

ЗАЩИТНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МАКРОФАГОВ RAW 264.7

© 2023 С.Б. Парфенюк^{1*}, О.В. Глушкова¹, М.Г. Шарапов¹, М.О. Хренов¹,
С.М. Лунин¹, А.А. Кузкова¹, Э.К. Мубаракшина¹, Т.В. Новоселова¹,
Д.А. Черенков², Е.Г. Новоселова¹

¹ Институт биофизики клетки ФИЦ ПЦБНИ РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия; электронная почта: lana_kras2@rambler.ru

² ФГБОУ ВО Воронежский государственный университет инженерных технологий,
394036 Воронеж, Россия

Поступила в редакцию 05.06.2023

После доработки 14.07.2023

Принята к публикации 15.07.2023

Целью работы было изучение действия пероксиредоксина 6 (PRDX6), рекомбинантного белка-антиоксиданта, на уровень провоспалительных ответов, вызванных воздействием эндотоксина на макрофаги RAW 264.7. Добавление липополисахаридов (ЛПС) в среду культивирования клеток RAW 264.7 ожидаемо увеличивало продукцию фактора некроза опухоли-альфа (TNF- α), а добавление PRDX6 привело к достоверному снижению его продукции на 15–20%. Уровень продукции другого провоспалительного цитокина, IL-1 β , значительно повышенный эндотоксином, под воздействием PRDX6 полностью нормализовался. Кроме того, добавление PRDX6 снижало продукцию активных форм кислорода, индуцированную эндотоксином, а также препятствовало сверхэкспрессии гена *Nos2* в клетках RAW 264.7. Результаты показали, что PRDX6 оказывает подавляющее действие на экспрессию гена *Nfe2l2* и продукцию фактора транскрипции NRF-2 в течение первых 6 ч культивирования клеток. Добавление эндотоксина вызывает активацию сигнальных каскадов NF- κ B и SAPK/JNK, при этом в присутствии PRDX6 происходит снижение активности этих сигнальных каскадов. Известно, что провоспалительный ответ клеток, вызванный бактериальным ЛПС, приводит к активации апоптоза и элиминации повреждённых клеток. Нашими исследованиями это подтверждается, поскольку ЛПС приводит к активации гена *Trp53*, маркера апоптоза. Добавление PRDX6 в первые часы развития острого провоспалительного ответа приводит к подавлению экспрессии гена *Trp53*, что указывает на защитный эффект PRDX6, снижающий апоптоз в макрофагах RAW 264.7.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пероксиредоксин 6, воспаление, цитокины, экспрессия генов, сигнальные каскады.

DOI: 10.31857/S0320972523080092, **EDN:** IKLJLS

ВВЕДЕНИЕ

Воспаление является универсальной защитной реакцией на любое повреждение ткани, однако важное значение имеет уровень провоспалительного ответа. Известно, что его высокий уровень может вызывать множество критических состояний, включая сепсис, деструктивный панкреатит и другие. Воспалению отводится ключевая роль в патогенезе большинства лёгочных заболеваний, таких как пневмония, деструктивные заболевания лёг-

ких (абсцесс, гангрена), а также хронических неспецифических заболеваний лёгких (хроническая обструктивная болезнь лёгких (ХОБЛ), бронхиальная астма и другие) [1]. По этой причине в настоящее время необходимы исследования, направленные на изучение внутриклеточных механизмов развития различных заболеваний, в частности болезней лёгких.

Альвеолярные макрофаги — клетки, играющие центральную роль в воспалении и регулирующие сложные межклеточные взаимодействия. При активации альвеолярных

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ЛПС — липополисахарид; NF- κ B — ядерный фактор- κ B; PRDX6 — пероксиредоксин 6; TNF- α — фактор некроза опухоли-альфа.

* Адресат для корреспонденции.

макрофагов реализуются чрезвычайно важные события врождённого иммунитета, в частности, фагоцитоз, презентация антигена Т-лимфоцитам, секреция лизоцима и активных ферментов, активация системы комплемента [2]. Именно поэтому исследование молекулярно-клеточных механизмов активации альвеолярных макрофагов имеет большое значение для понимания механизмов развития воспаления лёгочной ткани.

Воспалительные реакции, вызванные липополисахаридами (ЛПС) грамотрицательных бактерий, характеризуются мощным иммунным ответом с участием Toll-подобных рецепторов (TLR). TLR относятся к семейству паттерн-распознающих рецепторов (PRRs) и осуществляют распознавание молекулярных структур патогенов экзогенных (PAMPs, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны) и ряда эндогенных лигандов (DAMPs, ассоциированные с повреждениями молекулярные паттерны – молекулы, которые высвобождаются в ответ на повреждение клеток), обеспечивая быструю реакцию клетки. Среди TLR первым был идентифицирован TLR4, который участвует в распознавании ЛПС. Сигнальный путь TLR4, опосредованный узнаванием внеклеточного эндотоксина, также включает белок миелоидной дифференцировки 2 (MD2) и CD14 [3]. Взаимодействие ЛПС с поверхностными рецепторами макрофагов активирует ядерный фактор-κВ (NF-κB), который участвует в провоспалительном ответе. Известно, что значимую роль в развитии воспаления играют активные формы кислорода (АФК). Несмотря на то что АФК являются важными регуляторными молекулами на всех этапах воспаления, их чрезмерная продукция при несвоевременной или недостаточной работе антиоксидантных систем приводит к переходу воспаления в хроническую стадию, которая, в свою очередь, лежит в основе различных заболеваний [4].

Пероксиредоксин 6 (PRDX6) – представитель 1Cys-пероксиредоксинов, содержащих единственный активный остаток цистеина (Cys47) – был обнаружен во всех клетках млекопитающих, однако его наибольшие количества выявлены в цитоплазме эпителиальных клеток: лёгких, дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта и ротовой полости, а также в клетках печени и поджелудочной железы [5]. Исследования рекомбинантных белков PRDX6 человека и крысы подтвердили наличие у них как пероксидазной, так и фосфолипазной активности [6]. PRDX6, по-видимому, играет двойную роль в воспалительных забо-

леваниях. С одной стороны, фосфолипазный активный центр (aiPLA2) необходим для активации провоспалительной NADPH-оксидазы. С другой стороны, пероксидазная активность PRDX6 имеет решающее значение для противодействия повышенному образованию АФК и для восстановления окисленных клеточных мембран после окислительного стресса [7]. В настоящее время рецептор PRDX6 достоверно не определён, однако в работе Sharapov et al. [8] показано, что трансмембранный транспорт PRDX6 осуществляется при участии рецептора TLR4. Гомеостаз окислительно-восстановительных реакций жизненно важен для регуляции воспалительных состояний, и нарушение его регуляции может влиять на патогенез воспалительных заболеваний дыхательных путей. Известно, что PRDX6 является важным внутриклеточным ферментом-антиоксидантом, способным к значительной экспрессии в дыхательных путях и лёгких здоровых людей [9]. В настоящее время имеется достаточное количество сведений, которые дают основания полагать, что пероксиредоксины в перспективе будут применяться в терапии заболеваний, патогенез которых связан с окислительным стрессом. К примеру, в ряде работ показана защитная роль пероксиредоксинов при различных патологиях: кожи [10, 11], лёгких [12], глаз [13], нервной системы [14], поджелудочной железы [15].

