

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ДИСФУНКЦИИ ПЕЧЕНИ ПРИ ОСТРОМ ПОРАЖЕНИИ ПОЧЕК

© 2023 г. А.Е. Гордеева*, Э.А. Курганова**, В.И. Новоселов*.,#

*Институт биофизики клетки — обособленное подразделение ФИЦ «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

**Пушкинский государственный естественно-научный институт, просп. Науки, 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: novoselov-vi@rambler.ru

Поступила в редакцию 23.01.2023 г.

После доработки 23.01.2023 г.

Принята к публикации 01.02.2023 г.

Острое поражение почек провоцирует нарушение функций печени, что является отягощающим фактором для эффективного лечения. В настоящей работе в качестве модели было использовано ишемически-реперфузионное поражение почек. Так как при этом основным поражающим фактором является гиперпродукция активных форм кислорода, для предотвращения повреждения печени при поражении почек в работе использовали экзогенный фермент-антиоксидант пероксиредоксин 6, который способен нейтрализовать гиперпродукцию широкого спектра активных форм кислорода. Поражение почки было инициировано 45-минутной ишемией с одновременной левосторонней нефрэктомией. Печень не подвергалась манипуляциям. Пероксиредоксин 6 вводили внутривенно за 15 мин до ишемии. Состояние печени оценивали через 2, 5 и 24 ч после реперфузии почки методами гистологии и биохимии. Максимально признаки поражения печени выявлены через 5 ч реперфузии почки. Использование пероксиредоксина 6 приводит к снижению выраженности сосудистой реакции и лейкоцитарной инфильтрации в печени; уменьшению степени дистрофии и апоптоза гепатоцитов; отсутствию роста концентрации ТБК-реактивных продуктов и стабилизации уровня цитокинов ИЛ-6, ИЛ-10 в печеночной ткани, а также к нормализации активности внутриклеточных трансфераз в крови с началом реперфузии. Протекторный эффект пероксиредоксина 6 связан прежде всего с его антиоксидантными свойствами, которые позволяют нейтрализовать гиперпродукцию активных форм кислорода уже в начальный период реперфузии почки, однако не стоит исключать вклад сигнально-регуляторной функции белка в его протекторный эффект.

Ключевые слова: пероксиредоксины, ишемически-реперфузионное поражение почки, активные формы кислорода, печень.

DOI: 10.31857/S000630292304018X, EDN: KNAIRU

Острое поражение почек (ОПП) при ишемии-реперфузии (И-Р) характеризуется быстрым нарушением функций почек различной степени выраженности. Главная опасность этой патологии заключается в ее влиянии на функцию отдаленных органов. ОПП может приводить к дисфункции легких, печени, сердца и мозга [1, 2]. В частности, поражение печени и развитие острой почечно-печеночной недостаточности является одной из наиболее распространенных форм полиорганной недостаточности [1–4]. Повреждение печени в послеоперационном периоде при

ишемическом поражении почек является наиболее социально значимой патологией в силу ее широкой распространенности и провоцируемой ею высокой смертности [1, 2]. Вероятность летального исхода при сочетанном остром почечно-печеночном поражении в три раза выше, чем при изолированном остром печеночном поражении [4]. Поражение печени наряду с поражением почек усложняет эффективное лечение, так как печень играет важную роль в метаболизме лекарств при критических состояниях [1, 3]. Точный механизм повреждения печени при почечной И-Р до сих пор остается мало изученным. Тем не менее, были предложены потенциальные пути, провоцирующие это поражение, включающие активацию воспалительного каскада и системных цитокинов, гиперпродукцию и транспорт активных

Сокращения: ОПП — острое поражение почек, И-Р — ишемия-реперфузия, АФК — активные формы кислорода, Prx6 — пероксиредоксин 6, АЛТ — аланинаминотрансфераза, АСТ — аспартатамино-трансфераза.

форм кислорода (АФК) и лейкоцитов в другие органы и активацию проапоптотических путей [1–3, 5–8].

