёнке в ответ на острый стресс. Тот факт, что введение эндогенных дефенсинов не влияет на экспрессию генов TLR в гипоталамусе, может свидетельствовать о том, что регуляторное действие дефенсинов нейтрофильных гранулоцитов не опосредуется через центральные механизмы регуляции.

Ключевые слова: стресс, Toll-подобные рецепторы, антимикробные пептиды, гипоталамус, селезенка, экспрессия генов.

Abstract

Infectious diseases and immune disorders have been a problem for humanity for centuries. To combat various diseases and infections, it is essential to gain a deep understanding of how immune responses are triggered and modulated. In this regard, Toll-like receptors (TLRs) have become one of the main topics of biomedical research, since this family of proteins acts as one of the early determinants of immune response activation. One of the most common causes of changes in the immune response are stressful effects, which lead to redistribution reactions of blood leukocytes, changes in hormonal levels and cytokine production. It has also been shown that under stressful conditions, *TLR4* gene expression increases. It is known that endogenous damage-associated molecular factors (DAMPs, or alarmins) can be ligands of Toll-like receptors. It can be assumed that among the endogenous compounds whose concentration increases under unfavorable conditions, there may be TLR antagonists, whose task is to prevent excessive expression of these receptors. The aim of the study was to determine how preventive administration of the endogenous antimicrobial peptide defensin RatNP-3 affects *TLR3* and *TLR4* gene expression in the hypothalamus and spleen of rats after acute emotional and physical stress induced by forced swimming in cold water for two minutes. Three hours after the application of stress to the rats, the spleen and hypothalamus were removed from the animals, RNA was isolated and a reverse transcription reaction was performed to obtain cDNA. The expression of the *TLR3* and *TLR4* genes was assessed relative to the expression of the housekeeping gene *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) by real-time PCR. It was found that three hours after stress exposure the expression of *TLR3* and *TLR4* genes increases in the hypothalamus and spleen. However, preliminary intraperitoneal administration of defensin reduces the expression level of these genes only in splenocytes, but does not affect their expression in the hypothalamus. Conclusions: These results indicate systemic activation of Toll-like receptors in hypothalamic structures of the brain and spleen in response to acute stress. The fact that administration of endogenous defensins does not affect the expression of TLR genes in the hypothalamus may indicate that the regulatory action of neutrophil granulocyte defensins is not mediated through central regulatory mechanisms.

Keywords: stress, Toll-like receptors, antimicrobial peptides, hypothalamus, spleen, gene expression.

1 Введение

Toll-подобные рецепторы (TLR) относятся к категории рецепторов распознавания образов (PRR) системы защиты хозяина. PRR распознают специфические молекулярные паттерны у микробов, известные как патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP), а также молекулы, высвобождаемые поврежденной клеткой хозяина, которые известны как молекулярные паттерны, связанные с повреждением (DAMP) [12]. Таким образом, PRR участвуют в развитии иммунного ответа против патогенов и помогают в процессе самовосстановления клетки.

Распознавание Toll-подобных рецепторов активирует сигнальный каскад, который продуцирует секретируемые цитокины и хемокины, которые затем активируют как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ [10]. TLR присутствуют как на иммунных клетках, включая моноциты, макрофаги, дендритные клетки, нейтрофилы, В-клетки, Т-клетки, тучные клетки, естественные клетки-киллеры, так и на неиммунных клетках, включая фибробласты, эпителиальные клетки, астроциты, кератиноциты и тромбоциты. [3, 4, 7]. TLR также представлены на различных опухолевых клетках, и их активация может индуцировать или уменьшать рост опухоли [6].

