

УДК 577.12

ЗАЩИТНОЕ ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 НА БЕТА-КЛЕТКИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ RIN-m5F ПРИ ТОКСИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ ГЛЮКОЗЫ И ЦИТОКИНОВ*

© 2019 Е.Г. Новоселова**, О.В. Глушкова, С.Б. Парфенюк,
М.О. Хренов, С.М. Лунин, Т.В. Новоселова, М.Г. Шарапов,
И.А. Шаев, В.И. Новоселов

*Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290 Пущино,
Московская обл., Россия; электронная почта: elenapov_06@mail.ru*

Поступила в редакцию 14.01.2019

После доработки 18.03.2019

Принята к публикации 18.03.2019

С учетом особой роли бета-клеток поджелудочной железы при развитии сахарного диабета было проведено исследование влияния пероксиредоксина 6 (Prx6) на жизнеспособность и функциональную активность бета-клеток инсулиномы крыс (линия RIN-m5F) в условиях, моделирующих диабет. С этой целью клетки культивировали при повышенных концентрациях глюкозы в среде или в присутствии провоспалительных цитокинов (TNF- α и IL-1), известных своей особой ролью в цитотоксических аутоиммунных реакциях при диабете. Было установлено, что повышение концентрации глюкозы в пределах 23–43 мМ вызывает гибель 20–60% бета-клеток. Добавление Prx6 вызывает снижение уровня активных форм кислорода и защищает бета-клетки от гипергликемии, снижая гибель клеток RIN-m5F в несколько раз. Исследование секреции инсулина бета-клетками RIN-m5F показало значительный стимулирующий эффект пероксиредоксина 6 на инсулин-продуцирующую активность бета-клеток поджелудочной железы. Интересно, что стимулирующая активность Prx6 была обнаружена как при культивировании бета-клеток в нормальных условиях, так и в неблагоприятных условиях, вызывающих гибель клеток. Было показано, что в качестве одного из механизмов действия пероксиредоксина 6 на бета-клетки может быть регуляция активности сигнального каскада NF- κ B, в частности, через активацию фосфорилирования RelA/p65 по Ser536.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пероксиредоксин 6, гипергликемия, цитокины, бета-клетки RIN-m5F, продукция инсулина, сигнальный каскад NF- κ B.

DOI: 10.1134/S0320972519060071

Нарушение функций бета-клеток поджелудочной железы является общим признаком сахарного диабета 1 и 2 типа. Сахарный диабет 1 типа является аутоиммунным заболеванием, которое возникает из-за разрушения инсулин-продуцирующих бета-клеток поджелудочной железы в результате атаки аутореактивных клонов цитотоксических Т-лимфоцитов. Это заболевание проявляется в том случае, когда гибнет

большинство панкреатических бета-клеток через механизм активации аутореактивных Т-лимфоцитов, что приводит к накоплению глюкозы в крови и вызывает необходимость регулярного пожизненного применения инсулина больным с диабетом первого типа [1]. Для сахарного диабета 2 типа, который является серьезным метаболическим заболеванием, основным критерием является не разрушение, а дисфункция бета-клеток, а также нарушение инсулиновой резистентности. Этот процесс называют «токсичностью глюкозы» [2]. Окислительный стресс, который возникает при развитии диабета 1 и 2 типа, считается главным патофизиологическим фактором сахарного диабета [3]. В мировой литературе имеются сведения о применении антиоксидантов, в основном низкомолекулярных природных и синтетических веществ, для лечения различных патологий, сопряженных с са-

Принятые сокращения: Prx6 – пероксиредоксин 6; клетки линии RIN-m5F – клетки инсулиномы крыс; SOD – супероксиддисмутаза; GPx – глутатионпероксидаза; IL – интерлейкин; АФК – активные формы кислорода; NF- κ B – ядерный фактор каппа-Би; TNF- α – фактор некроза опухолей.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochimija>, в рубрике «Papers in Press», ВМ 19-011, 29.04.2019.

** Адресат для корреспонденции.

харным диабетом [4, 5]. Между тем имеются все основания считать, что ферменты-антиоксиданты могут быть более эффективными по своей способности нейтрализовать активные формы кислорода (АФК) по сравнению с низкомолекулярными антиоксидантами. Ранее мы показали терапевтический эффект рекомбинантного пероксиредоксина 6 (Prx6) при различных патологиях, связанных с окислительным стрессом, например, механических и термических травмах кожи, химических ожогах дыхательных путей, гипоксии-реперфузии кишечника [6–8]. При этом было доказано, что антиоксидантная активность Prx6 значительно превышает активность известных белков-антиоксидантов – супероксиддисмутазы (SOD), каталазы и глутатионпероксидазы (GPx). Полагаем, что Prx6 может быть эффективным в качестве агента, подавляющего уровень окислительного стресса при сахарном диабете. Действительно, в сравнении с другими тканями млекопитающих, в бета-клетках поджелудочной железы содержатся более низкие уровни ферментов-антиоксидантов, таких как SOD, каталаза и GPx, что делает эти клетки более чувствительными к повреждающему действию АФК [9]. В условиях дефицита эндогенных ферментов-антиоксидантов возрастает интерес к использованию новых белков, обладающих антиоксидантной активностью и способных защитить бета-клетки поджелудочной железы при развитии диабета. В нашей работе впервые изучали эффективность Prx6 для снижения повреждающих эффектов в отношении панкреатических бета-клеток инсулиномы крыс (линии RIN-m5F), культивируемых в условиях, вызывающих апоптоз и подавление инсулин-продуцирующей активности этих клеток.

