

УДК 577.2:616_-006:615.277

ЭКЗОГЕННЫЙ БТШ70 И СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ИНГИБИРОВАНИИ ИНДУЦИРОВАННОЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОМ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ КЛЕТОК НЕЙРОБЛАСТОМЫ

© 2020 г. М. М. Юринская^{a, b}, Д. Г. Гарбуз^a, М. Б. Евгеньев^{a, b, *}, М. Г. Винокуров^b

^aИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^bИнститут биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки “Федеральный исследовательский центр “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

*e-mail: misha672011@yahoo.com

Поступила в редакцию 14.05.2019 г.

После доработки 10.06.2019 г.

Принята к публикации 20.06.2019 г.

Нейровоспаление играет ключевую роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний. Клетки микроглии — основные иммунные клетки центральной нервной системы — активируются под действием липополисахаридов (компонентов клеточной стенки грамотрицательных энтеробактерий) и синтезируют активные формы кислорода, цитокины, медиаторы воспаления, которые вызывают гибель нейронов. Охарактеризовано влияние экзогенного рекомбинантного белка теплового шока человека (БТШ70) на активацию клеток микроглии и нейробластомы человека при действии липополисахаридов из *Escherichia coli*. Эксперименты были выполнены на отдельно культивируемых клеточных культурах и при переносе кондиционированной среды от клеток микроглии A-172 к клеткам нейробластомы SK-N-SH. Эти эксперименты проведены для моделирования действия микроглии, обработанной липополисахаридом и/или БТШ70, на клетки нейробластомы SK-N-SH. Оценен уровень активных форм кислорода, TNF α и апоптоза в клетках, обработанных липополисахаридами, в присутствии и в отсутствие БТШ70. Установлено, что БТШ70 снижает индуцируемую липополисахаридом продукцию активных форм кислорода, TNF α , апоптоз и некроз как в отдельно культивируемых клеточных культурах, так и при переносе кондиционированной среды от клеток микроглии к клеткам SK-N-SH. Показано, что в механизме защиты белком БТШ70 клеток микроглии и нейробластомы от липополисахарид-индуцированного апоптоза и продуцируемых активных форм кислорода важная роль принадлежит сигнальным путям с участием протеинкиназ p38MAPK, JNK и PI3K.

Ключевые слова: белок теплового шока БТШ70, липополисахариды, апоптоз, активные формы кислорода, фактор некроза опухолей, ингибиторы сигнальных путей

DOI: 10.31857/S0026898420010164

ВВЕДЕНИЕ

В патогенезе нейродегенеративных заболеваний человека важную роль играет нейровоспаление, характерное для болезней Альцгеймера и Паркинсона, бокового амиотрофического склероза и лобно-височной деменции [1]. Накоплены данные, свидетельствующие о значительной роли микроглии в нейровоспалении [2]. При активации клеток микроглии высвобождаются различные провоспалительные цитокины, что, в конечном итоге, приводит к развитию нейродегенерации, опосредованной нейровоспалением [3]. В процессах нейродегенерации важная роль принадлежит липополисахаридам (ЛПС) — компо-

нентам грамотрицательных энтеробактерий [4]. Известно, что ЛПС активируют иммунную систему, вызывают перекисное окисление липидов, нарушения поведения и памяти, образование активных форм кислорода (АФК) и, как следствие, приводят к окислительным повреждениям мозга [5]. Установлено также, что уровень ЛПС в плазме крови повышается при болезни Альцгеймера и некоторых других видах протеинопатий [6].

Основными мишенями ЛПС служат клетки врожденного иммунитета, в том числе макрофаги. В центральной нервной системе (ЦНС) функционируют клетки микроглии, относящиеся к мононуклеарным макрофагам [7]. Эти клетки

Сокращения: БТШ70 — белок теплового шока 70 кДа; ЛПС — липополисахарид; АФК — активные формы кислорода.

участвуют в воспалительных процессах в ЦНС, а также регулируют гомеостаз и нейровоспаление [8]. Клетки микроглии активируются в стрессовых условиях, при инфекциях или воспалении [9] и секретируют различные медиаторы воспаления, такие как фактор некроза опухоли-альфа (TNF α), интерлейкин (IL)-10, АФК, оксид азота (NO) и простагландин E2 [8, 10]. Активированная микроглия оказывает нейротоксическое действие на нейроны, вызывая их гибель [8], что, в свою очередь, усиливает повреждение нервной ткани и приводит к хронической нейродегенерации [11–13].

ЛПС активируют макрофаги, и механизм этого процесса включает перенос ЛПС ЛПС-связывающим белком из ЛПС-мицелл к CD14 фагоцитов. Далее образуется гетеродимерный рецепторный комплекс, включающий (ЛПС-MD2-TLR4)₂ [14]. К этому комплексу присоединяются различные цитоплазматические адаптерные белки, после чего активирующий сигнал передается от рецептора к различным внутриклеточным сигнальным путям, включающим сигнальные молекулы и киназы различного типа [15]. Эти сигналы затем передаются факторам транскрипции, таким как ядерный фактор- κ B (NF- κ B), белок-активатор-1 (AP-1), что приводит к секреции воспалительных медиаторов, NO и АФК, а также к активации апоптоза [15, 16].

Важную защитную роль при различных воспалительных процессах в организме человека и животных играют белки теплового шока (БТШ), в том числе главный стрессовый высококонсервативный белок БТШ70 [17, 18]. БТШ70 обладает шаперонной активностью, поддерживает клеточный гомеостаз, участвует в фолдинге, сборке и транслокации белков через мембраны [19], обладает нейропротекторными свойствами [20], а также участвует в регуляции рецепторзависимых сигнальных путей [21]. Показано также, что в разных ситуациях БТШ70 может проявлять как воспалительные, так и противовоспалительные свойства [22].

Ранее нами было показано, что экзогенный БТШ70 человека эффективно защищает нейтрофилы человека от активирующего действия ЛПС [23, 24], а также снижает продукцию АФК клетками нейробластомы человека при действии амилоидных пептидов [25]. На мышиных моделях установлено, что экзогенный БТШ70 защищает животных от старения и нейропатологий типа болезни Альцгеймера [26]. Однако молекулярные механизмы защиты ЦНС белком БТШ70 изучены недостаточно.

