МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2023, том 57, № 6, с. 1006–1016

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИИ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

УДК 571.27

ТИМУСНЫЙ ГОРМОН ТИМОЗИН-1α СНИЖАЕТ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ КЛЕТОК RAW 264.7, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ЭНДОТОКСИНОМ

© 2023 г. Е. Г. Новоселова[a, *], О. В. Глушкова[a], М. О. Хренов[a], С. М. Лунин[a], М. Г. Шарапов[a], Р. Г. Гончаров[a], Э. К. Мубаракшина[a], Т. В. Новоселова[a], С. Б. Парфенюк[a]

[a]Институт биофизики клетки Российской академии наук, "Федеральный исследовательский центр "Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук", Пущино, Московская обл., 142290 Россия

**e-mail: elenanov_06@mail.ru*

Поступила в редакцию 13.03.2023 г.
После доработки 14.04.2023 г.
Принята к публикации 15.05.2023 г.

Изучено влияние тимозина-1альфа (Tα1) на противовоспалительный ответ альвеолярных макрофагов RAW 264.7, культивируемых в присутствии липополисахарида (ЛПС) из стенок грамотрицательных бактерий. При этом оценена продукция провоспалительных цитокинов, определена активность сигнальных путей NF-κB и SAPK/JNK, а также изучен уровень экспрессии ряда генов, регулирующих уровни апоптоза клеток, и активность рецепторов, принимающих участие в провоспалительном ответе на воздействие ЛПС. Показано, что, во-первых, добавление Tα1 в разной степени нормализовало продукцию цитокинов, особенно заметно интерлейкинов (IL)-1β и IL-6. Во-вторых, добавление Tα1 нормализовало активность сигнальных каскадов NF-κB и SAPK/JNK и экспрессию гена *Tlr4*. В-третьих, Tα1 заметно снижал уровень p53 и активность гена *P53,* который является маркером апоптоза клеток. В-четвертых, доказано, что увеличение экспрессии гена *Ap-1* под влиянием ЛПС снижалось при использовании Tα1. Таким образом, установлено, что присутствие Tα1 в среде культивирования клеток RAW 264.7 значительно снижает уровень провоспалительного ответа клеток на ЛПС.

Ключевые слова: тимозин-1α, воспаление, цитокины, сигнальные каскады, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0026898423060125, **EDN:** QGCMUF

ВВЕДЕНИЕ

Воспаление – это реакция иммунной системы на такие факторы, как патогены, поврежденные клетки, токсические соединения или ионизирующее излучение [1]. Реакция организма при этом направлена на удаление повреждающих раздражителей и инициирование процесса заживления [2]. Таким образом, воспаление является защитным механизмом, жизненно важным для млекопитающих [3]. Последние 15 лет мы изучали противовоспалительную эффективность гормонов тимуса (тимулина и тимопентина) в условиях *in vitro* и *in vivo* [4–15]. Выбор этого направления исследований вызван пониманием особой роли тимуса в функционировании иммунной системы. Известно, что тимус подвергается возрастной инволюции [16], которая может ускоряться при воздействии на организм повреждающих факторов. При этом ускоренная инволюция тимуса проявляется как побочный эффект, вызываемый применением ряда лекарственных средств при таких тяжелых заболеваниях, как туберкулез, онкологические заболевания и др. [17]. Инволюция тимуса может снизить способность организма восстанавливать репертуар периферических Т-клеток и реагировать на новые антигены. В настоящее время отсутствуют доступные методы лечения острой атрофии тимуса, которая приводит к нарушению работы иммунной системы во время острых стрессовых событий [18]. Известно, что множество факторов, включая инфекции, яды, ионизирующую радиацию и др., приводят к острой атрофии ткани тимуса. Важно отметить, что, согласно существующим представлениям, к острой инволюции тимуса приводят все физиологические стрессовые факторы, включая недостаточное питание [19].

Для предупреждения перехода острого воспаления в хроническое воспалительные реакции должны быть подавлены, чтобы предотвратить дополнительное повреждение тканей. Снижение уровня воспаления – это хорошо управляемый процесс, включающий контролируемую продук-

цию медиаторов в пространстве и во времени, при котором градиенты хемокинов, цитокинов и активных форм кислорода (АФК) "разбавляются" с течением времени [20]. Циркулирующие лейкоциты постепенно перестают ощущать эти изменения и не рекрутируются к местам повреждения. Дисрегуляция этого процесса может привести к неконтролируемому хроническому воспалению [21]. Процессы разрешения воспаления, которые восстанавливают гомеостаз тканей, включают уменьшение или прекращение инфильтрации тканей нейтрофилами и апоптоз отработанных нейтрофилов, контррегуляцию хемокинов и цитокинов, трансформацию макрофагов из классических в альтернативно активированные и инициацию исцеления [22, 23].

Ранее мы доказали противовоспалительное действие тимусных гормонов тимулина и тимопентина не только на модели сепсиса у мышей [4–6], но и при состоянии, моделирующем рассеянный склероз [7, 8]. Опубликованы данные, указывающие на вероятную противовоспалительную эффективность другого гормона тимуса, тимозина 1α (Tα1) [26, 27]. Установлено, что Tα1 является мощным модулятором иммунитета и воспаления. В совокупности результаты этих исследований подтверждают внутритимусную роль гормона лептина в поддержании здорового эпителия тимуса и стимуляцию тимопоэза, которая проявляется при нарушении гомеостаза тимуса эндотоксемией [1]. Кроме того, установлена определенная связь между продолжительностью жизни долгожителей, состоянием системы иммуносенесценции и уровнем Tα1 [19, 28, 29]. Tα1 – 28-аминокислотный белок, обладающий иммуномодулирующими функциями, оказывает благоприятное воздействие при инфекционных и онкологических заболеваниях, иммунодефицитных состояниях, а также обладает нейропротекторным действием [30].