На сегодняшний день идентифицировано 13 членов семейства TLR, наиболее изучены из которых TLR2, TLR3 и TLR4. Рецепторы TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 и TLR10 расположены на поверхности клетки, а TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, и TLR13 – на мембранах внутриклеточных компартментов [9]. TLR взаимодействует с лигандом при участии корецепторных молекул (MD-2, CD14), что в дальнейшем приводит к инициации сигнального пути трансдукции, завершающейся продукцией провоспалительных молекулярных факторов (цитокинов, хемокинов и др.), интерферонов β/α или активацией регуляторных сигналов адаптивного иммунитета [5, 9].

Как уже было сказано, лигандами для Toll-подобных рецепторов могут служить эндогенные молекулы, связанные с повреждением клеток (DAMP или алармины). Можно предположить, что среди эндогенных соединений, концентрация которых увеличивается при неблагоприятных условиях, могут быть и антагонисты TLR, которые препятствуют излишней экспрессии этих рецепторов.

Одной из самых распространенных причин, вызывающих изменения иммунного ответа, являются стрессирующие воздействия, которые приводят к перераспределительным реакциям лейкоцитов крови, изменению гормонального уровня и продукции цитокинов. Ещё одним хорошо известным явлением при воздействии стресса является увеличение количества нейтрофилов. Хотя это явление широко известно и является стандартным проявлением реакции организма на стресс, его биологический смысл до конца не ясен. Можно предположить, что антимикробные пептиды и белки, которые

высвобождаются из нейтрофилов во внеклеточное пространство в процессе стресс-стимулированной дегрануляции, такие как пептиды дефенсины, могут не только проявлять антибиотическое действие, но и влиять на развитие стресс-реакции по принципу обратной связи. Так, показано, что предварительное введение дефенсина крысы снижает стресс-индуцированное повышение уровня кортикостерона в крови и оказывает нормализующее действие на изменение клеточного состава крови у крыс. [1].

Представляется возможным, что система TLR может играть важную роль в процессе активации врождённого иммунитета в ответ на стресс, и эндогенные антибиотические пептиды также участвуют в регуляции этого процесса.

Целью исследования было определить, как введение эндогенного антимикробного пептида дефенсина RatNP-3 влияет на экспрессию генов *TLR3* и *TLR4* в гипоталамусе и селезёнке крыс после острого эмоционально-физического стресса.

2 Материалы и методы

Работа была выполнена на взрослых крысах самцах массой 290-310 г породы Wistar. Крыс содержали согласно стандартам обращения с лабораторными животными.

Выделение дефенсина RNP-3 из лейкоцитов крысы проводили по схеме, применяемой для выделения антимикробных пептидов, включающей экстракцию пептидов в кислой среде, их разделение методами ультрафильтрации, препаративного электрофореза и обращено-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Получен высокоочищенный препарат RNP-3, чистоту и соответствие молекулярной массе подтверждали с помощью масс-спектрометрии MALDI TOF.

В качестве модели стресса использовали принудительное плавание в холодной воде. Одну группу животных помещали в бассейн, заполненный водой температурой 0-4°C, на 2 мин., другой группе перед плаванием вводили внутривенно дефенсин RatNP-3 в дозе 100 мкг/кг веса. В качестве контрольной группы животных были взяты крысы, не подвергавшиеся никаким воздействиям. В каждой группе было по 5-6 животных. Через 3 часа после плавания животных декапитировали и извлекали гипоталамус и селезенку.

Ткани гомогенизировали с помощью гомогенизатора Precellys Evolution, из полученного гомогенизата выделяли РНК (Gene Elute Mammalian total RNA mini preparation kit, Sigma-Aldrich), после чего с помощью метода обратной транскрипции синтезировали комплементарную ДНК (кДНК) (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific), затем методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (амплификатор CFX 96, Bio-Rad)

определяли относительную степень экспрессии генов *TLR3*, *TLR4* с помощью готовой смеси реактивов БиоМастер Hs-qPCR (2х). Уровень экспрессии генов оценивали относительно экспрессии гена домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH*).

