

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

РИФАМПИЦИН ИНГИБИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ TLR4 И IL1 β И ПОВЫШАЕТ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК SH-SY5Y ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭТАНОЛА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VITRO*

М.И. Айранетов^{1,2*}, С.О. Ереско^{1,3,4}, А.С. Рогова^{4,5}, Е.Р. Бычков¹, А.А. Лебедев¹, П.Д. Шабанов^{1,2}

¹Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12;
e-mail: *interleukin1b@gmail.com

²Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. акад. Лебедева, 6

³Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова,
195067, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41

⁴Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий,
механики и оптики, 197022, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

⁵Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29

Длительное воздействие алкоголя активирует TLR4-сигнальные пути в головном мозге, что служит причиной развития нейровоспаления. Существует интерес в отношении фармакологической коррекции этих механизмов. Антибиотик рифампицин (Rif) зарекомендовал себя как потенциальный нейропротектор для коррекции различных патологических состояний нервной системы, связанных с нейровоспалением. На культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y было выявлено, что длительная инкубация клеток в растворе этанола (24 ч, 100 мМ) вызывает активацию генов врожденной иммунной системы *Tlr4* и *Il1 β* . Предварительное добавление Rif (25-100 мМ) до инкубации клеток в растворе этанола ингибирует экспрессию генов *Tlr4* и *Il1 β* , тогда как добавление Rif после инкубации дозозависимо снижает повышенную экспрессию генов *Tlr4* и *Il1 β* , оказывая наиболее значимый эффект в концентрации 100 мМ, и повышает выживаемость клеток

Ключевые слова: этанол; нейровоспаление; TLR4; SH-SY5Y; рифампицин

DOI: 10.18097/BMCRM00208

ВВЕДЕНИЕ

Хроническое поступление этанола в организм служит причиной развития нейровоспалительных и нейродегенеративных процессов в головном мозге [1-5]. Предполагается, что такие события усугубляют ход развития алкоголизма, ускоряя развитие более тяжелых форм алкогольной зависимости [2-4]. Для коррекции таких состояний необходимы новые потенциальные нейропротекторные средства, которые будут направлены на устранение нейродегенерации и нейровоспаления [5]. Однако существует сложность в понимании того, каким образом поступающий в организм этанол опосредует развитие таких событий: способен ли этанол напрямую запускать развитие различных форм гибели нервных клеток или это эффект зависит от синтеза провоспалительных соединений, запускающих процесс гибели нейронов впоследствии посредством паракринных и эндокринных воздействий? В связи с этим представляется интересным изучение воздействия этанола на отдельные типы клеток нервной ткани в экспериментах *in vitro*.

Длительная алкоголизация приводит к активации путей TLR4-сигнализации, что служит причиной повышенной экспрессии провоспалительных генов, а ингибирование TLR4-зависимых путей передачи сигналов снижает развитие нейровоспаления [1-5]. Есть данные,

что антибиотик рифампицин (Rif) способен устранять признаки нейровоспаления [6-10]. Предполагается, что эффект реализуется посредством взаимодействия Rif с MD2 (миелоидный фактор дифференцировки 2) – корецептором TLR4, – что может приводить к снижению активности TLR4-сигнализации [11-12].

Целью данной работы была оценка жизнеспособности клеток нейробластомы человека SH-SY5Y и состояния экспрессии генов *Tlr4* и *Il1 β* при добавлении Rif к культуре клеток до и после длительного воздействия этанола.

МЕТОДИКА

Клеточная культура SH-SY5Y

Культивирование клеток SH-SY5Y (получены из коллекции клеточных культур Научно-образовательного центра молекулярных и клеточных технологий Санкт-Петербургского химико-фармацевтического университета) проводили в среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки («Capricorn Scientific», США) в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂, 37°C. Клетки помещали в 96-луночный планшет (TC-treated Culture Microplate, «Corning», США). Длительное воздействие алкоголя моделировали путем добавления этанола (100 мМ) в культивируемую среду на 24 ч.