Триггером в развитии всех патобиологических процессов при остром поражении почек является гиперпродукция АФК [9], которые выступают сигнальными молекулами, приводящими, в свою очередь, к активации воспалительных путей. Воспаление вносит значительный вклад в дисфункцию печени и играет важную роль в патофизиологии ОПП [6–8]. При ОПП признаки дисфункции печени появляются на ранних стадиях повреждения почек – в первые часы реперфузии [3, 5, 6]. К основным источникам гиперпродукции АФК в печени относят лейкоцитарную НАД(Ф)Н-оксидазу, рост активности ксантиоксидазы и миелопероксидазы [10, 11]. Хотя АФК необходимы для внутриклеточной передачи сигналов и иммунного ответа, их избыточное количество не может быть полностью устранено клеточными антиоксидантами вследствие снижения активности ферментов эндогенной антиоксидантной системы в печени на фоне ОПП. В итоге это приводит к развитию окислительного повреждения клеток, разрушению органелл, клеточных мембран и ядерной ДНК [3, 8, 11]. Роль окислительного стресса в патофизиологии поражения печени при ОПП подтверждается исследованиями, показывающими защитный эффект от применения антиоксидантных веществ, нейтрализующих АФК или реакции с их участием при И-Р почек [3, 10–14]. Повреждение клеток происходит уже в начальный период реперфузии почки [15], поэтому для успешной защиты необходимо блокировать раннюю стадию реперфузионного повреждения, приводящую к поражению тканей, а именно стадию выработки активных форм кислорода. Среди всех антиоксидантов ферменты семейства пероксиредоксинов способны нейтрализовать АФК при их минимальной концентрации (5–200 мкМ) и предотвратить их гиперпродукцию в начальный момент их образования [16]. Среди представителей семейства следует выделить пероксиредоксин 6 (Prx6). Он обладает широкой субстратной специфичностью по отношению к АФК, высокими показателями антиоксидантной активности при малых концентрациях АФК, при которых другие ферменты антиоксиданты малоэффективны, также обладает хорошей биодоступностью и способностью проникать в клетки [17, 18]. В рамках настоящего исследования данные характеристики Prx6 послужили ключевыми для его выбора в качестве потенциального протектора печеночной ткани при остром поражении почки на фоне И-Р.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. В экспериментах были использованы крысы-самцы линии Вистар массой 230 г, всего 30 особей.

Пероксиредоксин 6. Использовали рекомбинантный человеческий Prx6, содержащий His-tag-домен. Белок был получен в лаборатории механизмов рецепции ИБК РАН. Пероксидазная активность экзогенного белка составляла 200 нмоль/мг/мин по H_2O_2 и 100 нмоль/мг/мин по *трет*-бутилпероксиду. His-tag-домен не влияет на пероксидазную активность и субстратную специфичность белка и выступает маркером для экзогенного Prx6.

Модель ишемически-реперфузионного поражения почки. Крыс наркотизировали внутривенным введением 0.5 мл 3.5%-го Золетила 100 (Zoletil 100, Virbac Sante Animale, Франция). И-Р-поражение почки проводили путем окклюзии правой почечной ножки атравматичным зажимом в течение 45 мин с предварительной нефрэктомией левой почки. Период реперфузии наступал после снятия зажима и составлял 2, 5 и 24 ч. Печень не подвергали никаким манипуляциям. Для выявления эффектов Prx6 крысам через хвостовую вену за 15 мин до ишемии вводили 2 мл физиологического раствора, содержащего Prx6, из расчета 10 мг/кг веса животного. Экспериментальные животные были разделены на четыре группы: группа № 1 – интактный контроль ($n = 3$); группа № 2 – группа нефрэктомии (крысы только с правой почкой, через 2, 5 и 24 ч после левосторонней нефрэктомии) ($n = 9$); группа № 3 – ишемия-реперфузия правой почки + левосторонняя нефрэктомия (реперфузия 2, 5 и 24 ч) ($n = 9$); группа № 4 – ишемия-реперфузия правой почки + левосторонняя нефрэктомия + введение Prx6 перед ишемией (реперфузия 2, 5 и 24 ч) ($n = 9$). Период ишемии в группах № 3 и № 4 составил 45 мин. По окончании периода реперфузии крыс выводили из эксперимента путем декапитации и использовали образцы печени для исследования.