Ранее мы показали, что в развитии диабета у животных участвует система сигнальной трансдукции иммунных клеток, при этом особая роль принадлежит каскаду NF-κB [10]. Действительно, мы установили, что использование ингибитора этого сигнального пути значительно снижает уровень иммунного дисбаланса в клетках мышей с аллоксан-индуцированным диабетом [11]. В настоящей работе в условиях *in vitro* важно было изучить влияние Prx6 в бета-клетках на активность NF-κB, как одного из ключевых путей, участвующих в регуляции провоспалительного ответа при окислительном стрессе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культивирование клеток линии RIN-m5F. Клетки инсулиномы крыс (линия RIN-m5F) (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных»,

Санкт-Петербург, Россия) выращивали во флаконах для культивирования в среде, состоящей из смеси RPMI 1640 и DMEM («ПанЭко», Россия) в соотношении 1 : 1, с добавлением 10%-ной эмбриональной телячьей сыворотки («Thermo», Великобритания) и смеси антибиотиков (пенициллин – 100 мкг/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл, гентамицин – 50 мкг/мл), с низким содержанием глюкозы (8,0 мМ) при 37 °С, в атмосфере 5% CO₂. В экспериментах были использованы клетки после 3–7 пассажей. Для индукции гипергликемии добавляли глюкозу в диапазоне концентраций 15–35 мМ, конечная концентрация глюкозы составляла 23–43 мМ. Для индукции цитокин-индуцированного апоптоза добавляли смесь провоспалительных цитокинов: фактор некроза опухолей (TNF-α) (30 нг/мл) и интерлейкин (IL-1β) (15 нг/мл). Пероксиредоксин 6 в концентрации 150 мкг/мл добавляли за 30 мин до внесения глюкозы/цитокинов. В пределах каждого независимого эксперимента характеристики образцов измеряли параллельно в 9–12 повторах, получая среднее значение. Усредненные значения по четырем экспериментам использовали для определения достоверности различий между группами (n = 4). В качестве контролей использовали клетки, не подвергавшиеся дополнительной обработке глюкозой, цитокинами или Prx6.

Тест на выживаемость (цитотоксический тест).

Клетки RIN-m5F культивировали в 96-луночных планшетах («ТРП», Швейцария) по 100 мкл (2×10^4 клеток) в лунку в среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2,04 мМ L-глутамина («ПанЭко», Россия), 100 мкг/мл стрептомицина при 37 °С, в атмосфере 5% CO₂. Через 24 ч культивирования к образованному монослою клеток RIN-m5F добавляли 1 мкг/мл актиномицина D («Sigma», США), затем добавляли глюкозу, и/или цитокины и Prx6. Через 24 ч культивирования промытый три раза PBS монослой клеток-мишеней окрашивали в течение 10 мин 0,05% кристаллвиолетом («Sigma», США), лунки тщательно промывали проточной дистиллированной водой, и в каждую лунку добавляли по 100 мкл 1%-ного додецилсульфата натрия. Поглощение измеряли через 10 мин при 546 нм на спектрофотометре для планшетов Titertek Multiscan MCC/340 («Flow Laboratories», Финляндия).

Измерение концентрации инсулина. Клетки RIN-m5F культивировали в 24-луночных планшетах («ТРП», Швейцария) по 1 мл ($1,5 \times 10^6$ клеток) на каждую лунку в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2,04 мМ L-глутамина, 100 мкг/мл стрепто-

мицина при 37 °С, в атмосфере 5% CO₂. Через 24 ч культивирования к образованному монослою клеток RIN-m5F добавляли глюкозу или цитокины и/или Prx6 в концентрациях, указанных выше. Затем через 24 ч клетки разрушали 3× замораживанием-оттаиванием. Образцы центрифугировали («ELMI», Латвия) при 3000 g в течение 10 мин, супернатант использовали для дальнейшего анализа. Для определения концентрации инсулина были использованы коммерческие наборы для определения инсулина крысы с помощью иммуноферментного анализа Rat Insulin, INS ELISA Kit («Cloud-Clone Corp.», Китай). Все последующие манипуляции были проведены в соответствии с протоколами проведения анализа, которые были приложены к набору. Поглощение измеряли при 450 нм на спектрофотометре для планшетов Titertek Multiscan MCC/340.

Определение активных форм кислорода с использованием карбокси-H₂DCFDA. Клетки RIN-m5F предварительно культивировали в течение 24 ч в 96-ти луночном планшете (2,5 × 10⁴ клеток на лунку в 100 мкл среды DMEM), отмывали PBS и добавляли свежеприготовленный раствор карбокси-H₂DCFDA («Invitrogen», США) в стерильном DMSO в конечной концентрации 2,5 мкМ в среде с обедненной эмбриональной телячьей сывороткой (2%). Клетки инкубировали с карбокси-H₂DCFDA в темноте 1 ч, затем добавляли Prx6 и глюкозу и инкубировали еще 1 ч. В качестве контроля использовали клетки без добавок Prx6 и глюкозы. Зеленую флуоресценцию измеряли с помощью флуоресцентного планшет-ридера Infinite 200 («Tecan», Австрия) при длине волны возбуждения 480 нм и длине волны поглощения 530 нм (Ex/Em = 485/535 nm), как описано ранее [12].