Синтез праймеров осуществляла фирма Beagle (Санкт-Петербург):

TLR3 — прямая последовательность 5'-CGGTCAAGGTGTTCAAGA-3';

TLR3 — обратная последовательность 5'-GGATGGTAGAAGCGTGTT-3';

TLR4 — прямая последовательность 5'-CCTGAAGATCTTAAGAAGCTAT-3';

TLR4 — обратная последовательность 5'-CCTTGTCTTCAATTGTCTCAAT-3';

GAPDH — прямая последовательность 5'-CCTGCACCACCAACTGCTTAGC-3'; •

GAPDH — обратная последовательность 5'-GCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3'.

Специфичность продуктов амплификации контролировали по кривым плавления.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10.0 по U-критерию Манна-Уитни.

3 Результаты и обсуждение

Установлено, что экспрессия генов *TLR3* и *TLR4* повышается через 3 часа после стрессирующего воздействия, как в гипоталамусе, так и в селезенке, но превентивное введение дефенсина снижало уровень экспрессии этих генов только в спленоцитах (Таблица 1) и не влияло на экспрессию в гипоталамусе (Таблица 2).

Как известно, стресс вызывает значительные изменения в различных системах организма, включая многочисленные перераспределительные реакции в иммунной системе как на клеточном уровне, так и на уровне гуморальных факторов. Однако степень выраженности стресс-опосредованных изменений в иммунной системе и их направленность могут варьироваться в зависимости от типа стрессора и продолжительности его воздействия.

В нашем исследовании мы использовали хорошо изученную модель острого эмоционально-физического стресса, которая заключалась в том, что экспериментальные животные плавали в холодной воде в течение двух минут. Для этой модели характерны классические стресс-индуцированные реакции организма, такие как повышение уровня гормона стресса кортикостерона

через 30 минут после воздействия, увеличение количества нейтрофилов и другие [1].

Ранее мы уже получили данные о том, что после воздействия такого стресса через 3 часа в гипоталамусе повышается экспрессия генов *TLR3* и *TLR4* [2]. Рецептор *TLR3* расположен на поверхности эндосом и преимущественно распознаёт двухцепочечную РНК. Активация *TLR3* запускает противовирусный ответ, стимулируя синтез интерферонов I типа. Однако существуют данные о том, что этот тип рецепторов также участвует в патогенезе бактериальной пневмонии и системного гипервоспаления при сепсисе [11].

Ген *TLR4* кодирует Toll-подобный рецептор 4, который является наиболее изученным членом семейства PRR. Он экспрессируется на поверхности большинства клеток млекопитающих и распознаёт широкий спектр бактериальных PAMP. Также для него описаны эндогенные лиганды. Активация этого рецептора приводит к синтезу провоспалительных цитокинов [8].

4 Выводы

Таким образом, получены данные, указывающие на системную активацию Toll-подобных рецепторов в гипоталамических структурах мозга и селезёнке в ответ на острый стресс. Поскольку пути сигналинга, активируемые TLR, приводят к синтезу преимущественно провоспалительных факторов, активация целого комплекса TLR также может служить сигналом для развития системного воспаления при стрессе.

Тот факт, что введение эндогенных дефенсинов не влияет на экспрессию генов TLR в гипоталамусе, свидетельствует о том, что регуляторное действие дефенсинов нейтрофильных гранулоцитов не опосредуется через центральные механизмы регуляции

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, Государственное задание № 1022041101015-4-3.1.9 (FGWG-2025-0005).

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Экспрессия генов *TLR3* и *TLR4* относительно экспрессии гена *GAPDH* в селезенке крыс при плавательном стрессе и введении дефенсина RatNP-3 ($n = 5-6$; Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)).

Table 1. *TLR3* and *TLR4* gene expression relative to *GAPDH* gene expression in rat spleen under swimming stress and administration of defensin RatNP-3 ($n = 5-6$; Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)) ($n = 5-6$; Me ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$)).