С учетом этих сведений цель настоящей работы состояла в изучении эффектов Tα1 на провоспалительную активацию альвеолярных макрофагов RAW264.7, культивируемых в присутствии липополисахарида (ЛПС) из стенок грамотрицательных бактерий. Оценена продукция провоспалительных цитокинов, а также изучено состояние сигнальных путей NF-κB и SAPK/JNK. Кроме того, определен уровень экспрессии ряда генов, регулирующих уровни апоптоза клеток, а также активность рецептора TLR4, принимающего участие в провоспалительном ответе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток RAW 264.7. Клетки макрофагальной линии RAW264.7 культивировали в присутствии индуктора воспаления и Tα1. Клетки RAW 264.7 росли в культуральных флаконах в среде, состоящей из смеси RPMI: DMEM ("ПанЭко", Россия) в соотношении 1 : 1 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и смеси антибиотиков (пенициллин – 100 мкг/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл, гентамицин – 50 мкг/мл), при 37°C и 5% CO_2. Пересев (пассаж) клеток производили после достижения плотности монослоя ~80%. В экспериментах использовали клетки после 4–8 пассажей. После каждого пассажа жизнеспособность RAW 264.7 оценивали визуально с использованием инвертированного микроскопа LEICA DMIL HC ("Leica", Германия), а также путем подсчета живых клеток в камере Горяева при окрашивании суспензии RAW 264.7 0.01%-ным раствором трипанового синего ("AppliChem", Германия) в физиологическом растворе (NaCl 0.9%). Количество выживших макрофагальных клеток составляло 93–97%. Провоспалительные ответы индуцировали ЛПС, выделенным из стенок *Escherichia coli* штамм 0128: B12 ("Sigma", США), в концентрации 1 мкг/мл. Экзогенный Tα1 ("Sigma") добавляли в концентрации 10 нг/мл одновременно с индукцией провоспалительных ответов. Для определения продукции цитокинов клетки снимали с поверхности культурального флакона с помощью скребков ("Corning", США), отмывали от старой среды, разводили в свежей среде и рассевали с плотностью 10^6 клеток в 1 мл в 24-луночные планшеты. Через 24 ч в каждую лунку добавляли исследуемые вещества в заданной концентрации. По окончании 72-часовой инкубации клетки лизировали 3 раза замораживанием–оттаиванием, при этом лизаты использовали немедленно либо хранили при –20°C. Для определения продукции сигнальных и стрессовых белков клетки рассевали в культуральные флаконы с плотностью 100×10^6 клеток на флакон. После прикрепления клеток (24 ч) добавляли исследуемые вещества по приведенной выше схеме и инкубировали в течение 6 ч. Далее клетки снимали с поверхности флакона, отмывали от старой среды и разводили в 1 мл физиологического раствора для дальнейшего выделения белков. В пределах каждого независимого эксперимента характеристики образцов измеряли параллельно в 6–9 повторах и определяли среднее значение. Усредненные по четырем экспериментам значения использовали для определения статистической значимости различий между группами ($n = 4$). В качестве контроля использовали клетки, не подвергавшиеся обработке ЛПС.

Тест на жизнеспособность. Клетки RAW 264.7 культивировали в 96-луночных планшетах ("ТРР", Швейцария) по 100 мкл (2×10^4 клеток) на лунку в среде RPMI 1640 ("ПанЭко"), содержащей 10% ЭТС, 2.04 мМ *L*-глутамина ("ПанЭко"), 100 мкг/мл стрептомицина, при 37°C в атмосфере 5% CO_2. После культивирования в течение 24 ч к монослою клеток RAW 264.7 добав-

ляли либо ЛПС (1 мкг/мл), либо Tα1 (10 нг/мл), либо ЛПС + Tα1 в указанных концентрациях, культивировали в течение еще 24 ч, промывали 3 раза PBS и окрашивали в течение 10 мин 0.05%-ным фиолетовым кристаллом (“Sigma”). Лунки тщательно промывали проточной дистиллированной водой, в каждую лунку добавляли по 100 мкл 1%-ного додецилсульфата натрия. Через 10 мин после этого измеряли оптическую плотность при 546 нм на спектрофотометре для планшетов Titertek Multiscan MCC/340 (“Flow Laboratories”, Финляндия).

Определение уровня окислительного стресса в клетках. Уровень окислительного стресса в клетках измеряли с помощью диацетилового производного 5.6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (карбокси-H2DCFDA) (“Invitrogen”, США). Карбокси-H2DCFDA представляет собой химически восстановленный аналог флуоресцеина, используемый в качестве общего индикатора окислительного стресса в клетках. Эта нефлуоресцентная молекула легко превращается в зеленую флуоресцентную форму (карбокси-DCF), так как при окислении внутри клетки ацетатные группы удаляются внутриклеточными эстеразами. Следует отметить, что DCFH (и карбокси-H2DCFDA) не реагируют с супероксидом, пероксидом водорода или оксидом азота. Соотношение DCFH/карбокси-H2DCFDA в значительной степени отражает катализируемое пероксидазой окисление. Клетки RAW 264.7 предварительно культивировали в течение 24 ч в 96-луночном планшете (2.5×10^4 клеток на лунку) в 100 мкл среды DMEM, промывали PBS и обрабатывали свежеприготовленным раствором карбокси-H2DCFDA (“Invitrogen”) в стерильном ДМСО в конечной концентрации 2.5 мкМ в среде с 2% ЭТС. Клетки инкубировали с карбокси-H2DCFDA в темноте в течение 1 ч. Одновременно с добавлением карбокси-H2DCFDA добавляли ЛПС (1 мкг/мл), Tα1 (10 нг/мл). Сигнал флуоресценции от необработанных клеток RAW 264.7 использовали в качестве контроля. Фоновый сигнал культуральной среды DMEM вычитали из соответствующих сигналов экспериментальных образцов. Флуоресценцию измеряли с помощью флуоресцентного планшетного ридера Infinite 200 (“Tecan”, Австрия) при длине волны возбуждения 480 нм и длине волны поглощения 530 нм (Ex/Em = = 485/535 нм). Выполняли три независимых эксперимента (по три повтора на каждую экспериментальную группу ($n = 9$)).

Определение продукции цитокинов. TNF, IL-10 и IL-1β, IL-6 мыши определяли с использованием набора для ИФА (“PeproTech”, США). Связывание визуализировали с использованием 100 мкл зеленого красителя ABTS (“Sigma”), растворенного в 0.05 М цитратного буфера (pH 5.0) с добавлением 0.01% пероксида водорода, и измеряли оптическую плотность при 405 нм с помощью спектрофотометра для микропланшетов (Мультискан EX; “Thermo Electron Corp.”, США).

Гель-электрофорез в денатурирующих условиях и иммуноблотинг. Для приготовления белковых образцов суспензию клеток RAW 264.7, предварительно отмытую от среды культивирования с помощью 0.9%-ного NaCl, трехкратно замораживали–оттаивали. После этого добавляли ингибиторы протеаз и фосфатаз (Protease and phosphatase inhibitor cocktail 100 xl; “Thermo Scientific”). К приготовленным таким способом пробам добавляли солюбилизирующий буфер для электрофореза, β-меркаптоэтанол (2–5%) и кипятили в течение 5 мин. Концентрацию белка измеряли с помощью NanoDrop2000c (“NanoDrop”, США), по 10 мкл образца вносили в каждую лунку 10%-ного денатурирующего полиакриламидного геля (Ds-Na-ПААГ). Наличие белков в образцах определяли с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием наборов антител: антител кролика к ph-NF-κB (Ser536), p53, ph-SAPK/JNK, NRF-2, TLR4, α-β-тубулину (“Cell Signaling”, США). Белки выявляли с использованием системы ECL (“GE Healthcare”, Швеция). Фотографии полос получены с помощью трансиллюминатора TFX 35.WL (“Vilber Lourmat”, Франция). Количественное содержание белков определяли после денситометрирования с использованием программы Qapa (Ver. 3.7). Проведено по три независимых эксперимента (использовали клетки разных пассажей) для каждого белка. Полученные цифровые данные нормировали по значениям в соответствующем контроле (полосы α-β-тубулина) и выражали в относительных единицах.