Ds-Na-ПААГ-электрофорез и иммуноблоттинг. Для приготовления образцов 2 × 10⁶ клеток лизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора («UZDN-2T», Россия) на льду при постоянном помешивании в течение 2 мин. Белок осаждали с помощью ацетона и добавляли 2× солюбилизирующий буфер (50 мМ Tris-HCl, 2% Ds-Na, 25% (v/v) глицерина, 5% β-меркаптоэтанола и 0,1% бромфенолового синего, pH 6,8) в соотношении 1 : 1. Образцы кипятили в течение 5 мин. Конечная концентрация белка в образцах составляла 1 мг/мл (белок определяли по методу Бредфорда [13]), образцы наносились по 10 мкл в каждую лунку. Наличие белков в образцах определяли методом Вестерн-блот анализа с использованием наборов следующих антител: кроличьи антитела к ph-NF-κB (Ser276) («Santa Cruz», США); кроличьи антитела к ph-NF-κB (Ser536) и кроличьи антитела к caspase-3 («Cell Signaling», США).

Для выявления белков использовали систему ECL («GE Healthcare», Швеция). Фотографии полос были получены с помощью трансиллюминатора TFX-35.WL («Vilber Lourmat», Франция). Количественную оценку белков после денситометрии проводили с использованием программы Qara (Ver. 3.7). Было проведено по 3 независимых эксперимента (используя клетки от разных пассажей) для каждого белка. Полученные цифровые данные нормировали к соответствующему контролю нагрузки (полосам GAPDH) и выражали в относительных единицах.

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние пероксиредоксина 6 на жизнеспособность панкреатических бета-клеток изучали в системе *in vitro* с использованием линии клеток инсулиномы RIN-m5F. Известно, что пролиферативная и регенерационная способности панкреатических бета-клеток тесно связаны с количеством высвобождаемого инсулина; действительно, существует обратная связь между секрецией инсулина и концентрацией глюкозы в крови [14]. Бета-клетки линии RIN-m5F использовали в качестве модели сахарного диабета, при этом исследовали жизнеспособность этих клеток при их культивировании в неблагоприятных условиях (повышенное содержание глюкозы и провоспалительных цитокинов), а также определяли секрецию инсулина, уровень апоптоза, активность сигнального каскада NF-κB и эффективность защитного действия Prx6. Кроме того, тестировали антиоксидантную активность Prx6 в клетках с использованием зонда карбокси-H₂DCFDA. Результаты показали, что добавление Prx6 достоверно снижает уровень АФК в клетках RIN-m5F, культивируемых в присутствии 33 мМ глюкозы (таблица).

Влияние Prx6 на уровень АФК в клетках RIN-m5F в присутствии повышенного содержания глюкозы

Контроль	Prx 6	Глюкоза	Глюкоза + Prx6
100 ± 10,5	115,6 ± 8,52	* 182,8 ± 14,6	# 137,5 ± 20,8

Примечание. Клетки инкубировали 1 ч в присутствии флуоресцентного красителя карбокси-H₂DCFDA и 33 мМ глюкозы и/или Prx6 (150 мг/мл). Каждое значение – уровень зеленой флуоресценции, средний от 9–12 повторов, рассчитанный в % от контроля.

* Достоверное отличие от контроля, *p* < 0,01; # – достоверное отличие от группы «глюкоза», *p* < 0,05.

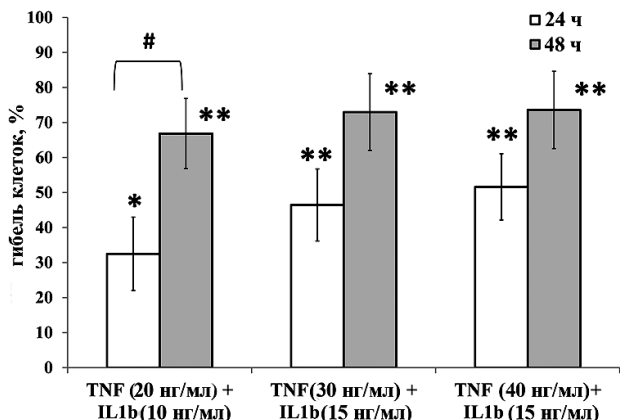


Рис. 1. Гибель бета-клеток RIN-m5F при их культивировании в течение 24 и 48 ч в присутствии цитокинов. * Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$; ** достоверное отличие от контроля, $p < 0,01$

Исследование влияния провоспалительных цитокинов на выживаемость клеток. На рис. 1 показаны результаты измерения выживаемости бета-клеток в присутствии провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1 β . Показано, что добавление смеси двух провоспалительных цитокинов индуцирует гибель бета-клеток поджелудочной железы при времени культивирования клеток в течение 24 и 48 ч. При этом цитотоксический эффект провоспалительных цитокинов увеличивался, как при увеличении длительности культивирования, так и при увеличении концентрации добавленных цитокинов. Так, при культивировании клеток в течение 24 ч с максимальной концентрацией цитокинов (40 нг для TNF- α и 15 нг для IL-1 β) гибель клеток RIN-m5F составляла 50%, а при увеличении времени