Нами изучено влияние экзогенного белка БТШ70 человека на продукцию АФК, TNF α и гибель ЛПС-стимулированных клеток микроглии A-172 и нейробластомы SK-N-SH при их раздельном культивировании. Изучены также механизмы опосредованного защитного действия БТШ70

при переносе кондиционированной среды от клеток микроглии к клеткам SK-N-SH. Описаны сигнальные пути, участвующие в защитном действии БТШ70 от индуцируемого ЛПС воспаления в изучаемых клетках.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использованы среда культивирования (КС) DMEM, флуоресцентные зонды Hoechst 33358 и йодид пропидия, HEPES, L-глутамин, фосфатно-солевой буфер (PBS), краситель Crystal Violet, нитросиний тетразолий (НСТ), актиномицин D, додецилсульфат натрия (SDS), пенициллин, стрептомицин, диметилсульфоксид (DMSO), ЛПС из *E. coli* O55:B5, ингибиторы SB203580, PD98059, Wortmannin, SP600125 (все “Sigma-Aldrich”, США), эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (ЭТС, “HyClone”, США).

Получение БТШ70. Нами использован рекомбинантный БТШ70 человека (свободный от ЛПС), экспрессированный в клетках *Spodoptera frugiperda* [23]. Клон, содержащий кДНК БТШ70 человека (pBlueScriptSK + БТШ70), применяемый для создания экспрессионных конструкций, любезно предоставлен R. Morimoto (Northwestern University, США). Чистота препаратов БТШ70 из клеток *Spodoptera* подтверждена электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием кумасси синим и иммуноблоттингом с использованием моноклональных антител 3B5 против БТШ70 и N69 против Hsc70. Антитела любезно предоставлены Маргулис Б.А. (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Концентрацию белка измеряли в соответствии с протоколом Брэдфорда.

Культуры клеток. Клетки нейробластомы человека SK-N-SH получены из Американской типовой коллекции клеточных культур (АТСС, НТВ-11), клетки микроглии человека A-172 и фибробласты L-929 мыши — из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН. Клетки выращивали в КС DMEM с добавлением 10% термоинактивированной ЭТС, проверенной на присутствие эндотоксина (0.01 ед/мл) (“HyClone”, США), 2 mM L-глутамина, 1% стрептомицина, 100 ед. пенициллина при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Жизнеспособность клеток контролировали с помощью флуоресцентной микрокопии с использованием йодида пропидия [25]. Жизнеспособность клеток, используемых в экспериментальных пробах, составляла не менее 96–99%. В диапазоне концентраций от 10 до 300 нМ БТШ70 не влиял на жизнеспособность клеток.

Гибель клеток (апоптоз и некроз) регистрировали с использованием флуоресцентного инвертированного микроскопа Keyence (Япония) согласно [25]. Содержание апоптотических клеток опреде-

ляли как долю неокрашенных йодидом пропидия клеток с фрагментированной ДНК от общего количества клеток (принятого за 100%). Некротическими считали клетки, окрашенные йодидом пропидия [25]. В экспериментальных пробах регистрировали не менее 20 видимых полей, содержащих 250–350 клеток.

Производство TNF α клетками определяли по цитотоксическому действию образцов на клетки-мишени — линию L-929 фибробластов мыши [24]. Клетки L-929 культивировали в 96-луночных планшетах по 2×10^4 клеток в 100 мкл КС на лунку при 37°C и 5% CO₂. Через 24 ч культивирования к образовавшемуся монослою клеток L-929 добавляли актиномицин D (1 мкг/мл), а затем по 100 мкл супернатанта исследуемых клеток. К контрольным лункам добавляли только КС. Планшеты инкубировали в течение 24 ч, затем клетки отмывали фосфатным буфером, окрашивали красителем Crystal Violet (“Sigma-Aldrich”) и определяли их выживаемость после растворения кристаллов в 1%-ном растворе SDS. Оптическую плотность измеряли при 595 нм на спектрофотометре для планшетов “Униплан” (Россия). Производство TNF α определяли по индексу цитотоксичности [27]. Специфичность цитотоксического действия TNF α проверяли в реакции нейтрализации моноклональными антителами (“StressGen”, Канада).

Образование активных форм кислорода (АФК). Производство АФК в клетках A-172 и SK-N-SH определяли с использованием НСТ [24]. Используемый метод отражает активность кислород-зависимого клеточного метаболизма — источника АФК. По окончании культивирования из планшетов отбирали КС, к клеткам добавляли 0.1%-ный раствор НСТ (2 ч, 37°C и 5% CO₂). Затем клетки 2 раза отмывали PBS, фиксировали этанолом и сушили. Образовавшийся внутриклеточный формазан растворяли в 300 мкл 2 М КОН и 400 мкл DMSO на лунку. Далее оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 620 нм [28] на планшетном ридере “Униплан”.

Исследование действия БТШ70 и ЛПС на клетки нейроblastомы SK-N-SH или микроглии A-172. В этих экспериментах клетки собирали с использованием раствора Трипсина-Версена, отмывали в полной КС, разводили в КС с 5% ЭТС до требуемой концентрации, рассевали в 24-луночные планшеты (“Sarstedt”, ФРГ) с повышенной адгезией и инкубировали в течение 12 ч при 37°C и 5% CO₂. Затем КС с 5% ЭТС заменяли на бессывороточную среду и инкубировали в течение еще 12 ч. После чего добавляли БТШ70 (на 120 мин) и/или ЛПС, инкубировали клетки в течение 24 ч.

