

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

УДК 577.2:616-006:615.277

ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ HSP70 И ДОНОРОВ СЕРОВОДОРОДА В МАКРОФАГАХ TLR-1 ПРИ ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОМ ВОСПАЛЕНИИ С УЧАСТИЕМ ЭНДОЦИТОЗА

© 2023 г. М. М. Юринская^а, Д. Г. Гарбуз^б, М. Б. Евгеньев^{а, б, *}, М. Г. Винокуров^а

^аИнститут биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра “Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”, Пушкино, Московская обл., 142290 Россия

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

*e-mail: misha672011@yahoo.com

Поступила в редакцию 19.04.2023 г.

После доработки 19.04.2023 г.

Принята к публикации 17.05.2023 г.

Известно, что Hsp70 и доноры сероводорода уменьшают воспалительные процессы в клетках человека и животных, однако молекулярные механизмы их действия изучены недостаточно. Эффекты Hsp70 и доноров H₂S (GY4137 и тиосульфат натрия) зависят от кинетики защиты клеток от активации липополисахаридами (ЛПС). В работе изучено влияние рекомбинантного Hsp70 человека и доноров H₂S на образование активных форм кислорода и фактора некроза опухоли-альфа, индуцированных в клетках человека (TLR-1) ЛПС. Определены изменения транскриптома в этих клетках после введения ЛПС в сочетании с предварительной обработкой GY4137. Показано, что Hsp70 и доноры сероводорода снижают воспалительные процессы в клетках, активированных ЛПС. Hsp70 и доноры H₂S различались кинетикой защитного действия, при этом более эффективными оказались доноры сероводорода. Изучена роль эндоцитоза в механизмах защиты клеток донорами H₂S и Hsp70 от действия ЛПС. Установлено, что предварительная обработка клеток, подвергающихся воздействию ЛПС, донором сероводорода GY4137 снижает индукцию провоспалительных генов и влияет на экспрессию генов разных путей внутриклеточной сигнализации.

Ключевые слова: доноры H₂S, GY4137, STS, Hsp70, липополисахариды, макрофаги TLR-1, TNF α , активные формы кислорода

DOI: 10.31857/S002689842306023X, **EDN:** QMZEBQ

ВВЕДЕНИЕ

В этиопатогенезе широкого спектра заболеваний важную роль играют воспалительные процессы, активаторами которых часто выступают эндотоксины (липополисахариды, ЛПС). К основным источникам ЛПС в организме относятся грамотрицательные бактерии, входящие в состав микробиома человека, а поступление ЛПС из просвета кишечника в кровяное русло (эндотоксемия) [1] считается важным патогенетическим фактором грамотрицательного сепсиса, сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний, сахарного диабета типа 2 и других. Кроме того, важную роль в развитии многих хронических заболеваний животных и человека играет метабо-

лическая эндотоксемия, к развитию которой приводят нарушения в питании [2].

Циркулирующие в крови ЛПС активируют различные клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы, моноциты, макрофаги и др.) [3] посредством цепи последовательных событий. Сначала ЛПС связываются со вспомогательными белками LBP и CD14, затем сигнал от них передается на Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) в комплексе с MD2. После димеризации комплекса TLR4-MD2 на клеточной поверхности происходит MyD88-зависимая передача сигналов с последующей экспрессией факторов транскрипции (NF- κ B и др.). Интернализация TLR4 индуцирует MyD88-независимую (TRIF-зависимую) передачу сигналов в эндосомах и экспрессию таких регуляторов, как интерферон-регуляторный фактор 3 (IRF-3) и, в конечном итоге, интерфероны (IFN) типа 1. Это приводит к синтезу цитокинов и хемокинов, таких как IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2 и

Сокращения. Hsp70 – белок теплового шока 70 кДа, ЛПС – липополисахарид; АФК – активные формы кислорода; TNF α – фактор некроза опухоли-альфа; STS – тиосульфат натрия.

TNF α , с использованием MyD88-зависимых путей, а CXCL10, CCL5, IFN- β и оксида азота посредством MyD88-независимых путей [4]. Постоянное пополнение пула провоспалительных цитокинов приводит к слабовыраженному системному хроническому воспалению [5].

Один из природных лигандов TLR4 – индуцибельная форма белка теплового шока Hsp70, отвечающего также за фолдинг белков, синтезируемых в клетке, рефолдинг частично денатурированных белков при различных видах стресса, в том числе при тепловом шоке [6, 7].

Ранее было показано, что рекомбинантный Hsp70 обладает противовоспалительным действием, ингибирует продукцию активных форм кислорода (АФК), а также экспрессию основных медиаторов воспаления (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 и др.) нейтрофилами и макрофагами в ответ на различные бактериальные токсины [8–11]. Взаимодействие эндогенного Hsp70 с TLR4 приводит к быстрому фагоцитозу образовавшегося комплекса [12]. Также известно, что эндогенный внутриклеточный Hsp70 ингибирует активность TLR4, способствуя его убиквитинзависимой деградации [13].

Еще одно важное противовоспалительное соединение – газотрансмиссер сероводород (H₂S), образуется в клетках в результате процесса транссульфурации, описанного у большинства прокариотических и эукариотических организмов, включая человека [14]. У млекопитающих H₂S продуцируется клетками с помощью различных ферментов, преимущественно цистатионин- β -синтазы (CBS), цистатионин- γ -лиазы (CSE) и 3-меркаптопируват-сульфидтрансферазы (3-MST), но часть H₂S продуцируется кишечной микробиотой. Подавление эндогенных ферментов, участвующих в образовании H₂S при различных заболеваниях, или генетические дефекты ферментных систем биосинтеза H₂S приводят к развитию различных патологий, включая онкологические, сердечно-сосудистые, нейродегенеративные, аутоиммунные (ревматоидный артрит, астма) и др. [15–18]. В последние годы наши исследования защитных свойств рекомбинантного Hsp70 человека и различных доноров H₂S показали, что эти соединения защищают клетки от действия ЛПС [6, 11, 19, 20]. Известно также, что повышенный уровень H₂S в клетках может приводить к индукции образования Hsp70 [21]. Ранее мы изучали влияние экзогенного Hsp70 на функциональные свойства клеток нейробластомы при действии различных ингибиторов эндоцитоза [22]. В настоящей работе исследовали действие белка Hsp70 на клетки ТНР-1 в присутствии ЛПС и доноров сероводорода разной природы – GYY4137 и тиосульфата натрия (STS).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали культуральную среду RPMI-1640, флуоресцентный зонд SF7-AM, HEPES, L-глутамин, фосфатно-солевой буфер (PBS), краситель Crystal Violet, краситель нитросиний тетразолий (НСТ), краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид (МТТ), актиномицин D, додецилсульфат натрия (SDS), пенициллин, стрептомицин, диметилсульфоксид (ДМСО), раствор Трипсина-Версена, ЛПС из *Escherichia coli* O55:B5, GYY4137 (морфолин-4-иум (4-метоксифенил)морфолин-4-илфосфинодиоат) (все “Sigma-Aldrich”, США); эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота (ЭТС), тестируемая на присутствие эндотоксина 0.01 ед./мл (“HyClone”, США); ди-насор (Dun), амилорид (Am), метил-бета-циклодекстрин (MBCD), нокодазол (Noc), филипин (Fil) (“Sigma-Aldrich”); STS (“Дальхимфарм”, Россия).