№ No	Группы животных Groups of animals	Относительная экспрессия генов Relative gene expression	
		<i>TLR3</i>	<i>TLR4</i>
1	Интактные Intact	0,003826 (0,000868- 0,008912)	0,002590 (0,002400- 0,003450)
2	После стресса After stress	0,135842* (0,069348- 0,151774)	0,012580* (0,005505- 0,022955)
3	После стресса и введения дефенсина After stress and defensin administration	0,005384# (0,001748- 0,007340)	0,002565# (0,001540- 0,003150)

* – $p < 0,05$ относительно группы 1 (по U-критерию Манна-Уитни)

* – $p < 0.05$ vs group 1 according to the nonparametric Mann–Whitney U-test.

– $p < 0,05$ относительно группы 2 (по U-критерию Манна-Уитни)

– $p < 0.05$ vs group 2 according to the nonparametric Mann–Whitney U-test.

Таблица 2. Экспрессия генов *TLR3* и *TLR4* относительно экспрессии гена *GAPDH* в гипоталамусе крыс при плавательном стрессе и введении дефенсина RatNP-3 (n = 5-6; Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)).

Table 2. *TLR3* and *TLR4* gene expression relative to *GAPDH* gene expression in rat hypothalamus under swimming stress and administration of defensin RatNP-3 (n = 5-6; Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)).

№ No	Группы животных Groups of animals	Относительная экспрессия генов Relative gene expression	
		<i>TLR3</i>	<i>TLR4</i>
1	Интактные Intact	0,001194 (0,001004- 0,001818)	0,000502 (0,000259- 0,000758)
2	После стресса After stress	0,003562* (0,002323- 0,004334)	0,005715* (0,004373- 0,018426)
3	После стресса и введения дефенсина After stress and defensin administration	0,010525* (0,003217- 0,017701)	0,011078* (0,006867- 0,019288)

* – $p < 0,05$ относительно группы 1 (по U-критерию Манна-Уитни)

* – $p < 0.05$ vs group 1 according to the nonparametric Mann–Whitney U-test.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Алешина Галина Матвеевна, доктор биологических наук, доцент, заведующий лабораторией общей патологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

адрес: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12;

телефон: 8(812)234-0764;

e-mail: aleshina.gm@iemspb.ru

Aleshina Galina Matveevna, PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory of General Pathology, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

address: 197022, Russia, Saint-Petersburg, 12, Acad. Pavlov Street;

telephone: 8(812)234-0764;

e-mail: aleshina.gm@iemspb.ru

Блок 2. Информация об авторах

Филатенкова Татьяна Александровна, научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия;

Filatenkova Taniana Aleksandrovna, Research Associate, Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia;

Шустов Марк Васильевич, лаборант, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия;

Shustov Mark Vasilievich, Laboratory Assistant, Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, Saint Petersburg, Russia.

Блок 3. Метаданные статьи

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ TOLL-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В СЕЛЕЗЕНКЕ И ГИПОТАЛАМУСЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ СТРЕССИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ И ВВЕДЕНИЯ ДЕФЕНСИНА КРЫСЫ RATNP-3

EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTOR GENES IN RAT SPLEEN AND HYPOTHALAMUS UNDER CONDITIONS OF STRESS EXPOSURE AND ADMINISTRATION OF RAT DEFENSIN RATNP-3

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ДЕФЕНСИН RATNP-3 И АКТИВНОСТЬ ГЕНОВ TLR

DEFENSIN RATNP-3 AND TLR GENE ACTIVITY

Ключевые слова: стресс, Toll-подобные рецепторы, антимикробные пептиды, гипоталамус, селезенка, экспрессия генов.

Keywords: stress, Toll-like receptors, antimicrobial peptides, hypothalamus, spleen, gene expression.

Иммунологические чтения в Челябинске.

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 2,

Количество рисунков – 0.

