

ВЛИЯНИЕ АГАРОВЫХ И БИОПЛЕНОЧНЫХ КУЛЬТУР *FRANCISELLA TULARENSIS* НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ TLR2 И TLR4 В КЛЕТКАХ КРОВИ И СЕЛЕЗЕНКИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

**Дубровина В.И.,
Пятидесятникова А.Б.,
Юрьева О.В.,
Корытов К.М.,
Старовойтова Т.П.,
Мазепа А.В.,
Наумова К.В.,
Балахонов С.В.**

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Дубровина Валентина Ивановна,
e-mail: dubrovina-valya@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Биопленка является формой существования многих бактерий, позволяющая им выживать в неблагоприятных условиях внешней среды. К таким патогенам относятся некоторые штаммы возбудителя туляремии. Иммуногенные свойства штаммов *Francisella tularensis*, способных к образованию биопленки, изучены недостаточно. Одним из ключевых показателей активации врожденного иммунитета является повышение уровня экспрессии TLRs (Toll-подобные рецепторы). Сравнительный анализ экспрессии генов TLRs в иммунокомпетентных клетках животных, инфицированных биопленочными и агаровыми культурами, позволит оценить их иммуногенный потенциал и адаптивную пластичность, а также дополнит новыми данными имеющиеся сведения о патогенезе туляремии.

Цель работы. Оценить влияние биопленочных и агаровых культур *F. tularensis* на экспрессию генов TLRs 2 и 4 типов клетками крови и селезенки белых мышей.

Материалы и методы. Исследование проведено на 125 сертифицированных беспородных белых мышах. Забор материала (кровь и селезенка) осуществляли на 1, 2, 3, 7 и 14 сутки. В работе использовали семисуточные биопленочные и двухсуточные агаровые культуры аттенуированного вакцинного штамма *F. tularensis* 15В линии НИИЭГ и авирулентного *F. tularensis* И-384. Детекцию молекул РНК и обратную транскрипцию выполняли с помощью коммерческих комплектов реагентов. Концентрацию кДНК TLR2 и TLR4 определяли методом ПЦР в реальном времени с применением специфических праймеров.

Результаты. Сравнительный анализ экспрессии генов TLR2 и TLR4 в ответ на введение биопленочных и агаровых культур *F. tularensis* выявил статистически значимое увеличение экспрессии генов TLRs в клетках экспериментальных животных, инфицированных биопленочными культурами по сравнению с агаровыми культурами.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии подвидовой принадлежности штамма *F. tularensis* и условий его культивирования на экспрессию генов TLR2 и TLR4 в клетках крови и селезенки белых мышей при экспериментальной туляремии.

Ключевые слова: TLR, биопленка, *Francisella tularensis*, иммунитет

Статья поступила: 04.12.2024
Статья принята: 15.05.2025
Статья опубликована: 17.07.2025

Для цитирования: Дубровина В.И., Пятидесятникова А.Б., Юрьева О.В., Корытов К.М., Старовойтова Т.П., Мазепа А.В., Наумова К.В., Балахонов С.В. Влияние агаровых и биопленочных культур *Francisella tularensis* на экспрессию генов TLR2 и TLR4 в клетках крови и селезенки экспериментальных животных. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(3): 208-216. doi: 10.29413/ABS.2025-10.3.22

EFFECT OF AGAR AND BIOFILM CULTURE OF *FRANCISELLA TULARENSIS* ON TLR2 AND TLR4 GENES EXPRESSION IN BLOOD AND SPLEEN CELLS OF EXPERIMENTAL ANIMALS

**Dubrovina V.I.,
Pyatidesyatnikova A.B.,
Yuryeva O.V.,
Korytov K.M.,
Starovoitova T.P.,
Mazepa A.V.,
Naumova K.V.,
Balakhonov S.V.**

Irkutsk Anti plague Research
Institute of Siberia and Far East
of Rospotrebnadzor (st. Trilissera 78,
Irkutsk 664047, Russian Federation)

Corresponding author:
Valentina I. Dubrovina,
e-mail: dubrovina-valya@mail.ru

RESUME

Biofilm as a form of existence of many bacteria that allows them to survive in unfavorable environmental conditions. Such pathogens include some strains of tularemia pathogen. Immunogenic properties of Francisella tularensis strains capable of biofilm formation are insufficiently studied. One of the key indicators of the activation of innate immunity is an increase in the level of TLRs expression. A comparative analysis of TLRs gene expression in immunocompetent cells of animals infected with biofilm and agar cultures will allow us to assess the degree of their adaptive capacity to the pathogen, as well as add to the existing data on the pathogenesis of tularemia.

The aim. To evaluate the effect of biofilm and agar cultures of *F. tularensis* on the expression of TLRs genes of types 2 and 4 by blood and spleen cells of white mice.

Materials and methods. The study was carried out on 125 certified mongrel white mice. Material (blood and spleen) was collected on days 1, 2, 3, 7 and 14. Seven-day-old biofilm and two-day-old agar cultures of attenuated vaccine strain *F. tularensis* 15B of the NILEG line and avirulent *F. tularensis* I-384 were used to create experimental tularemia infection. RNA molecule detection and reverse transcription were performed using commercial reagent kits. TLR2 and TLR4 cDNA concentration was determined by real-time PCR using specific primers.