Выделение рекомбинантного Hsp70 человека. Рекомбинантный Hsp70 человека с пятью аминокислотными заменами, повышающими растворимость и стабильность белка [23], продуцировали в бактериальной культуре с использованием конструкции на основе вектора pET-14b и очищали методом металл-аффинной хроматографии на Ni-NTA-сефарозе и аффинной хроматографии на АТР-агарозе. Дополнительную доочистку препаратов Hsp70 от остаточного ЛПС проводили на полимиксин- или полилизин-агарозе, степень очистки контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и LAL-теста согласно инструкции производителя. Концентрацию очищенного белка измеряли по методу Брэдфорда (Pierce Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit).

Культуры клеток. Линия промоноцитов человека, ТНР-1, получена из Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC, США), линия клеток L-929 фибробластов мыши – из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (“Sigma-Aldrich”), содержащей 10% термоинактивированной ЭТС, 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°C и 5% CO₂.

Дифференцировку клеток ТНР-1 проводили в культуральной среде (КС) в 24-луночных плоскостонных планшетах с добавлением 200 нМ форбол-12-миристат-13-ацетата (РМА) в течение 72 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂, промывали КС и затем использовали в экспериментах. К клеткам добавляли 2 мкг/мл Hsp70, 2 мМ STS или 200 мкМ GYY4137 на 120 мин, затем в соответствующие образцы добавляли 1 мкг/мл ЛПС из *E. coli* (серотип O55:B5) и инкубировали в течение 24 ч при +37°C в атмосфере 5% CO₂.

Образование активных форм кислорода (АФК) в клетках ТНР-1 определяли с использованием красителя НСТ [24]. Этот метод отражает активность кислородзависимого клеточного метаболизма — источника АФК. По окончании культивирования из планшетов с клетками отбирали КС, клетки промывали PBS и добавляли 0.1%-ный раствор НСТ (2 ч при +37°C и 5% CO₂). Затем клетки отмывали 2 раза PBS, фиксировали этанолом и сушили. Образовавшийся внутриклеточный формазан растворяли в 300 мкл 2 М КОН и 400 мкл ДМСО на лунку. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 620 нм на планшетном ридере “Униплан” (“Пикон”, Россия).

Продукцию TNF α определяли по цитотоксическому действию образцов на клетки-мишени — линию фибробластов L-929 мыши [19]. Клетки L-929 культивировали в 96-луночных планшетах (2 × 10⁴ в 100 мкл среды на лунку) при +37°C и 5% CO₂ в течение 24 ч, затем к образовавшемуся монослою 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”, США) и определяли выживаемость клеток после растворения кристаллов в 1%-ном растворе SDS. Оптическую плотность измеряли при 595 нм на планшетном ридере “Униплан” (“Пикон”, Россия). Продукцию TNF α определяли по индексу цитотоксичности [25].

Жизнеспособность клеток контролировали с использованием МТТ-теста [19, 20]. Жизнеспособность клеток в экспериментальных пробах была не менее 96–99%.

Образование сероводорода в клетках. Образование H₂S под действием доноров сероводорода GYY4137 и STS регистрировали на проточном цитометре CytoFLEX (“Beckman Coulter”, США) с использованием флуоресцентного зонда SF7-AM [26]. Показано, что добавление GYY4137 и STS приводило к высвобождению H₂S в клетках ТНР-1, что полностью соответствует результатам, приведенным в [19].

Ингибиторный анализ. В экспериментах использовали следующие ингибиторы эндоцитоза: амилорид (Amil), нокодазол (Noc), филипин (Fil), динасор (Dun), Метил- β -циклодекстрин (MBCD). Ингибиторы добавляли к клеткам за 30 мин до введения Hsp70, ЛПС и доноров сероводорода (GYY4137 и STS) [27]. Оптимальные и нетоксичные концентрации ингибиторов определяли, используя предварительно установленные максимальные нетоксичные концентрации (данные не приведены).

Регистрация действия Hsp70-Alexa 555 на клетки ТНР-1. Клетки ТНР-1 в КС с 10% ЭТС помещали в 35 мм чашки Петри с повышенной адгезией (“Eppendorf”, Германия) и добавляли 200 нМ РМА. Клетки дифференцировали в течение 72 ч при +37°C в атмосфере 5% CO₂, промывали КС, снимали с поверхности с помощью раствора Трипсина–Версена и использовали в экспериментах. Суспензию дифференцированных клеток ТНР-1 (1 × 10⁶/мл) в бессывороточной КС без фенолового красного разливали в микропробирки по 300 мкл, вносили добавки (ингибиторы) и инкубировали в течение 30 мин при +37°C и 5% CO₂. Затем клетки центрифугировали (отмывали от ингибиторов) при 250 g в течение 5 мин, разводили осадок в 300 мкл бессывороточной КС без фенолового красного и добавляли Hsp70-Alexa 555 в конечной концентрации 1 мкг/мл. Hsp70, меченый Alexa 555 (Hsp70-Alexa 555), любезно предоставлен Б. Маргулисом (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Пробы инкубировали при +37°C и 5% CO₂ в течение 3 ч, этот интервал времени был выбран, исходя из результатов, полученных в [12], а затем измеряли на цитометре CytoFLEX (“Beckman Coulter”).

Статистика. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение, вычисленные в шести независимых экспериментах, выполненных в четырех повторностях. Различия между группами анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с попарными сравнениями Тьюки. Нормальность распределения анализируемых величин проверяли с использованием критерия Шапиро–Уилка. Пороги значимости были следующими: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.001$, # $p < 0.001$, ## $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кинетика защиты клеток ТНР-1 белком теплового шока Hsp70, GYY4137 и STS от ЛПС-индуцированной активации

Инкубация клеток с Hsp70 (2 мкг/мл), GYY4137 (200 мкМ) и STS (2 мМ) в течение 24 ч приводит (по сравнению с контрольными клетками) к небольшому увеличению продукции TNF α клетками — до 17, 9 и 7 пг/мл соответственно (рис. 1а, 1). Добавление Hsp70, GYY4137 и STS к клеткам за 2 ч до ЛПС снижает продукцию TNF α (по сравнению с действием ЛПС) на 61, 69 и 65% соответственно. Исследование кинетики защитного действия использованных соединений показало, что при предварительной обработке клеток в течение 20 мин (до добавления ЛПС) эффективность защиты достигает 50% (рис. 1б). Из трех соединений наиболее эффективно клетки от действия ЛПС защищал GYY4137. Эффективность Hsp70, GYY4137 и STS можно оценить, сравнивая