Исходя из актуальности проблемы, в настоящей работе с использованием линии макрофагоподобных клеток мыши RAW 264.7 были исследованы эффекты PRDX6 при стимулировании клеток ЛПС грамотрицательных бактерий. Концентрация ЛПС 1 мкг/мл используется в мировой практике как приводящая к острому лёгочному воспалению [16]. Добавление ЛПС к макрофагам RAW 264.7 моделирует условия воспаления дыхательных путей, вызванного бактериальной инфекцией, а также может рассматриваться в качестве модели активации макрофагальных клеток при различных неинфекционных поражениях дыхательной системы.

Целью работы было изучение эффектов PRDX6, рекомбинантного белка-антиоксиданта, на уровень провоспалительных ответов, вызванных воздействием эндотоксина на макрофаги RAW 264.7.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток RAW 264.7. Клетки RAW 264.7 растили в культуральных флаконах

в среде для культивирования, состоящей из смеси RPMI : DMEM («ПанЭко», Россия) в соотношении 1 : 1, с добавлением 10%-ной (v/v) эмбриональной телячьей сыворотки, 2,04 мМ L-глутамина («ПанЭко») и раствора антибиотика-антимикотика («Sigma», США) в концентрации, рекомендованной производителем, при 37 °C и 5% CO₂. Пересев (пассаж) клеток производили после достижения плотности монослоя ~80%. В экспериментах использовались клетки после 4–8 пассажей. Жизнеспособность клеток RAW 264.7 оценивалась визуально, с использованием инвертированного микроскопа LEICA DMIL HC («Leica», Германия) с применением окрашивания 0,01%-ным (m/v) раствором трипанового синего («Appli-Chem», Германия) в физиологическом растворе (0,9%-ный (m/v) NaCl) и подсчётом живых клеток в камере Горяева. Количество жизнеспособных макрофагальных клеток составляло 93–97%. Провоспалительный ответ индуцировали ЛПС, выделенным из стенок *Escherichia coli* O55:B5 («Sigma») в концентрации 1 мкг/мл, экзогенный PRDX6 добавляли в концентрации 150 мкг/мл одновременно с индукцией провоспалительных ответов. Ген, кодирующий PRDX6 дикого типа, был клонирован и экспрессирован в клетках *E. coli* BL21 (DE3). Белок был очищен с помощью металлоаффинной хроматографии (Ni-NTA-агароза) в соответствии с ранее описанной процедурой [17]. Для определения продукции цитокинов клетки снимали с поверхности культурального флакона с помощью скребков для клеток («Corning», США), избавляли от старой среды путём промывания, разводили в свежей среде и рассевали с плотностью 10⁶ клеток в 1 мл в 24-луночные планшеты. По истечении 24 ч в каждую лунку добавляли исследуемые вещества в заданной концентрации. Завершив 72-часовую инкубацию, клетки лизировали 3 раза замораживанием-оттаиванием, при этом лизаты использовали немедленно либо хранили при –20 °C. Для определения экспрессии генов и продукции сигнальных и стрессовых белков клетки рассевали в культуральные флаконы площадью 25 см² с плотностью 100 × 10⁶ клеток на флакон. После прикрепления клеток в течение 24 ч добавляли исследуемые вещества по приведённой выше схеме и инкубировали 6 ч. Далее клетки снимали с поверхности флакона, отмывали от старой среды и разводили в 1 мл физиологического раствора для дальнейшего выделения РНК или белков. В пределах каждого независимого эксперимента характеристики образцов измеряли параллельно в 6–9 повторах, получая среднее

значение. Усреднённые значения по четырём экспериментам использовали для определения достоверности различий между группами ($n = 4$). В качестве контролей использовали клетки, не подвергавшиеся обработке.

Определение уровня продукции АФК в клетках. Уровень генерации АФК в клетках измеряли с помощью диацетилового производного 5,6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (карбокси-Н₂DCFDA, «Invitrogen», США). Карбокси-Н₂DCFDA – химически восстановленный аналог флуоресцеина, который используют в качестве общего индикатора окислительного стресса в клетках. Клетки RAW 264.7 предварительно культивировали в течение 24 ч в 96-луночной планшете (2,5 × 10⁴ клеток на лунку) в 100 мкл среды DMEM, промывали PBS и обрабатывали свежеприготовленным раствором карбокси-Н₂DCFDA («Invitrogen») в стерильном ДМСО в конечной концентрации 2,5 мкМ в среде с 2%-ной (v/v) эмбриональной телячьей сывороткой. Далее клетки инкубировали с карбокси-Н₂DCFDA в темноте в течение 1 ч. Одновременно с добавлением карбокси-Н₂DCFDA добавляли ЛПС (1 мкг/мл) и PRDX6 (150 мкг/мл).

В качестве контроля использовали сигнал флуоресценции от необработанных клеток RAW 264.7. Фоновый сигнал культуральной среды вычитали из соответствующих сигналов экспериментальных образцов. Флуоресценцию измеряли с помощью флуоресцентного планшетного ридера Infinite 200 («Tecan», Австрия) при возбуждении длиной волны 480 нм и с длиной волны поглощения 530 нм (аппроксимальное возбуждение флуоресценции (Ex)/испускание (Em) = Ex/Em = 485/535 нм), как описано ранее [18]. Проводили три независимых эксперимента, в каждом из которых было по 3 повтора на каждую экспериментальную группу ($n = 9$ в каждой группе).

Определение продукции цитокинов. Применяли наборы для ИФА для определения мышиного TNF-α, IL-10 и IL-1β («PeproTech», США). Для визуализации связывания использовали зелёный краситель ABTS («Sigma») – 100 мкл, растворённые в 0,05 М цитратном буфере (pH 5,0) с добавлением 0,01%-ного пероксида водорода – и измеряли оптическую плотность при 405 нм с помощью спектрофотометра для микропланшетов (Multiskan EX, «Thermo Electron Corporation», США).

