

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ТOLL-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», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия

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 селезенке 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 селезенке увеличивается экспрессия генов *TLR3* и *TLR4*. Однако предварительное внутрибрю-

Адрес для переписки:

Алешина Галина Матвеевна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика
Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-07-64.
E-mail: aleshina.gm@iemspb.ru

Address for correspondence:

Galina M. Aleshina
Institute of Experimental Medicine
12, Acad. Pavlov St
St. Petersburg
197022 Russian Federation
Phone: +7 (812) 234-07-64.
E-mail: aleshina.gm@iemspb.ru

Образец цитирования:

Г.М. Алешина, Т.А. Филатенкова, М.В. Шустов
«Экспрессия генов Toll-подобных рецепторов в селезенке
и гипоталамусе крыс в условиях стрессирующего
воздействия и введения дефенсина крысы RatNP-3»
// Российский иммунологический журнал, 2025. Т. 28,
№ 3. С. 561-566.
doi: 10.46235/1028-7221-17139-EOT

© Алешина Г.М. и соавт., 2025
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

G.M. Aleshina, T.A. Filatenkova, M.V. Shustov “Expression
of Toll-like receptor genes in rat spleen and hypothalamus
under conditions of stress exposure and administration
of rat defensin RatNP-3”, Russian Journal of Immunology/
Rossiyskiy Immunologicheskii Zhurnal, 2025, Vol. 28, no. 3,
pp. 561-566.
doi: 10.46235/1028-7221-17139-EOT

© Aleshina G.M. et al., 2025
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-17139-EOT

шинное введение дефенсина снижает уровень экспрессии этих генов только в спленоцитах, но не влияет на их экспрессию в гипоталамусе. Получены данные, указывающие на системную активацию Toll-подобных рецепторов в гипоталамических структурах мозга и селезенке 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

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 Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Infectious diseases and immune disorders present a problem for mankind for centuries. To combat various diseases and infections, it is essential to gain 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. Stress factors are among the most common causes of changes in the immune response which lead to rearranged response of blood leukocytes, altered hormonal levels and cytokine production. It has also been shown that *TLR4* gene expression increases under stressful conditions. Endogenous damage-associated molecular factors (DAMPs, or alarmins) are known to be potential ligands of Toll-like receptors. One may assume that, TLR antagonists may be among the endogenous compounds whose concentration increases under unfavorable conditions, Their 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 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 stress exposure 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. Expression of *TLR3* and *TLR4* genes was assessed, with a reference to the housekeeping gene *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) expression, being determined by real-time PCR. Three hours after stress exposure, the expression of *TLR3* and *TLR4* genes was found to increase in hypothalamus and spleen. However, the pre-exposure intraperitoneal administration of defensin reduced the expression level of these genes only in splenocytes, but did not affect their expression in hypothalamus. These results indicate to the stress-induced systemic activation of Toll-like receptors in hypothalamic structures of the brain and spleen cells. Since the administration of endogenous defensins did not affect expression of TLR genes in hypothalamus, one may suggest that the regulatory action of neutrophilic defensins is not mediated *via* central regulatory mechanisms.

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

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

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 корцепторных 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 стрессорные воздействия, которые приводят к перераспределительным реакциям лейкоцитов крови, изменению гормонального уровня и продукции цитокинов. Еще 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 врожденного 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 селезенке крыс после острого эмоционально-физического стресса.

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 °С, на 2 мин, другой группе перед плаванием вводили внутривентриально 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, США), после чего с помощью метода обратной транскрипции синтезировали комплементарную ДНК (кДНК) (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific, США), затем методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (амплификатор CFX 96, Bio-Rad, США) определяли относительную

степень экспрессии генов *TLR3*, *TLR4* с помощью готовой смеси реактивов «БиоМастер» Нs-qPCR (2x). 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.

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 (табл. 1) и не влияло на экспрессию в гипоталамусе (табл. 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 стрессопосредованных 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 стрессиндуцированные 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 распознает 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

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}))

№ 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)

Примечание.* – p < 0,05 относительно группы 1 (по U-критерию Манна–Уитни), # – p < 0,05 относительно группы 2 (по U-критерию Манна–Уитни).

Note. *, p < 0.05 vs group 1 according to the nonparametric Mann–Whitney U test; #, 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	
		TLR3	TLR4
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 де- фенсина After stress and defensin administration	0,010525* (0,003217-0,017701)	0,011078* (0,006867-0,019288)

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

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

семейства PRR. Он экспрессируется на поверхности большинства клеток млекопитающих и распознает широкий спектр бактериальных PAMP. Также для него описаны эндогенные лиганды. Активация этого рецептора приводит к синтезу провоспалительных цитокинов [8].

Выводы

Таким образом, получены данные, указывающие на системную активацию Toll-подобных рецепторов в гипоталамических структурах мозга

и селезенке 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.

Список литературы / References

1. Янкевич 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. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*, 2014, Vol. 14, no. 4, pp. 63-67. (In Russ.)]
2. Янкевич 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. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*, 2020, Vol. 20, no. 2, pp. 11-16. (In Russ.)]
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. *Scand. J. Immunol.*, 2017, Vol. 85, pp. 122-129.
4. Cognasse F., Nguyen K. A., Damien P., McNicol A., Pozzetto B., Hamzeh-Cognasse H., Garraud O. The inflammatory role of platelets via their TLRs and siglec receptors. *Front. Immunol.*, 2015, Vol. 6, 83. doi: 10.3389/fimmu.2015.00083.
5. De Nardo D. Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*, 2015, Vol. 74, no. 2, pp. 181-189.
6. Muccioli M., Benencia F. Toll-like receptors in ovarian cancer as targets for immunotherapies. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, 341. doi: 10.3389/FIMMU.2014.00341.
7. Ospelt C., Gay S. TLRs and chronic inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010, Vol. 42, pp. 495-505.
8. Picard C., Casanova J.L., Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IκBα deficiency. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2011, Vol. 24, no. 3, pp. 490-497.

9. Satoh T., Akira S. Toll-like receptor signaling and its inducible proteins. *Microbiol. Spectr.*, 2016, Vol. 4, no. 6. doi: 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. *Medicine (Baltimore)*, 2016, Vol. 95, e3951. doi: 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. *JCI Insight*, 2019, Vol. 4, no. 23, e131195. doi: 10.1172/jci.insight.131195.
12. Vijay K. Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: past, present, and future. *Int. Immunopharmacol.*, 2018, Vol. 59, pp. 391-412.

Авторы:

Алешина Г.М. — д.б.н., доцент, заведующая лабораторией общей патологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Филатенкова Т.А. — научный сотрудник лаборатории общей патологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Шустов М.В. — лаборант научно-образовательного центра ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Aleshina G.M., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Laboratory of General Pathology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Filatenkova T.A., Research Associate, Laboratory of General Pathology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Shustov M.V., Laboratory Assistant, Scientific and Educational Center, St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 26.03.2025
Принята к печати 25.05.2025

Received 26.03.2025
Accepted 25.05.2025