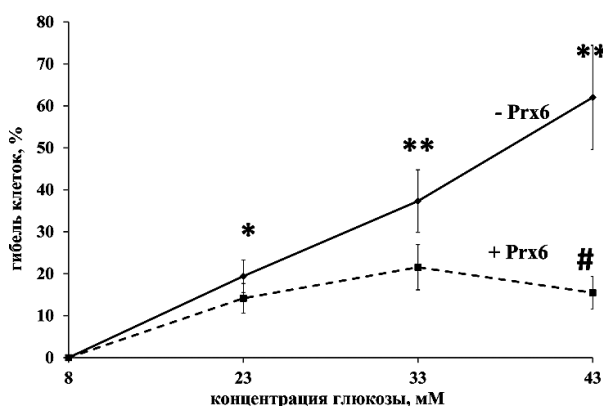


Рис. 2. Защитное действие Prx6 на жизнеспособность клеток RIN-m5F, культивируемых 24 ч в среде с высоким содержанием глюкозы. * Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$; ** достоверное отличие от контроля, $p < 0,01$; # достоверное отличие от клеток, культивируемых без Prx6 в присутствии 35 мМ глюкозы, $p < 0,01$

экспозиции клеток в этих же условиях погибало более 60% клеток.

Влияние пероксиредоксина 6 на выживаемость бета-клеток в условиях гипергликемии. В следующей серии экспериментов исследовали выживаемость бета-клеток RIN-m5F при повышении концентрации глюкозы в среде культивирования, при этом изучали эффект добавления в среду культивирования клеток Prx6. Результаты этих исследований представлены на рис. 2. Показано, что повышение концентрации глюкозы в пределах 23–43 мМ вызывает гибель 20–60% бета-клеток. Добавление Prx6 достоверно защищает бета-клетки от гипергликемии, снижая число погибших клеток 5 \times (при концентрации глюкозы 43 мМ). Полученные результаты кажутся очень важными, поскольку прямая защита бета-клеток поджелудочной железы от гибели в условиях гипергликемии с применением пероксиредоксина 6 позволяет предположить эффективность этого фермента-антиоксиданта и в условиях *in vivo*. Сохранение бета-клеток в неблагоприятных условиях гипергликемии при добавлении Prx6 ставит вопрос о том, какова функциональная активность этих клеток, основная роль которых связана с секрецией инсулина.

Влияние пероксиредоксина 6 на секрецию инсулина бета-клетками RIN-m5F. Результаты, показанные на рис. 3, демонстрируют значительный стимулирующий эффект Prx6 на инсулин-продуцирующую активность бета-клеток поджелудочной железы. Интересно, что стимулирующая активность Prx6 была обнаружена как при культивировании бета-клеток в нормальных условиях, так и в неблагоприятных условиях, вы-

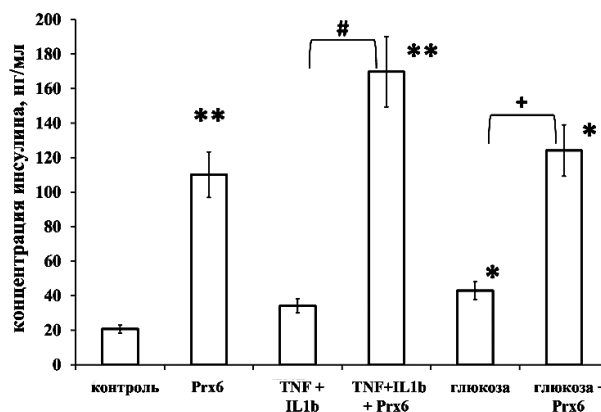


Рис. 3. Продукция инсулина клетками RIN-m5F при их культивировании 24 ч при добавлении в среду культивирования глюкозы (33 мМ), цитокинов (40 нг/мл TNF- α и 15 нг/мл IL-1 β), Prx6 и их комбинаций. * Достоверное отличие от контроля, $p < 0,01$; # достоверное отличие от группы «цитокины», $p < 0,01$; + достоверное отличие от группы «глюкоза», $p < 0,01$

зывающих гибель клеток. Действительно, и в присутствии цитокинов, и в условиях гипергликемии, добавление Prx6 в среду культивирования резко увеличивало инсулин-продуцирующую активность клеток.

Влияние пероксиредоксина 6 на апоптоз и активность каскада NF-κB в бета-клетках RIN-m5F. Уровень апоптоза бета-клеток RIN-m5F оценивали по измерению соотношения активированной/неактивированной каспазы 3 (рис. 4, а). Показали, что при повышенном содержании глюкозы в среде культивирования клеток (33 мМ) наблюдается достоверное повышение уровня апоптоза. При этом присутствие Prx6 в среде полностью устраняло эффект гипергликемии, нормализуя соотношение активированной и неактивированной каспазы 3.