Ds-Na-ПААГ-электрофорез и иммуноблоттинг. Для приготовления белковых образцов из клеток RAW 264.7 клеточную суспензию, предварительно отмывую от культуральной среды 0,9%-ного (m/v) NaCl, подвергали трёх-

кратному замораживанию-оттаиванию. Перед циклами замораживания-оттаивания к суспензии добавляли ингибиторы протеаз и фосфатаз (100×) по рекомендациям производителя («Thermo Fisher Scientific», США). Далее добавляли солюбилизирующий буфер для электрофореза и β-меркаптоэтанол (2–5%), кипятили 5 мин. Концентрацию белка измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop2000 («NanoDrop», США), образцы наносились по 10 мкл в каждую лунку с 10%-ным (*m/v*) Ds-Na-ПААГ [19]. Наличие белков в образцах определяли методом Вестерн-блот анализа с использованием наборов следующих антител: кроличьи антитела к общему NF-κB (total-NF-κB) и фосфорилированному по Ser536 (ph-NF-κB (Ser536)), p53, phSAPK/JNK, NRF-2, TLR4, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH) («Cell Signaling», США). Для выявления белков использовали систему ECL («GE Healthcare», Швеция). Фотографии полос регистрировали 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.

Оценка изменений экспрессии генов. Экспрессию генов анализировали в клетках RAW 264.7 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. После воздействия исследуемых веществ, а именно экзогенного PRDX6 (150 мкг/мл), ЛПС (1 мкг/мл) или их совместного добавления в среду культивирования клеток через 6 ч инкубации были исследованы гены, кодирующие ряд ферментов антиоксидантного ответа (*Sod3*, *Prdx1*, *Nos2*), апоптоз (*Trp53*), факторы транскрипции (*Nfe2l2*, *Nfxb1*, *Ap1m1*), рецептор (*Tlr4*), цитокин (*Tnfsf18*).

Процедура выделения тотальной РНК, синтеза кДНК и организация ПЦР в режиме реального времени подробно описана нами ранее [20].

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6.0 («StatSoft», США). Для определения достоверности различий применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным критерием Тьюки. Значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для проверки нормальности распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Значение W во всех случаях было незначимым ($p > 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее время известно, что PRDX6 вносит существенный вклад в защиту органов дыхания от воспаления, вызванного ЛПС. Новоселов в 2012 г. [21] показал увеличение секреции PRDX6 в эпителии трахеи и бронхов сразу после аппликации ЛПС и сохранение высокого уровня секреции на протяжении всего периода воспаления. Между тем внутриклеточные механизмы влияния экзогенного PRDX6 на процесс ЛПС-индуцированной активации альвеолярных макрофагов до сих пор остаются малоизученными.

Влияние PRDX6 на продукцию цитокинов клетками RAW 264.7 при воздействии эндотоксина. Известно, что в очаге воспаления происходит увеличение пролиферации макрофагов. Это является защитной функцией организма, направленной на борьбу с воспалительными агентами разной природы, в частности бактериальной. С другой стороны, чрезмерное увеличение количества альвеолярных макрофагов в тканях лёгких, вырабатывающих факторы, участвующие в формировании фиброзной ткани, такие как фибронектин, IL-1 и другие, приводит к необратимым повреждениям органа. Необходимо отметить, что стойкое увеличение количества альвеолярных макрофагов лежит в основе формирования хронических воспалительных заболеваний дыхательных путей за счёт увеличения количества рецепторов IgE, продукции хемоаттрактантов, привлекающих нейтрофилы и лимфоциты, в свою очередь стимулирующие макрофаги [22].

Важным маркером развития провоспалительного ответа является продукция ряда про- и противовоспалительных цитокинов. В работе были измерены уровни продукции провоспалительных цитокинов, таких как TNF-α и IL-1β, а также продукция противовоспалительного цитокина IL-10 (рис. 1). Параллельно исследовали уровень экспрессии гена *Tnfsf18* на первичном этапе провоспалительного ответа (таблица).

Добавление ЛПС в среду культивирования клеток RAW 264.7 ожидаемо увеличило продукцию TNF-α до 450% от контрольных значений, а добавление PRDX6 привело к незначительному, но достоверному снижению его продукции на 15–20%. Путём исследования уровня экспрессии гена *Tnfsf18* было показано, что экзогенный PRDX6 в первые 6 ч способен удерживать уровень экспрессии данного гена на уровне контроля.

Уровень продукции другого провоспалительного цитокина, IL-1β, значительно активи-

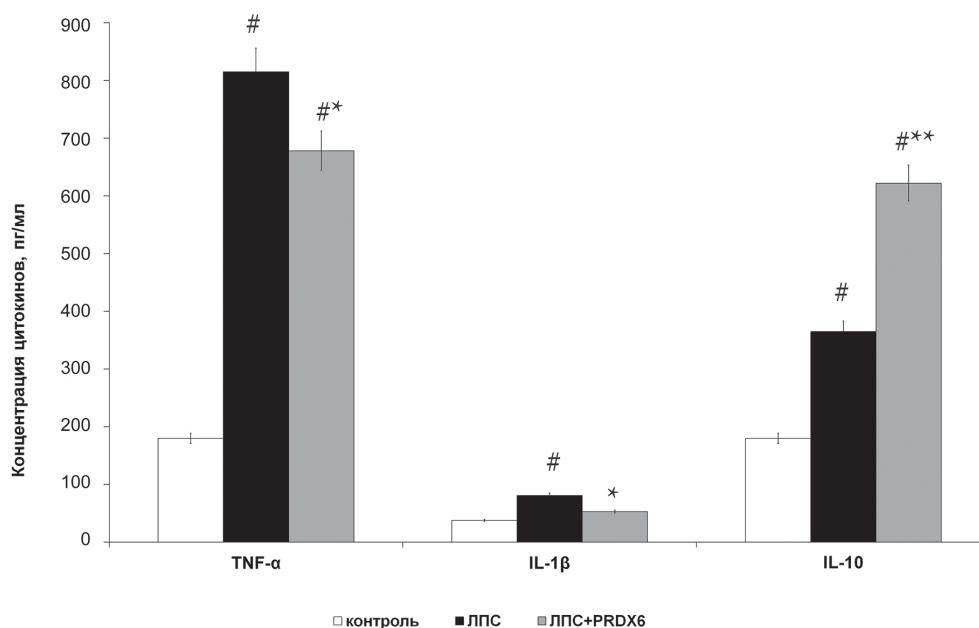


Рис. 1. Влияние экзогенного PRDX6 на продукцию цитокинов в макрофагах RAW 264.7. Средние значения ($\pm$ стандартная ошибка) изменения уровней продукции цитокинов представлены по отношению к уровням в клетках RAW 264.7 в нормальных условиях. # $p < 0,05$, изменения статистически значимы для групп «ЛПС + PRDX6» и «ЛПС» относительно группы «контроль»; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$, изменения статистически значимы для группы «ЛПС + PRDX6» относительно группы «ЛПС»

вирусовый эндотоксином, под воздействием PRDX6 практически возвращается к контрольному значению.

Антивоспалительные цитокины на ранних этапах развития провоспалительного ответа ограничивают повреждение здоровой ткани и обеспечивают баланс между физиологической реакцией и патологическим воспалением. Ключевым антивоспалительным цитокином является IL-10, который противодействует эффекту основных провоспалительных цитокинов. Положительным эффектом в борьбе с воспалением можно считать тот факт, что добавление PRDX6 двукратно увеличивает продукцию IL-10.