Гистологический анализ. Гистологический анализ ткани печени проводили на парафиновых срезах ткани, с окраской гематоксилин-эозином («Biovitrum», Россия). Микроскопический анализ проводили на микроскопе DM 6000 с цифровой камерой DFC 490 (Leica, Германия).

Иммуногистохимический анализ. Анализ проводили на парафиновых срезах печени. Для определения распределения маркера апоптоза каспазы-3 срезы инкубировали с первичными поликлональными антителами кролика к каспазе-3 (1 : 50) (ab52293, Abcam, Великобритания). Для исследования распределения эндогенного Prx6 срезы инкубировали с первичными поликлональными антителами кролика к Prx6 (1 : 1000), антитела были получены в лаборатории механизмов

рецепции ИБК РАН. Для исследования распределения экзогенного Prx6-His-tag срезы инкубировали с первичными поликлональными антителами кролика к His-tag-домену (1 : 100) (ab9108, Abscam, Великобритания). Инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи при 4°C. В качестве контрольного теста (для исключения неспецифического окрашивания) использовали негативный контроль, в котором исключали инкубацию с первичными антителами. Микроскопический анализ проводили на микроскопе DM 6000 с цифровой камерой DFC 490. Итоговый уровень иммуноокрашивания независимо оценивали два эксперта.

Иммуноферментный анализ. Образцы печени гомогенизировали и лизировали с 2 мМ фенилметилсульфонилфторида. Гомогенаты печени центрифугировали, супернатант сорбировали на 96-луночный планшет и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Использовали моноклональные мышинные антитела к цитокинам IL-6 (1 : 500) (10E5, Santa Cruz Biotechnology, США); и поликлональные кроличьи антитела к IL-10 (1 : 1000) (Ab9969, Abscam, Великобритания). Инкубацию проводили в течение ночи при 4°C. Измеряли оптическую плотность при 450 нм на приборе Multiskan (Labsystems Plus, Финляндия).

Определение уровня ТБК-реактивных продуктов в печени. К гомогенату ткани печени добавляли 1% H_3PO_4 и 0.8% водного раствора 2-тиобарбитуровой кислоты. Для экстракции продукта реакции (окрашенного триметинового комплекса) использовали *n*-бутанол. Оптическую плотность определяли при длине волны 535 нм.

Биохимический анализ. Биохимический анализ крови включал в себя измерение активности печеночных ферментов — аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ) на биохимическом экспресс-анализаторе Reflotron Plus (Roche Diagnostics, Швейцария) в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистический анализ. Статистический анализ выполняли с использованием программы SigmaPlot 11.0 Software (Systat Software Inc, США). Результаты выражали как среднее значение (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистическую значимость между отдельными экспериментальными группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента, $P < 0.05$ принимали статистически достоверной.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние экзогенного Prx6 на морфологию печени при ренальной ишемии-реперфузии. Оценка морфологии печени показала, что нефрэктомия не приводит к повреждению структур паренхимы, однако через 5 ч после нефрэктомии наблю-

дается слабовыраженная сосудистая реакция: расширение центральных вен и синусоидных капилляров в прицентральной зоне, мелкоочаговая инфильтрация лейкоцитов в зоне портальных трактов (рис. 1б). Через 24 ч после нефрэктомии такие изменения не были отмечены (рис. 1в). При реперфузии почки изменения в печени отмечаются через 2 ч: мелкоочаговое расширение синусоидных капилляров и сосудов портальных трактов, инфильтрация лейкоцитов в перипортальной зоне (рис. 1г). Через 5 ч реперфузии почки в печени наблюдается развитие мелкоочаговой деструкции гепатоцитов в центрилобулярной зоне и выраженная сосудистая реакция: расширение центральных вен и синусоидных капилляров, полнокровие центральных вен и сосудов портальных трактов, отек в перипортальной зоне с выраженной очагово-диффузной лейкоцитарной инфильтрацией (рис. 1д). Через 24 ч отмечается гидрорическая дистрофия и некроз гепатоцитов центрилобулярной зоны, полнокровие центральных вен, вен портальных трактов, а также мелкоочаговое полнокровие и дилатация синусоидных капилляров с эритростазами. Сосуды портальных трактов расширены, в строме ряда из них отмечается очаговая лейкоцитарная инфильтрация (рис. 1е). При использовании Prx6 дистрофические изменения гепатоцитов не отмечены. Через 5 ч реперфузии почки в печени выявлена слабо-выраженная сосудистая реакция и очагово-диффузная лейкоцитарная инфильтрация в портальной зоне (рис. 1з), с сохранением последней через 24 ч реперфузии (рис. 1и).