Оценка изменений экспрессии генов. Экспрессию генов анализировали в клетках RAW 264.7 методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). В среду культивирования клеток добавляли Tα1 (10 нг/мл) или ЛПС (1 мкг/мл) по отдельности или совместно, инкубировали в течение 6 ч и определяли экспрессию генов, связанных с апоптозом (*P53*), кодирующих факторы транскрипции (NF-κB, Ap-1, NRF-2), рецептор TLR4, цитокины TNF, IL-6, а также iNos.

Процедура выделения суммарной РНК, синтез кДНК и проведение ПЦР-РВ подробно описаны нами ранее [31]. РНК из клеток RAW 264.7 выделяли с использованием реагента RNAextract согласно инструкции производителя (“Евроген”, Россия). Суммарную РНК обрабатывали ДНКазой I (“New England Biolabs”, США) для удаления возможных примесей геномной ДНК. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрически (NanoDrop1000c, США) по поглощению при 260 нм. Целостность РНК оценивали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле в присутствии бромида этидия (1 мкг/мл) по

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в ПЦР-РВ

Ген	GenBank	Последовательность олигонуклеотида 5' → 3'	
Actb	NM_007393.4	F:	GCCTTCCTTCTTGGGTATGGAATCC
		R:	CACCAGACAGCACTGTGTTGGCA
		P:	FAM-CAATTCCATCATGAAGTGTGACGTTG-BHQ1
P53	NM_011640.3	F:	CGAAGACTGGATGACTGCCA
		R:	CGTCCATGCAGTGAGGTGAT
		P:	VIC-CTCCCTCTGAGCCAGGAGACA-BHQ2
Nf-kB	NM_008689	F:	GACAACTATGAGGTCTCTGGGG
		R:	ATCACTTCAATGGCCTCTGTGT
		P:	VIC-GGAGGCCCTGCAACAGATGGGC-BHQ2
Ap-1	NM_010591	F:	GAGTCTCAGGAGCGGATCAAG
		R:	CTTTTTCCTCTAGCCGAGCGA
		P:	VIC-GCCGCCTCCAAGTGCCGGAA-BHQ2
Nrf-2	NM_010902	F:	TCCATTCCCGAATTACAGTGTCTT
		R:	TTCTGTCAGTGTGGCTTCTGG
		P:	ROX-GCAGCTGGCTGATACTACCGCTGT-BHQ2
Tlr4	NM_021297.3	F:	CACTGGTTGCAGAAAATGCCA
		R:	GAACTACCTCTATGCAGGGATTCA
		P:	VIC-TGCCTCCCTGGCTCCTGGCT-BHQ2
Tnf	NM_013693.3	F:	TAGCCCACGTCGTAGCAAAC
		R:	TGTCTTTGAGATCCATGCCGT
		P:	VIC-TGGAGTGGCTGAGCCAGCGC-BHQ2
Il-6	NM_031168	F:	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC
		R:	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
		P:	ROX-ACAGATAAGCTGGAGTCACAGAAGGA-BHQ2
iNos	NM_010927.4	F:	GCTTCACTTCCAATGCAACA
		R:	CATGGTAAACACGTTCTTTG
		P:	Cy5-GCTCATCCAGAGCCCGGAGC-BHQ2

Примечание. F – прямой праймер; R – обратный праймер; P – зонд, меченный флуорофором (на 5'-конце) и тушителем (на 3'-конце).

наличию полос рРНК (18S и 28S). Полученную РНК (2 мкг на реакцию) использовали в реакции обратной транскрипции с использованием набора MMLV RT kit (“Евроген”). Синтезированную кДНК использовали в ПЦР-РВ с ген-специфическими олигонуклеотидами (табл. 1) и набором 5× qPCRmix-HS (“Евроген”) в амплификаторе DTprime (“ДНК-технология”, Россия), Режим ПЦР-РВ: (1) “горячий старт” – 95°C, 3 мин; (2) денатурация – 95°C, 15 с; (3) отжиг праймеров и синтез цепи – 60°C, 20 с + регистрация флуоресценции. Этапы 2 и 3 повторяли 40 раз. Изменения уровней экспрессии генов представлены в относительных единицах от значений в контроле для интактных клеток [31].

Уровень экспрессии генов нормировали по уровню гена цитоскелетного β-актина (ген *Actb* домашнего хозяйства). Значение ΔCt рассчитывали по формуле ΔCt = Ct (исследуемый ген) – Ct (*Actb*); ΔΔCt рассчитывали по формуле ΔCt (контроль) × × ΔCt(эксперимент). Различия в экспрессии генов рассчитывали с использованием метода 2^ – ΔΔCt.

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft, США). Статистическую значимость различий определяли с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки. Значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние тимозина-1α на экспрессию генов, регулирующих ответ клеток RAW 264.7 на липополисахарид

Методом ПЦР-РВ оценили экспрессию генов, известных как гены регуляторов ответа клеток на повреждающее воздействие эндотоксина. К таким генам относятся, в первую очередь, гены цитокинов, концентрация которых (TNF и IL-6)

Таблица 2. Уровень экспрессии мРНК, отн. ед.

Ген	Контроль	Tα1	ЛПС	ЛПС + Tα1
Tnf	**1** ± *0.087*	**0.6** ± *0.038*	**4.95** ± *0.38*#	**3.2** ± *0.291**#
Il-6	**1** ± *0.093*	**0.85** ± *0.073*	**2.45** ± *0.098*#	**2.15** ± *0.093*#
iNos	**1** ± *0.057*	**1.3** ± *0.095*	**8** ± *0.56*#	**13** ± *0.795**#
Tlr4	**1** ± *0.062*	**0.45** ± *0.031*#	**2.45** ± *0.096*#	**1.35** ± *0.054**
Nf-kb	**1** ± *0.069*	**0.4** ± *0.040*#	**3.7** ± *0.175*#	**3.05** ± *0.195**#
Nrf-2	**1** ± *0.091*	**0.55** ± *0.025*	**1.2** ± *0.1*	**2.6** ± *0.097**#
Ap-1	**1** ± *0.058*	**0.6** ± *0.048*	**6.5** ± *0.482*#	**1.85** ± *0.054**
P53	**1** ± *0.084*	**0.3** ± *0.015*#	**8.5** ± *0.645*#	**5** ± *0.288**#

Статистически значимые отличия от контрольной группы, $p < 0.05$.