Полученные нами данные по увеличению продукции TNF- α , IL-1 β и IL-10 подтверждают тот факт, что в условиях воспаления, вызванного воздействием ЛПС, активация макрофагов проходит по так называемому классическому пути с приобретением фенотипа M1 (провоспалительный). Результаты показали, что экзогенный рекомбинантный PRDX6 является перспективным антивоспалительным агентом, способным частично снижать уровень патологических реакций, связанных с чрезмерным уровнем продукции провоспалительных цитокинов.

Влияние PRDX6 на генерацию АФК в клетках RAW 264.7, стимулированных ЛПС. В условиях воспаления показан высокий уровень АФК, который увеличивается с течением

времени (от 0 до 8 ч). При этом добавление PRDX6 полностью блокирует его увеличение, удерживая концентрацию АФК на уровне таковой для клеток, не подвергающихся никакому воздействию (рис. 2). Таким образом, было установлено, что PRDX6 стабилизирует антиоксидантный статус клетки, нарушенный в условиях провоспалительного ответа макрофагов RAW 264.7, индуцированного ЛПС.

При изучении экспрессии гена *Nos2* было показано, что в условиях воспаления в первые 6 ч PRDX6 препятствует его сверхэкспрессии (таблица).

Влияние экзогенного PRDX6 на экспрессию генов системы антиоксидантной защиты (*Sod3*, *Prdx1*). При взаимодействии клеток RAW 264.7 с бактериальным ЛПС происходит активация ферментных систем антиоксидантной защиты. Наблюдается повышение экспрессии генов таких ферментов, как внеклеточная супероксиддисмутаза 3. Этот фермент является участником системы быстрой защиты, и поэтому его максимальная активность проявляется в первые часы развития провоспалительного ответа при резком повышении АФК [23]. Экзогенный PRDX6 препятствует активации экспрессии гена супероксиддисмутазы 3. Вероятно, что PRDX6, добавленный в среду культивирования активированных ЛПС макрофагов, является достаточным для антиоксидантной защиты клетки, защищая её от повреждения и апоптоза, вызванных гиперпродукцией АФК.

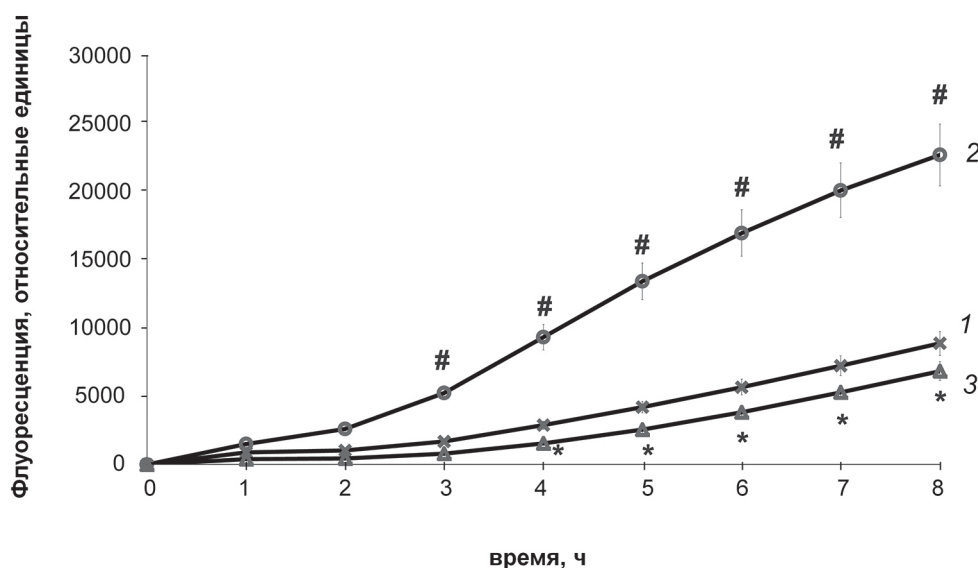


Рис. 2. Влияние PRDX6 на продукцию АФК клетками RAW 264.7. Средние значения ($\pm$ стандартная ошибка) изменения уровня флуоресценции карбокси- H_2DCFDA в клетках RAW 264.7. 1 — Нормальные клетки, группа «контроль»; 2 — клетки, стимулированные ЛПС, группа «ЛПС»; 3 — клетки, культивированные в среде с одновременным добавлением ЛПС и PRDX6, группа «ЛПС + PRDX6». # $p < 0,05$, изменения статистически значимы для группы «ЛПС» относительно группы «контроль»; * $p < 0,05$, изменения статистически значимы для группы «ЛПС + PRDX6» относительно группы «ЛПС»

Это подтверждается и количеством АФК в клетках при добавлении PRDX6, которое не повышается в присутствии ЛПС.

Исследовав экспрессию гена *Prdx1*, мы пришли к выводу, что ЛПС вызывает активацию его экспрессии. Добавление экзогенного PRDX6 снижает активацию экспрессии гена *Prdx1* в первые 6 ч инкубации. Логично пред-

положить, что добавленный в начале культивирования экзогенный PRDX6 используется клетками для защиты от АФК, в свою очередь не позволяя PRDX1 проявить свои провоспалительные свойства (таблица).

Влияние PRDX6 на внутриклеточную сигнализацию в макрофагах RAW 264.7 при воздействии эндотоксина. Интересные данные были

Изменение уровня экспрессии (в отн. ед.) некоторых маркерных генов в нормальных и стимулированных эндотоксином клетках RAW 264.7 через 6 ч инкубации с PRDX6

Гены	Контроль	ЛПС	ЛПС + PRDX6
<i>Tnfsf18</i>	$1 \pm 0,087$	$4,95 \pm 0,361^{\#}$	$1,2 \pm 0,088^{**}$
<i>Nos2</i>	$1 \pm 0,059$	$8 \pm 0,688^{\#}$	$3,6 \pm 0,259^{***}$
<i>Nfxb1</i>	$1 \pm 0,051$	$3,7 \pm 0,316^{\#}$	$0,8 \pm 0,054^{**}$
<i>Tlr4</i>	$1 \pm 0,095$	$2,4 \pm 0,195^{\#}$	$0,25 \pm 0,011^{***}$
<i>Nfe2l2</i>	$1 \pm 0,072$	$1,2 \pm 0,086$	$0,4 \pm 0,024^{**}$
<i>Ap1m1</i>	$1 \pm 0,058$	$6,5 \pm 0,498^{\#}$	$0,25 \pm 0,021^{***}$
<i>Trp53</i>	$1 \pm 0,089$	$8,5 \pm 0,615^{\#}$	$0,2 \pm 0,017^{***}$
<i>Sod3</i>	$1 \pm 0,062$	$5,2 \pm 0,337^{\#}$	$0,3 \pm 0,024^{***}$
<i>Prdx1</i>	$1 \pm 0,077$	$2,48 \pm 0,156^{\#}$	$1,2 \pm 0,121^{*}$

Примечание. Средние значения ($\pm$ стандартная ошибка) изменения уровней экспрессии генов представлены по отношению к уровням в клетках RAW 264.7 в нормальных условиях. $^{\#} p < 0,05$, изменения статистически значимы для группы «ЛПС + PRDX6» и «ЛПС» относительно группы «контроль»; $^{**} p < 0,01$, $^{*} p < 0,05$, изменения статистически значимы для группы «ЛПС + PRDX6» относительно группы «ЛПС».