Comparative analysis of TLR2 and TLR4 gene expression in response to the introduction of biofilm and agar cultures of *F. tularensis* revealed a statistically significant increase in TLRs gene expression in cells of experimental animals infected with biofilm cultures compared to agar cultures.

Conclusion. The obtained results indicate a significant effect of *F. tularensis* subspecies and conditions of its cultivation on TLR2 and TLR4 genes expression in blood and spleen cells of white mice in experimental tularemia.

Key words: TLR, biofilm, *Francisella tularensis*, immunity

Received: 04.12.2024
Accepted: 15.05.2025
Published: 17.07.2025

For citation: Dubrovina V.I., Pyatidesyatnikova A.B., Yuryeva O.V., Korytov K.M., Starovoitova T.P., Mazepa A.V., Naumova K.V., Balakhonov S.V. Effect of agar and biofilm culture of *Francisella tularensis* on TLR2 and TLR4 genes expression in blood and spleen cells of experimental animals. *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(3): 208-216. doi: 10.29413/ABS.2025-10.3.22

ВВЕДЕНИЕ

Биопленки представляют собой организованное сообщество микроорганизмов, закрепленное на живых и неживых поверхностях при помощи полимерных структур, синтезированных членами сообщества. Эти экзо-полимерные структуры биопленок образуются из полисахаридов, белков, липидов и нуклеиновых кислот и могут содержать различные микроорганизмы. Такая форма существования позволяет микробам выживать и персистировать в различных условиях. Инфекции, связанные с образованием биопленок, такие как раневые, ушные, лёгочные и т.д., трудно поддаются лечению, поскольку патогенные микроорганизмы в составе таких сообществ обладают резистентностью к антибиотикам и иммунным механизмам хозяина [1, 2, 3].

Понимание вирулентности и патогенеза *Francisella tularensis* значительно продвинулось в последние годы, включая исследования, касающиеся способности возбудителя образовывать биопленку. *F. tularensis* способна менять свой стиль жизни на внутриклеточный, персистирующий, «некультивируемый», симбиотический или свободноживущий, в зависимости от среды, в которую она попадает. Для патогенных бактерий биопленка является фактором адаптации к внешней среде. Роль биопленкообразования в вирулентности патогена до конца не выявлена, возможно, данная способность может являться ключевым механизмом выживания и устойчивости в окружающей среде [4, 5].

Опубликованы данные о существовании популяции туляремийной бактерии в водно-болотной среде, насыщенной простейшими с высокой питательной доступностью [6, 7].

Способность поражать и размножаться в различных клетках хозяина является одной из главных особенностей экологии и эпидемиологии *F. tularensis* subsp. *holarctica*. После инфицирования эукариотических клеток бактерии *F. tularensis* быстро диссеминируют и размножаются в селезенке, печени, легких, лимфатических узлах и костном мозге [8, 9].

Подвид *F. tularensis* subs. *novicida* никогда не идентифицировали у диких животных и членистоногих переносчиков. Единственным источником изолята *F. tularensis* subs. *novicida* была вода в штате Юта (США, 1951 г.). Позже сообщалось о выделении и идентификации новацидоподобного подвида *F. tularensis* из раны на ноге, полученной в солоноватой воде на территории Австралии [10, 11]. Известно, что *F. tularensis* subs. *novicida* может вызывать заболевание только у людей с ослабленным иммунитетом и обладает сниженной вирулентностью для кроликов [12]. Обычно этот подвид используют в качестве объекта для лабораторных исследований, поскольку он способен инфицировать макрофаги *in vitro* и вызывать заболевания у мышей [13].

По некоторым данным, биопленочные культуры приобретают свойства, при которых бактериальные клетки способны вызывать более выраженные патологические изменения в органах и тканях [14]. Также имеются сведения о том, что *F. tularensis*, культивируемая в питательном

бульоне, быстро и спонтанно переходит в неподдающееся культивированию состояние (некультивируемые формы, НФ), пик которого приходится на 7 сутки. При этом клетки туляремийного микроба сохраняют свою жизнеспособность. Фагоциты реагируют на бактерии, находящиеся в состоянии НФ, интенсивно продуцируя провоспалительный цитокин TNF- α , секретируемый в результате сигнала TLR4 (Toll-подобные рецепторы 4 типа). Вместе с тем, клетки макроорганизма, зараженные культивируемым типом туляремийного микроба продуцируют данный цитокин, в количестве, сопоставимом с его продукцией интактными клетками [15].

Исследования, связанные с оценкой иммуногенного потенциала биопленочных культур *F. tularensis* имеют большое фундаментальное и практическое значение. Ключевую роль в активации врожденного иммунитета играют TLR, которые распознают консервативные структуры микроорганизмов и индуцируют развитие иммунного ответа. Выработка цитокинов опосредована экспрессией TLR2. Воспаление, также необходимое для быстрой активации врожденного иммунитета, индуцирует экспрессия TLR4. Лигандами для TLR являются липополисахарид (ЛПС), некоторые белки теплового шока, гликолипиды, липопротеины, липопептиды и др.