Фактор транскрипции NF-κB является ключевым участником ответа клетки на стресс, повреждение и воспаление [15]. В цитоплазме NF-κB присутствует в качестве p65/p50 гетеродимера, который поддерживается в неактивном состоянии IκB белками. В ответ на воздействие различных факторов, включая окислительный

стресс, NF-κB активируется путем фосфорилирования IκB и высвобождения димера p65, что вызывает транслокацию NF-κB в ядро и запуск экспрессии генов, регулирующих продукцию цитокинов [16]. Известно, что именно посттрансляционные модификации сигнального белка p65/NF-κB определяют его транскрипционную специфичность. Наиболее важными сайтами фосфорилирования p65 являются Ser276 и Ser536. Ser536 фосфорилируется киназами IKK, TANK (TBK1) и RSK1. Фосфорилирование Ser276 обычно происходит при участии протеинкиназы A (PKA) в цитоплазме и киназы MSK1 в ядре [17]. Посттрансляционная модификация p65 при фосфорилировании Ser536 описана практически при всех известных видах неспецифических ответов клетки, ее биологическая роль сходна с функцией фосфо-p65 (Ser276). В то время как активация по Ser276 способствует увеличению периода полураспада p65 [18], фосфорилирование Ser536 с участием IKK связано с усилением протеосомной деградации этого транскрипционного фактора в активированных макрофагах [19]. Таким образом, фосфорилирование p65 по

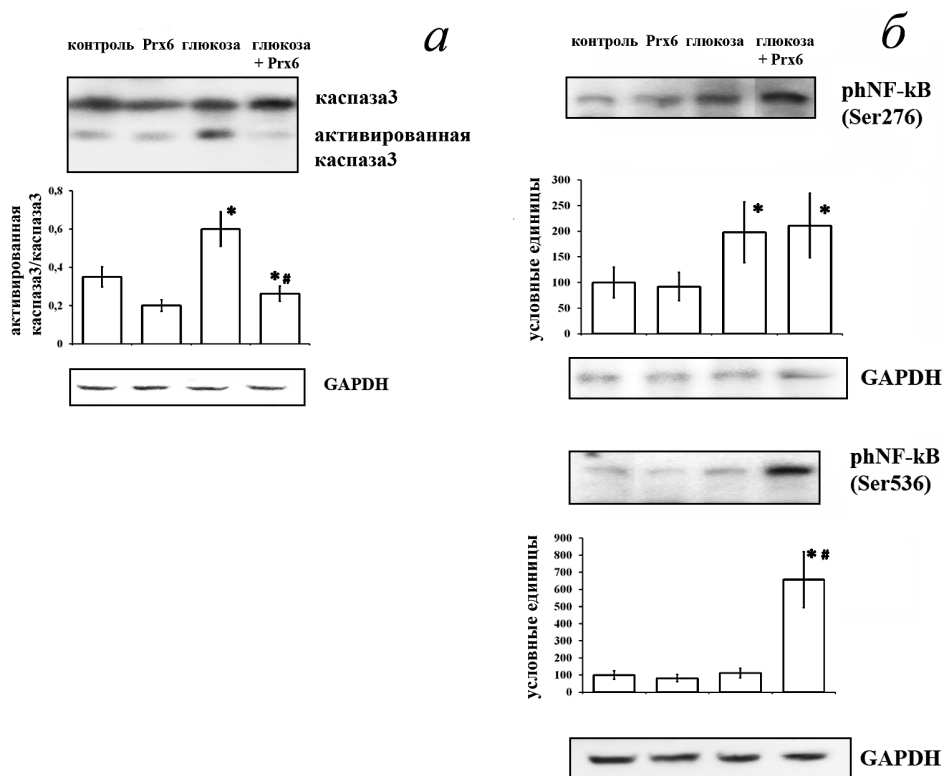


Рис. 4. Влияние Prx6 на апоптоз бета-клеток RIN-m5F (а) и на активность сигнального каскада NF-κB (б) при культивировании клеток в присутствии 33 мМ глюкозы в течение 24 ч. Показаны фотографии полос от одного эксперимента, гистограммы показывают средние значения от трех независимых экспериментов. а – Гистограммы под полосками – соотношение двух форм каспаз; * достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$; # достоверное отличие между группами «глюкоза» и «Prx6 + глюкоза», $p < 0,01$. б – гистограммы под полосками – результаты денситометрии полос, в относительных единицах. * Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$; # достоверное отличие между группами «глюкоза» и «Prx6 + глюкоза». GAPDH (Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа) – контроль загрузки полосок

Ser276, скорее всего, связано с выживаемостью клеток, тогда как фосфорилирование по Ser536 может приводить к гибели клеток путем апоптоза. Активность сигнального каскада NF- κ B оценивали по фосфорилированию RelA/p65 по двум сериновым остаткам (Ser276 и Ser536) (рис. 4, б). Показали, что культивирование клеток в присутствии 33 мМ глюкозы 2× увеличивает фосфорилирование RelA/p65 по Ser276, но не изменяет фосфорилирование по Ser536. Интересно, что добавление к клеткам P α х6 приводит к еще более значительному фосфорилированию RelA/p65 по Ser536, при этом не изменяется фосфорилирование NF- κ B по Ser276. Важно отметить, что в отсутствие повышенного содержания глюкозы, добавление P α х6 также значительно повышает активность каскада NF- κ B, не влияя при этом на уровень апоптоза RIN-m5F клеток.