Таблица 1. Последовательность праймеров

Ген	Праймеры	
	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
<i>Tlr4</i>	GCTAAATGCTGCCGTTTTAT	CTGGATTTCACACCTGGATA
<i>Il1β</i>	GATGGCTTATTACAGTGGCAAT	AAGAAGGTGCTCAGGTCATT
<i>Gapdh</i>	CTCGATGGGTGGAGTGC	ATTGGAACATGTAAACCATGTAG

Жизнеспособность клеток

Оценку жизнеспособности клеток после инкубации проводили с помощью AlamarBlue-анализа [13]. Для этого после инкубации клеток удаляли клеточную среду и добавляли AlamarBlue («Sigma-Aldrich», США) (10% w/w) к каждой лунке. Планшеты инкубировали в течение 4 ч при 5% CO₂ и 37°C. Поглощение анализировали с помощью спектрофотометрического ридера микропланшетов Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer («Thermo Fisher Scientific Inc.», США) при длинах волн 570 нм и 600 нм.

Культивирование культуры SH-SY5Y с рифампицином

Рифампицин (рифампицин, лиофилизат для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий 150 мг, «Белмедпрепараты», Беларусь) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) («Merck KGaA», Германия) и вносили в среду в трех концентрациях – 25 мМ, 50 мМ, 100 мМ за 2 ч (по 5 лунок каждая) до добавления этанола и на 2 ч после добавления этанола (5 лунок каждая). В качестве контроля использовали лунки с содержанием культивируемой среды (10 лунок) и лунки с добавлением ДМСО (5 лунок).

Выделение РНК и ОТ-ПЦР

Выделение тотальной РНК выполняли при помощи реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) в полном соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре Implen NanoPhotometer P330 («Implen», Германия), чистоту выделенного продукта оценивали по отношению A_{260}/A_{280} (в норме ≥ 1.8). Синтез кДНК проводили методом обратной транскрипции (ОТ) в 20 мкл с использованием набора реактивов MMLV RT kit («Евроген», Россия) в полном соответствии с инструкцией производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени (Mx3005P, «Stratagene», США) проводили в 10 мкл реакционной смеси, содержащей SYBR Green («Biolabmix», Россия), смесь специфических прямых и обратных праймеров (10 пкмоль) («Beagle», Россия) (табл. 1), подобранных с использованием программного обеспечения Primer-BLAST. Полученные данные нормировали к уровню гена *Gapdh* и рассчитывали в относительных единицах по отношению к содержанию мРНК изучаемого гена методом 2^{ΔΔCt} [14].

Статистическая обработка данных

Для статистической обработки полученных результатов использовали программное обеспечение Graph Pad Prism v. 6. Для сравнения групп применяли U-критерий Манна-Уитни

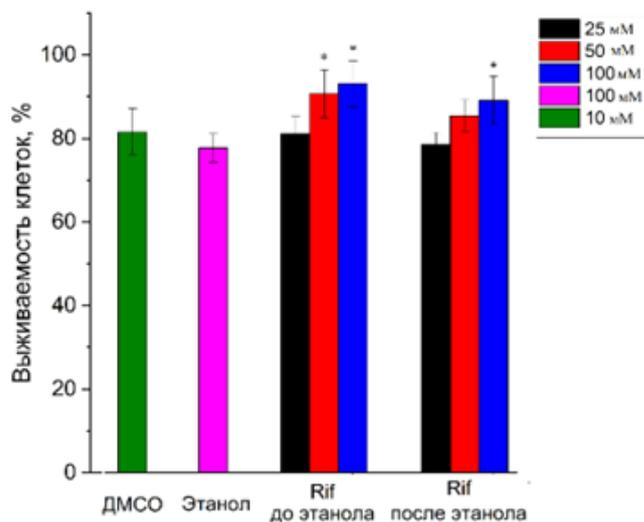


Рисунок 1. Жизнеспособность культуры SH-SY5Y через 24 ч инкубации в растворе этанола (100 мМ) и через 2 ч инкубации с ДМСО и Rif (* $p \leq 0.05$ относительно этанола).