ЛПС туляремийного микроба является главным антигенным компонентом клеточной стенки. В его состав входит липид А, О-полисахарид (О-антиген), высоковариабильные углеводы. Липид А и О-антиген в составе ЛПС могут подвергаться модификации. Установлена связь между модификацией компонентов ЛПС *F. tularensis* и способностью туляремийного микроба «ускользнуть» от иммунных процессов. Механизмы защиты возбудителя туляремии от иммунной системы связывают с тем, что рецепторам TLR сложно идентифицировать измененную структуру ЛПС рецепторами [8]. Установлено, что вирулентность подвидов *F. tularensis* зависит от соотношения массы углеводной части (основная часть состоит из О-антигена) и массы гидрофобной (липид А). Чем выше это соотношение, т.е. масса гидрофильной части больше массы липида А, тем наиболее вирулентный подвид [16].

Способность *F. tularensis* нарушать передачу сигналов TLR2 и оставаться незамеченным для клеток макроорганизма на ранних стадиях после заражения играет центральную роль, что обеспечивает репликацию и выживание туляремийного микроба во внутриклеточной нише [17]. Уровень экспрессии TLR2, индуцированной *Francisella*, варьирует в зависимости от подвида. Установлено, что *F. tularensis* subs. *novicida* значительно увеличивает экспрессию TLR2 после заражения, в то время как при инфицировании *F. tularensis* уровень TLR2 снижается [18].

Таким образом, изучение экспрессии генов Toll-подобных рецепторов экспериментальных животных важно для выяснения особенностей иммунных механизмов хозяина, которые активируются при проникновении в его клетки патогенных микроорганизмов, поскольку эти рецепторы являются основными рычагами системы врожденной реакции организма, инициирующей иммунный ответ. Исследование экспрессии

генов TLR2 и TLR4 в иммунокомпетентных клетках экспериментальных животных под действием биопленочных культур *F. tularensis* позволит оценить иммуногенный потенциал и адаптивную пластичность различных штаммов туляремийного микроба и может послужить фундаментом для разработки способов оптимизации оценки иммунного ответа на туляремийную инфекцию.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить влияние биопленочных и агаровых культур *F. tularensis* на экспрессию генов TLRs 2 и 4 типов клетками крови и селезенки белых мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В эксперименте использованы семисуточные биопленочные и двухсуточные агаровые культуры аттенуированного вакцинного штамма *F. tularensis* subs. *holarctica* 15B линии НИИЭГ (далее *F. tularensis* 15B) и штамма *F. tularensis* subs. *novicida* И-384 (далее *F. tularensis* И-384), полученные из музея живых культур ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Агаровую культуру получали путем выращивания туляремийной бактерии на FT-агаре с глюкозой, а биопленочную – на мясopептонном бульоне (МПБ) с добавлением глюкозы [19].

Исследование проведено на 125 сертифицированных беспородных белых мышах (НПО «Вектор») обоих полов, стандартных по условиям содержания и весу (18–20 г). Работа проводилась в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней», а также с требованиями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях и «Правил надлежащей лабораторной практики», утвержденных приказом Министерства здравоохранения № 199н от 01.04.2016 года. Исследование одобрено локальным этическим комитетом института (протокол № 3 от 01.06.2020 г., протокол № 7 от 15.11.2021 г.).

Животных разделили на 4 опытные и одну контрольную группы (по 25 особей). Культуру клеток в концентрации 4 КОЕ/мл (LD_{50}) вводили белым мышам подкожно во внутреннюю поверхность правого бедра в дозе 0,5 мл: I группе – агаровую культуру штамма *F. tularensis* 15B, II – биопленочную культуру штамма *F. tularensis* 15B, III – агаровую культуру штамма *F. tularensis* И-384, IV – биопленочную культуру штамма *F. tularensis* И-384. В контрольной (V) группе использовали интактных животных. Наблюдения проводили в течение 14 суток. Из эксперимента белых мышей выводили гуманным способом. Забор биологического материала (кровь, селезенку) осуществляли на 1, 2, 3, 7 и 14 сутки. Кровь использовали цельную, селезенку гомогенизированной.

Материал подвергали обеззараживанию согласно методическим указаниям МУ 3.5.5.1034-01. Исследуемые образцы (100 мкл) и лизирующий буфер (300 мкл) помещали в микропробирки на 1,5 мл типа «Eppendorf», смешивали и прогревали при температуре 65 °C в течение 15 мин.

Экстракцию РНК из биологического материала проводили с помощью комплекта реагентов для выделения тотальной РНК из цельной крови, клеточных культур и образцов тканей РНК-ЭКСТРАН (ООО «Синтол», г. Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Для расщепления геномной ДНК в пробах применяли фермент ДНКазу (ООО «Синтол», г. Москва) согласно инструкции. Инкубирование образцов при 37 °C в течение 30 минут и термической инактивации при 75 °C – 10 мин, приводило к полному распаду геномной ДНК, отсутствие которой оценивали с помощью ПЦР-РВ. Затем, определяли концентрацию РНК в пробе с помощью спектрофотометра NanoDrop (Thermo Fisher, США) и приводили содержание РНК к 0,1 нг/мкл.