Перенос кондиционированной среды от клеток микроглии к клеткам SK-N-SH. Клетки A-172 рассевали в 24-луночные планшеты (“Sarstedt”) с повышенной адгезией и инкубировали в течение 12 ч

при 37°C и 5% CO₂. Затем КС с 5% ЭТС заменяли на бессывороточную среду и инкубировали в течение 12 ч. После чего к клеткам A-172 добавляли БТШ70 (на 120 мин) и/или ЛПС и инкубировали в течение 24 ч. После окончания инкубирования собирали супернатант (кондиционированную среду [29, 30] от клеток A-172), центрифугированием освобождали от клеток и их фрагментов, переносили в лунки планшета с прикрепленными клетками SK-N-SH, предварительно удалив КС. Затем клетки SK-N-SH инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Эти эксперименты проводили для моделирования действия микроглии, обработанной ЛПС и/или БТШ70, на клетки SK-N-SH.

Эксперименты с использованием ингибиторов сигнальных путей. Ингибиторы добавляли к клеткам за 30 мин до введения БТШ70 [31]. Использовали ингибиторы митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК): SB203580 (p38МАРК), PD98059 (ERK), Wortmannin (PI3K), SP600125 (JNK), участвующих в ЛПС-индуцируемом воспалении. Оптимальные и нетоксичные концентрации ингибиторов определяли с помощью предварительно полученной концентрационной зависимости (данные не представлены).

Статистический анализ. Экспериментальные данные анализировали с помощью программы SigmaPlot. Результаты приведены как средние значения пяти независимых экспериментов $\pm$ стандартное отклонение (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Белок БТШ70 снижает ЛПС-индуцированную продукцию АФК в клетках A-172 и SK-N-SH

Добавление БТШ70 (30 нМ) не влияет на продукцию АФК клетками A-172 и SK-N-SH (рис. 1, A1 и B1). ЛПС (1 мкг/мл) индуцирует повышение уровня образования АФК в клетках A-172 и SK-N-SH в 1.8 раза. БТШ70 (добавленный за 2 ч до ЛПС) снижает индуцированную ЛПС продукцию АФК в клетках A-172 (115%) и SK-N-SH (108%). Перенос кондиционированной среды от клеток A-172 к клеткам SK-N-SH не индуцирует увеличения продукции АФК в пробах 1 и 2 (рис. 1C) и увеличивает образование АФК в пробах 3 (со 180 до 200%) и 4 (со 108 до 135%) (рис. 1C).

Белок БТШ70 снижает ЛПС-индуцированную продукцию TNF α в клетках A-172 и SK-N-SH

Добавление БТШ70 увеличивает продукцию TNF α контрольными клетками в 2 раза (до ~6 пг/мл). ЛПС значительно увеличивает продукцию TNF α клетками A-172 (19.6 пг/мл) и SK-N-SH (15 пг/мл). Добавление кондиционированной среды от клеток A-172 увеличивает про-

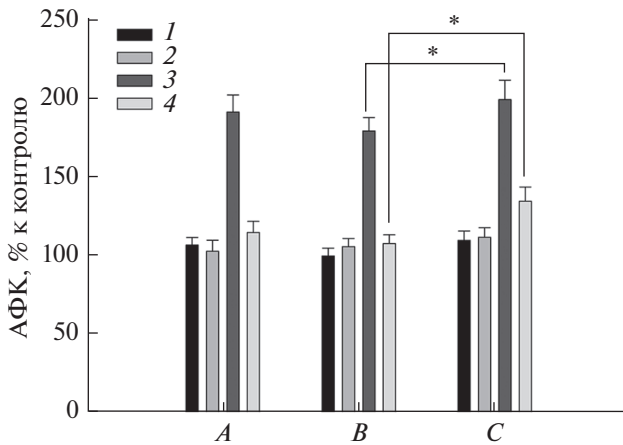


Рис. 1. Действие ЛПС и БТШ70 на продукцию АФК клетками А-172 и SK-N-SH. А – Клетки А-172, В – клетки SK-N-SH, С – перенос кондиционированной среды от клеток А-172 к клеткам SK-N-SH. 1 – В отсутствие БТШ70 и ЛПС; 2 – в присутствии БТШ70; 3 – в присутствии ЛПС; 4 – в присутствии БТШ70 и ЛПС. За 100% принята продукция АФК в пробе В1. Концентрации БТШ70 и ЛПС, соответственно, 30 нМ и 1 мкг/мл. * $p < 0.05$, $n = 5$.

дукцию $\text{TNF}\alpha$ клетками SK-N-SH до 25 пг/мл, что на 67% больше, чем клетками SK-N-SH без добавления этой среды в присутствии ЛПС. БТШ70, добавленный к клеткам до ЛПС, снижает продукцию $\text{TNF}\alpha$ в пробах А4 (с 19.6 до 11.5 пг/мл), В4 (с 15 до 10 пг/мл) и С4 (с 25 до 15.5 пг/мл) (рис. 2).

Белок БТШ70 снижает ЛПС-индуцированную гибель клеток А-172 и SK-N-SH (некроз и апоптоз)

Показано, что в контроле содержание некротических клеток составляло ~ 3–4%. ЛПС в кон-

центрации 100 нг/мл усиливал некроз клеток SK-N-SH (в 1.9 раза) и А-172 (в 2.3 раза) (рис. 3). Добавление кондиционированной среды от клеток А-172 (с обработкой ЛПС) увеличивало некроз клеток нейробластомы в 1.5 раза (рис. 3, С3) по сравнению с действием только ЛПС на клеточные культуры SK-N-SH (рис. 3, В3) и А-172 (рис. 3, А3). Обработка белком БТШ70 в присутствии ЛПС снижала некроз клеток SK-N-SH (в 1.7 раза) и А-172 (в 1.4 раза), при действии кондиционированной среды некроз клеток SK-N-SH уменьшился в 2 раза (рис. 3, С4).

ЛПС усиливал апоптоз клеток SK-N-SH в 1.8 раза (рис. 4, В3), а А-172 в 2.1 раза (рис. 4, А3) по сравнению с соответствующими контрольными образцами. Предварительная обработка белком БТШ70 значительно снижала ЛПС-индуцированную активацию апоптоза клеток SK-N-SH (в 1.5 раза, рис. 4, В4) и А-172 (в 1.9 раза, рис. 4, А4). Добавление кондиционированной среды с ЛПС от клеток А-172 увеличивало апоптоз клеток SK-N-SH на 42% (рис. 4, С3). БТШ70 снижал ЛПС-стимулированный апоптоз этих клеток в 1.9 раза (рис. 4, С4).