При исследовании уровня маркера апоптоза каспазы-3 при поражении почки в паренхиме печени были отмечены очаги апоптоза в центрилобулярной и портальной зонах максимально через 5 ч реперфузии почек (рис. 2г), со снижением очагов апоптоза через 24 ч реперфузии (рис. 2д). Напротив, при использовании Prx6 отмечено значительное снижение иммуносигнала каспазы-3 в паренхиме печени (рис. 2е,ж).

В связи с тем, что для протекции печени от И-Р-поражения почки будет использован экзогенный Prx6, введенный внутривенно перед И-Р-поражением, было проведено иммуногистохимическое исследование его распределения в печени. Так, при внутривенном введении экзогенный Prx6 имеет внутрисосудистую локализацию в печени и отмечен сосудах портальной зоны. Напротив, эндогенный Prx6 отмечен в цитоплазме и мембране гепатоцитов (рис. 3).

Морфологические изменения в печени при поражении почки отразились на изменении в активности печеночных ферментов в крови (табл. 1). Нефрэктомия привела к росту активности этих метаболитов в крови, особенно АСТ, относительно контрольных значений. При ишемии

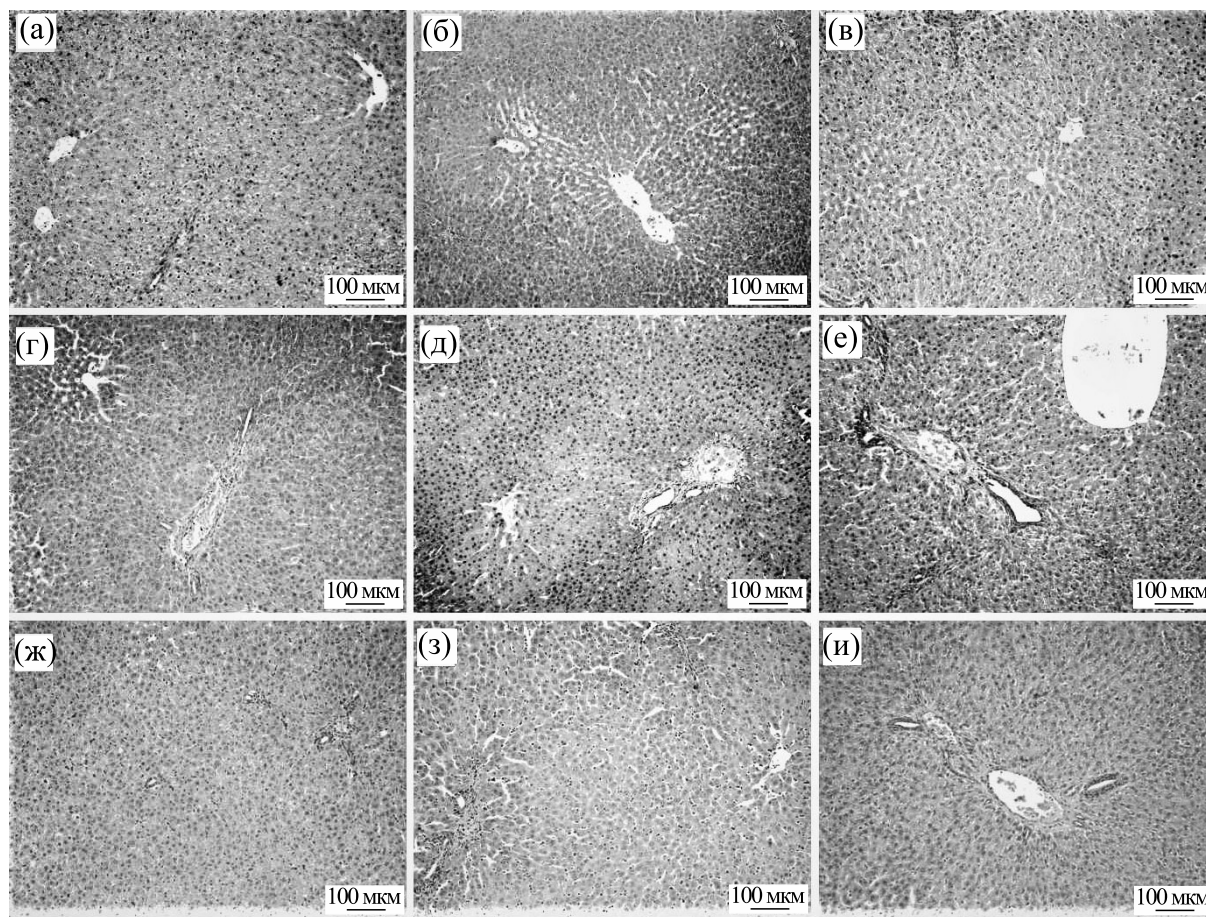


Рис. 1. Морфология печени при И-Р почки. (а)–(в) – Печень после нефрэктомии (группа № 2): (а) – через 2 ч, (б) – через 5 ч, (в) – через 24 ч; (г)–(е) – печень после И-Р почки (группа № 3): (г) – реперфузия 2 ч, (д) – реперфузия 5 ч, (е) – реперфузия 24 ч; (ж)–(и) – печень после И-Р почки в условиях введения Prx6 (группа № 4): (ж) – реперфузия 2 ч, (з) – реперфузия 5 ч, (и) – реперфузия 24 ч. Окраска гематоксилин-эозином.