Синтез комплементарной ДНК на матрице одноцепочечной РНК проводили с использованием набора реагентов для проведения реакции обратной транскрипции (ОТ) и приводили концентрацию кДНК к 50 нг/мкл. Для определения относительной концентрации (ОК) комплементарной ДНК (кДНК), полученной в результате реакции обратной транскрипции применяли метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) с помощью набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (ООО «Синтол», г. Москва). При постановке реакции использовали канал детекции FAM при следующих условиях: предварительная инкубация – 50 °C в течение 2 мин, начальная стадия денатурации при 95 °C – 2 мин, затем 40 циклов денатурации в течение 15 с при 95 °C и отжига при 60 °C – 30 с. Амплификацию проводили в трех повторах, в качестве отрицательного контроля использовали деионизированную воду. Относительную концентрацию генов TLRs определяли с помощью порогового цикла (C_T) и нормировали относительно гена «домашнего хозяйства» GAPDH, который кодирует фермент глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы. Используемые в реакциях специфические пары праймеров мышиных TLR2, TLR4 и GAPDH [20], синтезированные ООО «Люмипроб РУС» (Россия), представлены в таблице 1. ПЦР-РВ проводили в амплификаторе детектирующем ДТ-прайм (ООО «ДНК-технологии», г. Москва).

ПЦР-РВ проводили в амплификаторе детектирующем ДТ-прайм (ООО «ДНК-технологии», г. Москва).

Исследование по оценке уровня экспрессии генов TLRs проводили в трех независимых репликациях, оценивали внутритестовую и межтестовую вариабельность данных, определяя коэффициенты вариации и стандартное отклонение. Статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel. Достоверность между группами оценивали непараметрическим методом U-критерия Манна – Уитни. Относительную концентрацию выражали в условных единицах (у.е). Результаты считали достоверными при значении $p < 0,05$.

ТАБЛИЦА 1

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ
В ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

TABLE 1

SPECIFIC PRIMERS USED IN REAL-TIME PCR

№	Ген	Последовательность нуклеотидов (5'→ 3')	Длина продукта (bp)
1	GAPDH	F: TGAGCAAGAGAGGCCCTATC R: AGGCCCCCTCTGTTATTATG	94
2	TLR2	F: CAGCTGGGAGAACTCTGACCC R: CAAAGAGCCTGAAGTGGGAG	193
3	TLR4	F: CAACATCATCCAGGAAGGC R: GAAGGCGATACAATTCCACC	206

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что введение, как агаровой, так и биопленочной культуры *F. tularensis* И-384, индуцирует экспрессию гена TLR2 в клетках крови экспериментальных животных уже на 1 сутки с последующим повышением к 14 суткам, а в селезенке на 2 сутки и активным повышением уровня данного показателя к окончанию исследования (14 сутки). Так, в IV группе животных ОК TLR2 в крови на 1 сутки составила 13,1 у.е., на 2 сутки – 19,1, на 3, 7 и 14 сутки – 24,7; 58,0; 257,0 у.е. соответственно. Таким образом, медианные значения ОК TLR2 в клетках крови были статистически значимо выше значений III группы в 2,3 раза на 1 сутки, в 1,9 раза на 2 сутки, в 2,1 – на 3 и 7 сутки, в 1,8 раза ($p < 0,05$) – на 14 сутки исследования. В IV опытной группе ОК была выше в 2,9 раза на 1 сутки, в 14,7 раза – на 2 сутки в 3,0 раза – на 3 сутки, в 3,8 раза – на 7 сутки и в 4,6 раза ($p < 0,05$) – на 14 сутки наблюдения по сравнению с показателями ОК TLR2 II группы. Необходимо отметить, что введение биопленочной культуры *F. tularensis* 15B (II группа) приводит к повышению уровня экспрессии гена TLR2 в клетках крови в 2,3 раза на 3 сутки и в 6,4 раза – на 7 сутки исследования по сравнению с I группой (табл. 2).

Экспрессия Toll-подобного рецептора 2 типа в селезенке отмечалась во всех опытных группах животных со 2 суток исследования и имела нарастающий характер к 14 суткам (табл. 2). Медианные показатели TLR2 в клетках селезенки животных IV группы статистически значимо выше по сравнению с другими опытными группами на 2, 3 и 7 сутки. При введении биопленочной культурой *F. tularensis* И-384 (IV группа), на 2 сутки показатели ОК статистически значимо выше в 2,5 ($p < 0,05$) раза по сравнению с III группой и в 3,0 раза ($p < 0,05$) по сравнению со II группой. На 3 и 7 сутки установлено статистически значимое повышение экспрессии гена TLR2 в 3,2 и 18,4 раза ($p < 0,05$) по сравнению с III группой и в 1,4 и 1,9 раза ($p < 0,05$) по сравнению со II группой. К 14 суткам отмечалось значительное повышение уровня экспрессии TLR2 в клетках селезенки животных, но статистически значимых различий между биопленочными культурами *F. tularensis*, так же, как и между агаровыми культурами разных подвидов,