* Статистически значимые отличия от группы ЛПС, $p < 0.05$. $n = 3–4$.

Примечание. Представлены средние значения ± стандартная ошибка изменений уровней экспрессии генов по отношению к уровням в контрольных клетках RAW 264.7 в нормальных условиях.

обычно резко возрастает при воздействии эндотоксина. Что же касается генов этих цитокинов, то нами также отмечена значительная стимуляция экспрессии, особенно TNF (почти в 5 раз), и IL-6 – в 2.5 раза (табл. 1). При этом добавление Tα1 значимо снижало экспрессию TNF, индуцированную ЛПС. Важно отметить, что введение ЛПС в среду культивирования клеток RAW 264.7 вызывало значимое повышение экспрессии всех исследуемых генов, за исключением гена *Nrf-2*. Не отмечено сколько-нибудь заметной стимуляции экспрессии гена *Nrf-2* под воздействием ЛПС, хотя Tα1 на фоне ЛПС заметно стимулировал экспрессию этого гена, что свидетельствует о повышении антиоксидантной защиты клеток в присутствии тимусного пептида.

Следует отметить, что добавление Tα1 статистически значимо нормализовало экспрессию всех исследуемых генов. Единственное исключение составила экспрессия гена *Inos*, кодирующего индуцибельную NO-синтазу синтез которой в присутствии ЛПС увеличился в 8 раз, а при добавлении Tα1 – в 13.

Что же касается гена *Tlr4*, то в присутствии ЛПС его экспрессия возрастала почти в 2.5 раза, при этом добавление Tα1 приводило к значительному снижению экспрессии этого гена, что свидетельствует о нормализации, вызванной присутствием Tα1 в культуральной среде клеток RAW 264.7. Такие же изменения обнаружены и в экспрессии гена *Nf-κb*, повышенной в присутствии ЛПС почти в 4 раза, при этом добавление Tα1 значимо снижало экспрессию этого гена (табл. 2).

Тем не менее, определение экспрессии гена *Ap-1* показало, что присутствие ЛПС в среде культивирования клеток RAW 264.7 активировало экспрессию этого гена почти в 6.5 раза, при этом добавление Tα1 значительно снижало ее уровень. Экспрессия гена *P53*, регулирующего уровень апоптоза клеток, в присутствии ЛПС резко увеличивается (в 8.5 раза), тогда как добавление Tα1 снижает этот эффект (табл. 2).

Продукция цитокинов и активных форм кислорода в альвеолярных макрофагах RAW 264.7, культивируемых в присутствии липополисахарида и тимозина-1α

Продукция нескольких провоспалительных цитокинов (TNF, IL-6, IL-1β) и противовоспалительного цитокина IL-10 была измерена методом иммуноферментного анализа (ИФА). Важно, что внесение в среду культивирования клеток RAW 264.7 ЛПС стимулировало продукцию всех исследованных цитокинов, при этом добавление Tα1 в разной степени нормализовало продукцию цитокинов. Особенно заметный эффект отмечен в случае IL-1β и IL-6 (рис. 1*а*). Однако добавление Tα1 не снижало продукцию TNF в макрофагах, активированных ЛПС.

Известно, что при воздействии ЛПС в клетке может возрастать продукция АФК. Действительно, с использованием флуоресцентного карбокси-H2DCFDA-зонда нами показано, что добавление ЛПС приводит к повышению в несколько раз количества АФК, продуцируемого в клетках RAW 264.7, причем добавление Tα1 полностью снимает этот эффект (рис. 1*б*). При этом добавление к клеткам только Tα1 не влияло на уровень АФК.

Интересно, что определение количества жизнеспособных макрофагов RAW 264.7 показало, что и ЛПС, и Tα1 стимулируют жизнеспособность клеток, причем эти эффекты были аддитивными (рис. 1*в*). Это важное наблюдение свидетельствует о том, что концентрация Tα1, равная 10 нг/мл и заметно превышающая концентрацию в контрольных клетках, не является токсичной.

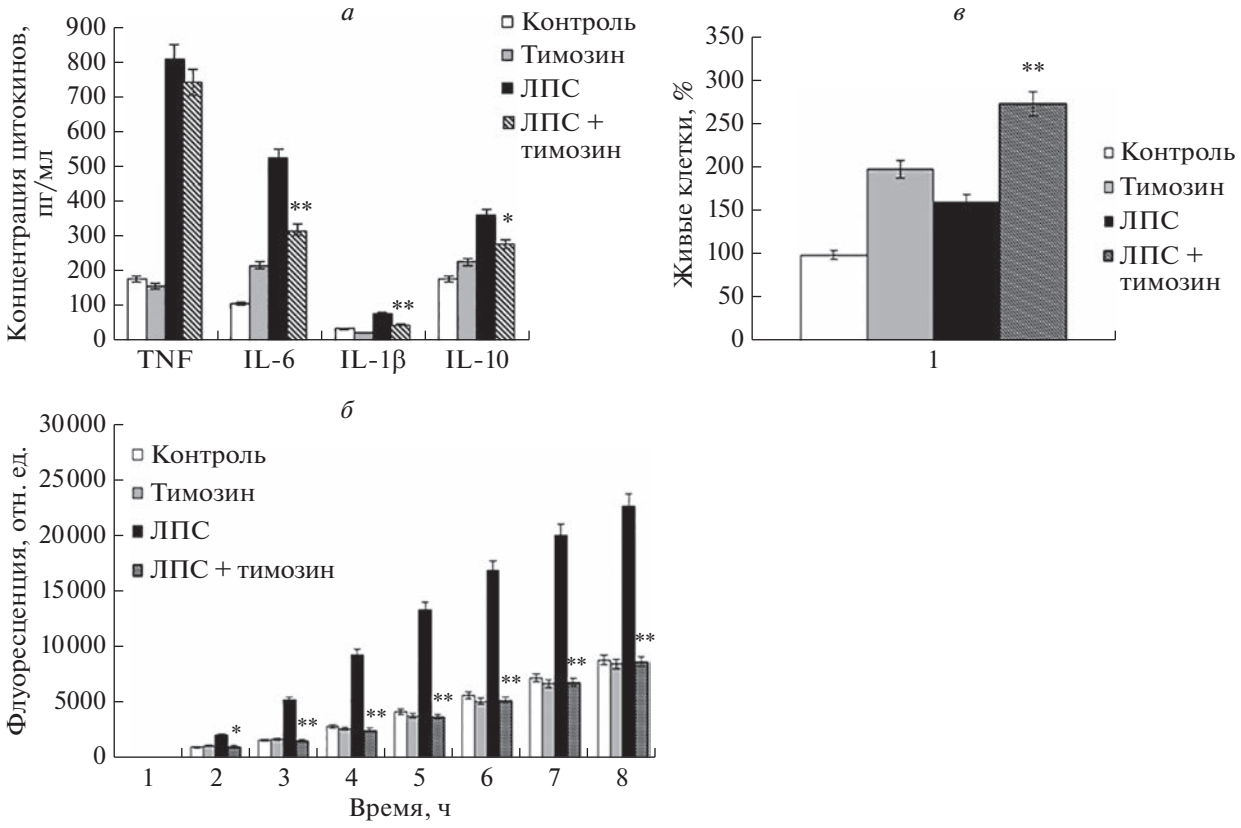

Рис. 1. Влияние тимозина-1альфа на продукцию цитокинов (*а*), продукцию АФК, оцениваемую по флуоресценции зонда (*б*), и количество живых клеток RAW 264.7 (*в*). Статистически значимые отличия от группы ЛПС: $*p < 0.05$, $**p < 0.01$. $n = 3–4$.