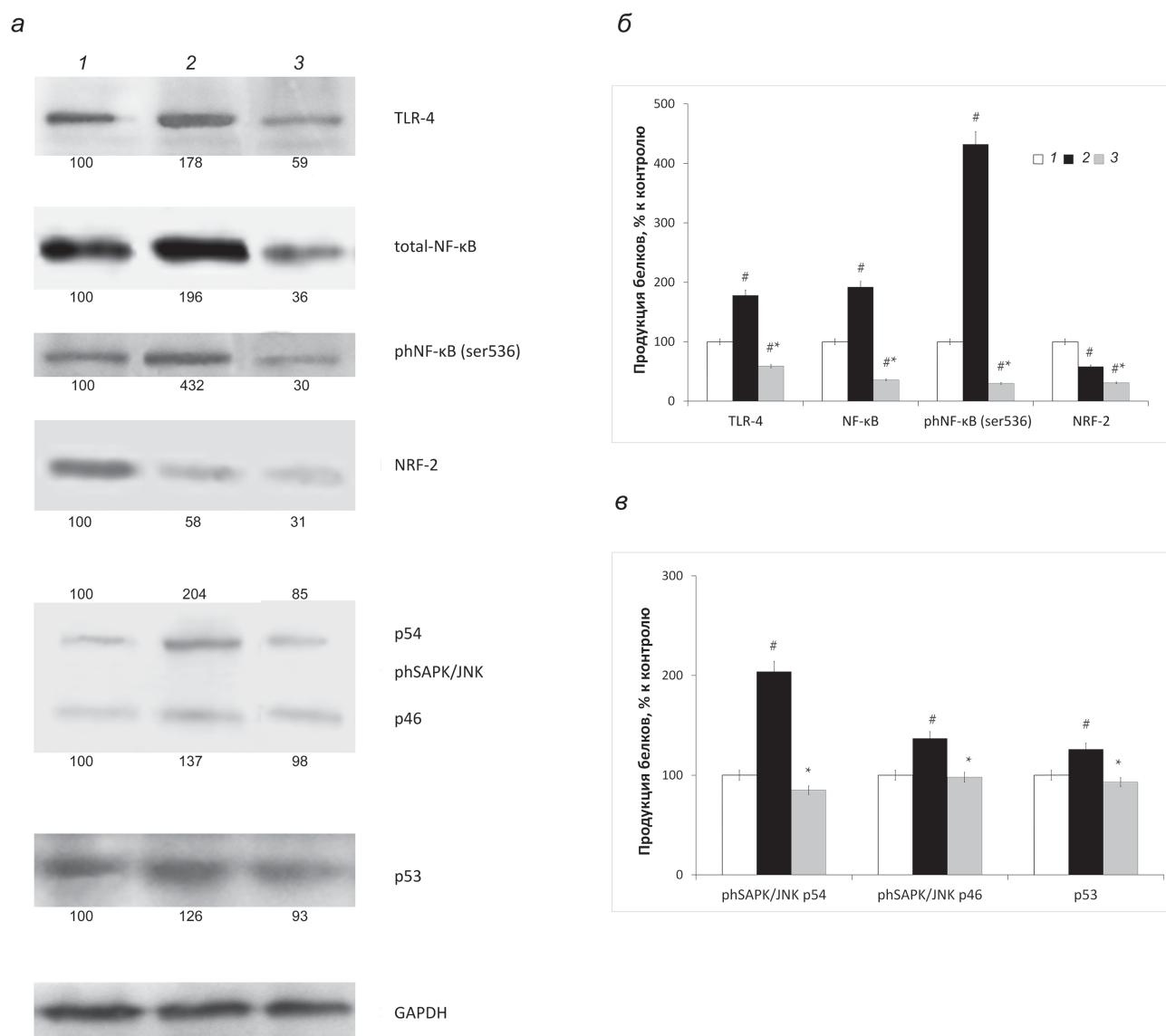


Рис. 3. Влияние PRDX6 на продукцию TLR4, NF-κB, phNF-κB (Ser536), NRF-2, phSAPK/JNK, p53 и референсного белка GAPDH. Числовые значения внизу — данные денситометрического анализа, средние значения ($\pm$ стандартная ошибка) изменения уровней продукции цитокинов представлены по отношению к уровням в клетках RAW 264.7 в нормальных условиях. **а** — Репрезентативные фотографии результатов Вестерн-блот анализа с использованием специфических антител к данным белкам; **б, в** — графическое представление результатов денситометрического измерения количества белка (в % от контроля). Условные обозначения: 1 — нормальные клетки, группа «контроль»; 2 — клетки, стимулированные ЛПС, группа «ЛПС»; 3 — клетки, культивированные в среде с одновременным добавлением ЛПС и PRDX6, группа «ЛПС + PRDX6». Каждое значение — среднее от трёх независимых экспериментов, на рисунке представлены результаты одного из трёх экспериментов. # $p < 0,05$, изменения статистически значимы для группы «ЛПС + PRDX6» и «ЛПС» относительно группы «контроль»; * $p < 0,05$, изменения статистически значимы для группы «ЛПС + PRDX6» относительно группы «ЛПС»

получены при изучении экспрессии гена *Tlr4* рецептора TLR4 (таблица) и непосредственно продукции самого рецептора (рис. 3). Так, было показано, что ЛПС стимулирует экспрессию *Tlr4* (широко известный факт), а экзогенный PRDX6 полностью снимает эту стимуляцию. С использованием Вестерн-блот анализа мы продемонстрировали аналогичные результаты. Так, через 6 ч инкубации с PRDX6 клетки, стимулированные ЛПС, показали резкое снижение продукции TLR4 до 30% от уровня,

характерного для провоспалительного ответа (рис. 3).

