

УДК 57.017.3: 621.373.826

## УЧАСТИЕ БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА Hsp70 и Hsp90α В ФОРМИРОВАНИИ СТРЕССОВОГО ОТВЕТА В УСЛОВИЯХ ДИАБЕТА 1 ТИПА

© 2020 г. Е. Г. Новосёлова<sup>1,\*</sup>, О. В. Глушкова<sup>1</sup>,  
М. О. Хренов<sup>1</sup>, С. Б. Парфенюк<sup>1</sup>, С. М. Лунин<sup>1</sup>, Т. В. Новоселова<sup>1</sup>,  
член-корреспондент РАН Е. Е. Фесенко<sup>1</sup>

Поступило 25.02.2020 г.  
После доработки 10.04.2020 г.  
Принято к публикации 10.04.2020 г.

Работа была направлена на исследование роли двух белков теплового шока, Hsp70 и Hsp90α, в формировании стрессового ответа у мышей с тяжелой формой сахарного диабета, индуцированного введением большой дозы аллоксана (500 мг/кг веса), а также в бета-клетках RIN-m5F, культивируемых в присутствии цитокинов (IL-1 и TNF-α). Результаты показали, что тяжелый диабет 1 типа вызывал повышение экспрессии белка Hsp90α, но не Hsp70. При этом введение фермента-антиоксиданта пероксиредоксина 6 (PRDX6) не влияло на экспрессию этих шаперонов. Напротив, провоспалительные цитокины, добавленные к бета-клеткам, вызывали значительное увеличение экспрессии Hsp90α и, особенно, Hsp70. При этом культивирование клеток в присутствии PRDX6 значительно повышало эффект цитокинов. Таким образом, при тяжелой форме аллоксан-индуцированного Д1Т не была выявлена защитная роль белков теплового шока, экспрессию которых не могло повысить даже введение PRDX6. Между тем, защитный потенциал белков теплового шока был показан в условиях *in vitro* с использованием бета-клеток RIN-m5F. Таким образом, при тяжелой форме Д1Т, сопровождающейся высокой смертностью животных, система белков теплового шока неспособна предотвратить разрушительные последствия Д1Т.

**Ключевые слова:** белки теплового шока, Hsp70, Hsp90α, диабет 1 типа, бета клетки RIN-m5F, пероксиредоксин 6

**DOI:** 10.31857/S2686738920040204

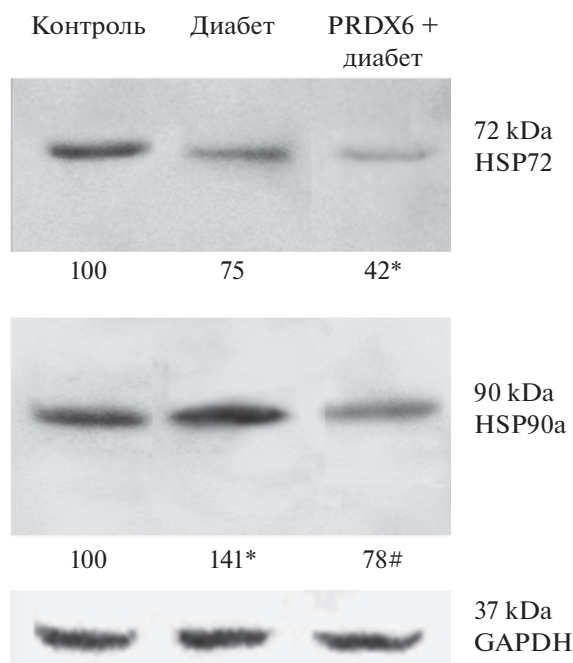
Инсулин-зависимый сахарный диабет 1 типа (Д1Т) является спонтанным аутоиммунным заболеванием, которое вызывает патологические изменения многих органов и тканей человека. К сожалению, в мире растет число диагностированных случаев этого неизлечимого заболевания, которое поражает в основном молодых людей, включая детей. Основной мишенью этой патологии являются инсулин-продуцирующие бета-клетки поджелудочной железы, которые атакуются аутореактивными клонами Т лимфоцитов. Не-

достаток инсулина ведет к гипергликемии и, несмотря на ежедневные пожизненные инъекции инсулина, понижающие уровень глюкозы в крови, это заболевание вызывает многие осложнения [1].