Продукция белков, регулирующих активность сигнальных каскадов и TLR4, апоптоз клеток RAW 264.7

Известно, что сигнальный каскад NF-κB является основным регулятором активности клеток в присутствии повреждающих агентов. Определение уровня белка p65 NF-κB показало, что добавление ЛПС заметно увеличивает количество этого белка, тогда как добавление в среду культивирования клеток Tα1 полностью снимает эффект ЛПС. Таким образом, нами доказано, что Tα1 защищает клетки от действия эндотоксина. Рассмотрение активности другого каскада сигнальной трансдукции, SAPK/JNK, показало, что под влиянием ЛПС в клетках усиливается накопление фосфорилированных форм p46 и p54, а добавление Tα1 устраняет вызванную ЛПС функциональную активацию этих белков в клетке (рис. 2). Это свидетельствует о защитном потенциале Tα1, который отменял повреждающий эффект ЛПС, вызывающий активацию каскада SAPK/JNK.

Toll-подобные рецепторы (TLR) участвуют в передаче сигналов, активирующих каскад сигнальной трансдукции NF-κB. Самым изученным рецептором этого класса является трансмембранный рецептор TLR4. Нами показано, что культивирование клеток RAW 264.7 в присутствии ЛПС приводит к статистически значимому увеличению количества TLR4, тогда как добавление Tα1 полностью отменяет действие ЛПС (рис. 2).

На рис. 2 показаны также результаты определения количества белка NRF-2, который регулирует антиоксидантный ответ клеток. В присутствии ЛПС наблюдалось снижение уровня белка NRF-2, тогда как добавление Tα1 к среде культивирования клеток RAW 264.7 повышало уровень белка NRF-2 до значений, превышающих контрольный уровень.

Наконец, методом Вестерн-блотинга проанализировано изменение содержания белка p53, который участвует в регуляции уровня апоптоза в клетках. Установлено, что добавление ЛПС приводит к увеличению содержания p53, что указывает на индукцию апоптоза в клетках RAW 264.7 в присутствии эндотоксина. Если же к клеткам добавляли Tα1, то наблюдали снижение уровня белка p53, что указывает на возможность изменения уровня апоптоза (рис. 2).

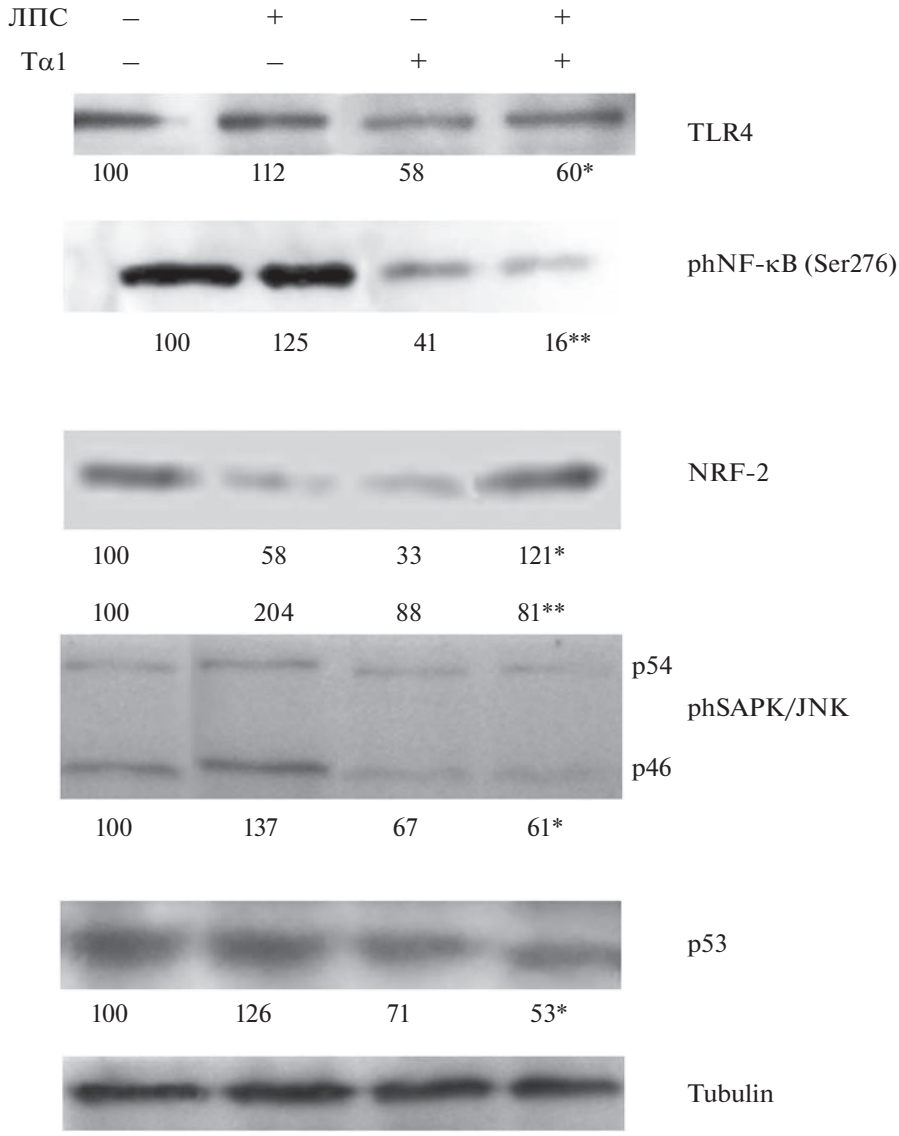

Рис. 2. Вестерн-блот-анализ белков (TLR4, NF-κB и SAPK/JNK, NRF-2, p53) в клетках RAW 264.7, культивируемых в разных условиях. Представлены результаты типичного эксперимента. Под иммуноблотами указано содержание белков (в относительных единицах), рассчитанное по усредненным результатам денситометрического определения в трех независимых экспериментах. Статистически значимые отличия от величин в клетках, инкубированных с добавлением ЛПС: $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$. Содержание phNF-κB (Ser276) определяли с использованием антител к субъединице p65.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эффективность Tα1 в качестве противовоспалительного агента изучена нами на альвеолярных макрофагах RAW 264.7, которые подвергали воздействию эндотоксина (ЛПС), наиболее часто используемого для моделирования воспаления. Анализировали такие функции клеток, как продукция про- и противовоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-10), образование АФК, активность сигнальных каскадов NF-κB и SAPK/JNK, продукция NRF-2, TLR4, p53, а также активность ряда генов, регулирующих синтез этих ключевых агентов.