Изучение кинетики действия БТШ70 показало, что для максимальной защиты клеток от апоптоза и некроза, индуцированного ЛПС, БТШ70 необходимо добавлять не менее чем за 30 мин до ЛПС (максимальный защитный эффект обеспечивало культивирование клеток с БТШ70 в течение 2 ч).

Влияние БТШ70 на ключевые сигнальные пути ЛПС-индуцированной активации клеток

Влияние БТШ70 на сигнальные пути оценивали по его воздействию на ЛПС-индуцированную продукцию АФК и апоптоз клеток в присутствии

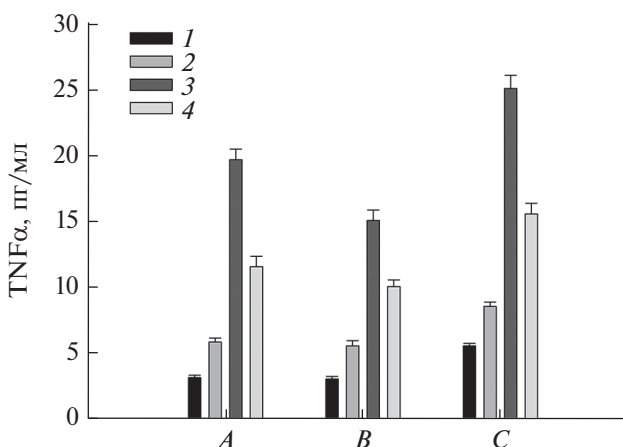


Рис. 2. Влияние ЛПС и БТШ70 на секрецию $\text{TNF}\alpha$ клетками А-172 и SK-N-SH. Обозначения, как на рис. 1.

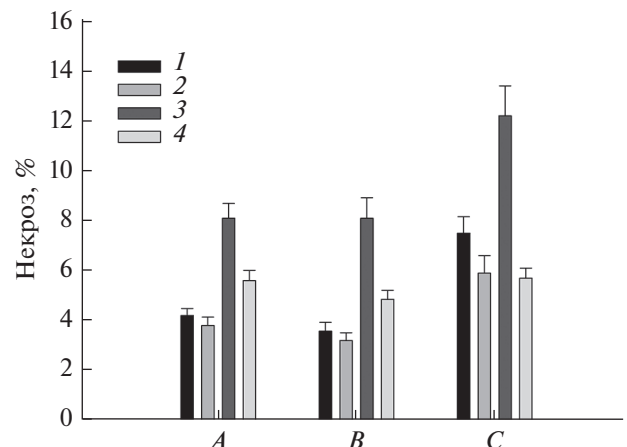


Рис. 3. Действие ЛПС и БТШ70 на некроз клеток А-172 и SK-N-SH. Обозначения как на рис. 1.

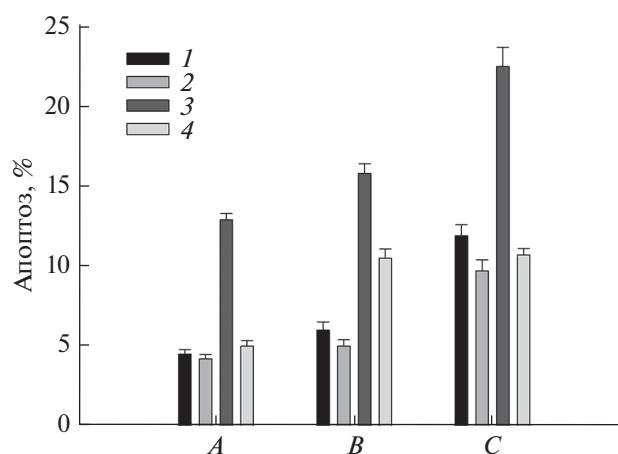


Рис. 4. Влияние ЛПС и БТШ70 на апоптоз клеток А-172 и SK-N-SH. Обозначения, как на рис. 1.

ингибиторов MAP-киназ, участвующих в ЛПС-индуцируемом воспалении.

Ингибиторы p38MAP-киназы и JNK практически полностью устраняют защиту белком БТШ70 клеток SK-N-SH от ЛПС-индуцированной продукции АФК

Все использованные ингибиторы, как и ожидали, снижали ЛПС-индуцированное увеличение продукции АФК клетками SK-N-SH (рис. 5, 2). В то же время защитный эффект БТШ70 ингибировался при использовании только двух типов ингибиторов киназ — p38MAPK и JNK (рис. 5, SB и SP сравнение столбиков 2 и 3). Wortmannin (ингибитор PI3K) снижал защитный эффект БТШ70 (рис. 5, W, сравнение столбиков 2 (178%) и 3 (154%)) менее эффективно, чем ингибиторы p38MAPK и JNK. Ингибирующее действие PD98059 на защитный эффект БТШ70 было слабо выражено (рис. 5, PD, сравнение столбиков 2 (172%) и 3 (130%)).

Ингибиторы p38MAPK и JNK практически полностью отменяют защиту белком БТШ70 клеток SK-N-SH от ЛПС-индуцированного апоптоза

Все использованные нами ингибиторы протеинкиназ снижали подавление апоптоза клеток SK-N-SH под действием ЛПС (рис. 6, 2). В то же время, в присутствии ингибиторов p38MAPK и JNK БТШ70 не защищал клетки от ЛПС-индуцированного апоптоза (рис. 6, SB и SP, сравнение столбиков 2 и 3). Wortmannin не полностью отменял защитное действие БТШ70, а ингибитор ERK PD98059 не влиял на эту способность БТШ70.