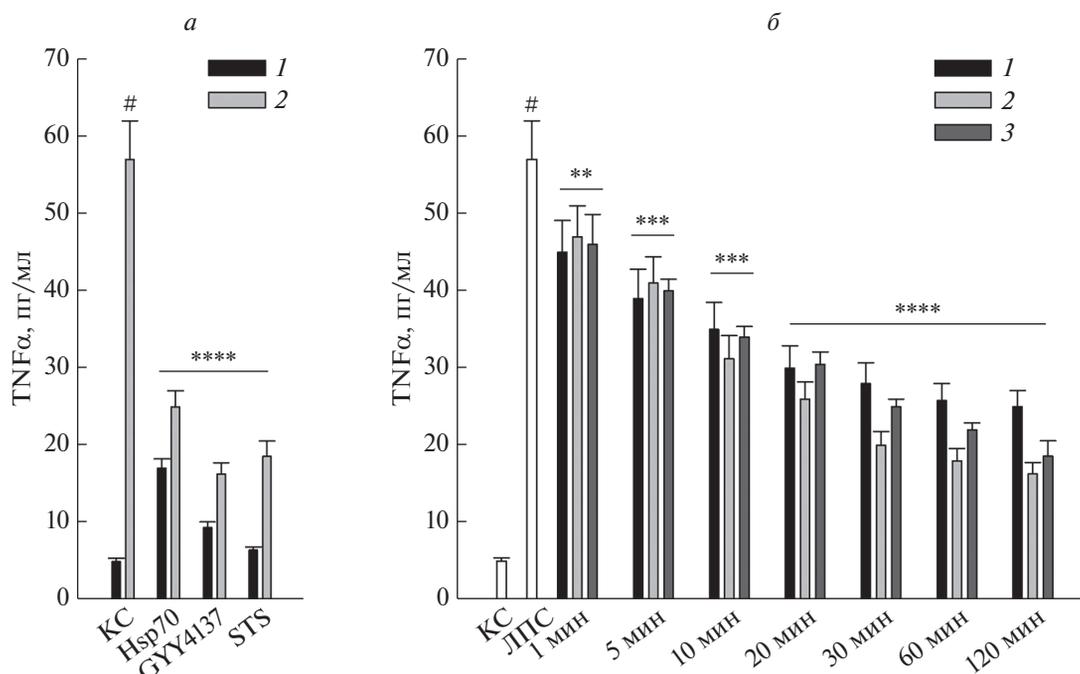


Рис. 1. Действие Hsp70, GYY4137 и STS на ЛПС-индуцированную продукцию TNF α клетками THP-1. *а:* 1 – продукция TNF α клетками в отсутствие ЛПС; 2 – продукция TNF α клетками в присутствии ЛПС. *б:* 1 – 2 мкг/мл Hsp70; 2 – 200 мкМ GYY4137; 3 – 2 мМ STS. 1, 2 и 3 – последовательное добавление к клеткам сначала одного из соединений (Hsp70, GYY4137 и STS), а затем (в интервале 1–120 мин) ЛПС. Концентрация ЛПС в клеточных пробах – 1 мкг/мл.

отношение ЛПС-индуцированной продукции TNF α (или АФК) клетками к контролю и отношение продукции TNF α в присутствии Hsp70 (или GYY4137 и STS) и ЛПС (обозначено как коэффициент эффективности K_3) к контрольному значению. Так, например, отношение продукции TNF α для ЛПС составило 11.4 (57/5), а для STS – 3.1 соответственно. В случае Hsp70 и GYY4137 величины K_3 составят 2.3 и 3.5 соответственно.

Ингибиторы эндоцитоза снижают связывание Hsp70-Alexa 555 с клетками THP-1

Показано, что все использованные нами ингибиторы эндоцитоза снижали связывание Hsp70-Alexa 555 с макрофагами по сравнению с контрольными клетками. Наиболее эффективно связывание снижали ингибиторы динасор и МВСД (рис. 2, МВСД и Дуп) по сравнению с контрольными клетками (рис. 2, КС), ~35%.

Влияние Hsp70, GYY4137 и STS на ЛПС-индуцированную активацию клеток THP-1 в присутствии ингибиторов эндоцитоза

Изучение действия ингибиторов эндоцитоза показало, что все примененные ингибиторы уменьшали продукцию АФК и TNF α клетками THP-1, а также и ЛПС-индуцированную продукцию АФК и TNF α (рис. 3 и 4, сравнение столби-

ков 2 с ингибиторами со столбиком 2 с ЛПС). Максимальное снижение продукции АФК вызывали МВСД и динасор. Амилорид, нокодазол и филиппин ингибировали продукцию АФК в меньшей степени. МВСД, динасор и амилорид несколько снижали продукцию АФК для Hsp70, GYY4137 и STS по сравнению с действием этих соединений без ингибиторов. В присутствии ингибиторов величины K_3 для Hsp70, GYY4137 и STS приближаются к единице.

Ингибиторы эндоцитоза более значимо влияли на продукцию TNF α клетками, чем на продукцию АФК (рис. 4). Так, в присутствии всех ингибиторов ЛПС-индуцированная продукция TNF α снижается более чем в 2 раза (рис. 4, столбики 2 с ингибиторами по сравнению со столбиком 2, КС). В присутствии ингибиторов во всех клеточных пробах величина K_3 находится в интервале ~1.3–1.5. Ингибиторы МВСД, динасор, амилорид и филиппин снижали продукцию TNF α в клеточных пробах с Hsp70, GYY4137 и STS по сравнению с действием этих соединений без ингибиторов (рис. 4, 1–5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

TLR4 активируется ЛПС с участием LBP (LPS binding protein) и CD14 и последовательно запускает два сигнальных каскада. Первый каскад с участием адапторных белков TIRAP и MyD88 ин-

