

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭКЗОГЕННОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА HSP70 С ФАГОЦИТАМИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ LPS РАЗЛИЧНОЙ СТРУКТУРЫ

**О. Ю. Антонова, М. М. Юринская,
М. Б. Евгеньев, М. Г. Винокуров**

Пушкинский государственный естественно-научный институт,

Институт биофизики клетки РАН, Пушкино

Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта РАН, Москва

antonovaolga07@rambler.ru

В развитии грамотрицательного сепсиса ключевая роль принадлежит липополисахаридам (LPS), которые также имеют важное значение в развитии некоторых социально значимых заболеваний [1]. Большинство энтеробактерий *Escherichia coli* содержат S-форму LPS, в состав которой входит липид А, олигосахаридный кор и О-антиген, также энтеробактерии синтезируют и кор-дефектные молекулы LPS (R-хемотипы), имеющие в своем составе липид А и коровую часть разной длины [2]. Поступая в кровяное русло, LPS взаимодействует с липополисахарид-связывающим белком (LBP), затем — с CD14 рецептором, который в свою очередь передает LPS к MD-2, с последующим образованием комплекса LPS-MD-2-TLR4 [3]. Далее развивается клеточный ответ, на ранних стадиях которого происходит увеличение продукции активных форм кислорода (АФК) клетками и увеличение экспрессии факторов адгезии. В более поздний период происходит синтез провоспалительных цитокинов, среди которых первым секретируется TNF α [4].

Предполагается, что с рецепторным комплексом LPS могут связываться и белки теплового шока 70 (HSP70). Ранее было показано, что

введение экзогенного рекомбинантного HSP70 увеличивает выживаемость животных в модели септического шока [5].

Следует отметить, что в настоящее время достаточно хорошо исследовано действие S-формы эндотоксинов на миелоидные клетки, в то время как действие различных R-форм LPS исследовано сравнительно мало. В данной работе было проведено исследование кинетики взаимодействия человеческого рекомбинантного экзогенного HSP70 с клетками THP-1, а также его влияние на генерацию АФК, продукцию TNF α и экспрессию рецепторов фагоцитами крови (нейтрофилами и моноцитами) при действии различных хемотипов LPS.

На первом этапе работы было проведено исследование кинетики взаимодействия экзогенного рекомбинантного HSP70 меченого зондом Alexa 555 с промоноцитарной клеточной линией человека THP-1, которое показало, что HSP70 быстро (в течение 5 мин.) связывается рецепторами на поверхности данных клеток. В течение 3 часов происходит постепенное увеличение уровня флуоресценции и соответственно связывания HSP70, с последующим распределением интенсивности флуоресценции и соответственно интернализация HSP70 внутрь клетки в течение 6 час.

Исследование продукции АФК и TNF α нейтрофилами показало, что наибольшей активирующей способностью обладал LPS S-формы, а наименьшей — Re-форма. Предварительная инкубация нейтрофилов с HSP70 значительно снижала эндотоксин-индуцируемую продукцию АФК и TNF α , оказывая, таким образом, защитное действие. Распределение хемотипов по их способности усиливать продукцию данных медиаторов воспаления нейтрофилами коррелирует с уменьшением длины полисахаридной цепи, аналогичные выводы были получены в отношении защитного эффекта HSP70. Изучение действия хемотипов LPS на продукцию АФК и TNF α моноцитами выявило схожее распределение хемотипов LPS — с той лишь разницей, что экспозиция с Ra-формой LPS наиболее эффективно усиливала ХЛ.

Ранее упоминалось, что процесс взаимодействия LPS с клетками обусловлен связыванием его с LBP, TLR-4, CD14 и MD2, также известно, что в состав данного рецепторного комплекса, входят β -2-интегриновые CD11b/CD18 рецепторы [6]. Нами было показано, что обработка клеток S-формой LPS практически двукратно увеличивала экспрессию данного рецептора. При этом протективное действие HSP70 от этого LPS было максимальным, снижая величину экспрессии рецепторов до уровня, соответствующего действию этого белка. По мере уменьшения

полисахаридной цепи активирующее действие хемотипов LPS и защитное действие HSP70 снижалось.