Известно, что гипергликемия вызывает усиленную продукцию активных форм кислорода (ROS), что изменяет состояние клеточного статуса при диабете и вызывает каскад патологических последствий [2]. Положение усугубляется тем, что гипергликемия также снижает уровень эндогенной антиоксидантной системы защиты при сахарном диабете, включающую ферменты-антиоксиданты и низкомолекулярные соединения, обладающие антиоксидантной активностью [3].

В сравнении с другими клетками, бета-клетки поджелудочной железы характеризуются низким содержанием основных ферментов-антиоксидантов, включая супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу, что определяет повышен-

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр Пуцинский научный центр биологических исследований Российской академии наук, Пущино, Московская область, Россия  
\*e-mail: elenapov\_06@mail.ru



**Рис. 1.** Экспрессия белков теплового шока в лимфоцитах селезенки мышей с тяжелой формой аллоксан-индуцированного диабета 1 типа.

Наличие белков в образцах определяли методом Вестерн-блот анализа с использованием следующих первичных антител: поликлональных антител кролика к HSP90α (Enzo Life Sciences, США); поликлональных антител кролика к HSP70/HSP72 (Enzo Life Sciences, США); поликлональных антител кролика к GAPDH (Cell Signalling, США). В качестве вторичных антител были использованы антитела козы к IgG кролика, конъюгированные с биотином (Имтек, Россия), а затем комплекс, содержащий стрептавидин и пероксидазу хрена (Sigma, США). Для выявления белков использовали систему ECL (“GE Healthcare”, Швеция). Детекция сигнала производилась с помощью хемилуминесцентного сканера C-DiGit (LI-COR Biosciences (США)), денситометрический анализ проводили с использованием Image Studio 4.0. В качестве контроля массы использовали маркеры молекулярного веса Spectra (Thermo FS, Швеция), для контроля специфичности – белки HSP90α и HSP70/HSP72 (Enzo Life Sciences, США). Показаны фотографии Вестерн-блот анализа для одного из трех независимых экспериментов (индивидуально от каждой из трех мышей в каждой группе), цифры под полосками – среднее значение количества белка после денситометрии блотов от трех экспериментов, показатели нормировали к соответствующему контролю нагрузки (GAPDH) и выражали в относительных единицах, статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. \* – Достоверное отличие от контроля; # – достоверное отличие от группы “диабет”.

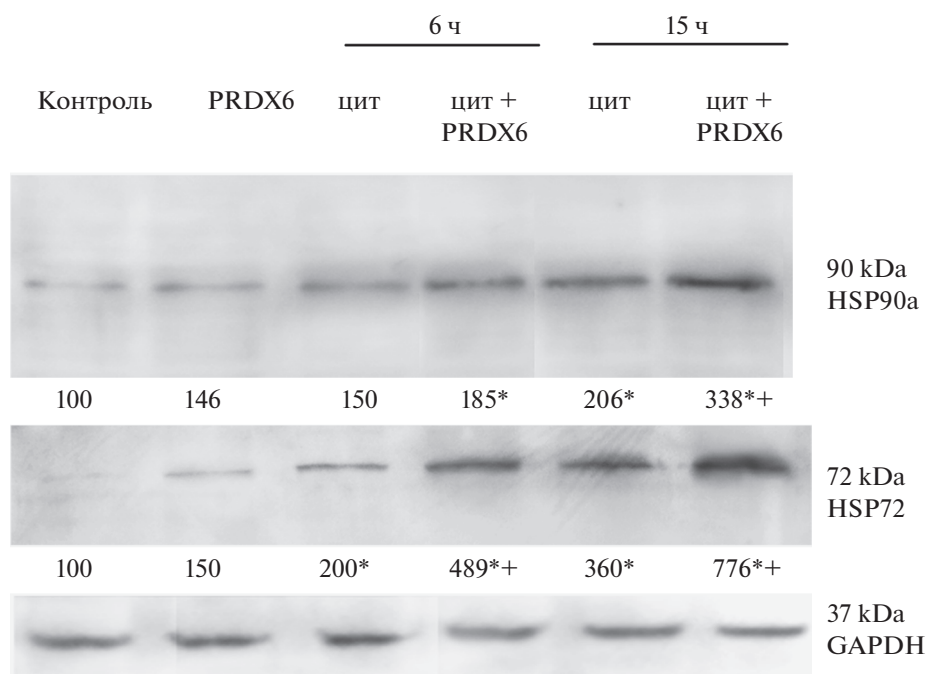
ную чувствительность панкреатических бета-клеток к окислительному стрессу [4, 5]. В ответ на повреждение бета-клетки инициируют “стрессовый” ответ, который, помимо других факторов, характеризуется быстрым увеличением опреде-

ленного набора белков, известных как белки теплового шока (Hsp’s). Основными функциями белков теплового шока являются защита от апоптотических стимулов и предотвращение неправильного сворачивания и агрегации белка в стрессовых ситуациях, что указывает на анти-стресспалительную функцию этих белков [6, 7]. Известно, что в условиях *in vitro* повышенная экспрессия Hsp70 может защищать бета-клетки поджелудочной железы от действия цитокина IL-1, а тепловой шок активирует защитные механизмы бета-клеток [8, 9].