для независимых малых выборок. Нормальность распределения полученных значений проверяли тестом Д'Агостино-Пирсона. Различия считали статистически значимыми при значении $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Была выполнена оценка жизнеспособности клеток нейроblastомы SH-SY5Y при моделировании длительного воздействия этанола на организм. Полученные данные были нормированы по уровню значений в группе контроля, не содержащей этанола и ДМСО (рис. 1). Выживаемость культуры клеток после инкубации в этаноле (100 мМ) в течение 24 ч составила более 70 %, в ДМСО в течение 2 ч – более 80%.

Добавление к культуре клеток раствора Rif на 2 ч повысило выживаемость клеток SH-SY5Y как в случае добавления до инкубации клеток в этаноле, так и в случае добавления Rif после инкубации; однако в последнем случае значимый эффект был лишь только при добавлении Rif в самой высокой концентрации (100 мМ).

Длительная инкубация клеток в этаноле вызвала повышение относительного уровня мРНК TLR4 и IL1β. Предварительная инкубация клеток с Rif (25-100 мМ) до инкубации клеток в растворе этанола сохраняла уровень мРНК TLR4 на уровне контрольных значений во всех трех экспериментальных группах, при этом инкубация клеток с Rif после длительной инкубации клеток с этанолом дозозависимо снижала содержание мРНК TLR4. Rif 100 мМ оказал наиболее выраженный эффект. Предварительная

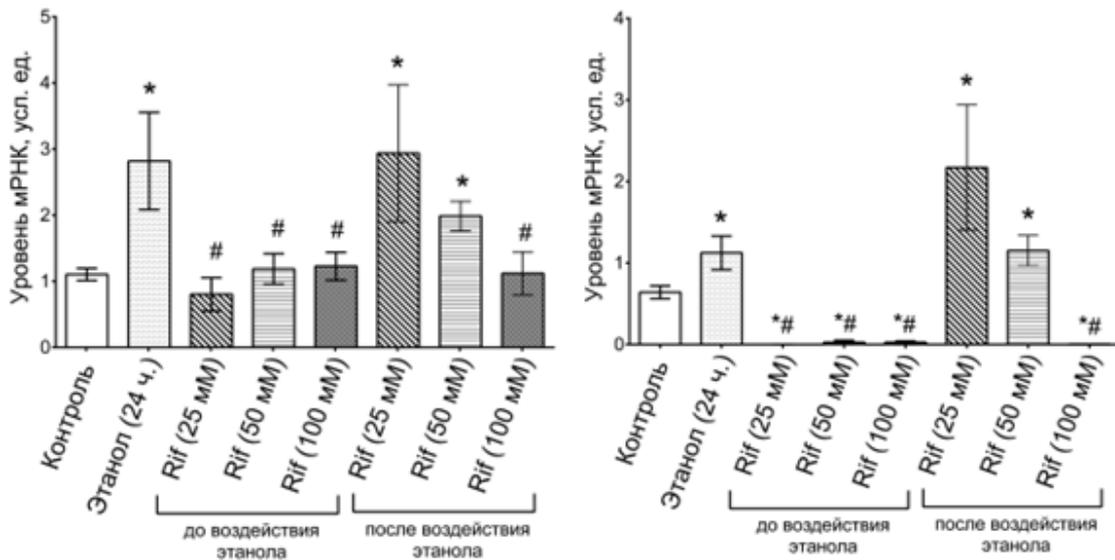


Рисунок 2. Относительный уровень содержания мРНК TLR4 (слева) и IL1β (справа) (* – $p \leq 0.05$ относительно контроля, # – $p \leq 0.05$ относительно этанола).

инкубация клеток с Rif (25-100 мМ) блокировала экспрессию IL1β. При этом использование Rif после воздействия этанола дозозависимо снижало уровень мРНК IL1β, блокируя экспрессию цитокина при применении Rif 100 мМ (рис. 2).

Нейропротекторный эффект Rif был обнаружен в ходе эпидемиологических исследований пациентов с лепрой, которые принимали Rif в качестве терапии. Было замечено, что у таких пациентов низкий уровень заболеваемости нейродегенеративными патологиями [12]. Дальнейшие экспериментальные наблюдения на разных моделях нейровоспаления показали способность Rif снижать уровень провоспалительных цитокинов [6-10, 15], содержание β-амилоида при моделировании болезни Альцгеймера [16], α-синуклеина при моделировании болезни Паркинсона [17-18]. На модели демиелинизации мозолистого тела было показано снижение апоптотической активности, а предварительное введение Rif подавляло индуцированную литий-пилокарпином нейродегенерацию гиппокампа, снижая уровень цитохрома с в гиппокампе [8-9].