не выявлено. ОК гена Toll-подобного рецептора 2 типа I группы составляла 1960 у.е., II – 12301 у.е., III – 2032 у.е., IV – 14632 у.е. Следует отметить, что ОК TLR2 в клетках селезенки II группы животных, инокулированных биопленочной культурой *F. tularensis* 15B, во все сроки наблюдения статистически значимо выше, чем ОК в клетках селезенки I группы. Так, ОК гена TLR2 во II группе выше, чем в I группе в 9,0 раз ($p < 0,05$) на 2 сутки, в 4,7 раза ($p < 0,05$) – на 3 сутки, в 19,8 раза ($p < 0,05$) – на 7 сутки, в 6,3 раза ($p < 0,05$) – на 14 сутки (табл. 2).

Полученные данные указывают на то, что штамм *F. tularensis* И-384, независимо от метода культивирования, более активно индуцирует экспрессию гена TLR2 по сравнению с *F. tularensis* 15B, что может быть связано с его низкой способностью уклоняться от иммунных реакций макроорганизма, а также за счет перехода бактерий в НФ.

Экспрессия гена TLR4 в клетках крови и селезенки белых мышей, инфицированных штаммами *F. tularensis* И-384, отмечалась на 2 сутки, а при введении *F. tularensis* 15B – на 3 сутки наблюдения. Пик увеличения копий гена наблюдался к 7 суткам с последующим его снижением. Установлено, что уровень экспрессии гена TLR4 в крови экспериментальных животных, инфицированных биопленочной культурой *F. tularensis* И-384 (IV группа), статистически значимо выше на 3 сутки в 14,3 раза ($p < 0,05$), на 7 сутки – в 3,6 раза ($p < 0,05$), чем экспрессия гена данного типа Toll-подобного рецептора у животных, которым вводили агаровую культуру *F. tularensis* И-384 (III группа). Также медианные показатели ОК гена TLR4 в клетках крови IV группы статистически значимо превышали данный показатель во II группе на 3 и 7 сутки исследования в 19,9 ($p < 0,05$) и 5,9 ($p < 0,05$) раза соответственно. На 14 сутки отмечалось статистически значимое снижение уровня экспрессии данного гена в клетках крови во II-IV опытных группах (табл. 3).

Выявлены значительные различия в динамике экспрессии TLR4 между агаровой (III) и биопленочной (IV) культурами в клетках селезенки (табл. 3). В группе животных, инокулированных биопленочной культурой *F. tularensis* И-384 (IV группа), зарегистрировано статистически значимое повышение ОК по сравнению с III группой (на 2 сутки в 16,4 раза, на 3 сутки – в 10,8 раза, на 7 сутки – в 14,0 раз и на 14 сутки – в 17,8 раза ($p < 0,05$)).

ТАБЛИЦА 2

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ КДНК ПОСЛЕ ОТ МРНК TLR2 В ОБРАЗЦАХ КРОВИ И СЕЛЕЗЕНКИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ, ИНФИЦИРОВАННЫХ АГАРОВЫМИ И БИОПЛЕНОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ *F. TULARENSIS*, ME (Q_1-Q_2)

TABLE 2

RELATIVE CDNA CONCENTRATION AFTER OT OF TLR2 MRNA IN BLOOD AND SPLEEN SAMPLES OF WHITE MICE INFECTED WITH AGAR AND BIOFILM CULTURES OF *F. TULARENSIS*, ME (Q_1-Q_2)

Группа	TLR2, у.е.									
	Кровь					Селезенка				
	Срок, сутки					Срок, сутки				
	1	2	3	7	14	1	2	3	7	14
I	2,2 (1,9-2,8)	2,0 (1,4-2,6)	3,5 (2,7-3,9)	2,4 (1,7-2,6)	31,2 (27,1-33,5)	1,1 (0,5-2,4)	36,1 (29,3-38,5)	160,0 (154,0-163,0)	160,0 (152,0-164,0)	1960,0 (1845,0-2030,0)
II	4,5 (3,8-4,8)	1,3 (1,2-1,4)	8,1 (7,6-8,3)	15,4 (14,5-17,1)*	56,2 (52,5-58,0)*	1,9 (1,3-2,0)	325,0 (319,0-331,0)	750,0 (739,0-759,0)*	3168,0 (2998,0-3201,0)*	12301,0 (11865,0-12560,0)*
III	5,8 (5,0-6,1)	10,1 (8,9-11,0)	12,0 (10,8-13,1)	28,0 (26,0-30,0)	143,0 (137,0-149,0)	3,1 (2,8-3,6)	395,0 (378,0-410,0)	326,0 (318,0-339,0)	321,0 (316,0-332,0)	2032,0 (1899,0-2025,0)
IV	13,1 (12,1-14,2)	19,1 (18,5-20,4)*	24,7 (23,0-26,0)*	58,0 (55,0-61,0)*	257,0 (253,0-262,0)*	2,2 (1,6-2,5)	968,0 (951,0-980,0)*	1040,0 (902,0-1086,0)*	5920,0 (5299,0-6153,0)*	14632,0 (12986,0-15026,0)*
V	0,1 (0,1-0,2)	0,5 (0,3-0,6)	2,1 (1,5-2,6)	1,1 (0,9-1,5)	2,2 (1,7-2,5)	2,2 (1,8-2,6)	1,2 (0,5-1,5)	3,5 (2,7-3,9)	4,0 (3,4-5,1)	3,7 (2,7-4,6)