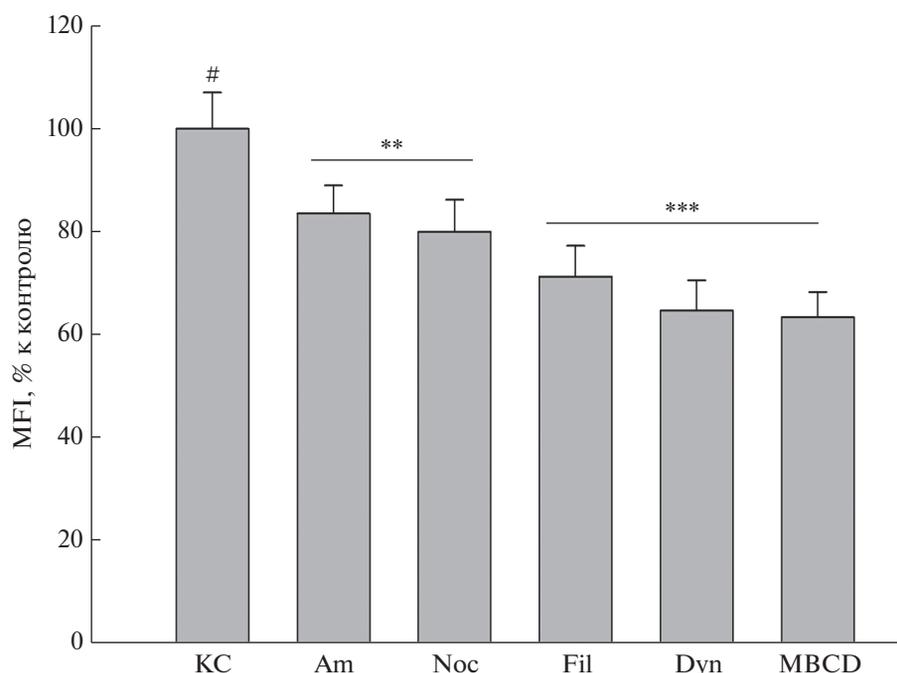


Рис. 2. Действие ингибиторов эндоцитоза на связывание Hsp70-Alexa 555 с клетками THP-1. MFI – медианная интенсивность флуоресценции. KC – культуральная среда; Am – 100 мкМ амилорид; Noc – 1 мкМ нокодазол; Fil – 1 мкМ филиппин; Dyn – 40 мкМ динасор; MBCD – 2 мМ метил- β -циклодекстрин. Ингибиторы добавляли к клеткам за 30 мин до Hsp70-Alexa 555. За 100% принята MFI клеток в культуральной среде, все остальные значения представлены в процентах от указанного значения. Общее время культивирования клеток – 24 ч. $N = 6$, $*p < 0.01$, $**p < 0.005$ по сравнению с KC.

дуцируется в плазматической мембране, тогда как второй каскад активируется присоединением адапторных белков TRAM и TRIF к удвоенному комплексу (TLR4-MD2) в ранних эндосомах после эндоцитоза рецептора TLR4 [28]. Мембранная форма CD14 заякорена в липидных микродоменах клеточной мембраны рядом с молекулами TLR4 [29].

Одним из первых ответов клетки на провоспалительное действие ЛПС является индукция синтеза АФК с последующим синтезом TNF α и ряда других провоспалительных цитокинов [30]. Основным источником АФК в макрофагах – NADPH-оксидаза [31], механизм активации которой с участием Toll-подобных рецепторов (TLR) остается недостаточно изученным. Однако известно, что NADPH-оксидаза, по крайней мере частично, включает сигнальные пути с участием различных протеинкиназ [31, 32].

Исследование кинетики защитного действия Hsp70 и доноров H₂S показало, что доноры сероводорода более значимо снижают активацию клеток при действии ЛПС, чем Hsp70 (рис. 1б). При этом и Hsp70, и доноры H₂S в отсутствие ЛПС увеличивали продукцию TNF α клетками по сравнению с контролем (рис. 1а, столбики 2). Максимальной активацией обладал белок Hsp70

(17 пг/мл), минимальной – STS (6.5 пг/мл). Меньшая эффективность защитного действия Hsp70 (по сравнению с STS), вероятно, связана с его небольшим провоспалительным действием. Некоторое увеличение продукции TNF α клетками при действии GYY4137 (9.4 пг/мл) может быть обусловлено тем, что GYY4137 способен увеличивать экспрессию белков семейства Hsp70 [19].

Нами показано (рис. 3), что Hsp70 и доноры сероводорода значительно снижают продукцию АФК. Эти результаты подтверждаются и данными проведенного нами транскриптомного анализа, согласно которым ЛПС вызывает увеличение синтеза нескольких субъединиц NADPH-оксидазы: мембранной gp67 и двух цитоплазматических – p47phox и p67 phox [19]. При этом GYY4137 снижает уровень трех субъединиц в составе NADPH-оксидазного комплекса. В этом, по-видимому, состоит основной механизм защиты клеток от ЛПС-индуцируемой продукции АФК. При бактериальной инфекции NADPH-оксидаза участвует в механизмах гибели бактерий в составе фагосом. Анализ транскриптома показал [19], что ЛПС увеличивает уровень катепсина и Fc γ -рецептора. Этот рецептор вместе с фосфолипазой D и ARF6 может участвовать в активации NADPH-оксидазы [33]. В наших экспериментах экспрессия фосфолипазы D и ARF6 не изменялась под

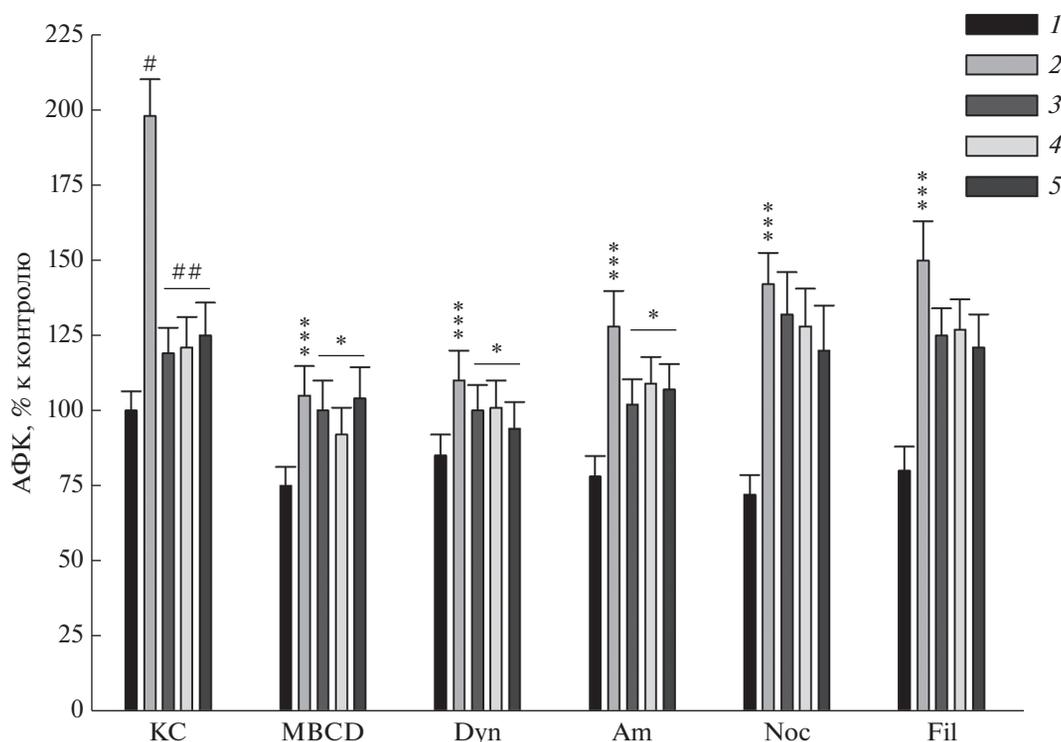


Рис. 3. Действие ингибиторов эндоцитоза на продукцию АФК клетками ТНР-1 в присутствии Hsp70 (2 мкг/мл), GYY4137 (200 мкМ), STS (2 мМ) и ЛПС (1 мкг/мл). KC – культуральная среда; MBCD – 2 мМ метил- β -циклодекстрин; Dyn – 40 мкМ динасор; Am – 100 мкМ амилорид; Noc – 1 мкМ нокодазол; Fil – 1 мкМ филипин. 1 – клетки в отсутствие ЛПС, Hsp70, GYY4137 и STS; 2 – добавление ЛПС; 3 – добавление Hsp70; 4 – добавление GYY4137; 5 – добавление STS. Ингибиторы добавляли за 30 мин до Hsp70, GYY4137 и STS; с последними клетки инкубировали в течение 2 ч и добавляли ЛПС. За 100% принята продукция АФК клетками ТНР-1 в контроле (KC, столбик 1), все остальные значения представлены как процент от указанного значения. Общее время культивирования клеток – 24 ч. Сравнивали значения # с *** и ## с *.