Таким образом, P α х6 в условиях *in vitro* оказывает очевидный защитный эффект на бета-клетки, повышая их выживаемость и инсулин-продуцирующую активность в условиях повышенного содержания глюкозы. Доказано, что влияние P α х6 на бета-клетки осуществляется через активацию сигнального каскада NF- κ B путем увеличения фосфорилирования RelA/p65 по Ser536.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что дисфункция бета-клеток поджелудочной железы является ключевым процессом в развитии и прогрессировании сахарного диабета, а нарушение функций бета-клеток способствуют снижению секреции инсулина и последующему ускоренному развитию патологии. В нашей работе для защиты RIN-m5F бета-клеток впервые использовали фермент-антиоксидант пероксиредоксин 6, при этом были получены впечатляющие результаты, доказывающие эффективность применения P α х6 как для снижения уровня апоптоза бета-клеток в условиях гипергликемии, так и для восстановления их способности секретировать инсулин.

В этой связи было важно исследовать влияние P α х6 на инсулин-секреторную функцию бета-клеток, а также на выживаемость этих клеток в неблагоприятных условиях, вызванных присутствием цитокинов или повышенного содержания глюкозы. В настоящем исследовании клетки RIN-m5F, выращенные в среде с высоким содержанием глюкозы, были менее жизнеспособны по сравнению с клетками, выращенными в условиях с низкой концентрацией глюкозы, что не противоречит известным данным. Однако нам удалось достичь значительного увеличения выживаемости клеток, культивированных в ус-

ловиях гипергликемии, с использованием P α х6. Это новые данные, неизвестные в мировой литературе, указывающие на перспективность применения этого препарата для снижения патологических последствий сахарного диабета.

Известно, что провоспалительные цитокины (TNF- α и IL-1 β) являются важными участниками патогенеза диабета 1 типа [20], при этом мишенью этих цитокинов являются бета-клетки. Механизм разрушительного воздействия IL-1 β реализуется через ингибирование фактора транскрипции MafA и транскрипции гена инсулина [21]. Продукция и секреция этого цитокина, индуцируемая высоким содержанием глюкозы, способствует гибели бета-клеток [22]. В настоящей работе мы показали, что присутствие TNF- α и IL-1 β приводит к снижению выживаемости RIN-m5F клеток, при этом добавление P α х6 в среду культивирования защищает клетки от токсического действия цитокинов, способствуя повышению их способности продуцировать инсулин. Таким образом, удалось установить, что в присутствии P α х6 бета-клетки поджелудочной железы, культивируемые в неблагоприятных условиях (например, при высоком содержании глюкозы или в присутствии провоспалительных цитокинов), сохраняют способность к повышенной секреции инсулина. Считаем, что это является самым важным результатом настоящей работы.

Возникает вопрос о механизме воздействия P α х6 на секрецию инсулина бета-клетками, которые культивируются в обычных условиях. Действительно, P α х6 приводит к стимуляции выработки инсулина независимо от присутствия добавок глюкозы или цитокинов. Другие авторы, изучая влияние фермента-антиоксиданта (пероральный миметик GPx) на изменение уровня инсулина в крови молодых крыс по мере их взросления, показали, что к 14-й неделе количество инсулина у животных, получающих антиоксидант, достоверно возрастало [23]. Авторы считают, что это объясняется повышением содержания двух транскрипционных факторов (Pdx1 и белка MafA), важных для синтеза инсулина. Вполне возможно, что P α х6 также может участвовать в регуляции продукции инсулина, причем это предположение в дальнейшем необходимо проверить.

Анализируя разные патологии, сопряженные с окислительным стрессом у животных, установили, что механизм защитного действия P α х6 обусловлен, по крайней мере, двумя обстоятельствами: во-первых, пероксидазной активностью фермента и, во-вторых, сигнально-регуляторной функцией P α х6, которая не связана с его пероксидазной активностью, как указано в нашем обзоре [24].

Судя по результатам предыдущих исследований, активация NF-κB может запускать проли анти-апоптотические каскады [25]. Известно, что бета-клетки поджелудочной железы являются мишенями аутоиммунной атаки, которая провоцируется провоспалительными цитокинами, которые активируют NF-κB и способствуют трансклокации NF-κB в ядро клетки [26]. Эти цитокины модифицируют экспрессию сотен генов, приводя к дисфункции бета-клеток и их гибели от апоптоза [27]. Некоторые из этих генов, индуцированных цитокинами, регулируются активацией NF-κB и являются предполагаемыми мишенями для NF-κB [28].

Другие данные свидетельствуют о том, что активированный сигнальный каскад NF-κB в бета-клетках может играть защитную роль. Так, была получена модель трансгенных диабетных мышей, у которых наблюдали ингибирование NF-κB в бета-клетках поджелудочной железы [29]. В этой работе было показано, что длительная блокада NF-κB у новорожденных животных в течение развития поджелудочной железы уменьшала экспрессию ключевых генов в пути секреции инсулина и уменьшала общее количество эндокринных клеток в поджелудочной железе мышей. Это не противоречит результатам, полученным в работе Kim et al. [30], которые показали, что NF-κB предотвращает клеточную гибель

и развитие диабета 1 типа у трансгенных NOD мышей, и свидетельствует о том, что NF-κB может играть анти-апоптотическую роль в бета-клетках мышей NOD и потенциально может предотвратить развитие диабета. В настоящей работе показано, что добавление Prx6 к бета-клеткам RIN-m5F значительно увеличивает активность каскада NF-κB. На фоне того, что пероксиредоксин 6 увеличивает жизнеспособность и инсулин-секреторную активность этих клеток, в данном случае можно утверждать, что NF-κB проявляет анти-апоптотическую активность.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-04-00091 и 19-04-00080-а) и Программы Президиума РАН 1.18 «Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии».