26.03.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1.	Янкелевич И.А., Алешина Г.М., Кокряков В.Н. Особенности развития стресс-реакции у крыс при стрессирующем воздействии и введении антимикробного пептида дефенсина RatNP-3 // Медицинский академический журнал. 2014. Т. 14. № 4. С. 63-67.	Yankelevich I.A., Aleshina G.M., Kokryakov V.N. Some features of the stress reaction in rats after exposure to stress and administration of antimicrobial peptide defensin RatNP-3. <i>Medicinskij akademicheskij zhurnal = Medical academic journal</i> , 2014, Vol. 14, no. 4, pp. 63-67.	https://elibrary.ru/download/elibrary_22827740_25906503.pdf
2.	Янкелевич И.А., Шустов М.В., Мартышкина Ю.С., Филатенкова Т.А. Стресс-индуцированное повышение экспрессии генов TLR2, TLR3 и TLR4 в клетках гипоталамуса // Медицинский академический журнал. 2020. Т. 20. № 2. С. 11-16.	Yankelevich I.A., Shustov M.V., Martyshkina Yu.S., Filatenkova T.A. Stress-induced increased expression of TLR2, TLR3, and TLR4 genes in hypothalamic tissue. <i>Medicinskij akademicheskij zhurnal = Medical academic journal</i> , 2020, Vol. 20, no. 2, pp. 11-16.	https://doi.org/10.17816/MAJ33432
3.	Aletaha S., Haddad L., Roozbehki, M., Bigdel, R., Asgary V., Mahmoudi M., Mirshafiey A. M2000 (b-D-mannuronic acid) as a novel antagonist for blocking the TLR2 and TLR4 downstream signalling pathway. <i>Scand. J. Immunol.</i> , 2017, Vol. 85, pp. 122–129.		https://doi.org/10.1111/sji.12519
4.	Cognasse F., Nguyen K. A., Damien P., McNicol A., Pozzetto B., Hamzeh-Cognasse H., Garraud O. The inflammatory role of platelets via their		https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00083

	TLRs and siglec receptors. <i>Front. Immunol.</i> , 2015, Vol. 6, Article 83.		
5.	De Nardo D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. <i>Cytokine</i> , 2015, Vol. 74, no. 2, pp. 181-189.		https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.025
6.	Muccioli M., Benencia F. Toll-like receptors in ovarian cancer as targets for immunotherapies. <i>Front. Immunol.</i> , 2014, Vol. 5, Article 341.		https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00341
7.	Ospelt C., Gay S. TLRs and chronic inflammation. <i>Int. J. Biochem. Cell Biol.</i> 2010, Vol. 42, pp. 495-505.		https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.10.010
8.	Picard C, Casanova JL, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I κ B α deficiency. <i>Clin Microbiol Rev.</i> , 2011, Vol. 24, no. 3, pp. 490-497.		https://doi.org/10.1128/CMR.00001-11
9.	Satoh T, Akira S. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins. <i>Microbiol Spectr.</i> , 2016, Vol. 4, no. 6.		https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0040-2016 .
10.	Shi M., Chen X., Ye K., Yao Y., Li Y. Application potential of toll-like receptors in cancer immunotherapy: systematic review. <i>Medicine (Baltimore)</i> , 2016, Vol. 95, e3951.		https://doi.org/10.1097/MD.0000000000003951

11.	Suresh M.V., Dolgachev V.A., Zhang B., Balijepalli S., Swamy S., Mooliyil J., Kralovich G., Thomas B., Machado-Aranda D., Karmakar M., Lalwani S., Subramanian A., Anantharam A., Moore B.B., Raghavendran K. TLR3 absence confers increased survival with improved macrophage activity against pneumonia. <i>JCI Insight</i> , 2019, Vol. 4, no. 23, e131195.		https://doi.org/10.1172/jci.insight.131195
12.	Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: past, present, and future. <i>Int. Immunopharmacol.</i> , 2018, Vol. 59, pp. 391-412.		https://doi.org/10.1016/J.INTIMP.2018.03.002