действием ЛПС и GYY4137, при этом GYY4137 снижал уровень Fc α R, Fc γ R и катепсина, присутствующего в фаголизосомах. В фаголизосомах присутствует только катепсин. Ингибитор динасора снижал защиту клеток от ЛПС донорами H₂S и Hsp70, а также общую продукцию АФК и TNF α (рис. 3, 4, Dyn). Снижение продукции АФК и TNF α клетками при действии динасора может быть обусловлено взаимосвязью NADPH-оксидазы [34] и TLR4 [35] с клатрином клеточных мембран.

Другим механизмом снижения уровня АФК и TNF α в наших экспериментах (рис. 1, 3 и 4) может быть снижение уровня клеточных TLR4 в присутствии Hsp70 и доноров H₂S [19, 20].

ЛПС может не только активировать NADPH-оксидазу, но и переключать метаболизм макрофагов с окислительного фосфорилирования на гликолиз и пентозофосфатный путь. Ингибирование пентозофосфатного пути подавляет вызванное ЛПС повышение активности NOX2 и связано со значительным снижением экспрессии мРНК NADPH-оксидазы [36]. По данным транскриптомного анализа ЛПС и GYY4137 влияют на

экспрессию ферментов, вовлеченных в регуляцию гликолиза и глюконеогенеза. Установлено [19], что ЛПС увеличивает экспрессию мутаротазы галактозы, гексокиназы 1, фруктозо-1,6-бисфосфатазы и бисфосфолицератмутазы. GYY4137 уменьшает экспрессию первых трех ферментов и не влияет на экспрессию бисфосфолицератмутазы. Эти данные позволяют предположить, что под действием ЛПС метаболизм клеток ТНР-1 переключается с окислительного фосфорилирования на гликолиз. GYY4137 нивелирует эти процессы.

В наших экспериментах Hsp70 эффективно защищал клетки от ЛПС-индуцированной продукции АФК и TNF α (рис. 1, 3 и 4). Одним из механизмов этой защиты может быть непосредственное взаимодействие Hsp70 с NADPH-оксидазой с последующей деградацией этого фермента [37, 38]. Показано, что Hsp70, используя TLR4, может подавлять индукцию NOX3 [39].

Ключевую роль в активации макрофагов под действием ЛПС играет TLR4 [4]. Выполненный нами ранее транскриптомный анализ клеток ТНР-1 [19] показал, что ЛПС вызывает повыше-

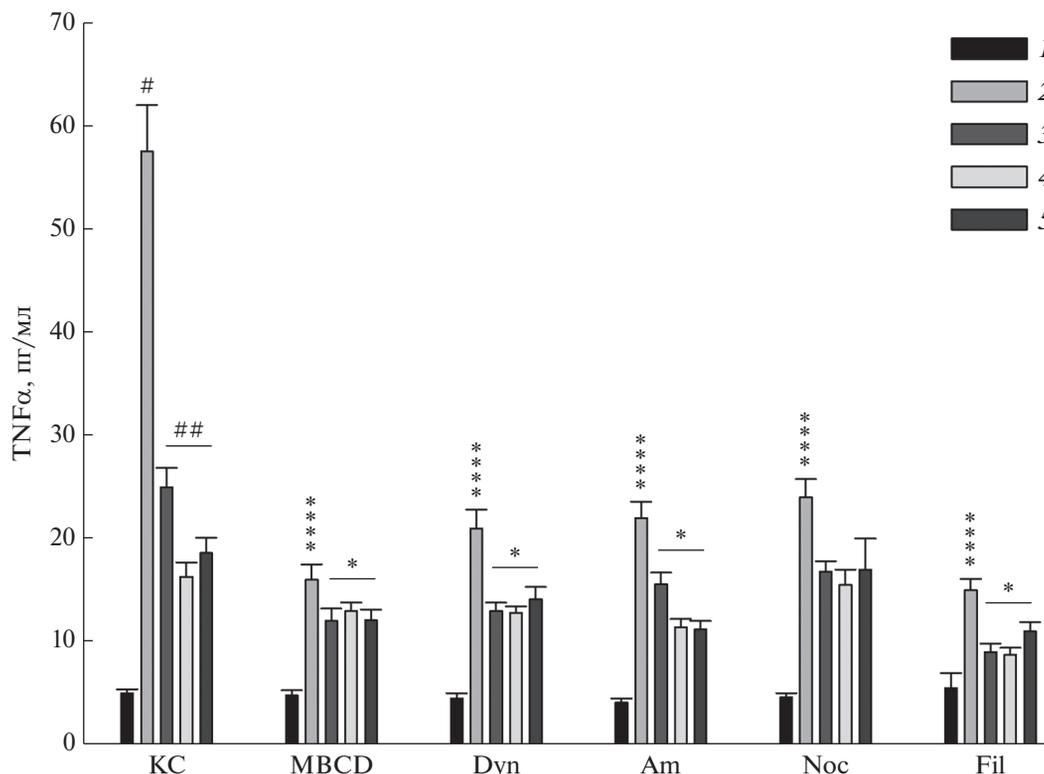


Рис. 4. Действие ингибиторов эндоцитоза на продукцию TNFα клетками THP-1. Обозначения как на рис. 3. Сравнивали значения # с **** и ## с *.

ние уровня экспрессии MyD88 и активирует сигнальный путь NF-κB, важную роль в котором играет TRAF6 (TNF receptor associated factor 6). При действии ЛПС экспрессия TRAF6 в клетках THP-1 не изменяется, зато значительно снижается в присутствии GYY4137 [19]. ЛПС вызывает также увеличение экспрессии TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β) и адапторной киназы RIP1 (receptor-interacting protein 1), связанной с регуляцией сигнальных путей с участием MAP-киназ, а также с регуляцией программируемой клеточной гибели [40]. Согласно данным транскриптомного анализа [19], в присутствии ЛПС значительно возрастает экспрессия хемокинов и провоспалительных цитокинов (INFα, IL-1β, IL-6, IL-8) [19, 20, 22].

Экзогенный Hsp70 взаимодействует с клетками-мишенями благодаря ряду клеточных рецепторов, основными из которых являются TLR4 и TLR2, а также LOX-1, SREC-1 и CLEVER-1 (группа Scavenger receptors, SR), а также CD40 (семейство рецепторов TNF), CD91 (рецептор липопротеинов низкой плотности) и CCR5 (рецептор хемокинов) [41]. Кроме того, рекомбинантный Hsp70 может проникать в клетки, взаимодействуя с липидами клеточных мембран [42]. Связываясь с рецепторами, Hsp70 проникает в клетки при интернализации рецепторов. Показа-

но, что Hsp70 может поступать в клетки и с помощью клатриннезависимого эндоцитоза [43]. ЛПС может поступать в клетки путем рецепторзависимого и клатринзависимого эндоцитоза [44, 45], а также с использованием белков LBP, HMGB1 (high-mobility group protein B1) и RAGE (Receptor of advanced glycation end products) [4].