В исследовании на культуре микроглиальных клеток были получены сведения о конкуренции Rif и липополисахарида за связывание с белком MD2. Белок MD2 является корецептором TLR4 и необходим для связывания лиганда TLR4 с последующей активацией TLR4-сигнализации. Rif, связываясь с MD2, способствовал ингибированию TLR4-сигнальных путей в эксперименте [11-12] (рис. 3).

Результаты нашего эксперимента показали активацию генов *Il1β* и *Tlr4*, данные подтверждают полученные ранее другими исследователями результаты с использованием модели длительного воздействия этанола на культуру клеток SH-SY5Y [19-21]. Однако еще остается открытым вопрос относительно механизма воздействия этанола на активацию генов нейровоспаления. Клетки нейробластомы SH-SY5Y часто используют *in vitro* в качестве моделей для изучения механизмов дифференцировки нейронов; они являются адренергическими по фенотипу, но также экспрессируют дофаминергические маркеры. Данная клеточная культура не является зрелой микроглиальной клеткой, однако при воздействии этанола отмечается реакция к активации генов

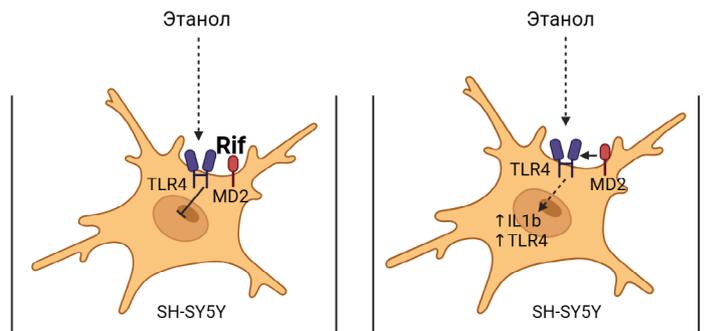


Рисунок 3. Предполагаемый механизм действия Rif.

воспаления без поступающих сигналов от кокультивируемых каких-либо других клеток, как это было показано ранее в другом эксперименте, где добавление питательной среды от культивируемых клеток микроглии к клеткам SH-SY5Y вызвало их активацию [21]. Таким образом, мы наблюдаем механизм ответной защитной реакции одних лишь клеток SH-SY5Y на воздействие этанола. Результаты эксперимента позволяют предположить, что провоспалительный ответ на этанол опосредуется TLR4-зависимым путем, так как добавление Rif, который способен нарушать проведение TLR4-сигнализации, до инкубации клеток в этаноле значительно ингибировало экспрессию генов *Il1β* и *Tlr4*. При этом эффект был получен независимо от используемой дозировки Rif. Добавление же Rif после длительной инкубации клеток в растворе этанола снижало уровень экспрессии генов *Il1β* и *Tlr4* дозозависимо и эффект был значим лишь только при применении Rif в самой высокой концентрации в нашем эксперименте (100 мМ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполненное исследование подтверждает способность Rif оказывать влияние на экспрессию генов нейровоспаления; при этом наиболее значимый эффект был получен при добавлении Rif (20-100 мМ) до инкубации клеток SH-SY5Y в растворе этанола, что указывает на способность Rif ингибировать пути активации