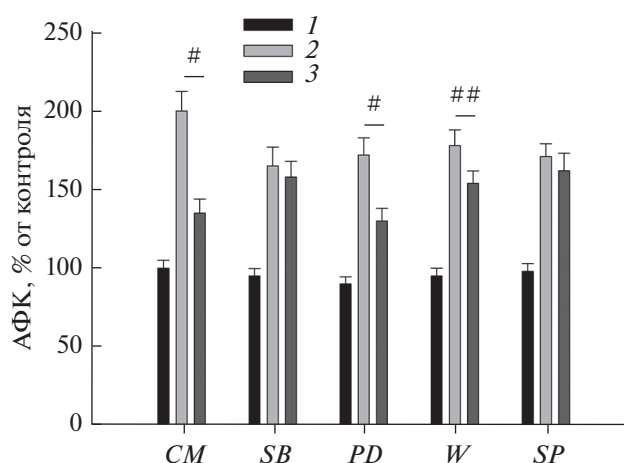


Рис. 5. Влияние ингибиторов протеинкиназ на продукцию АФК клетками SK-N-SH при добавлении к ним кондиционированной среды от клеток А-172. 1 — Клетки в отсутствие БТШ70 и ЛПС; 2 — в присутствии ЛПС; 3 — в присутствии БТШ70 и ЛПС. CM — культуральная среда; SB — 10 мкМ SB203580; PD — 10 мкМ PD98059; W — 100 нМ Wortmannin; SP — 20 мкМ SP600125. Концентрации БТШ70 и ЛПС, соответственно, 30 нМ и 1 мкг/мл. # $p < 0.001$; ## $p < 0.01$.

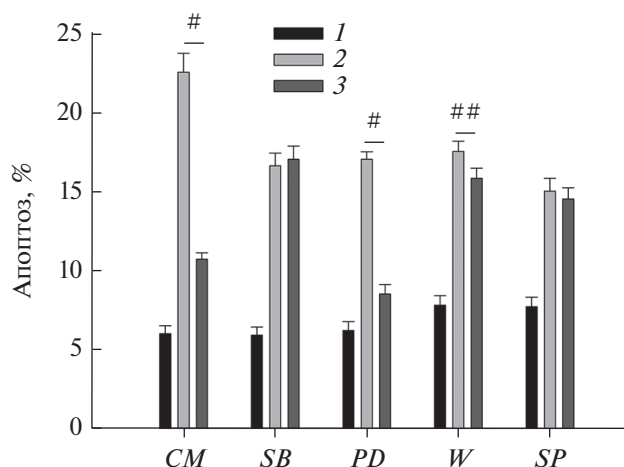


Рис. 6. Влияние ингибиторов протеинкиназ на апоптоз клеток SK-N-SH при добавлении к ним кондиционированной среды от клеток А-172. Обозначения, как на рис. 5.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Микроглия выполняет множество функций, включая участие в развитии ЦНС. Клетки микроглии вносят вклад в иммунный ответ против инфекционных агентов, в нейрогенез, нейровоспаление и развитие нейродегенеративных заболеваний. Клетки микроглии взаимодействуют с различными типами клеток ЦНС, включая нейроны [8]. Известно, что нейродегенеративные процессы в ЦНС реализуются в значительной мере в результате повреждения нейронов соеди-

нениями, продуцируемыми клетками микроглии [32].

За последние годы показана важная роль Toll-подобных рецепторов (TLR) при нейродегенеративных патологиях [33]. Важную роль в активации микроглии играет TLR4, основным агонистом которого является ЛПС. TLR4 также экспрессируются в нейронах и клетках нейробластомы [34, 35]. Показано, что экспрессия TLR4 в клетках микроглии увеличивается при действии бета-амилоидных пептидов, вызывая их активацию [36]. Известно также, что эти пептиды увеличивают экспрессию TLR4 в нейронах и гибель клеток [37].

В настоящее время существуют различные экспериментальные подходы к изучению роли взаимодействия разных типов клеток в механизмах нейродегенерации. В первом подходе смешивают разные популяции клеток, во втором — используют вкладыши, проницаемые для синтезируемых клетками веществ (Trans-well), в третьем — переносят супернатант от одних клеток к другим. Мы использовали третий подход, поскольку сравнение трех способов изучения взаимодействия клеток микроглии и нейронов показало более высокую эффективность именно этого подхода [38].

Взаимодействие ЛПС-TLR4 достаточно быстро активирует продукцию таких АФК, как супероксидный анион-радикал и пероксид водорода [39]. Этому способствует и прямое взаимодействие NADPH-оксидазы с TLR4 после связывания ЛПС с этим рецептором [40].

Ранее с использованием БТШ70, меченного ¹²⁵I, мы установили, что экзогенный БТШ70 быстрее поступает в клетки RAW264.7, THP-1 и SK-N-SH с максимальным уровнем TLR2 и TLR4 в клеточной мембране. Самой медленной кинетика поступления ¹²⁵I-БТШ70 была в клетках SK-N-SH, в которых БТШ70, вероятно, может взаимодействовать с цитоплазматическими TLR4 только после диффузии через клеточную мембрану (2–3 ч) [44].

Оптимальное время культивирования клеток SK-N-SH с БТШ70 (до воздействия ЛПС), необходимое для обеспечения максимальной защиты, составило 2 ч.

Для сравнения можно отметить, что при интраназальном введении ¹²⁵I-БТШ70 попадает в мозг животных через 30 мин после введения [44]. Некоторые различия в кинетике поступления ¹²⁵I-БТШ70 в клетки SK-N-SH и в мозг мышей обусловлены, по-видимому, разным уровнем экспрессии TLR4 в клетках нейробластомы и мозга мыши.

Полученные данные (рис. 1, С3) показали, что перенос кондиционированной среды от клеток A-172 к клеткам SK-N-SH не приводит к значительному увеличению продукции ими АФК (по

сравнению с рис. 1, В3). Это может быть связано с уменьшением продукции АФК из-за увеличения клеточной гибели. С другой стороны, полученные результаты позволяют заключить, что в пробах с переносом кондиционированной среды, которая содержит ЛПС, усиливается некроз и апоптоз (рис. 3, С3 и рис. 4, С3), что, вероятно, и приводит к снижению продукции АФК.