ЛПС-Активация рецептора TLR4 приводит к последующей активации сигнального каскада NF-κB. Было установлено значительное увеличение экспрессии гена *Nfkb1* в ответ на присутствие ЛПС. Интересно, что в первые 6 ч добавление PRDX6 удерживает уровень экспрессии гена *Nfkb1* в клетках активированных ЛПС на контрольном уровне (таблица). Результаты Вестерн-блот анализа показали,

что через 6 ч после добавления ЛПС присутствие PRDX6 снижает продукцию как общего, так и фосфорилированного по Ser536 NF- κ B до контрольных значений. Известно, что фосфорилирование NF- κ B по Ser536 активирует клеточный апоптоз, таким образом, PRDX6 проявляет себя как антиапоптозный агент. Эти результаты свидетельствуют о том, что PRDX6 обладает ингибирующим влиянием на сигнальный каскад NF- κ B. Его действие заметно по экспрессии соответствующего гена и продукции как общего, так и фосфорилированного по Ser536 белка (рис. 3).

NRF-2 участвует в сложной регуляторной сети и выполняет плеiotропную роль в регуляции метаболизма, воспаления, аутофагии, протеостаза, митохондриальных, физиологических и иммунных ответов [24]. Интересно, что продукция NRF-2 при действии ЛПС почти в 2 раза ниже, чем в контрольных клетках. Это согласуется с тем, что NRF-2 и NF- κ B действуют друг на друга по принципу отрицательной обратной связи. И так как в «классических» условиях воспаления активен каскад NF- κ B, то количество NRF-2 в этих условиях уменьшается, при этом наблюдается повышение уровня АФК в клетках, культивированных с ЛПС. Результаты исследования показали, что PRDX6 проявляет подавляющее действие на экспрессию гена *Nfe2l2* и продукцию фактора транскрипции NRF-2 в течение первых 6 ч инкубации. В присутствии PRDX6 не было выявлено описанных для ЛПС регуляторных механизмов между NRF-2 и NF- κ B, что может говорить о том, что фермент-антиоксидант так влияет на эти сигнальные каскады, что они теряют свою способность к регулированию по принципу отрицательной обратной связи (рис. 3).

В условиях индукции провоспалительного ответа активен и сигнальный каскад SAPK/JNK. Показано, что при этом продукция phSAPK/JNK гораздо выше контрольного уровня. Обе изоформы p54 и p46 активны через 6 ч инкубации клеток с ЛПС (рис. 3). Добавление PRDX6 полностью снимает активацию данного каскада и приводит продукцию phSAPK/JNK к норме. Сигнальный каскад SAPK/JNK заканчивается активацией гена *Ap1m1*. Нами было показано, что PRDX6, добавленный к активированным ЛПС клеткам, практически полностью ингибирует экспрессию этого транскрипционного фактора (таблица).

Известно, что провоспалительный ответ клеток, вызванный бактериальным ЛПС, приводит к активации апоптоза и элиминации повреждённых клеток. Нашими исследованиями

это подтверждается, поскольку ЛПС приводит к активации гена *Trp53*, маркера апоптоза. Добавление PRDX6 в первые часы развития острого провоспалительного ответа приводит к подавлению экспрессии гена *Trp53* (таблица). Аналогичные эффекты нами показаны с помощью Вестерн-блот анализа. Так, продукция белка p53 в присутствии PRDX6 остаётся на уровне контроля в макрофагах RAW 264.7, стимулированных эндотоксином (рис. 3). Можно предположить, что эффект PRDX6 заключается в том, чтобы не дать в первые часы развиться массовому апоптозу макрофагов, необходимых для местной защиты ткани лёгких, но при «взятии под контроль» воспалительного процесса данный фермент способствует элиминации повреждённых макрофагов, которые уже не могут быть «реанимированы».

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование ряда патологий, сопряжённых с окислительным стрессом, показало, что защитные свойства PRDX6 связаны как с его пероксидазной активностью, так и с его способностью выступать в роли сигнально-регуляторной молекулы [20]. Ранее было показано, что PRDX6 ингибирует воспалительные заболевания путём подавления повреждения, вызванного свободными радикалами и митохондриальной генерацией H_2O_2 , а также препятствует воспалительным заболеваниям посредством активации NF- κ B/AP-1 в сочетании с путём JNK [25]. В своей работе, в отличие от предыдущих исследований, мы изучали влияние экзогенного PRDX6, тогда как большинство ранее опубликованных работ было направлено на исследование влияния экспрессии собственного PRDX6. Гиперпродукция провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α , IL-1 β и IL-6, является ключевым фактором в развитии патогенеза многих лёгочных патологий, таких как бронхиальная астма, ХОБЛ, респираторный дистресс-синдром взрослых, идиопатический фиброз лёгких [26]. Поэтому полученные нами данные о том, что добавление PRDX6 снижает продукцию TNF- α и IL-1 β , а также увеличивает продукцию противовоспалительного цитокина IL-10 в макрофагальных клетках, стимулированных ЛПС, являются актуальными для дальнейшего исследования противовоспалительных свойств PRDX6. В работе Zhao et al. [27] были исследованы эффекты всех 6 типов перокси-редоксинов и показано, что PRDX1, PRDX2 и PRDX4 обладают выраженным провоспалительным действием на макрофаги RAW 264.7,

тогда как PRDX6 влияет на них незначительно. Работа была проведена с использованием нативных клеток, тогда как в своей работе мы исследовали влияние PRDX6 на макрофаги, активированные бактериальным эндотоксином. Исходя из полученных нами результатов, можно сделать вывод о том, что PRDX6 снижает провоспалительные эффекты эндотоксина на макрофагоподобных клетках RAW 264.7.

Сигнальные пути NF- κ B и MAPK регулируют воспаление и иммунные ответы, контролируя экспрессию генов провоспалительных факторов, таких как TNF- α и IL-6. Yuan et al. в 2019 г. показали, что ядерная транслокация фосфорилированного p65, ингибирование киназы I κ B (IKK) в сигнальном пути NF- κ B и фосфорилирование ERK, JNK и p38 MAPK (т.е. активация сигнального пути MAPK) может контролировать выработку IgE и IL-4 и ингибировать медиаторы воспаления, характерные для бронхиальной астмы [28]. Ранее нами было показано, что PRDX6 активирует каскад NF- κ B в фибробластах 3T3 и стабилизирует до контрольного уровня активность данного сигнального каскада при его гиперактивации в условиях воздействия ионизирующего излучения [29]. В настоящей работе мы подтвердили способность PRDX6 выступать в роли регуляторной молекулы, показав его способность снижать гиперактивацию транскрипционного фактора NF- κ B при развитии провоспалительного ответа, вызванного ЛПС.

Zhang et al. [30] показали, что нокдаун TLR4 приводит к блокировке выработки АФК, ингибированию экспрессии p53 и каспазы-3. В своей статье авторы предполагают, что TLR4 является перспективной мишенью для профилактики и лечения заболеваний, связанных с апоптозом, в частности атеросклероза. Наши результаты, полученные при исследовании экспрессии и продукции TLR4, показали, что экзогенное влияние PRDX6 на активированные ЛПС макрофаги приводит к блокировке данного рецептора и всех нижележащих сигнальных путей, что в конечном итоге приводит к ингибированию апоптоза, вероятно, через ингибирование экспрессии p53.