провоспалительного ответа клетками SH-SY5Y на длительно присутствующий этанол в питательной среде. Представляется интересным в дальнейшем исследовать данный эффект на других клеточных линиях нервной ткани, а также в экспериментах *in vivo*. Дальнейшие исследования нейропротекторных механизмов, оказываемых Rif, могут способствовать его внедрению в качестве нейропротектора в клиническую наркологическую практику для коррекции нейровоспалительных событий в ЦНС, развивающихся при длительном употреблении алкоголя.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе не проводились исследования с использованием людей или животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России (2022-2025 гг.) «Поиск молекулярных мишеней для фармакологического воздействия при аддиктивных и нейроэндокринных нарушениях и создание новых фармакологически активных веществ, действующих на рецепторы ЦНС», шифр FGWG-2022-0004.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Airapetov, M.I., Eresko, S.O., Lebedev, A.A., Bychkov, E.R., Shabanov, P.D. (2020) The role of toll-like receptors in the neuroimmunology of alcoholism. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **66**(3), 208-215. DOI: 10.18097/PBMC20206603208
2. Crews, F.T., Zou, J., Qin, L. (2011) Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain, Behavior, and Immunity*, **25**(Suppl.1), 4-12. DOI: 10.1016/j.bbi.2011.03.003
3. Crews, F.T., Vetreno, R.P. (2014) Neuroimmune basis of alcoholic brain damage. *Int. Rev. Neurobiol.*, **118**, 315-357. DOI: 10.1016/B978-0-12-801284-0.00010-5
4. Crews, F.T., Vetreno, R.P. (2016) Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism. *Psychopharmacology (Berl)*, **233**(9), 1543-57. DOI: 10.1007/s00213-015-3906-1
5. Coleman, L.G.J., Crews, F.T. (2018) Innate immune signaling and alcohol use disorders. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **248**, 369-396. DOI: 10.1007/164-2018-92
6. Bi, W., Zhu, L., Wang, C. (2011) Rifampicin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation. *Brain. Res.*, **1395**, 12-20. DOI: 10.1016/j.brainres.2011.04.019
7. Yurtsever, I., Üstündağ, Ü.V., Ünal, İ., Ateş, P.S., Emekli-Alturfan, E. (2022) Rifampicin decreases neuroinflammation to maintain mitochondrial function

- and calcium homeostasis in rotenone-treated zebrafish. *Drug Chem. Toxicol.*, **45**(4), 1544-1551. DOI: 10.1080/01480545.2020.1846549
8. Zahednasab, H., Firouzi M., Kaboudanian-Ardestani, S., Mojallal-Tabatabaei, Z., Karampour, S., Keyvani, H. (2019) The protective effect of rifampicin on behavioral deficits, biochemical, and neuropathological changes in a cuprizone model of demyelination. *Cytokine*, **113**, 417-426. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.10.016
 9. Airapetov, M.I., Eresko, S.O., Ignatova, P.D., et al. (2023) The effect of rifampicin on expression of the toll-like receptor system genes in the forebrain cortex of rats prenatally exposed to alcohol. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(4), 228-234. DOI: 10.18097/PBMC20236904228
 10. Airapetov, M.I., Eresko, S.O., Skabelkin, D.A., et al. (2022) The effect of rifampicin on the system of toll-like receptors in the nucleus accumbens of the brain of long-term alcoholized rats during alcohol withdrawal. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **68**(4), 279-287. DOI: 10.18097/PBMC20226804279
 11. Wang, X., Grace, P.M., Pham, M.N., Cheng, K., Strand, K.A., Smith, C., Li, J., Watkins, L.R., Yin, H. (2013) Rifampin inhibits toll-like receptor 4 signaling by targeting myeloid differentiation protein 2 and attenuates neuropathic pain. *FASEB J.*, **27**(7), 2713-2722. DOI: 10.1096/fj.12-222992
 12. Bi, W., Cheng, X., Zeng, Z., Zhou, R., Luo, R., Zhang, J., Zhu, L. (2021) Rifampicin ameliorates lipopolysaccharide-induced cognitive and motor impairments via inhibition of the TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway in mice. *Neuro. Res.*, **43**(5), 358-371. DOI: 10.1080/01616412.2020.1866353
 13. Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P.D. (2018) Analysis of cell viability by the alamar blue assay. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2018**(6), 095489. DOI: 10.1101/pdb.prot095489
 14. Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.*, **25**(4), 402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262
 15. Yulug, B., Hanoglu, L., Kilic, E., Schabitz, W.R. (2014) RIFAMPICIN: an antibiotic with brain protective function. *Brain Res. Bull.*, **107**, 37-42. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2014.05.007
 16. Umeda, T., Uekado, R., Shigemori, K., Eguchi, H., Tomiyama, T. (2022) rifampicin halts the progression of tauopathy by inhibiting tau oligomer propagation in alzheimer brain extract-injected mice. *Biomedicines*, **10**(2), 297. DOI: 10.3390/biomedicines10020297
 17. Umeda, T., Hatanaka, Y., Sakai, A., Tomiyama, T. (2021) Nasal rifampicin improves cognition in a mouse model of dementia with lewy bodies by reducing α-synuclein oligomers. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**(16), 8453. DOI: 10.3390/ijms22168453
 18. Acuña, L., Hamadat, S., Corbalán, N.S. (2019) Rifampicin and its derivative rifampicin quinone reduce microglial inflammatory responses and neurodegeneration induced in vitro by α-synuclein fibrillary aggregates. *Cells*, **8**(8), 776. DOI: 10.3390/cells8080776
 19. Getachew, B., Csoka, A.B., Tizabi, Y. (2022) Dihydropyridinone protects against ethanol-induced toxicity in SH-SY5Y cell line: role of GABAA receptor. *Neurotox. Res.*, **40**(3), 892-899. DOI: 10.1007/s12640-022-00503-9
 20. Wernicke, C., Hellmann, J., Finckh, U., Rommelspacher, H. (2010) Chronic ethanol exposure changes dopamine D2 receptor splicing during retinoic acid-induced differentiation of human SH-SY5Y cells. *Pharmacol. Rep.*, **62**(4), 649-663. DOI: 10.1016/s1734-1140(10)70322-4
 21. Lawrimore, C.J., Coleman, L.G., Zou, J., Crews, F.T. (2019) Ethanol induction of innate immune signals across bv2 microglia and SH-SY5Y neuroblastoma involves induction of IL-4 and IL-13. *Brain. Sci.*, **9**(9), 228. DOI: 10.3390/brainsci9090228