Полученные нами результаты указывают на то, что суммарная гибель клеток SK-N-SH (апоптоз + некроз), к которым добавили кондиционированную среду от клеток A-172, увеличивается на 45.2%, а количество апоптотических клеток — на 42.4%. Обработка клеток в этой системе культивирования белком БТШ70 снизила гибель клеток (апоптоз + некроз) в 2.1 раза. Эти данные свидетельствуют о том, что БТШ70 ингибировал апоптоз клеток SK-N-SH, подавляя активацию микроглии при переносе кондиционированной среды от клеток микроглии к клеткам нейробластомы. Таким образом, экзогенный БТШ70 защищает клетки SK-N-SH от нейротоксического действия ЛПС, опосредованного клетками микроглии.

Апоптоз нейронов — одна из основных причин заболеваний ЦНС, в том числе болезней Паркинсона и Альцгеймера, церебральной ишемии [1, 2]. Множество данных указывает на участие нейровоспаления в процессе апоптоза нейронов [3]. В физиологическом состоянии резидентные иммунные клетки в мозге, такие как микроглия, играют важную роль в быстрой инициации воспалительного ответа на инфекцию или травму. С другой стороны, в активированной микроглии при воспалении усиливается секреция TNF α , который, в свою очередь, активирует процесс клеточной гибели [4]. Установлено, что секреция TNF α клетками микроглии также увеличивается при введении ЛПС экспериментальным животным [41]. Снижение ЛПС-индуцированной клеточной гибели белком БТШ70 связано, вероятно, и со снижением продукции TNF α при действии БТШ70.

Следует отметить, что сильным индуктором клеточной гибели при нейродегенеративных заболеваниях является пероксид водорода. Выполненные нами ранее исследования показали, что экзогенный БТШ70 эффективно защищает клетки нейробластомы от нейротоксического действия пероксида водорода в широком диапазоне концентраций [42].

Дальнейшее изучение защитного действия БТШ70 показало, что этот белок не полностью блокирует провоспалительное действие ЛПС (рис. 1–3). Действие БТШ70 на продукцию АФК и особенно TNF α имеет двоякий характер: при предварительной инкубации с клетками БТШ70 значительно снижает продукцию АФК и TNF α , индуцированную ЛПС, но сам БТШ70 несколько

увеличивает продукцию этих соединений клетками (рис. 1 и 2). Подобное увеличение образования АФК и $\text{TNF}\alpha$ под действием БТШ70 обнаружено также у фагоцитов млекопитающих [23], что связывают с его взаимодействием с рецепторами TLR2 и TLR4, которое, в свою очередь, приводит к некоторой активации фагоцитов и продукции ими различных медиаторов воспаления [43]. Кроме того, внеклеточный БТШ70 снижает экспрессию TLR4 [44]. В наших экспериментах белок БТШ70 обеспечивал максимальную защиту только в случае ЛПС-индуцированной продукции АФК. Это, по-видимому, обусловлено связыванием БТШ70 с рецептором ЛПС (конкуренция за рецептор) и снижением экспрессии TLR в клетках. Таким образом, понятно, почему при увеличении экспрессии БТШ70 в клетках микроглии снижается активация микроглии под действием ЛПС [45].

Связывание ЛПС с TLR4 приводит к передаче активирующих эффекторных сигналов через MAPK к факторам транскрипции, что вызывает продукцию АФК, NO, синтез и секрецию $\text{TNF}\alpha$ и других цитокинов, гибель клеток [46, 47].

Мы предположили, что наблюдаемое снижение ЛПС-индуцированного апоптоза в присутствии БТШ70 и продукции АФК может быть связано с участием клеточных MAP-киназ в защите клеток от действия ЛПС. Ранее при изучении роли БТШ70 во внутриклеточной сигнализации было показано, что в условиях теплового шока БТШ70 может влиять на сигнальные пути с участием ERK, JNK и p38MAPK [48]. В ряде работ обнаружена корреляция между активацией p38MAPK, ERK1/2 и JNK и увеличением синтеза БТШ70 при тепловом стрессе [49].

Исходя из этих данных, с использованием специфических ингибиторов мы исследовали роль p38MAPK, JNK, PI3K и ERK в механизме защитного действия БТШ70.

Показано, что все изученные протеинкиназы участвуют в сигнальных путях ЛПС-индуцированной активации апоптоза и продукции АФК клетками, так как они ингибируют действие ЛПС (рис. 5 и 6), что согласуется с данными [47].

При ЛПС-индуцированном апоптозе и продукции АФК защитное действие БТШ70 практически полностью отменялось ингибиторами p38MAPK и JNK. Ингибитор PI3K не полностью отменял защитное действие БТШ70.

Таким образом, результаты этого исследования свидетельствуют о том, что экзогенный индуцибельный БТШ70 человека защищает клетки микроглии и нейробластомы от ЛПС-индуцированной гибели (апоптоза и некроза), продукции АФК и $\text{TNF}\alpha$. Защита клеток нейробластомы белком БТШ70 сохраняется и при переносе кондиционированной среды от клеток микроглии

при их активации ЛПС. В механизме защиты клеток от ЛПС-индуцированной активации ключевая роль принадлежит p38MAPK и JNK. Показано, что экзогенный БТШ70 может защищать клетки SK-N-SH от повреждающего действия ЛПС путем ингибирования клеточной гибели, синтеза АФК и $\text{TNF}\alpha$ при воздействии на p38MAPK- и JNK-сигнальные пути, участвующие в ответе на введение ЛПС.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-04-00109), выделение и очистка рекомбинантного БТШ70 человека проведены при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 19-14-00167 (ДГ)).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Catorce M.N., Gevorkian G. (2016) LPS-induced murine neuroinflammation model: Main features and suitability for pre-clinical assessment of nutraceuticals. *Curr. Neuropharmacol.* **14**, 155–164.
2. Muhammad T., Ali T., Ikram M., Khan A., Alam S.I., Kim M. (2018) Melatonin rescue oxidative stress-mediated neuroinflammation/neurodegeneration and memory impairment in scopolamine-induced amnesia mice model. *J. Neuroimmun. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1007/s11481-018-9824-3>.
3. DeFrancesco-Lisowitz A., Lindborg J., Niemi J., Zigmund R. (2015) The neuroimmunology of degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. *Neuroscience.* **302**, 174–203.
4. Pintado C., Gavilán M.P., Gavilán E., García-Cuervo L., Gutiérrez A., Vitorica J., Castaño A., Ríos R.M., Ruano D. (2012) Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation leads to the accumulation of ubiquitinated proteins and increases susceptibility to neurodegeneration induced by proteasome inhibition in rat hippocampus. *J. Neuroinflammation.* **9**, 87.
5. Barron H., Hafizi S., Andreadza A.C., Mizrahi R. (2017) Neuroinflammation and oxidative stress in psychosis and psychosis risk. *Int. J. Mol. Sci.* **18**(3), 651.
6. Pretorius E., Bester J., Page M., Kell D. (2018) The potential of LPS-binding protein to reverse amyloid formation in plasma fibrin of individuals with Alzheimer-type dementia. *Front. Aging Neurosci.* **10**, 257.
7. Prinz M., Priller J. (2014). Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 300–312.
8. Lannes N., Eppler E., Etemad S., Yotovskii P., Filgueira L. (2017) Microglia at center stage: a comprehensive review about the versatile and unique residential macrophages of the central nervous system. *Oncotarget.* **8**(69), 114393–114413.