Ранее, используя макрофаги RAW 264.7, мы показали, что и другие пептиды тимуса (тимулин и тимопентин) проявляют противовоспалительный эффект в клетках, обработанных ЛПС [6]. Оба пептида снижали секрецию провоспалительных цитокинов в макрофагах RAW 264.7, культивированных с ЛПС, и эти эффекты блокировались ингибиторами каскадов NF-κB и стресс-активируемой протеинкиназы SAPK/JNK, а также, в меньшей степени, ингибитором TLR4.

В макрофагах RAW 264.7, стимулированных бактериальным ЛПС, сами пептиды не влияли на секрецию цитокинов, но значительно усиливали

эффекты каждого из ингибиторов. Тимопентин повышал активацию каскадов NF-κB и SAPK/JNK в нестимулированных макрофагах, в то время как тимулин значительно снижал активацию каскада SAPK/JNK, но не NF-κB, в макрофагах, стимулированных ЛПС. Тимулин и тимопентин увеличивали продукцию белка теплового шока HSP72 и в стимулированных, и в нестимулированных ЛПС клетках [6].

Возможность применения гормонов тимуса (тимулина и тимопентина) в качестве противовоспалительных агентов была подтверждена нами ранее [4–6]. В настоящей работе мы анализировали противовоспалительную эффективность Tα1. Можно было предположить, что Tα1 способен компенсировать состояние хронического воспаления, вызванного эндотоксином. В реальности для понимания механизма действия гормонов тимуса полезно учитывать роль возрастной инволюции тимуса и недостаток секреции гормонов тимуса для процессов старения и, особенно, "воспалительного старения".

Еще два века назад средняя продолжительность жизни человека даже в самых развитых странах не превышала 40–45 лет, хотя и тогда были долгожители. Однако улучшение условий жизни и достижения медицины привели к росту продолжительности жизни, а, следовательно, к старению значительной части населения [32].

Иммунная система человека вынуждена справляться с эволюционно непредсказуемым воздействием различных антигенов, что лежит в основе глубоких возрастных изменений, обозначаемых как иммуносенесценция, или иммуностарение. Основные изменения, происходящие при иммуностарении, обусловлены накоплением клеточных, молекулярных дефектов и инволюционных событий (например, инволюцией тимуса), происходящих одновременно с гиперстимуляцией как врожденного, так и адаптивного иммунитета (накопление размножившихся клонов клеток памяти и эффекторных Т-клеток, сокращение репертуара Т-клеточных рецепторов, прогрессивная активация макрофагов), что приводит к вялотекущему хроническому воспалению [19].

Корреляции между хроническим воспалением и старением объясняются в рамках "сетевой теории старения", которая рассматривает глобальное снижение способности справляться с различными стрессорами и сопутствующее прогрессирующее увеличение провоспалительного статуса в качестве основных характеристик процесса старения [3]. Эти характеристики, определяемые как "воспалительное старение", возникают в результате антигенной нагрузки и стресса, причем согласно данным эволюционных исследований, иммунная реакция и реакция на стресс эквивалентны. Можно сослаться на особую роль макрофагов в качестве действующего агента не только в воспалительной реакции и иммунитете, но и в реакции на стресс [33]. При этом утверждается, что сохранение воспалительных стимулов с течением времени можно рассматривать как биологический фон, благоприятствующий восприимчивости к возрастным заболеваниям [33]. Наконец, дефицит устойчивых вариантов генов или наличие слабых вариантов генов необходимы, вероятно, для развития явных органоспецифических возрастных заболеваний, имеющих воспалительный патогенез, таких как атеросклероз, болезнь Альцгеймера, остеопороз и сахарный диабет. В согласии с этим феноменом объясняются несколько парадоксов здоровых долгожителей (повышение уровня воспалительных цитокинов в плазме, белков острой фазы и факторов свертывания крови). Однако согласно антагонистической плейотропной теории старения, положительные эффекты воспаления, направленные на нейтрализацию вредных агентов в раннем и во взрослом возрасте, становятся пагубными в конце жизни, в период, в значительной степени не предвиденный эволюцией [33].

Более того, изучение молекулярных механизмов, связанных со старением тимуса, показало необходимость учета биологических переменных, таких как пол и особенности питания, при изучении роли генов, участвующих в молекулярных процессах, ответственных за инволюцию тимуса [34]. Использование модельных организмов облегчает проверку различных гипотез о роли генетики в иммунных реакциях. Используя несколько полученных из природной популяции линий *Drosophila melanogaster* с хромосомными заменами [35], обнаружили значительную генетическую изменчивость иммунного ответа мух разных линий на *E. coli*, демонстрирующую улучшение, отсутствие изменений или их снижение с возрастом. В целом, эти данные предполагают, что разные локусы вносят вклад в вариации иммунных ответов в каждом возрасте, что согласуется с моделью накопления мутаций при старении. Ранее было установлено, что в зрелых макрофагах Tα1 осуществляет интернализацию и уничтожение патогенов посредством стимуляции фагоцитоза, опосредованного рецептором комплемента [36]. Эти наблюдения подтверждают, что Tα1 является ранним и мощным активатором врожденного иммунитета, а также свидетельствуют в пользу концепции его плейотропности.

Важная роль при старении принадлежит не только цитокинам, но также окислительному стрессу, при этом транскрипционный фактор NRF-2 является одной из основных антиоксидантных систем [30, 37, 38]. В нашей работе показано, что добавление ЛПС к клеткам приводит к значительному снижению содержания белка NRF-2, при этом добавление Tα1 к культивиро-

ванным макрофагам полностью снимает этот эффект. Более того, Тα1 стимулирует экспрессию гена *Nrf-2*.