Поступила: 12.12.2023
 После доработки: 30.01.2024
 Принята к публикации: 02.02.2024

RIFAMPICIN INHIBITS TLR4 AND IL1 β GENE EXPRESSION AND ENHANCES SH-SY5Y CELL VIABILITY AFTER PROLONGED ETHANOL EXPOSURE IN AN *IN VITRO* EXPERIMENT

M.I. Airapetov^{1,2}, S.O. Eresko^{1,3,4}, Rogova A.S.^{4,5}, E.R. Bychkov¹, A.A. Lebedev¹, P.D. Shabanov^{1,2}*

¹Institute of Experimental Medicine, 12 Acad. Pavlova str., St. Petersburg, 197376 Russia; e-mail: *interleukin1b@gmail.com

²Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russia

³North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia

⁴Saint-Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics, St. Petersburg, Russia

⁵Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

Prolonged alcohol exposure activates TLR4-signaling pathways in the brain, responsible for the development of neuroinflammation. There is interest in pharmacologic correction of these mechanisms. The antibiotic rifampicin (Rif) is known as a potential neuroprotectant which can correct various pathologic conditions of the nervous system associated with the development of neuroinflammatory events. We performed a study on human neuroblastoma cell culture SH-SY5Y. Prolonged incubation of SH-SY5Y cells with ethanol (24 h, 100 mM) induced activation of the innate immune system genes *Tlr4* and *Il1 β* . Pre-treatment with Rif (25-100 mM) prior to incubation of cells with ethanol inhibited *Tlr4* and *Il1 β* gene expression, whereas addition of Rif after incubation of cells with ethanol dose-dependently reduced the increased expression of *Tlr4* and *Il1 β* genes, with the most significant effect observed at a concentration of 100 mM. In addition, the use of Rif increased cell survival in culture. Thus, the results of our experiment have shown that Rif is able to eliminate the increased expression of inflammation genes caused by prolonged alcohol exposure and to increase the survival rate of long-term incubated cells in ethanol solution.

Key words: ethanol, neuroinflammation, TLR4, SH-SY5Y, rifampicin

FUNDING

The work was carried out within the framework of the State Task of the Ministry of Education and Science of Russia (2022-2025) "Search for molecular targets for pharmacological effects in addictive and neuroendocrine disorders and the creation of new pharmacologically active substances acting on CNS receptors", code FGWG-2022-0004.

Received: 12.12.2023, revised: 30.01.2024, accepted: 02.02.2024