Также было проведено исследование влияния HSP70 на экспрессию рецепторов TLR-4 моноцитами при действии LPS. Под действием S-формы LPS наблюдалось максимальное увеличение экспрессии TLR-4, под действием Re хемотипа – минимальное. Препрекондиционирование моноцитов с рекомбинантным HSP70 незначительно увеличивало экспрессию TLR-4 рецептора, при этом снижало индуцируемую LPS экспрессию TLR-4.

Таким образом, в данной работе было продемонстрировано физиологическое значение различия в структуре хемотипов LPS, предполагающее использование несколько отличных путей для активации клеток. Тем самым, уменьшение длины полисахаридной цепи связано с увеличением гидрофобности молекулы LPS и с ее активирующим действием и является важным фактором во взаимодействии с рецепторами клеток мишеней – нейтрофилов и моноцитов.

Также нами было показано, что экзогенный рекомбинантный HSP70 снижает индуцируемую LPS различной структуры продукцию АФК, TNF-а и экспрессию рецепторов CD11b и TLR-4 фагоцитами. При этом наблюдается ярко выраженная зависимость между защитным действием экзогенного HSP70 и структурой LPS, которая проявляется в максимальном действии для LPS S-типа и минимальном для LPS Re-типа. В заключение можно отметить, что защитное действие экзогенного HSP70 на нейтрофилы и моноциты при их активации хемотипами LPS свидетельствует о комплексном воздействии этого белка на клетки, включающее влияние на экспрессию CD11b и TLR4 рецепторы и функциональную активность клеток.

Литература

1. *Manco M., Putignani L., Bottazzo G. F.* Gut Microbiota. Lipopolysaccharides, and Innate Immunity in the Pathogenesis of Obesity and Cardiovascular Risk // *Endocr. Rev.* 2010. V. 31. № 6. P. 817–844.
2. *Christian A., Ulrich Z.* Chemical structure of lipid A the primary immunomodulatory center of bacterial lipopolysaccharides // *Trends Glycosci. Glycothechnol.* 2002. V. 14. № 76. P. 69–86.
3. *Park B.S., Song D.H., Kim H.M. et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex // *Nature.* 2009. V. 458. № 7242. P. 1191–1195.

4. Buttenschoen K., Radermacher P., Bracht H. Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application // *Langenbecks Arch. Surg.* 2010. V. 395. № 6. P. 597–605.

5. Schmitt E., Gehrmann M., Brunet M. et al. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy // *J. Leukoc. Biol.* 2007. V. 81. № 1. P.15–27.

6. Triantafilou M., Brandenburg K., Kusumoto S. et al. Combinational clustering of receptors following stimulation by bacterial products determines lipopolysaccharide responses // *Biochem J.* 2004. V. 381. № 2. P. 527–536.

RESEARCH OF THE INTERACTION MECHANISM
OF EXOGENOUS HEAT SHOCK PROTEIN HSP70
WITH HUMAN BLOOD PHAGOCYTES
AT ACTION OF VARIOUS STRUCTURE LPS

O. Yu. Antonova, M. M. Yurinskaya, M. B. Evgen'ev, M. G. Vinokurov
Institute of Cell Biophysics of Russian Academy of Science,
Pushchino State Institute of Natural Sciences,

Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Science

Summary. The dependence between *E. coli* LPS structure (different chemotypes) and magnitude of their activating action on human neutrophils and monocytes in the presence of exogenous HSP70 has been demonstrated.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ВНЕОСТРОВКОВЫХ
ИНСУЛИН-СИНТЕЗИРУЮЩИХ КЛЕТОК
ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПАТОЛОГИИ
(НА ПРИМЕРЕ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА)

Т. С. Булавинцева

Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург

Известно, что инсулинозависимый сахарный диабет развивается в результате прогрессирующего снижения количества инсулин- продуцирующих клеток панкреатических островков. Однако еще в 1998 г. L. Vouwens и D. G. Pipeleers показали, что около 15 % от всех инсулин синтезирующих клеток поджелудочной железы человека располагаются вне панкреатических островков [1].

© Булавинцева Т. С., 2012