Семейство димерных транскрипционных комплексов AP-1 участвует практически во всех клеточных и физиологических функциях. До недавнего времени оставалось неясным, каким образом AP-1 контролирует транскрипцию генов. Однако появление новых технологий, позволяющих изучать факторы транскрипции в масштабах всего генома, изменило взгляд на механистическое действие AP-1. Есть основание полагать, что AP-1 может действовать как локальный переключатель транскрипции, действующий вблизи сайтов начала транскрипции [39]. Все указывает на то, что AP-1 в основном действует как дистанционная команда, определяя динамику архитектуры хроматина [40]. В нашей работе доказано, что увеличение экспрессии гена *Ap-1* под влиянием ЛПС в значительной мере редуцировалось при использовании Тα1.

При подборе подходящей дозы Тα1, добавляемой к клеткам, мы опирались на данные, согласно которым концентрация Тα1 в крови человека составляет 0.1–1 нг/мл [41]. Мы испробовали две терапевтические дозы Тα1 *in situ*: 10 и 50 нг/мл. Анализ предварительных данных показал, что эффект Тα1 почти не зависит от используемой дозы, поэтому была выбрана доза 10 нг/мл, чтобы исключить возможный токсический эффект Тα1.

Известно, что стрессовые агенты повышают активность сигнальных каскадов NF-κB и SAPK/JNK. Действительно, нами показано, что добавление ЛПС к клеткам RAW 264.7 приводит к увеличению количества регуляторных белков, однако эта активация снималась в присутствии Тα1.

Таким образом, изучение эффектов Тα1 на стрессированные макрофаги RAW 264.7 в присутствии ЛПС показало, что Тα1защищает клетки от воздействия эндотоксина, почти во всех случаях нормализуя уровни изучаемых белков и экспрессию генов. Такое свойство тимусного пептида Тα1 делает его возможным претендентом на роль иммунотерапевтического средства, которое может использоваться для снижения патологических признаков, связанных не только с развитием вирусных и онкологических заболеваний, но и со старением.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда (проект 23-24-00041).

Настоящая работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследования

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gruver A.G., Ventevogel M.S., Sempowski G.D. (2009) Leptin receptor is expressed in thymus medulla and leptin protects against thymic remodeling during endotoxemia induced thymus involution. *J. Endocrinol.* **203**, 75–85.
2. Haynes B.F., Markert M.L., Sempowski G.D., Patel D.D., Hale L.P. (2000) The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 529–560.
3. Franceschi C., Bonafè M., Valensin S., Olivieri F., De Luca M., Ottaviani E., De Benedictis G. (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **908**, 44–54.
4. Lunin S.M., Khrenov M.O., Novoselova T.V., Parfenyuk S.B., Novoselova E.G. (2008) Thymulin, a thymic peptide, prevents the overproduction of pro-inflammatory cytokines and heat shock protein Hsp70 in inflammation-bearing mice. *Immunol. Invest.* **37**, 858–870.
5. Лунин С.М., Новоселова Т.В., Хренов М.О., Глушкова О.В., Парфенюк С.Б., Смолихина Т.И., Фесенко Е.Е., Новоселова Е.Г. (2009) Иммуномодулирующие эффекты тимопентина при остром и хроническом воспалениях у мышей. *Биофизика.* **54**, 260–266.
6. Lunin S.M., Glushkova O.V., Khrenov M.O., Parfenyuk S.B., Novoselova T.V., Fesenko E.E., Novoselova E.G. (2011) Thymus peptides regulate activity of RAW 264.7 macrophage cells: inhibitory analysis and a role of signal cascades. *Expert Opin. Ther. Targets.* **15**, 1337–1346.
7. Lunin S.M., Glushkova O.V., Khrenov M.O., Novoselova T.V., Parfenyuk S.B., Fesenko E.E., Novoselova E.G. (2013) Thymic peptides restrain the inflammatory response in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunobiology*. **218**, 402–407.
8. Lunin S.M., Khrenov M.O., Novoselova T.V., Parfenyuk S.B., Glushkova O.V., Fesenko E.E., Novoselova E.G. (2015) Modulation of inflammatory response in mice with severe autoimmune disease by thymic peptide thymulin and inhibitor of NF-kappaB signaling. *Int. Immunopharmacol.* **25**, 260–266.
9. Lunin S.M., Khrenov M.O., Glushkova O.V., Vinogradova E.V., Yashin V.A., Fesenko E.E., Novoselova E.G. (2017) Extrathymic production of thymulin induced by oxidative stress, heat shock, apoptosis, or necrosis. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **30**, 58–69.
10. Lunin S.M., Khrenov M.O., Glushkova O.V., Parfenyuk S.B., Novoselova T.V., Novoselova E.G. (2019) Immune response in the relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis in mice: the role of the NF-κB signaling pathway. *Cell. Immunol.* **336**, 20–27.
11. Lunin S.M., Novoselova E.G., Glushkova O.V., Parfenyuk S.B., Novoselova T.V., Khrenov M.O. (2022) Cell senescence and central regulators of immune response. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 4109.
12. Lunin S.M., Novoselova E.G. (2010) Thymus hormones as prospective anti-inflammatory agents. *Expert Opin. Ther. Targets.* **14**, 775–786.