Примечание: I – *F. tularensis* 15B (агаровая культура), II – *F. tularensis* 15B (биопленочная культура), III – *F. tularensis* И-384 (агаровая культура), IV – *F. tularensis* И-384 (биопленочная культура), V – контроль; * – $p < 0,05$ по сравнению с агаровыми культурами.

Сравнительный анализ экспрессии гена Toll-подобного рецептора 4 типа в селезенке мышей, инфицированных биопленочной и агаровой культурами *F. tularensis* 15B, выявил статистически значимое повышение ОК во II группе в 24,3 ($p < 0,05$) раза по сравнению с I группой на 3 сутки и в 15,6 ($p < 0,05$) раз на 7 сутки исследования (табл. 3). Достоверных различий между значениями ОК МРНК TLR4 типа у групп животных, зараженных *F. tularensis* И-384 и *F. tularensis* 15B, культивируемых в МПБ, на 1-7 сутки не выявлено. Статистически значимые различия между II и IV группами установлены на 14 сутки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность возбудителя туляремии к пленкообразованию является важным условием для выживания микроорганизма. В составе биопленок *F. tularensis* меньше подвержена фагоцитозу и воздействию антибактериальных веществ, что обусловлено барьерной функцией и способностью формировать клетки-персистеры. В связи с этим, образование биопленок можно рассценивать как фактор патогенности [8].

Распознавание патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) Toll-подобными рецепторами на клетках организма обосновывает роль TLR

в патогенетических механизмах многих заболеваний, в том числе и туляремии. В ходе исследований проведена сравнительная оценка влияния на этот процесс агаровых и биопленочных культур *F. tularensis*. Установлено статистически значимое увеличение экспрессии генов Toll-подобных рецепторов 2 и 4 типов в иммунокомпетентных клетках при экспериментальном инфекционном процессе, вызванном биопленочными культурами *F. tularensis* по сравнению с агаровыми. Показано, что штамм *F. tularensis* subs. *novicida* И-384, независимо от метода культивирования, более активно индуцирует экспрессию гена TLR2 и TLR4 по сравнению с *F. tularensis* subs. *holarctica* 15B.

Таким образом, в ходе исследований выявлены особенности влияния подвидовой принадлежности возбудителя туляремии, так и условий его культивирования на экспрессию генов TLR2 и TLR4 в клетках крови и селезенки белых мышей при экспериментальной туляремии.

Полученные результаты расширяют сведения об иммуно- и патогенезе туляремии и могут быть полезны при разработке новых критериев оценки иммунного ответа на тулярийную инфекцию.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ТАБЛИЦА 3

ОТНОСИТЕЛЬНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ КДНК ПОСЛЕ ОТ МРНК TLR4 В ОБРАЗЦАХ КРОВИ И СЕЛЕЗЕНКИ БЕЛЫХ МЫШЕЙ, ИНФИЦИРОВАННЫХ АГАРОВЫМИ И БИОПЛЕНОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ *F. TULARENSIS* 15B И *F. TULARENSIS* И-384, МЕ (Q_1-Q_2)

TABLE 3

RELATIVE CDNA CONCENTRATION AFTER OT OF TLR4 MRNA IN BLOOD AND SPLEEN SAMPLES FROM WHITE MICE INFECTED WITH AGAR AND BIOFILM CULTURES OF *F. TULARENSIS* 15B AND *F. TULARENSIS* I-384, ME (Q_1-Q_2)