Изучение влияния ингибиторов эндоцитоза показало, что наиболее эффективным ингибитором эндоцитоза Hsp70-Alexa 555 был MBCD. Способность других ингибиторов снижать эндоцитоз Hsp70-Alexa 555 изменялась в следующем порядке – амилорид < нокодазол < филиппин < < динасор < MBCD) (рис. 2). С этим связано значительное ингибирование продукции АФК и TNFα клетками в присутствии ингибитора липидных микродоменов – MBCD (рис. 3 и 4). Следует отметить, что MBCD не полностью подавляет продукцию АФК и TNFα в присутствии ЛПС и Hsp70, что обусловлено, по-видимому, проникновением ЛПС и Hsp70 в клетку путями, не связанными с рецепторами. Кроме того, ЛПС-индуцированная активация TLR4 усиливает синтез жирных кислот, которые превращаются в сфинголипиды, входящие в состав липидных микродоменов [46].

Транскриптомный анализ влияния ЛПС и GYY4137 на сигнальные пути, регулирующие эн-

доцитоз, показал, что эти соединения действуют как на клатринзависимый, так и на клатриннезависимый эндоцитоз. ЛПС увеличивает уровень MHC1, END1 (принимает участие в рециркуляции рецепторов [47]), SHMP5, MVB12, SWIP, SNX5, CPML и уменьшает уровень Ras, рецепторов TGF β и др. GYY4137 несколько увеличивает уровень TGF β R и Smad (2/3) и снижает уровень cPML. Установлено, что образование комплекса ЛПС-TLR4 индуцирует инактивацию сигналов от рецептора TGF β (TGF β R–Smad (2/3) – факторы транскрипции). Эффективность передачи сигнала от TGF β R к Smad (2/3) возрастает при присоединении к TGF β R адапторных белков cPML и SARA [48]. Сигнальный путь от рецептора TGF β может активироваться окислительным стрессом, что в дальнейшем приводит к активации сигнальных путей с участием p38 MAPK. Показано, что H₂S может эффективно ингибировать сигнальные пути NF- κ B, TGF β и IL-4/STAT6, а также снижать продукцию АФК посредством подавления NOX2/4 [49].

ЛПС уменьшает уровень GPCR и β -аррестина, в то время как GYY4137 повышает их уровень. Также нами установлено, что ЛПС увеличивает уровень кавеолина и тирозинкиназы Src, которые играют важную роль в путях клатриннезависимого эндоцитоза, а GYY4137 снижает уровень кавеолина и тирозинкиназы Src [19]. Ингибитор кавеолинзависимого эндоцитоза филиппин практически отменял защиту клеток донорами H₂S и Hsp70 от ЛПС-индуцированной продукции АФК. При этом филиппин почти на 30% снижал образование АФК, индуцированное ЛПС. Интересно, что продукцию TNF α (связанную с ЛПС) филиппин уменьшал почти в 6 раз (рис. 4, Fil). Кавеолы также связаны сигнальными путями с MAP-киназами, Akt, малыми GTPазами Ras и др. Все эти сигнальные пути в определенной степени связаны с активирующим действием ЛПС. В наших экспериментах филиппин – ингибитор кавеолинзависимого эндоцитоза – снижал защитное действие Hsp70 и GYY4137, нарушая структуру кавеол и воздействуя на многообразие внутриклеточных сигнальных путей, связанных с кавеолинзависимым эндоцитозом [50].

Ингибитор макропиноцитоза амилорид уменьшает и активацию клеток ЛПС, и защитное действие Hsp70 и доноров сероводорода (рис. 3, Am). Важную роль в макропиноцитозе играет NADPH-оксидаза, ингибирование которой подавляет макропиноцитоз, а также Na⁺/H⁺-обменник, который участвует в регуляции уровня актина. Амилорид воздействует на сигнальные пути NF- κ B и снижает продукцию TNF α клетками, что коррелирует с данными [51].

Ингибитор тубулинзависимого эндоцитоза – нокодазол, снижал ЛПС-индуцированную про-

дукцию АФК (~ на 20%) и TNF α (~ в 2.5 раза). При этом ингибитор значительно уменьшал защитное действие Hsp70 и доноров сероводорода (рис. 3 и 4, Noc), как и в [52].

Изучение влияния ингибиторов эндоцитоза на продукцию АФК и TNF α клетками THP-1 в присутствии ЛПС, Hsp70 и доноров сероводорода показало, что все эти ингибиторы снижают продукцию АФК и TNF α клетками. Все ингибиторы уменьшают продукцию TNF α клетками в присутствии ЛПС, Hsp70 и доноров сероводорода. MBCD, динасор и амилорид снижают продукцию АФК в присутствии ЛПС, Hsp70 и доноров сероводорода.

Таким образом, Hsp70 и доноры сероводорода снижают воспалительные процессы в клетках, активированные ЛПС. Hsp70 и доноры H₂S различаются кинетикой защитного действия, при этом более эффективными оказались доноры сероводорода. Изучена роль ингибиторов эндоцитоза в механизмах защиты клеток донорами H₂S и Hsp70 от действия ЛПС. Установлено, что предварительная обработка GYY4137 клеток, подвергшихся воздействию ЛПС, повышает опосредованную ЛПС индукцию провоспалительных генов и снижает экспрессию генов таких путей внутриклеточной сигнализации, как эндоцитоз, фагоцитоз, гликолиз, сигнальный путь NF- κ B, сигнальные пути с участием рецепторов TNF α , TLR4, сигнальные пути тирозинкиназ (PI-3K, MAPK, Src и др.).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00167 для Д.Г.).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hersoug L.-G., Møller P., Loft S. (2016) Gut microbiota-derived lipopolysaccharide uptake and trafficking to adipose tissue: implications for inflammation and obesity. *Obes. Rev.* **17**(4), 297–312.
2. Fuke N., Nagata N., Suganuma H., Ota T. (2019) Regulation of gut microbiota and metabolic endotoxemia with dietary factors. *Nutrients.* **11**(10), 2277.
3. Orecchioni M., Ghosheh Y., Pramod A.B., Ley K. (2019) Macrophage polarization: different gene signatures in M1(LPS+) vs. classically and M2(LPS-) vs. alternatively activated macrophages. *Front. Immunol.* **10**, 1084.
4. Page M.J., Kell D.B., Pretorius E. (2022) The role of lipopolysaccharide-induced cell signalling in chronic inflammation. *Chronic Stress (Thousand Oaks).* **8**, 6, 24705470221076390. <https://doi.org/10.1177/24705470221076390>