13. Novoselova E.G., Khrenov M.O., Glushkova O.V., Lunin S.M., Parfenyuk S.B., Novoselova T.V., Fesenko E.E. (2014) Anti-inflammatory effects of IKK inhibitor XII, thymulin, and fat-soluble antioxidants in LPS-treated mice. *Mediators Inflamm.* **2014**, 724838.
14. Novoselova E.G., Lunin S.M., Glushkova O.V., Khrenov M.O., Parfenyuk S.B., Zakharova N.M., Fesenko E.E. (2018) Thymulin, free or bound to PBCA nanoparticles, protects mice against chronic septic inflammation. *PLoS One.* **13**, e0197601.
15. Lunin S.M., Khrenov M.O., Glushkova O.V., Parfenyuk S.B., Novoselova T.V., Novoselova E.G. (2020) Precursors of thymic peptides as stress sensors. *Expert Opin. Biol. Ther.* **20**, 1461–1475.
16. Aspinall R., Andrew D. (2000) Thymic involution in aging. *J. Clin. Immunol.* **20**, 250–256.
17. Gruver A.L., Sempowski G.D. (2008) Cytokines, leptin, and stress-induced thymic atrophy. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 915–923.
18. Medzhitov R. (2010) Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell.* **140**, 771–776.
19. Ostan R., Bucci L., Capri M., Salvioli S., Scurti M., Pini E., Monti D., Franceschi C. (2008) Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. *Neuroimmunomodulation.* **15**, 224–240.
20. Chen L., Deng H., Cui H., Fang J., Zuo Z., Deng J., Li Y., Wang X., Zhao L. (2018) Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* **9**, 7204–7218.
21. Reville K., Crean J.K., Vivers S., Dransfield I., Godson C. (2006) Lipoxin A4 redistributes myosin IIA, Cdc42 in macrophages: implications for phagocytosis of apoptotic leukocytes. *J. Immunol.* **176**, 1878–1888.
22. Headland S.E., Norling L.V. (2015) The resolution of inflammation: principles and challenges. *Semin. Immunol.* **27**, 149–160.
23. Serhan C.N., Savill J. (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* **6**, 1191–1197.
24. Новоселова Е.Г., Лунин С.М., Хренов М.О., Новоселова Т.В., Фесенко Е.Е. (2009) Участие сигнального каскада NF-κB в реализации анти-воспалительной активности тимусных пептидов. *ДАН.* **428**, 707–709.
25. Lunin S.M., Khrenov M.O., Glushkova O.V., Parfenyuk S.B., Novoselova T.V., Novoselova E.G. (2019) Protective effect of PBCA nanoparticles loaded with thymulin against the relapsing-remitting form of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, E5374.
26. Romani L., Bistoni F., Montagnoli C., Gaziano R., Bozza S., Bonifazi P., Zelante T., Moretti S., Rasi G., Garaci E., Puccetti P. (2007) Thymosin alpha1: an endogenous regulator of inflammation, immunity, and tolerance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1112**, 326–338.
27. Liu F., Wang H.-M., Wang T., Zhang Y.-M., Zhu X. (2016) The efficacy of thymosin α1 as immunomodulatory treatment for sepsis: a systematic review of randomized controlled trials. *BMC Infect. Dis.* **16**, 488.
28. Pica F., Chimenti M.S., Gaziano R., Buè C., Casalinuovo I.A., Triggianese P., Conigliaro P., Di Carlo D., Cordero V., Adorno G., Volpi A., Perricone R., Garaci E. (2016) Serum thymosin a 1 levels in patients with chronic inflammatory autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol.* **186**, 39–45.
29. Sansoni P., Vescovini R., Fagnoni F., Biasini C., Zanni F., Zanlari L., Telera A., Lucchini G., Passeri G., Monti D., Franceschi C., Passeri M. (2008) The immune system in extreme longevity. *Exp. Gerontol.* **43**, 61–65.
30. Shi Q.-X., Chen B., Nie C., Zhao Z.-P., Zhang J.-H., Si S.-Y., Cui S.-J., Gu J.-W. (2020) Improvement in cognitive dysfunction following blast induced traumatic brain injury by thymosin α1 in rats: involvement of inhibition of Tau phosphorylation at the Thr205 epitope. *Brain Res.* **1747**, 147038.
31. Sharapov M.G., Novoselov V.I., Penkov N.V., Fesenko E.E., Vedunova M.V., Bruskov V.I., Gudkov S.V. (2018) Protective and adaptogenic role of peroxiredoxin 2 (Prx2) in neutralization of oxidative stress induced by ionizing radiation. *Free Radic. Biol. Med.* **134**, 76–86.
32. World Health Organization. (2002) *The European Health Report 2002.* European Ser. **97**. Geneva, Switzerland.
33. Fujiwara N., Kobayashi K. (2005) Macrophages in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflam. Allergy.* **4**, 281–286.
34. Lustig A., Weeraratna A.T., Wood 3rd W.W., Teichberg D., Bertak D., Carter A., Poosala S., Firman J., Becker K.G., Zonderman A.B., Longo D.L., Taub D.D. (2007) Transcriptome analysis of age-, gender- and diet-associated changes in murine thymus. *Cell Immunol.* **245**, 42–61.
35. Lesser K.J., Paiusi I.C., Leips J. (2006) Naturally occurring genetic variation in the age-specific immune response of *Drosophila melanogaster. Aging Cell.* **5**, 293–295.
36. Serafino A., Pica F., Andreola F., Gaziano R., Moroni N., Moroni G., Zonfrillo M., Pierimarchi P., Sinibaldi-Vallebona P., Garaci E. (2014) Thymosin α1 activates complement receptor-mediated phagocytosis in human monocyte-derived macrophages. *J. Innate Immun.* **6**, 72–88.
37. Cichon A.C., Brown D.R. (2014) Nrf-2 regulation of prion protein expression is independent of oxidative stress. *Mol. Cell. Neurosci.* **63**, 31–37.
38. Yanaka A., Zhang S., Tauchi M., Suzuki H., Shibahara T., Matsui H., Nakahara A., Tanaka N., Yamamoto M. (2005) Role of the *Nrf-2* gene in protection and repair of gastric mucosa against oxidative stress. *Inflammopharmacology.* **13**, 83–90.
39. Seo J., Koçak D.D., Bartelt L.C., Williams C.A., Barrera A., Gersbach C.A., Reddy T.E. (2021) AP-1 subunits converge promiscuously at enhancers to potentiate transcription. *Genome Res.* **31**, 538–550.
40. Manna P.R., Eubank D.W., Stocco D.M. (2019) The AP-1 transcriptional complex: local switch or remote command. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* **1872**, 11–23.
41. Weller F.E., Shah U., Cummings G.D., Chretien P.B., Mutchnick M.G. (1992) Serum levels of immunoreactive thymosin alpha 1 and thymosin beta 4 in large cohorts of healthy adults. *Thymus.* **19**, 45–52.

The Thymic Hormone Thymosin-1 α Reduces the Pro-Inflammatory Response of RAW 264.7 Cells Induced by Endotoxin

E. G. Novoselova[1], *, O. V. Glushkova[1], M. O. Khrenov[1], S. M. Lunin[1], M. G. Sharapov[1], R. G. Goncharov[1], E. K. Mubarakshina[1], T. V. Novoselova[1], and S. B. Parfenyuk[1]

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

**e-mail: elenanov_06@mail.ru*

The aim of this work was to study effects of thymosin-1 alpha (Tα1) on the anti-inflammatory response of RAW 264.7 macrophages cultured in the presence of lipopolysaccharide (LPS) from the walls of gram-negative bacteria. Also we evaluated production of pro-inflammatory cytokines and activity of the NF-κB and SAPK/JNK signaling pathways. In addition, the level of expression of a number of genes that regulate cell apoptosis, as well as the activity of receptors involved in the pro-inflammatory response, was determined. Firstly, the addition of Tα1 normalized the level of cytokine production to varying degrees, with a particularly noticeable effect on IL-1β and IL-6. Secondly, the addition of Tα1 normalized activity of the NF-κB and SAPK/JNK signaling cascades and the expression of the *Tlr4* gene. Thirdly, Tα1 significantly reduced p53 and the activity of the *P53* gene, which is a marker of cell apoptosis. Fourthly, it was shown that an increase in *Ar-1* gene expression under the influence of LPS was significantly reduced using Tα1. Thus, it was found that the presence of Tα1 in the RAW 264.7 cell culture medium significantly reduced the level of the pro-inflammatory response of cells.

Keywords: thymosin-1α, inflammation, signaling pathways, cytokines, gene expression