Группа	TLR4, у.е.									
	Кровь					Селезенка				
	Срок, сутки					Срок, сутки				
	1	2	3	7	14	1	2	3	7	14
I	0	2,0 (1,3-2,4)	24,1 (22,3-26,0)	19,6 (17,9-21,0)	20,6 (18,9-22,0)	2,5 (1,7-3,1)	4,1 (3,2-4,6)	161,0 (151,0-169,0)	28,9 (26,1-33,5)	3,8 (2,8-4,6)
II	1,1 (0,5-1,3)	0,2 (0,1-0,2)	43,2 (40,9-44,2)*	147,0 (141,0-150,0)*	31,3 (29,7-33,1)	3,9 (2,9-4,6)	4000,0 (2800,0-4800,0)*	3920,0 (3450,0-4310,0)*	4500,0 (4200,0-4860,0)*	2,6 (1,7-3,0)
III	3,2 (2,3-3,9)	15,0 (13,2-16,8)	60,3 (58,4-62,0)	241,0 (229,0-254,0)	22,1 (21,0-23,2)	2,3 (1,7-2,6)	203,0 (180,0-226,0)	420,0 (382,0-446,0)	399,0 (360,0-426,0)	153,0 (139,0-165,0)
IV	2,5 (1,8-3,1)	18,0 (16,5-19,6)	860,0 (826,0-887,0)*	861,0 (839,0-874,0)*	31,2 (28,4-33,8)	3,4 (2,6-4,2)	3320,0 (2999,0-3601,0)*	4520,0 (4120,0-4789,0)*	5600,0 (4982,0-5966,0)*	2720,0 (2450-3010,0)*
V	1,1 (0,5-1,3)	3,6 (2,7-4,1)	5,4 (4,1-5,9)	2,5 (1,8-3,1)	2,3 (1,5-2,9)	2 (1,4-2,7)	4,5 (2,7-5,7)	4 (2,5-6,7)	4,3 (3,4-4,8)	2,0 (1,3-2,2)

Примечание: I – *F. tularensis* 15B (агаровая культура), II – *F. tularensis* 15B (био пленочная культура), III – *F. tularensis* И-384 (агаровая культура), IV – *F. tularensis* И-384 (био пленочная культура), V – контроль; * – $p < 0,05$ по сравнению с агаровыми культурами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Schaudinn C, Rydzewski K, Meister B, Grunow R, Heuner K. *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* wild-type is able to colonize natural aquatic *ex vivo*. *Front Microbiol.* 2023; (14): 1113412. doi: 10.3389/fmicb.2023.1113412
- Mlynek K, Lopez CT, Fetterer DP, Williams JA, Bozue JA. Phase variation of LPS and capsule is responsible for stochastic biofilm formation in *Francisella tularensis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2022; 11: 16. doi: 10.3389/fcimb.2021.808550
- Ильина Т.С., Романова Ю.М. Бактериальные биопленки: роль в хронических инфекционных процессах и поиск средств борьбы с ними. Молекулярная генетика, микробиология. 2021; 39(2): 14-24. [Ilyina TS, Romanova YuM. Bacterial biofilms: their role in chronic infection processes and the means to combat them. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2021; 39(2): 1424. (In Russ.).] doi: 10.17116/molgen20213902114
- Brunet CD, Hennebique A, Peyroux J, Pelloux I, Caspar Y, Maurin M. Presence of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* DNA in the aquatic environment in France. *Microorganisms.* 2021; 9: 1398. doi: 10.3390/microorganisms9071398
- Hennebique A, Boisset S, Maurin M. Tularemia as a waterborne disease: a review. *Emerg. Microbes Infect.* 2019; 8(1): 1027–1042. doi: 10.1080/22221751.2019.1638734

- Ozanic M, Marecic V, Kwaik YA, Santic M. The divergent intracellular lifestyle of *Francisella tularensis* in evolutionarily distinct host cells. *PLoS Pathog.* 2015; 11(12): e1005208. doi: 10.1371/journal.ppat.1005208
- Hennebique A, Peyroux J, Brunet C, Martin A, Henry T, Knezevic M, et al. Amoebae can promote the survival of *Francisella* species in the aquatic environment. *Emerg Microbes Infect.* 2021; 10(1): 277-290. doi: 10.1080/22221751.2021.1885999
- Кудрявцева Т.Ю., Мокриевич А.Н. Стратегии выживания, распространения и вирулентности возбудителя туляремии. Инфекция и иммунитет. 2024; 14(1): 9-23. [Kudryavtseva TY, Mokrievich AN. Strategies for tularemia pathogen survival, spread and virulence. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2024; 14(1): 9-23. (In Russ.).] doi: 10.15789/2220-7619-SFT-17576
- Lewis E, Menanteau-Ledouble S, Tichy A, El-Matbouli M. Susceptibility of common carp and sunfish to a strain of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* in a challenge experiment. *Dis. Aquat. Organ.* 2016; 121(2): 161–166. doi: 10.3354/dao03044
- Kingry LC, Petersen JM. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; 4: 35. doi: 10.3389/fcimb.2014.00035
- Whipp MJ, Davis JM, Lum G, Boer J, Zhou Y, Bearden SW, et al. Characterization of a *novicida*-like sub-

species of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *Journal of Medical Microbiology*. 2003; 52(9): 839-842. doi: 10.1099/jmm.0.05245-0

12. Кузнецова Е.М., Волох О.А., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И. Характеристика протективного антигенного комплекса из *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; (2): 63-66. [Kuznetsova EM, Volokh OA, Avdeeva NG, Samokhvalova Yul. Characteristics of the protective antigen complex obtained from *Francisella tularensis* ssp. *novicida*. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017; (2): 63-66. (In Russ.).] doi: 10.21055/0370-1069-2017-2-63-66

13. Biot FV, Bachert BA, Mlynek KD, Toothman RG, Koroleva GI, Lovett SP, et al. Evolution of Antibiotic Resistance in Surrogates of *Francisella tularensis* (LVS and *Francisella novicida*): effects on biofilm formation and fitness. *Frontiers in Microbiology*. 2020; 11: 593542. doi: 10.3389/fmicb.2020.593542

14. Титова С.В., Анисимова А.С., Аронова Н.В. Образование биопленки *Klebsiella pneumoniae* на абиотическом субстрате. Материалы VIII Национального конгресса бактериологов. М.: Изд. Династия. 2023: 133-134. [Titova SV, Anisimova AS, Aronova NV. Formation of *Klebsiella pneumoniae* biofilm on an abiotic substrate. Proceedings of the VIII National Congress of Bacteriologists. Moscow: Dynasty Publishing House. 2023: 133-134. (In Russ.).]