Оксид азота, синтезируемый из L-аргинина с помощью NO-синтаз, представляет собой небольшую липофильную диффундирующую высокореактивную молекулу с дихотомической регуляторной ролью во многих биологических событиях в физиологических и патологических условиях [31]. NO может способствовать апоптозу в одних клетках и ингибировать апоптоз в других.

Местная клеточная среда играет решающую роль в характере этих видов регуляции [32]. Высокая продукция NO действует как проапоптотический модулятор, активируя протеазы семейства каспаз через высвобождение митохондриального цитохрома c в цитозоль, повышенную регуляцию белка p53, активацию сигнального пути SAPK/JNK, изменяя экспрессию апоптоз-ассоциированных белков семейства Bcl-2. Тем не менее, низкие или физиологические концентрации NO препятствуют апоптозу клеток, вызванному Fas и цитокинами. Антиапоптотический механизм связан с транскрипцией генов защитных белков (Bcl-2, циклооксигеназа-2) и прямым ингибированием эффекторных каспаз путём S-нитрозилирования тиоловой группы цистеина в их каталитическом сайте. Dubey et al. [33] доказали решающую роль индуцибельной NO-синтазы (iNOS) в апоптозе нейтрофилов посредством усиленного генерирования АФК и опосредованной каспазой-8 активации пути гибели митохондрий. В своей работе мы показали, что экзогенный PRDX6 препятствует гиперэкспрессии гена *Nos2* и повышению концентрации АФК в макрофагах, что, в конечном счёте, оказывает влияние на апоптоз. Подавление экспрессии гена *Trp53* экзогенным PRDX6 подтверждает его антиапоптотический эффект на клетки RAW 264.7, активированные эндотоксином.

Таким образом, настоящая работа дополняет наши более ранние исследования и выдвинутое предположение о том, что экзогенный PRDX6 выступает в роли регуляторной молекулы. В частности, PRDX6 является противовоспалительным агентом, способным защитить активированные ЛПС макрофаги RAW 264.7 от чрезмерного провоспалительного ответа и не допустить развития патологических состояний, вызванных хроническим воспалением лёгких.

Вклад авторов. С.Б. Парфенюк, Е.Г. Новоселова — концепция и руководство работой; С.Б. Парфенюк, О.В. Глушкова, М.Г. Шарапов, М.О. Хренов, Э.К. Мубаракшина, Т.В. Новоселова, А.А. Кузекова — проведение экспериментов; С.Б. Парфенюк, Е.Г. Новоселова, С.М. Лунин, О.В. Глушкова — обсуждение результатов исследования; С.Б. Парфенюк, Е.Г. Новоселова — написание текста; С.М. Лунин, Д.А. Черенков, О.В. Глушкова, М.Г. Шарапов — редактирование текста статьи.

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 23-24-00041.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Barnes, P. J. (2017) Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD, *Clin. Sci. (Lond)*, **13**, 1541-1558, doi: 10.1042/CS20160487.
- Joshi, N., Walter, J. M., and Misharin, A. V. (2018) Alveolar macrophages, *Cell Immunol.*, **330**, 86-90, doi: 10.1016/j.cellimm.2018.01.005.
- Lu, X. J., Ning, Y. J., Liu, H., Nie, L., and Chen, J. (2018) A novel lipopolysaccharide recognition mechanism mediated by internalization in teleost macrophages, *Front. Immunol.*, **9**, 2758, doi: 10.3389/fimmu.2018.02758.
- Челомбитько М. А. (2018) Роль активных форм кислорода в воспалении, *Вестн. Моск. Унив.*, **73**, 242-246.
- Sharapov, M. G., Ravin, V. K., and Novoselov, V. I. (2014) Peroxyredoxins as multifunctional enzymes, *Mol. Biol. (Mosk)*, **48**, 600-628, doi: 10.1134/S0026893314040128.
- Hanschmann, E. M., Godoy, J. R., Berndt, C., Hudemann, C., and Lillig, C. H. (2013) Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins – molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling, *Antioxid. Redox Signal.*, **19**, 1539-1605, doi: 10.1089/ars.2012.4599.
- Arevalo, J. A., and Vázquez-Medina, J. P. (2018) The role of peroxiredoxin 6 in cell signaling, *Antioxidants (Basel)*, **7**, 172, doi: 10.3390/antiox7120172.
- Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Parfenyuk, S. B., Glushkova, O. V., and Novoselov, V. I. (2022) The role of phospholipase activity of peroxiredoxin 6 in its transmembrane transport and protective properties, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 152-165, doi: 10.3390/ijms232315265.
- Chuchalin, A. G., Novoselov, V. I., Shifrina, O. N., Soodaeva, S. K., Yanin, V. A., et al. (2003) Peroxiredoxin VI in human respiratory system, *Respir. Med.*, **97**, 147-151, doi: 10.1053/rmed.2003.1429.
- Kümin, A., Huber, C., Rüllicke, T., Wolf, E., and Werner, S. (2006) Peroxiredoxin 6 is a potent cytoprotective enzyme in the epidermis, *Am. J. Pathol.*, **169**, 1194-1205, doi: 10.2353/ajpath.2006.060119.
- Kümin, A., Schäfer, M., Epp, N., Bugnon, P., Born-Berclaz, C., et al. (2007) Peroxiredoxin 6 is required for blood vessel integrity in wounded skin, *J. Cell. Biol.*, **179**, 747-760, doi: 10.1083/jcb.200706090.
- Sundar, I. K., Chung, S., Hwang, J. W., Arunachalam, G., Cook, S., et al. (2010) Peroxiredoxin 6 differentially regulates acute and chronic cigarette smoke-mediated lung inflammatory response and injury, *Exp. Lung Res.*, **36**, 451-462, doi: 10.3109/01902141003754128.
- Fisher, A. B. (2011) Peroxiredoxin 6: a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A₂ activities, *Antioxid. Redox Signal.*, **15**, 831-844, doi: 10.1089/ars.2010.3412.
- Power, J. H., Asad, S., Chataway, T. K., Chegini, F., Manavis, J., et al. (2008) Peroxiredoxin 6 in human brain: molecular forms, cellular distribution and association with Alzheimer's disease pathology, *Acta Neuropathol.*, **115**, 611-622, doi: 10.1007/s00401-008-0373-3.
- Novoselova, E. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Khrenov, M. O., Lunin, S. M., et al. (2019) Protective effect of peroxiredoxin 6 against toxic effects of glucose and cytokines in pancreatic RIN-m5F β -cells, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 637-643, doi: 10.1134/S0006297919060063.
- Chen, S., Hu, Y., Zhang, J., and Zhang, P. (2021) Anti-inflammatory effect of salusin β knockdown on LPS-activated alveolar macrophages via NF- κ B inhibition and HO-1 activation, *Mol. Med. Rep.*, **23**, 127, doi: 10.3892/mmr.2020.11766.
- Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., and Ravin, V. K. (2009) Cloning, expression and comparative analysis of peroxiredoxine 6 from different species, *Mol. Biol. (Mosk)*, **43**, 505-511, doi: 10.1134/s0026893309030194.
- Wu, D., and Yotnda, P. (2011) Production and detection of reactive oxygen species (ROS) in cancers, *J. Vis. Exp.*, **57**, 3357, doi: 10.3791/3357.
- Glushkova, O. V., Khrenov, M. O., Novoselova, T. V., Lunin, S. M., Parfenyuk, S. B., et al. (2015) The role of the NF- κ B, SAPK/JNK, and TLR4 signalling pathways in the responses of RAW 264.7 cells to extremely low intensity microwaves, *Int. J. Radiat. Biol.*, **91**, 321-328, doi: 10.3109/09553002.2014.996261.
- Sharapov, M. G., Novoselov, V. I., and Gudkov, S. V. (2019) Radioprotective role of peroxiredoxin 6, *Antioxidants (Basel)*, **8**, 15, doi: 10.3390/antiox8010015.
- Новоселов В. И. (2012) Роль пероксиредоксинов при окислительном стрессе в органах дыхания, *Пульмонология*, 83-87.
- Ross, E. A., Devitt, A., and Johnson, J. R. (2021) Macrophages: the good, the bad, and the gluttony, *Front. Immunol.*, **12**, 708186, doi: 10.3389/fimmu.2021.708186.

23. Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011) Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases, *Antioxid. Redox. Signal.*, **15**, 1583-1606, doi: 10.1089/ars.2011.3999.
24. Zhang, X., Yu, Y., Lei, H., Cai, Y., Shen, J., et al. (2020) The Nrf-2/HO-1 signaling axis: a ray of hope in cardiovascular diseases, *Cardiol. Res. Pract.*, **30**, 5695-5723, doi: 10.1155/2020/5695723.
25. Park, M. H., Jo, M., Kim, Y. R., Lee, C. K., and Hong, J. T. (2016) Roles of peroxiredoxins in cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory diseases, *Pharmacol. Ther.*, **163**, 1-23, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.018.
26. Webster, J. M., Kempen, L. J. A. P., Hardy, R. S., and Langen, R. C. J. (2020) Inflammation and skeletal muscle wasting during cachexia, *Front. Physiol.*, **11**, 597-675, doi: 10.3389/fphys.2020.597675.
27. Zhao, L. X., Du, J. R., Zhou, H. J., Liu, D. L., Gu, M. X., et al. (2016) Differences in proinflammatory property of six subtypes of peroxiredoxins and anti-inflammatory effect of ligustilide in macrophages, *PLoS One*, **11**, e0164586, doi: 10.1371/journal.pone.0164586.
28. Yuan, F., Liu, R., Hu, M., Rong, X., Bai, L., et al. (2019) JAX2, an ethanol extract of *Hyssopus cuspidatus* Boriss, can prevent bronchial asthma by inhibiting MAPK/NF- κ B inflammatory signaling, *Phytomedicine*, **57**, 305-314, doi: 10.1016/j.phymed.2018.12.043.
29. Sharapov, M. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Gudkov, S. V., Lunin, S. M., et al. (2021) The role of TLR4/NF- κ B signaling in the radioprotective effects of exogenous PRDX6, *Arch. Biochem. Biophys.*, **15**, 108830, doi: 10.1016/j.abb.2021.108830.
30. Zhang, Y., Xia, G., Zhang, Y., Liu, J., Liu, X., et al. (2017) Palmitate induces VSMC apoptosis via toll like receptor (TLR)4/ROS/p53 pathway, *Atherosclerosis*, **263**, 74-81, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.06.002.
31. Duran, X., Vilahur, G., and Badimon, L. (2009) Exogenous *in vivo* NO-donor treatment preserves p53 levels and protects vascular cells from apoptosis, *Atherosclerosis*, **205**, 101-106, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.11.016.
32. Lee, M., Rey, K., Besler, K., Wang, C., and Choy, J. (2017) Immunobiology of nitric oxide and regulation of inducible nitric oxide synthase, *Results. Probl. Cell Differ.*, **62**, 181-207, doi: 10.1007/978-3-319-54090-0_8.
33. Dubey, M., Nagarkoti, S., Awasthi, D., Singh, A. K., Chandra, T., et al. (2016) Nitric oxide-mediated apoptosis of neutrophils through caspase-8 and caspase-3-dependent mechanism, *Cell Death Dis.*, **7**, e2348, doi: 10.1038/cddis.2016.248.

PROTECTIVE EFFECTS OF PEROXIREDOXIN 6 IN MODELING PROINFLAMMATORY RESPONSE USING RAW 264.7 MACROPHAGES

S. B. Parfenyuk^{1*}, O. V. Glushkova¹, M. G. Sharapov¹, M. O. Khrenov¹,
S. M. Lunin¹, A. A. Kuzekova¹, E. K. Mubarakshina¹, T. V. Novoselova¹,
D. A. Cherenkov², and E. G. Novoselova¹

¹ Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences,
Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: lana_kras2@rambler.ru

² Voronezh State University of Engineering Technologies, 394036 Voronezh, Russia

The aim of the work was to study the effects of peroxiredoxin 6 (PRDX6), a recombinant antioxidant protein, on the level of proinflammatory responses caused by endotoxin exposure to RAW 264.7 macrophages. The addition of LPS to the RAW 264.7 cell culture medium expectedly increased the production of TNF- α , and the addition of PRDX6 led to a significant decrease in its production by 15-20%. The level of production of another proinflammatory cytokine, IL-1 β , significantly activated by endotoxin, was completely normalized under the PRDX6 action. In addition, the addition of PRDX6 reduced the production of reactive oxygen species (ROS) induced by endotoxin and also prevented overexpression of the *iNos* gene in RAW 264.7 cells. The results showed that PRDX6 has a suppressive effect on the expression of the *Nfe2l2* gene and the production of the transcription factor NRF-2 during the first 6 h of cell culture. The addition of endotoxin causes the activation of the NF- κ B and SAPK/JNK signaling cascades, while in the presence of PRDX6, the activity of these signaling cascades decreases. It is known that the proinflammatory response of cells caused by bacterial LPS leads to the activation of apoptosis and the elimination of damaged cells. Our studies confirm this, since LPS leads to the activation of the *Trp53* gene, a marker of apoptosis. The addition of peroxiredoxin 6 in the first hours of the development of an acute proinflammatory response leads to the suppression of *Trp53* gene expression, which indicates a protective effect of PRDX6 that reduces apoptosis in RAW 264.7 macrophages.

Keywords: peroxiredoxin 6, inflammation, cytokines, gene expression, signaling cascades