9. Graeber M., Streit W. (2010). Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **119**, 89–105.
10. More S., Kumar H., Kim I., Koppulla S., Kim B., Choi D. (2013). Strategic selection of neuroinflammatory models in Parkinson's disease: evidence from experimental studies. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* **12**, 680–697.
11. Qin L., Liu Y., Hong J., Crews F. (2013). NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration. *Glia.* **61**, 855–868.
12. Wang G., Zhang J., Hu X., Zhang L., Mao L., Jiang X., Liou A.K., Leak R.K., Gao Y., Chen J. (2013). Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **33**, 1864–1874.
13. Loane D., Kumar A., Stoica B., Cabatbat R., Faden A. (2014). Progressive neurodegeneration after experimental brain trauma: association with chronic microglial activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **73**, 14–29.
14. Kim S., Kim H. (2017). Dynamic lipopolysaccharide transfer cascade to TLR4/MD2 complex via LBP and CD14. *BMB Rep.* **50**(2), 55–57.
15. Kuzmich N., Sivak K., Chubarev V., Porozov Y., Savateeva-Lyubimova T., Peri F. (2017). TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis. *Vaccines* (Basel). **5**(4), pii: E34.
16. Muhammad T., Ikram M., Ullah R., Rehman S., Kim M. (2019). Hesperetin, a citrus flavonoid, attenuates lps-induced neuroinflammation, apoptosis and memory impairments by modulating TLR4/NF- κ B signaling. *Nutrients.* **11**(3), pii: E648.
17. Qu B., Jia Y., Liu Y., Wang H., Ren G., Wang H. (2015). The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress Chaperones.* **20**(6), 885–892.
18. Radons J. (2016). The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperones.* **21**(3), 379–404.
19. Dahiya V., Buchner J. (2019). Functional principles and regulation of molecular chaperones. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **114**, 1–60.
20. Yu W., Cao S., Zang C., Wang L., Yang H., Bao X., Zhang D. (2018). Heat shock protein 70 suppresses neuroinflammation induced by α -synuclein in astrocytes. *Mol. Cell Neurosci.* **86**, 58–64.
21. Streicher J. (2019). The role of heat shock proteins in regulating receptor signal transduction. *Mol. Pharmacol.* **95**(5), 468–474.
22. Pockley A., Henderson B. (2018). Extracellular cell stress (heat shock) proteins-immune responses and disease: an overview. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **373**(1738). pii: 20160522.
23. Rozhkova E., Yurinskaya M., Zatssepina O., Garbuz D., Surkov S., Murashev A., Ostrov V., Margulis B., Evgen'ev M., Vinokurov M. (2010). Exogenous mammalian extracellular HSP70 reduces endotoxin manifestations at the cellular and organism levels. *Ann. NY Acad. Sci.* **1197**, 94–107.
24. Yurinskaya M., Kochetkova O., Shabarchina L., Antonova O., Suslikov A., Evgen'ev M., Vinokurov M. (2017). Encapsulated Hsp70 decreases endotoxin-induced production of ROS and TNF α in human phagocytes. *Cell Stress Chaperones.* **22**(1), 163–171.
25. Yurinskaya M., Mitkevich V., Kozin S., Evgen'ev M., Makarov A., Vinokurov M. (2015). HSP70 protects human neuroblastoma cells from apoptosis and oxidative stress induced by amyloid peptide isoAsp7-A β (1–42). *Cell. Death Dis.* **19**(6), e1977.
26. Evgen'ev M., Krasnov G., Nesterova I., Garbuz D., Karpov V., Morozov A., Snezhkina A., Samokhin A., Sergeev A., Kulikov A., Bobkova N. (2017). Molecular mechanisms underlying neuroprotective effect of intranasal administration of human Hsp70 in mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **59**(4), 1415–1426.
27. Pfister H., Hennot T., Jungi T. (1992). Lipopolysaccharide synergizes with tumour necrosis factor- α in cytotoxicity assays. *Immunology.* **77**(3), 473–476.
28. Wang X., Hu D., Zhang L., Lian G., Zhao S., Wang C., Yin J., Wu C., Yang J. (2014). Gomisins A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in N9 microglia via blocking the NF- κ B/MAPKs pathway. *Food Chem. Toxicol.* **63**, 119–127.
29. Yin L., Li W., Chu Y., Li L. (2011). ERK pathway activation is required for amyloid- β (1–40)(-)-induced neurotoxicity of THP-1 human monocytes towards SK-N-SH neuroblastoma. *Brain Res.* **1378**, 9–17.
30. Yao L., Ye Y., Mao H., Lu F., He X., Lu G., Zhang S. (2018). MicroRNA-124 regulates the expression of MEKK3 in the inflammatory pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neuroinflammation.* **15**(1), 13.
31. Giraldo E., Martin-Cordero L., Garcia J., Gerhmann M., Multhoff G., Ortega E. (2010). Exercise-induced extracellular 72 kDa heat shock protein (Hsp72) stimulates neutrophil phagocytic and fungicidal capacities via TLR-2. *Eur. J. Appl. Physiol.* **108**(2), 217–225.
32. Xie Z., Smith C., Van Eldik L. (2004). Activated glia induce neuron death via MAP kinase signaling pathways involving JNK and p38. *Glia.* **45**(2), 170–179.
33. Xiang W., Chao Z., Feng D. (2015). Role of Toll-like receptor/myd88 signaling in neurodegenerative diseases. *Rev. Neurosci.* **26**(4), 407–414.
34. Hassan F., Islam S., Tumurkhuu G., Naiki Y., Koide N., Mori I., Yoshida T., Yokochi T. (2006). Intracellular expression of toll-like receptor 4 in neuroblastoma cells and their unresponsiveness to lipopolysaccharide. *BMC Cancer.* **6**, 281.
35. Trotta T., Porro C., Calvello R., Panaro M. (2014). Biological role of toll-like receptor-4 in the brain. *J. Neuroimmunol.* **268**(1–2), 1–12.
36. Cui Y., Wang Y., Zhao D., Feng X., Zhang L., Liu C. (2018). Loganin prevents BV-2 microglia cells from A β _{1–42}-induced inflammation via regulating TLR4/TRAF6/NF- κ B axis. *Cell. Biol. Int.* **42**(12), 1632–1642.
37. Calvo-Rodríguez M., de la Fuente C., García-Durillo M., García-Rodríguez C., Villalobos C., Núñez L. (2017). Aging and amyloid β oligomers enhance TLR4 expression, LPS-induced Ca²⁺ responses, and neuron cell death in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neuroinflammation.* **14**(1), 24.
38. Gibbons H., Dragunow M. (2006). Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide. *Brain Res.* **1084**(1), 1–15.