15. Cantlay S, Garrison NL, Patterson R, Wagner K, Kirk Z, Fan J, et al. Phenotypic and transcriptional characterization of *F. tularensis* LVS during transition into a viable but non-culturable state. *Front. Microbiol.* 2024; 15: 1347488. doi: 10.3389/fmicb.2024.1347488

16. Горбатов А.А., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б., Шайхутдинова Р.З., Герасимов В.Н., Мокриевич А.Н. и др.

Влияние химической структуры О-антигена разных подвидов *Francisella tularensis* на иммунологические реакции. *Изв. Сарат. ун-та. Нов. Сер. Химия. Биология. Экология*. 2019; 19(2): 207-215. [Gorbatov AA, Titareva GM, Kravchenko TB, Shaykhutdinova RZ, Gerasimov VN, Mokrievich AN, et al. Effect of the O-Antigen Chemical Structure in Different Subspecies of *Francisella tularensis* on Immunological Reactions. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*. 2019; 19(2): 207-215. (In Russ.).] doi: 10.18500/1816-9775-2019-19-2-207-215

17. Benziger PT, Kopping EJ, McLaughlin PA, Thanasi DG. *Francisella tularensis* disrupts TLR2-MYD88-p38 signaling early during infection to delay apoptosis of macrophages and promote virulence in the host. *mBio*. 2023; 14(4): 01136-23. doi: 10.1128/mbio.01136-23

18. Gillette DD, Tridandapani S, Butchar JP. Monocyte/macrophage inflammatory response pathways to combat *Francisella* infection: possible therapeutic targets? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2014; (4): 18. doi: 10.3389/fcimb.2014.00018

19. Наумова К.В., Мазепа А.В., Сынгеева А.К., Куликалова Е.С. Исследование способности штаммов *Francisella tularensis* к образованию биопленки. *Санитарный врач*. 2021; (8): 69-74. [Naumova KV, Mazepa AV, Syngeeva AK, Kulikalova ES. Study of the ability of *Francisella tularensis* strains to biofilm formation. *Sanitary Doctor*. 2021; (8): 69-74. (In Russ.).] doi: 10.33920/med-08-2108-10

20. Lin X, Fang D, Zhou H, Su SB. The expression of Toll-like receptors in murine Müller cells, the glial cells in retina. *Neurol Sci.* 2013; 34(8): 1339-46. doi: 10.1007/s10072-012-1236-1

Сведения об авторах

Дубровина Валентина Ивановна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией патофизиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; e-mail: dubrovina-valya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8561-6207>

Пятидесятникова Анна Борисовна – младший научный сотрудник ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6381-4517>

Юрьева Ольга Викторовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; e-mail: olga.yur1963@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7357-2219>

Корытов Константин Михайлович – научный сотрудник ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; e-mail: konstmikhkor@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1137-6049>

Старовойтова Татьяна Пантелеевна – научный сотрудник лаборатории патофизиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0952-8755>

Мазепа Андрей Владимирович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <http://orcid.org/0000-0002-0843-4757>

Наумова Ксения Викторовна – младший научный сотрудник эпидемиологического отдела ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5250-7530>

Балахонов Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Information about the authors

Valentina I. Dubrovina – Dr. Sc. (Biol.), Head of Pathophysiological Laboratory of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor; e-mail: dubrovinavalya@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8561-6207>

Anna B. Pyatidesyatnikova – Junior Research of Pathophysiological Laboratory of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor;

e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6381-4517>

Olga V. Yurieva – Cand. Sc. (Biol.), senior researcher of Pathophysiological Laboratory of Irkutsk Anti plague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor; e-mail: olga.yur1963@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7357-2219>

Konstantin M. Korytov – Research Officer, Pathophysiological Laboratory, Irkutsk Anti plague Research Institute of Rospotrebnadzor; e-mail: konstmikhkor@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-1137-6049>

Tatyana P. Starovoytova – Research Officer of Pathophysiological Laboratory of Irkutsk Anti plague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0952-8755>

Andrey V. Mazepa – Cand. Sc. (Med.), Leading Researcher of Department of Epidemiology of Irkutsk Anti plague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0843-4757>

Ksenia V. Naumova – Junior researcher of the Epidemiologic Department of the Irkutsk Anti plague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5250-7530>

Sergey V. Balakhonov – Dr. Sc. (Med.), Professor, Director of Irkutsk Anti plague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>