Благодарности. В работе использовали оборудование (планшет-ридер Infinite 200, («Тесан», Австрия)) центра коллективного пользования Пушкинского научного центра.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hober, D., and Sane, F. (2010) Enteroviral pathogenesis of type 1 diabetes, *Discov. Med.*, **10**, 151–160.
- Kaneto, H., Katakami, N., Kawamori, D., Miyatsuka, T., Sakamoto, K., Matsuoka, T.A., Matsuhisa, M., and Yamasaki, Y. (2007) Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes, *Antioxid. Redox Signal.*, **9**, 355–366.
- Rains, J.L., and Jain, S.K. (2011) Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes, *Free Radic. Biol. Med.*, **50**, 567–575, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006.
- Wojnar, W., Zych, M., and Kaczmarczyk-Sedlak, I. (2018) Antioxidative effect of flavonoid naringenin in the lenses of type 1 diabetic rats, *Biomed. Pharmacother.*, **108**, 974–984, doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.092.
- Czerwinska, M.E., Gasinska, E., Lesniak, A., Krawczyk, P., Kiss, A.K., Naruszewicz, M., and Bujalska-Zadrozny, M. (2018) Inhibitory effect of *Ligustrum vulgare* leaf extract on the development of neuropathic pain in a streptozotocin-induced rat model of diabetes, *Phytomedicine*, **49**, 75–82, doi: 10.1016/j.phymed.2018.06.006.
- Gordeeva, A.E., Sharapov, M.G., Tikhonova, I.V., Chemeris, N.K., Fesenko, E.E., Novoselov, V.I., and Temnov, A.A. (2017) Vascular pathology of ischemia/reperfusion injury of rat small intestine, *Cells Tissues Organs*, **203**, 353–364, doi: 10.1159/000455830.
- Sharapov, M.G., Goncharov, R.G., Gordeeva, A.E., Novoselov, V.I., Antonova, O.A., Tikhaze, A.K., and Lankin, V.Z. (2016) Enzymatic antioxidant system of endotheliocytes, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **471**, 410–412, doi: 10.1134/S1607672916060090.
- Karaduleva, E.V., Mubarakshina, E.K., Sharapov, M.G., Volkova, A.E., Pimenov, O.Y., Ravin, V.K., Kokoz, Y.M., and Novoselov, V.I. (2016) Cardioprotective effect of modified peroxiredoxins in retrograde perfusion of isolated rat heart under conditions of oxidative stress, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **160**, 639–642, doi: 10.1007/s10517-016-3237-1.
- Kaneto, H., Kajimoto, Y., Miyagawa, J., Matsuoka, T., Fujitani, Y., Umayahara, Y., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., Yamasaki, Y., and Hori, M. (1999) Beneficial effects of antioxidants in diabetes – possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity, *Diabetes*, **48**, 2398–2406.
- Новоселова Е.Г., Хренов М.О., Парфенюк С.Б., Новоселова Т.В., Лунин С.М., Фесенко Е.Е. (2014) Роль сигнальных каскадов NF-κB, IRF3 и SAPK/JNK в иммунных клетках животных при развитии сахарного диабета 1 типа, *Доклады Академии наук*, **457**, 360–362, doi: 10.7868/S0869565214210300.
- Novoselova, E.G., Glushkova, O.V., Lunin, S.M., Khrenov, M.O., Novoselova, T.V., Parfenyuk, S.B., and Fesenko, E.E. (2016) Signaling, stress response and apoptosis in pre-diabetes and diabetes: restoring immune balance in mice with alloxan-induced type 1 diabetes mellitus, *Intern. Immunopharm.*, **31**, 24–31, doi: 10.1016/j.intimp.2015.11.007.
- Wu, D., and Yotnda, P. (2011) Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers, *J. Vis. Exp.*, **57**, e3357, doi: 10.3791/3357.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.