39. Asehnoun K., Strassheim D., Mitra S., Kim J., Abraham E. (2004) Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J. Immunol.* **172**(4), 2522–2529.
40. Park H., Jung H., Park E., Kim J., Lee W., Bae Y. (2004) Direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J. Immunol.* **173**(6), 3589–3593.
41. Nadeau S., Rivest S. (2000) Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia. *J. Neurosci.* **20**, 3456–3468.
42. Юринская М.М., Митькевич В.А., Барыкин Е.П., Гарбуз Д.Г., Евгеньев М.Б., Макаров А.А., Винокуров М.Г. (2015) Белок теплового шока Hsp70 защищает клетки нейробластомы SK-N-SH от нейротоксического действия пероксида водорода и β -амилоидного пептида. *Молекуляр. биология.* **49**(6), 1030–1034.
43. Asea A., Rehli M., Kabingu E., Boch J., Bare O., Aaron P., Stevenson M., Calderwood S. (2002) Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J. Biol. Chem.* **277**, 15028–15034.
44. Yurinskaya M., Zatsepina O., Vinokurov M., Bobkova N., Garbuz D., Morozov A., Kulikova D., Mitkevich V., Makarov A., Funikov S., Evgen'ev M. (2015) The fate of exogenous human HSP70 introduced into animal cells by different means. *Curr. Drug Deliv.* **12**(5), 524–532.
45. Kacimi R., Yenari M. (2015) Pharmacologic heat shock protein 70 induction confers cytoprotection against inflammation in gliovascular cells. *Glia.* **63**(7), 1200–1212.
46. Subedi L., Ji E., Shin D., Jin J., Yeo J., Kim S. (2017) Equol, a dietary daidzein gut metabolite attenuates microglial activation and potentiates neuroprotection *in vitro*. *Nutrients.* **9**(3), 207.
47. Rahimifard M., Maqbool F., Moeini-Nodeh S., Niaz K., Abdollahi M., Braidy N., Nabavi S., Nabavi S. (2017) Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: A novel therapeutic strategy for neuroinflammation. *Ageing Res. Rev.* **36**, 11–19.
48. Hao Y., Feng Y., Li J., Gu X. (2018) Role of MAPKs in HSP70's protection against heat stress-induced injury in rat small intestine. *Biomed. Res. Int.* **12**, 1571406.
49. Gourgou E., Aggeli I., Beis I., Gaitanaki C. (2010) Hyperthermia-induced Hsp70 and MT20 transcriptional upregulation are mediated by p38-MAPK and JNKs in *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck); a pro-survival response. *J. Exp. Bio.* **213**(2), 347–357.

EXOGENOUS HSP70 AND SIGNALING PATHWAYS INVOLVED IN THE INHIBITION OF LPS-INDUCED NEUROTOXICITY OF NEUROBLASTOMA CELLS

M. M. Yurinskaya^{1,2}, D. G. Garbuz¹, M. B. Evgen'ev^{1,2,*}, and M. G. Vinokurov²

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Science, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

*e-mail: misha672011@yahoo.com

Neuroinflammation plays a key role in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Microglial cells represent the main immune cells of the central nervous system. Under the action of lipopolysaccharides (components of the cell wall of gram-negative enterobacteria), microglia is activated and synthesizes reactive oxygen species, cytokines, inflammatory mediators, which in turn may cause neuron death. The paper describes the effect of exogenous recombinant human heat shock protein HSP70 on the activation of microglial cells and human neuroblastoma under the action of lipopolysaccharides of *Escherichia coli* on separately cultivated cell cultures and when transferring the conditioned medium from microglial cells to neuroblastoma cells. These experiments were performed to simulate the action of microglia treated with LPS and/or HSP70 on neuronal cells. The level of active forms of oxygen, TNF α and apoptosis of cells under the action of lipopolysaccharides in the presence and in the absence of HSP70 was estimated. HSP70 was found to reduce lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species, TNF α , apoptosis and necrosis, both in separately cultivated cell cultures and in the case of transfer of conditioned medium from microglia cells to neuroblastoma cells. It was demonstrated that signaling pathways involving protein kinases (p38MAPK, JNK and PI3K) play an important role in protective effect of Hsp70 in microglial cells and neuroblastoma from lipopolysaccharide-induced apoptosis and the production of reactive oxygen species.

Keywords: heat shock protein Hsp70, lipopolysaccharides, apoptosis, reactive oxygen species, tumor necrosis factor, signaling pathway inhibitors