В настоящей работе использовали две модели Д1Т. Во-первых, большую дозу аллоксана (500 мг/кг веса) вводили мышам-самцам линии Balb/C для индукции тяжелой формы развитого диабета, при этом фиксировали значительное повышение уровня глюкозы в крови уже на 5-й день после внутрибрюшинной инъекции аллоксана. Во-вторых, исследовали экспрессию белков теплового шока в условиях *in vitro* в культивируемых бета-клетках поджелудочной железы RIN-m5F. В качестве фермента-антиоксиданта использовали рекомбинантный белок пероксиредоксин 6 (PRDX6), который вводили мышам внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг за 15 мин до введения аллоксана, либо добавляли в среду культивирования клеток RIN-m5F в количестве 150 мкг/мл. Ранее мы доказали, что PRDX6 защищает бета-клетки RIN-m5F, культивируемые с высоким содержанием глюкозы, через механизм снижения уровня продукции ROS и уровня апоптоза [10]. Основной задачей настоящей работы было сравнительное исследование влияния PRDX6 на экспрессию индуцибельных форм двух белков теплового шока (Hsp70 и Hsp90α) в лимфоцитах селезенки мышей на 10-й день развития тяжелой формы диабета, характеризующейся высокой смертностью животных, что указывает на истощение защитного потенциала организма в этих условиях. С другой стороны, задачей работы было выяснение закономерностей экспрессии этих белков в условиях *in vitro* с использованием бета-клеток RIN-m5F.

Показали, что экспрессия индуцибельной формы белка Hsp70, Hsp72, при тяжелой форме диабета снизилась. Напротив, экспрессия белка теплового шока Hsp90α достоверно повышалась при развитии диабете первого типа (рис. 1).

Несмотря на доказанную защитную активность PRDX6 в условиях *in vitro* [10], применение этого фермента в условиях *in vivo* еще больше снизило экспрессию Hsp72 в лимфоидных клетках диабетных мышей. С другой стороны, тогда как экспрессия Hsp90α повышалась в лимфоцитах мышей с тяжелой формой диабета, применение PRDX6 приводило к уменьшению экспрессии этого белка ниже контрольного значения.



**Рис. 2.** Экспрессия белков теплового шока в клетках RIN-m5F, культивируемых в присутствии цитокинов (IL-1 и TNF- $\alpha$ ) и PRDX6. Показаны фотографии Вестерн-блот анализа для одного из 3-х независимых экспериментов с использованием в каждом случае клеток из разных пассажей, цифры под полосками — среднее значение количества белков после денситометрии блотов от трех экспериментов, остальные пояснения, как на рис. 1. \* — достоверное отличие от контроля; + — достоверное отличие от группы “цитокины”.

Для выяснения механизмов функционирования Hsp's в условиях диабета изучали экспрессию Hsp70 и Hsp90 $\alpha$  в бета-клетках инсулиномы крысы RIN-m5F, культивируемых в присутствии смеси цитокинов (15 ng/ml IL-1 и 30 ng/ml TNF- $\alpha$ ) в течение 6 или 15 ч. Показали, что в присутствии цитокинов, которые моделировали аутоиммунную атаку на бета-клетки поджелудочной железы (основной фактор индукции Д1Т), экспрессия Hsp70 и Hsp90 $\alpha$  повышалась, причем этот рост был заметнее при увеличении времени культивирования клеток RIN-m5F (рис. 2). При добавлении к клеткам PRDX6 этот эффект усиливался, особенно для Hsp70. Таким образом, можно полагать, что присутствие фермента-антиоксиданта стимулирует защитный ресурс бета-клеток, который реализуется, в том числе, через экспрессию Hsp's.

Результаты работы показали, что при тяжелой форме Д1Т, вызывающей 80% смертности животных в течение 1 мес., не индуцируется защитный ответ лимфоидных клеток, связанный с экспрессией Hsp70.