5. Mohammad S., Thiernemann C. (2021) Role of metabolic endotoxemia in systemic inflammation and potential interventions. *Front. Immunol.* **11**, 594150.
6. Evgen'ev M.B., Garbuz D.G., Zatsepina O.G. (2014) Heat shock proteins and whole body adaptation to extreme environments. Berlin/Heidelberg, Germany: Springer.
7. Hu C., Yang J., Qi Z., Wu H., Wang B., Zou F., Mei H., Liu J., Wang W., Liu Q. (2022) Heat shock proteins: biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm.* **3**(3), e161. <https://doi.org/10.1002/mco2.161>
8. Aneja R., Odoms K., Dunsmore K., Shanley T.P., Wong H.R. (2006) Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *J. Immunol.* **177**, 7184–7192.
9. Ghosh A.K., Sinha D., Mukherjee S., Biswas R., Biswas T. (2015) LPS stimulates and Hsp70 down-regulates TLR4 to orchestrate differential cytokine response of culture-differentiated innate memory CD8⁺ T cells. *Cytokine.* **73**, 44–52.
10. Kustanova G.A., Murashev A.N., Karpov V.L., Margulis B.A., Guzhova I.V., Prokhorenko I.R., Grachev S.V., Evgen'ev M.B. (2006) Exogenous heat shock protein 70 mediates sepsis manifestations and decreases the mortality rate in rats. *Cell Stress Chaperones.* **11**, 276–286.
11. Rozhkova E., Yurinskaya M., Zatsepina 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.
12. Yurinskaya M., Zatsepina O.G., Vinokurov M.G., Bobkova N.V., Garbuz D.G., Morozov A.V., Kulikova D.A., Mitkevich V.A., Makarov A.A., Funikov S.Y., Evgen'ev M.B. (2015) The fate of exogenous human HSP70 introduced into animal cells by different means. *Curr. Drug Deliv.* **12**(5), 524–532.
13. Afrazi A., Sodhi C.P., Good M., Jia H., Siggers R., Yazji I., Ma C., Neal M.D., Prindle T., Grant Z.S., Branca M., Ozolek J., Eugene Chang E., Hackam D.J. (2012) Intracellular heat shock protein-70 negatively regulates TLR4 signaling in the newborn intestinal epithelium. *J. Immunol.* **188**, 4543–4557.
14. Kimura H. (2014) Hydrogen sulfide and polysulfides as biological mediators. *Molecules.* **19**, 16146–16157.
15. Dilek N., Papapetropoulos A., Toliver-Kinsky T., Szabo C. (2020) Hydrogen sulfide: an endogenous regulator of the immune system. *Pharmacol. Res.* **161**, 105119.
16. Xiao Q., Ying J., Xiang L., Zhang C. (2018) The biologic effect of hydrogen sulfide and its function in various diseases. *Medicine.* **97**, e13065.
17. Khattak S., Rauf M.A., Khan N.H., Zhang Q.Q., Chen H.J., Muhammad P., Ansari M.A., Alomary M.N., Jahangir M., Zhang C.Y., Ji X.Y., Wu D.D. (2022) Hydrogen sulfide biology and its role in cancer. *Molecules.* **27**(11), 3389. <https://doi.org/10.3390/molecules27113389>
18. Zhu C., Liu Q., Li X., Wei R., Ge T., Zheng X., Li B., Liu K., Cui R. (2022) Hydrogen sulfide: a new therapeutic target in vascular diseases. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **13**, 934231. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.934231>
19. Yurinskaya M.M., Krasnov G.S., Kulikova D.A., Zatsepina O.G., Vinokurov M.G., Chuvakova L.N., Rezykh A.P., Funikov S.Y., Morozov A.V., Evgen'ev M.B. (2020) H₂S counteracts proinflammatory effects of LPS through modulation of multiple pathways in human cells. *Inflamm. Res.* **69**(5), 481–495.
20. Onikienko S., Vinokurov M., Yurinskaya M., Zemlyanoi A., Abkin S., Shaykhutdinova E., Palikov V., Ivanov A., Smirnova O., Fedyakina I., Bychkova N., Zatsepina O., Garbuz D., Evgen'ev M. (2022) The effects of H₂S and recombinant human Hsp70 on inflammation induced by SARS and other agents *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicines.* **10**(9), 2155. <https://doi.org/10.3390/biomedicines>
21. Du Y., Liu X.H., Zhu H.C., Wang L., Wang Z.S., Ning J.Z., Xiao C.C. (2019) Hydrogen sulfide treatment protects against renal ischemia-reperfusion injury via induction of heat shock proteins in rats. *Iran J. Basic Med. Sci.* **22**(1), 99–105.
22. Юринская М.М., Гарбуз Д.Г., Афанасьев В.Н., Евгеньев М.Б., Винокуров М.Г. (2020) Действие донора сероводорода GYY4137 и белка Hsp70 на активацию клеток SH-SY5Y липополисахаридами. *Молекуляр. биология.* **54**(6), 1018–1028.
23. Gurskiy Y.G., Garbuz D.G., Soshnikova N.V., Krasnov A.N., Deikin A., Lazarev V.F., Sverchinskiy D., Margulis B.A., Zatsepina O.G., Karpov V.L., Belzhelarskaya S.N., Feoktistova E., Georgieva S.G., Evgen'ev M.B. (2016) The development of modified human Hsp70 (HSPA1A) and its production in the milk of transgenic mice. *Cell Stress Chaperones.* **21**(6), 1055–1064.
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. Pfister H., Hennet T., Jungi T. (1992) Lipopolysaccharide synergizes with tumour necrosis factor- α in cytotoxicity assays. *Immunology.* **77**(3), 473–476.
26. Lin V.S., Lippert A.R., Chang C.J. (2013) Cell-trappable fluorescent probes for endogenous hydrogen sulfide signaling and imaging H₂O₂-dependent H₂S production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**(18), 7131–7135.
27. 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.
28. Ciesielska A., Matyjek M., Kwiatkowska K. (2021) TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **78**(4), 1233–1261.
29. Пłyциениковска А., Хромлада-Жудычка А., Борзэчка К., Kwiatkowska K. (2015) Co-operation of TLR4 and

- raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 557–581.
30. Pérez S., Rius-Pérez S. (2022) Macrophage polarization and reprogramming in acute inflammation: a redox perspective. *Antioxidants* (Basel). **11**(7), 1394.
 31. Nocella C., D'Amico A., Cammisotto V., Bartimoccia S., Castellani V., Loffredo L., Marini L., Ferrara G., Testa M., Motta G., Benazzi B., Zara F., Frati G., Sciarretta S., Pignatelli P., Violi F., Carnevale R., Group S. (2023) Structure, activation, and regulation of Nox2: at the crossroad between the innate immunity and oxidative stress-mediated pathologies. *Antioxidants* (Basel). **12**(2), 429.
 32. Trevelin S.C., Shah A.M., Lombardi G. (2020) Beyond bacterial killing: NADPH oxidase 2 is an immunomodulator. *Immunol. Lett.* **221**, 39–48.
 33. Van Acker T., Tavernier J., Peelman F. (2019) The small GTPase Arf6: an overview of its mechanisms of action and of its role in host-pathogen interactions and innate immunity. *Int. J. Mol. Sci.* **20**(9), 2209.
 34. Ejlerskov P., Christensen D.P., Beyaie D., Burritt J.B., Paclet M., Gorchach A., van Deurs B., Vilhardt F. (2012) NADPH oxidase is internalized by clathrin-coated pits and localizes to a Rab27A/B GTPase-regulated secretory compartment in activated macrophages. *J. Biol. Chem.* **287**(7), 4835–4852.
 35. Pérez-Rodríguez M.J., Ibarra-Sánchez A., Román-Figueroa A., Pérez-Severiano F., González-Espinosa C. (2020) Mutant Huntingtin affects toll-like receptor 4 intracellular trafficking and cytokine production in mast cells. *J. Neuroinflammation.* **17**(1), 95.
 36. Erlich J.R., To E.E., Luong R., Liang F., Liang S., Oseghale O., Miles M.A., Bozinovski S., Brooks R.D., Vlahos R., Chan S., O'Leary J.J., Brooks D.A., Selimidis S. (2022) Glycolysis and the pentose phosphate pathway promote LPS-induced Nox2 oxidase- and IFN- β -dependent inflammation in macrophages. *Antioxidants* (Basel). **11**(8), 1488.
 37. Chen F., Yu Y., Qian J., Wang Y., Cheng B., Dimitropoulou C., Patel V., Chadli A., Rudic R.D., Stepp D.W., Catravas J.D., Fulton D.J. (2012) Opposing actions of heat shock protein 90 and 70 regulate nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase stability and reactive oxygen species production. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 2989–2999.
 38. Hsieh L.T., Frey H., Nastase M.V., Tredup C., Hoffmann A., Poluzzi C., Zeng-Brouwers J., Manon-Jensen T., Schröder K., Brandes R.P., Iozzo R.V., Schaefer L. (2016) Bimodal role of NADPH oxidases in the regulation of biglycan-triggered IL-1 β synthesis. *Matrix Biol.* **49**, 61–81.
 39. Zhang Y., Shan P., Srivastava A., Jiang G., Zhang X., Lee P.J. (2016) An endothelial Hsp70-TLR4 axis limits Nox3 expression and protects against oxidant injury in lungs. *Antioxid. Redox Signal.* **24**(17), 991–1012.
 40. Webster J.D., Vucic D. (2020) The balance of TNF mediated pathways regulates inflammatory cell death signaling in healthy and diseased tissues. *Front. Cell. Dev. Biol.* **21**, 365.
 41. Гарбуз Д.Г., Зацепина О.Г., Евгеньев М.Б. (2019) Основной стрессовый белок человека (Hsp70) как фактор белкового гомеостаза и цитокин-подобный регулятор. *Молекуляр. биология.* **53**(2), 200–217.
 42. De Maio A., Hightower L. (2021) The interaction of heat shock proteins with cellular membranes: a historical perspective. *Cell Stress Chaperones.* **26**(5), 769–783.
 43. Nimmervoll B., Chtcheglova L.A., Juhasz K., Cremades N., Aprile F.A., Sonnleitner A., Hinterdorfer P., Vigh L., Preiner J., Balogi Z. (2015) Cell surface localised Hsp70 is a cancer specific regulator of clathrin-independent endocytosis. *FEBS Lett.* **589**(19 Pt B), 2747–2753.
 44. Shim D.W., Heo K.H., Kim Y.K., Sim E.J., Kang T.B., Choi J.W., Sim D.W., Cheong S.H., Lee S.H., Bang J., Won H.S., Lee K.H. (2015) Anti-inflammatory action of an antimicrobial model peptide that suppresses the TRIF-dependent signaling pathway via inhibition of Toll-like receptor 4 endocytosis in lipopolysaccharide stimulated macrophages. *PLoS One.* **10**(5), e0126871.
 45. Józefowski S., Śrótek M. (2017) Lipid raft-dependent endocytosis negatively regulates responsiveness of J774 macrophage-like cells to LPS by down regulating the cell surface expression of LPS receptors. *Cell. Immunol.* **312**, 42–50.
 46. Olona A., Hateley C., Muralidharan S., Wenk M.R., Torta F., Behmoaras J. (2021) Sphingolipid metabolism during Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated macrophage activation. *Br. J. Pharmacol.* **178**(23), 4575–4587.
 47. Naslavsky N., Caplan S. (2020) Endocytic membrane trafficking in the control of centrosome function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **65**, 150–155.
 48. Gomart A., Vallée A., Lecarpentier Y. (2021) Necrotizing enterocolitis: LPS/TLR4-induced crosstalk between canonical TGF- β /Wnt/ β -catenin pathways and PPAR γ . *Front. Pediatr.* **9**, 713344. <https://doi.org/10.3389/fped.2021.713344>
 49. Chen Y., Yuan S., Cao Y., Kong G., Jiang F., Li Y., Wang Q., Tang M., Zhang Q., Wang Q., Liu L. (2021) Gasotransmitters: potential therapeutic molecules of fibrotic diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2021**, 3206982. <https://doi.org/10.1155/2021/3206982>
 50. Pathak C., Vaidya F.U., Waghela B.N., Jaiswara P.K., Gupta V.K., Kumar A., Rajendran B.K., Ranjan K. (2023) Insights of endocytosis signaling in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **24**(3), 2971.
 51. Tang H., Chen H., Jia Y., Liu X., Han Z., Wang A., Liu Q., Li X., Feng X. (2017) Effect of inhibitors of endocytosis and NF- κ B signal pathway on folate-conjugated nanoparticle endocytosis by rat Kupffer cells. *Int. J. Nanomedicine.* **12**, 6937–6947.
 52. Li Z., Davis G.S., Mohr C., Nain M., Gemsa D. (1996) Inhibition of LPS-induced tumor necrosis factor- α production by colchicine and other microtubule disrupting drugs. *Immunobiology.* **195**(4–5), 624–639.

Protective Action of HSP70 and Hydrogen Sulfide Donors in THP-1 Macrophages at Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Modulating Endocytosis

M. M. Yurinskaya¹, D. G. Garbuz², M. B. Evgen'ev^{1, 2, *} and M. G. Vinokurov¹

¹*Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

²*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

**e-mail: misha672011@yahoo.com*

Hsp70 and hydrogen sulfide donors reduce inflammatory processes in human and animal cells. The biological action mediated by Hsp70 and H₂S donors (GYY4137 and sodium thiosulfate) depends on their protection kinetics from cell activation by lipopolysaccharides. However, the molecular mechanisms of action of Hsp70 and H₂S are not well understood. We studied the effect of human recombinant Hsp70 and H₂S donors on the formation of reactive oxygen species and tumor necrosis factor- α induced in human cells (THP-1) by lipopolysaccharides. Transcriptomic changes occurring in these cells after LPS administration in combination with GYY4137 pretreatment were investigated. The results obtained showed that Hsp70 and hydrogen sulfide donors reduce inflammatory processes in cells activated by the action of LPS. Hsp70 and H₂S donors differed in the kinetics of the protective action, while hydrogen sulfide donors turned out to be more effective. The role of endocytosis in the mechanisms of protection of cells by H₂S and Hsp70 donors from the action of LPS was studied. It has been found that GYY4137 pretreatment of LPS-exposed cells reduces the LPS-induced induction of various pro-inflammatory genes and affects the expression of genes of various intracellular signaling pathways.

Keywords: GYY4137, STS, Hsp70, LPS, THP-1, TNF α , ROS