14. Weir, G.C., and Bonner-Weir, S. (2004) Five stages of evolving beta-cell dysfunction during progression to diabetes, *Diabetes*, **53** (Suppl. 3), S16–S21.
15. Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008) Shared principles in NF-kappaB signaling, *Cell*, **132**, 344–362, doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020.
16. Bubici, C., Papa, S., Dean, K., and Franzoso, G. (2006) Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance, *Oncogen*, **25**, 6731–6748, doi: 10.1038/sj.onc.1209936.
17. Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003) Transcriptional activation of the NF-kB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1), *EMBO J.*, **22**, 1313–1324, doi: 10.1093/emboj/cdg139.
18. Nihira, K., Ando, Y., Yamaguchi, T., Kagami, Y., Miki, Y., and Yoshida, K. (2010) Pim-1 controls NF-kappaB signalling by stabilizing RelA/p65, *Cell Death Differ.*, **17**, 689–698, doi: 10.1038/cdd.2009.174.
19. Lawrence, T., Bebién, M., Liu, G.Y., Nizet, V., and Karin, M. (2005) IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation, *Nature*, **434**, 1138–1143, doi: 10.1038/nature03491.
20. Imai, Y., Dobrian, A.D., Morris, M.A., and Nadler, J.L. (2013) Islet inflammation: a unifying target for diabetes treatment? *Trends Endocrinol. Metab.*, **24**, 351–360, doi: 10.1016/j.tem.2013.01.007.
21. Oetjen, E., Blume, R., Cierny, I., Schlag, C., Kutschenko, A., Kratzner, R., Stein, R., and Knepel, W. (2007) Inhibition of MafA transcriptional activity and human insulin gene transcription by interleukin-1beta and mitogen activated protein kinase kinase kinase in pancreatic islet beta cells, *Diabetologia*, **50**, 1678–1687, doi: 10.1007/s00125-007-0712-2.
22. Maedler, K., Sergeev, P., Ris, F., Oberholzer, J., Joller-Jemelka, H.I., Spinas, G.A., Kaiser, N., Halban, P.A., and Donath, M.Y. (2002) Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets, *J. Clin. Invest.*, **110**, 851–860, doi: 10.1172/JCI15318.
23. Mahadevan, J., Parazzoli, S., Oseid, E., Hertz, A.V., Bernlohr, D.A., Vallerie, S.N., Liu, C.Q., Lopez, M., Harmon, J.S., and Robertson, R.P. (2013) Ebselen treatment prevents islet apoptosis, maintains intranuclear Pdx-1 and MafA levels, and preserves beta-cell mass and function in ZDF rats, *Diabetes*, **62**, 3582–3588, doi: 10.2337/db13-0357.
24. Sharapov, M.G., Novoselov, V.I., and Gudkov, S.V. (2019) Radioprotective role of peroxiredoxin 6, *Antioxidants (Basel)*, **8**, 15, doi: 10.3390/antiox8010015.
25. Barkett, M., and Gilmore, T.D. (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappa B transcription factors, *Oncogene*, **18**, 6910–6924.
26. Cardozo, A.K., Heimberg, H., Heremans, Y., Leeman, R., Kutlu, B., Kruhoffer, M., Orntoft, T., and Eizirik, D.L. (2001) A comprehensive analysis of cytokine-induced and nuclear factor-kB-dependent genes in primary rat pancreatic beta-cells, *J. Biol. Chem.*, **276**, 48879–48886, doi: 10.1074/jbc.M108658200.
27. Eizirik, D.L., and Mandrup-Poulsen, T. (2001) A choice of death – the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis, *Diabetologia*, **44**, 2115–2133, doi: 10.1007/s001250100021.
28. Larsen, P.M., Fey, S.J., Larsen, M.R., Nawrocki, A., Andersen, H.U., Kahler, H., Heilmann, C., Voss, M.C., Roepstorff, P., Pociot, F., Karlens, A.E., and Nerup, J. (2001) Proteome analysis of interleukin-1beta-induced changes in protein expression in rat islets of Langerhans, *Diabetes*, **50**, 1056–1063.
29. Norlin, S., Ahlgren, U., and Edlund, H. (2005) Nuclear factor-kappa B activity in beta-cells is required for glucose-stimulated insulin secretion, *Diabetes*, **54**, 125–132.
30. Kim, S., Millet, I., Kim, H.S., Kim, J.Y., Han, M.S., Lee, M.K., Kim, K.W., Sherwin, R.S., Karin, M., and Lee, M.S. (2007) NF-kB prevents beta cell beta cell death and autoimmune diabetes in NOD mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 1913–1918, doi: 10.1073/pnas.0610690104.

PROTECTIVE EFFECT OF PEROXIREDOXIN 6 ON PANCREATIC RIN-m5F β -CELLS AGAINST TOXIC EFFECTS OF GLUCOSE AND CYTOKINES

E. G. Novoselova*, O. V. Glushkova, S. B. Parfenyuk, M. O. Khrenov, S. M. Lunin, T. V. Novoselova, M. G. Sharapov, I. A. Shaev, and V. I. Novoselov

Institute of Cell Biophysics, Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: elenanov_06@mail.ru

Received January 14, 2019

Revised March 18, 2019

Accepted March 18, 2019

Taking into account the special role of pancreatic β -cells in development of diabetes mellitus, the effects of peroxiredoxin 6 (Prx6) on the viability and functional activity of rat insulinoma RIN-m5F β -cells were studied under conditions simulating diabetes. To this end, cells were cultured with elevated concentrations of glucose in the medium or in the presence of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1) that are known for their special role in cytotoxic autoimmune reactions in diabetes. It was found that increased glucose concentration in the range 23–43 mM caused the death of 20–60% of β -cells. Added Prx6 significantly reduced level of reactive oxygen species and protected β -cells from hyperglycemia, reducing RIN-m5F cell death by several times. Prx6 showed a significant stimulatory effect on the insulin-producing activity of pancreatic β -cells. Interestingly, the stimulatory activity of Prx6 was detected during cultivation of β -cells both in normal and adverse conditions that cause cell death. One of the mechanisms of Prx6 action on β -cells could be a regulation of NF-kB signaling cascade, in particular, through activation of RelA/p65 phosphorylation at Ser536.

Keywords: peroxiredoxin 6, hyperglycemia, cytokines, RIN-m5F beta-cells, insulin production, signal cascade NF-kB