С другой стороны, экспрессия Hsp90 $\alpha$  повышается в этих условиях. Можно предположить, что такие изменения связаны с различной функцией этих белков для защитной системы клетки.

Действительно, белок Hsp70 в обычных условиях присутствует в клетке только в следовых концентрациях, а экспрессируется исключительно при стрессе. Напротив, Hsp90 $\alpha$  содержится в покое в достаточно больших концентрациях, при этом в стрессовых условиях он также активируется. Кроме того, известно, что субстратами для Hsp90 $\alpha$  являются сигнальные белки, некоторые из которых активно продуцируются при диабете, как было показано нами ранее [11]. Исследования роли отдельных Т-клеточных популяций для формирования аутоиммунного воспаления, свойственного для Д1Т, позволили выявить особую функцию T<sub>reg</sub> лимфоцитов, которые в кооперации с белками теплового шока регулируют противовоспалительную активность в условиях хронического воспаления [12, 13]. В нашей предыдущей работе сравнивали изменения иммунного статуса у мышей с аллоксан-индуцированным диабетом на двух стадиях его развития — при пре-диабете и развитом диабете. Доказали, что для пре-диабета характерно снижение активности Th2 и T<sub>reg</sub> популяций Т-клеток, но не Th1 лимфоцитов. Напротив, при развитом диабете наблюдали снижение активностей Th1 и T<sub>reg</sub>, но не Th2 лимфоцитов [14]. Кроме того, экспрессия Hsp70 резко увеличивалась в условиях пре-диабета, тогда как при развитом диабете син-

тез этого белка был значительно подавлен. Другие закономерности были показаны для белка теплового шока Hsp90 $\alpha$ . Экспрессия этого белка незначительно повышалась в условиях пре-диабета, но при развитии диабета наблюдали пик экспрессии Hsp90. С учетом этих сведений и на основании результатов настоящей работы можно сделать предположение о том, что вся сложная конфигурация вовлеченности белков теплового шока в реализацию аутоиммунных процессов при Д1Т находится в прямой зависимости от периода развития и степени тяжести этого хронического воспалительного процесса.

В заключение можно отметить, что при тяжелой форме сахарного диабета 1 типа, индуцированного аллоксаном, вызывающим окислительный стресс и гибель инсулин-продуцирующих бета-клеток, из двух исследованных белков теплового шока только Hsp90 $\alpha$  формирует стрессовый про-воспалительный ответ. С другой стороны, инсулин-продуцирующие бета-клетки RIN-m5F демонстрируют защитную роль Hsp70 и Hsp90 в условиях, моделирующих Д1Т, при этом PRDX6 усиливает защитный потенциал этих шаперонов.

#### ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана РФФИ, проекты № 18-04-00091 и 20-015-00216; и Программой Президиума РАН 1.18 “Молекулярная и клеточная биология и пост-геномные технологии”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Soedamah-Muthu S.S., Fuller J.H., Mulnier H.E., et al.* High risk of cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes in the U.K.: a cohort study using the general practice research database // *Diabetes Care*. 2006. V. 29. № 4. P. 798–804. <https://doi.org/10.2337/diacare.29.04.06>
2. *Tran B., Oliver S., Rosa J., et al.* Aspects of inflammation and oxidative stress in pediatric obesity and type 1 diabetes: an overview of ten years of studies // *Exp Diabetes Res*. 2012. 2012:683680. <https://doi.org/10.1155/2012/683680>
3. *Karunakaran U., Park K.G.*, A systematic review of oxidative stress and safety of antioxidants in diabetes: focus on islets and their defense // *Diabetes Metab J*. 2013. V. 37. № 2. P. 106–112. <https://doi.org/10.4093/dmj.2013.37.2.106>
4. *Miki A., Ricordi C., Sakuma Y., et al.* Divergent Antioxidant Capacity of Human Islet Cell Subsets: A Potential Cause of Beta-Cell Vulnerability in Diabetes and Islet Transplantation // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 5. e0196570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196570>
5. *Rojas J., Bermudez V., Palmar J., et al.* Pancreatic Beta Cell Death: Novel Potential Mechanisms in Diabetes Therapy // *J. Diabetes Res*. 2018. V. 19. 2018:9601801. <https://doi.org/10.1155/2018/9601801>
6. *Borges T.J., Wieten L., van Herwijnen M.J., et al.* The anti-inflammatory mechanisms of Hsp70 // *Front Immunol*. 2012. V. 3. P. 95. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00095>
7. *Ocaña G.J., Pérez L., Guindon L., et al.* Inflammatory stress of pancreatic beta cells drives release of extracellular heat-shock protein 90 $\alpha$  // *Immunology*, 2017. V. 151. № 2. P. 198–210. <https://doi.org/10.1111/imm.12723>
8. *Margulis B.A., Sandler S., Eizirik D.L., et al.* Liposomal delivery of purified heat shock protein hsp70 into rat pancreatic islets as protection against interleukin 1 beta-induced impaired beta-cell function // *Diabetes*. 1991. V. 40. № 11. P. 1418–1422.
9. *Bellmann K., Wenz A., Radons J., et al.* Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin toxicity in vitro // *Clin. Invest*. 1995. V. 95. № 6. P. 2840–2845.
10. *Новоселова Е.Г., Глушкова О.В., Парфенюк С.Б. и др.* Защитное влияние пероксиредоксина 6 на бета-клетки поджелудочной железы RIN-M5F при токсических воздействиях глюкозы и цитокинов // *Биохимия*. 2019. Т. 84. Вып. 6. С. 819–826. <https://doi.org/10.1134/S0006297919060063>
11. *Новоселова Е.Г., Хренов М.О., Парфенюк С.Б. и др.* Роль сигнальных каскадов NF- $\kappa$ B, IRF3 и SAPK/JNK в иммунных клетках животных при развитии сахарного диабета 1 типа // *ДАН*. 2014. Т. 457. № 3. С. 360–362. <https://doi.org/10.1134/S0012496614040073>
12. *Wieten L., Broere F., van der Zee R., et al.* Cell stress induced HSP are targets of regulatory T cells: a role for HSP inducing compounds as anti-inflammatory immuno-modulators // *FEBS Lett*. 2007. V. 581. № 19. P. 3716–3722. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.082>
13. *van Eden W., Wick G., Albani S., et al.* Stress, heat shock proteins, and autoimmunity: how immune responses to heat shock proteins are to be used for the control of chronic inflammatory diseases // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2007. V. 1113. P. 217–237. <https://doi.org/10.1196/annals.1391.020>
14. *Novoselova E.G., Glushkova O.V., Lunin S.M., et al.* Signaling, stress response and apoptosis in pre-diabetes and diabetes: restoring immune balance in mice with alloxan-induced type 1 diabetes mellitus // *Int. Immunopharmacol*. 2016. V. 31. P. 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.007>

## THE PARTICIPATION OF HEAT SHOCK PROTEINS Hsp70 and Hsp90 $\alpha$ IN THE STRESS RESPONSE IN TYPE 1 DIABETES

**E. G. Novoselova<sup>a,#</sup>, O. V. Glushkova<sup>a</sup>, M. O. Khrenov<sup>a</sup>, S. B. Parfenyuk<sup>a</sup>, S. M. Lunin<sup>a</sup>,  
T. V. Novoselova<sup>a</sup>, and Corresponding member of the RAS E. E. Fesenko<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> *Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>*e-mail: elenanov\_06@mail.ru*

The work was aimed to study the role of two heat shock proteins, Hsp70 and Hsp90 $\alpha$ , in the stress response in mice with severe diabetes mellitus induced by high alloxan dose (500 mg/kg weight), as well as in RIN-m5F beta cells cultured in the presence of cytokines (IL-1 and TNF- $\alpha$ ). The results showed that severe type 1 diabetes caused an increase in the expression of Hsp90 $\alpha$ , but not Hsp70. Moreover, the administration of the peroxiredoxin 6 antioxidant enzyme (PRDX6) did not affect the expression of these chaperones. In contrast, pro-inflammatory cytokines added to beta cells caused a significant increase in the expression of Hsp90 $\alpha$  and, especially, Hsp70. Moreover, cell cultivation in the presence of PRDX6 significantly increased the effect of cytokines. Thus, in the severe form of alloxane-induced T1D, no protective role of heat shock proteins, the expression of which could not be increased even by the introduction of PRDX6, was revealed. Meanwhile, the protective potential of heat shock proteins has been shown *in vitro* using RIN-m5F beta cells. Thus, under severe T1D, accompanied by high animal mortality, the system of heat shock proteins is unable to prevent the devastating effects of T1D.

**Keywords:** heat shock proteins, Hsp70, Hsp90 $\alpha$ , type 1 diabetes. RIN-m5F beta cells, peroxiredoxin 6