почки через 5 ч реперфузии отмечено максимальное увеличение активности печеночных метаболитов в крови: АЛТ в 1.6 раза, АСТ – в 2.0 раза относительно показателей при нефрэктомии. Использование Prx6 нормализует ситуацию с активностью печеночных ферментов в крови: через 5 ч реперфузии почки эти метаболиты соответствуют показателям при нефрэктомии, однако остаются выше контрольных значений.

Определение механизма гепатопротекторного действия экзогенного Prx6 при ренальной ишемии-реперфузии. И-Р-поражение почек приводит к росту концентрации интерлейкинов в ткани печени и их повышенному уровню в течение 24 ч. Напротив, использование Prx6 не приводит к росту концентрации провоспалительного цитокина ИЛ-6 в печени при И-Р почки, ее уровень не отличается от контрольных значений в течение 5 ч реперфузии. Рост уровня ИЛ-6 в 2.0 раза отмечен через 24 ч реперфузии, тем не менее, он в 1.3 раза ниже показателя при И-Р. Для противовоспалительного цитокина ИЛ-10 использование Prx6 не

оказывает влияния, его уровень не отличается от показателей при И-Р (рис. 4).

Степень перекисного окисления липидов в печени при И-Р почки оценивали по изменению концентрации ТБК-реактивных продуктов в печеночной ткани. На рис. 5 показано, что концентрация ТБК-реактивных продуктов в интактной печени находится на уровне 0.24 ± 0.05 нмоль/мг белка. И-Р-поражение почек приводит к росту уровня перекисного окисления липидов в печени, о чем свидетельствует увеличение концентрации ТБК-реактивных продуктов максимально в 10 раз через 5 ч реперфузии ишемизированной почки. Через 24 ч реперфузии отмечен резкий спад в концентрации ТБК-реактивных продуктов в печени до уровня контрольных значений. Использование Prx6 не приводит к росту концентрации ТБК-реактивных продуктов в печени в течение всего периода реперфузии ишемизированной почки. Их концентрация остается на уровне контрольных значений (рис. 5).

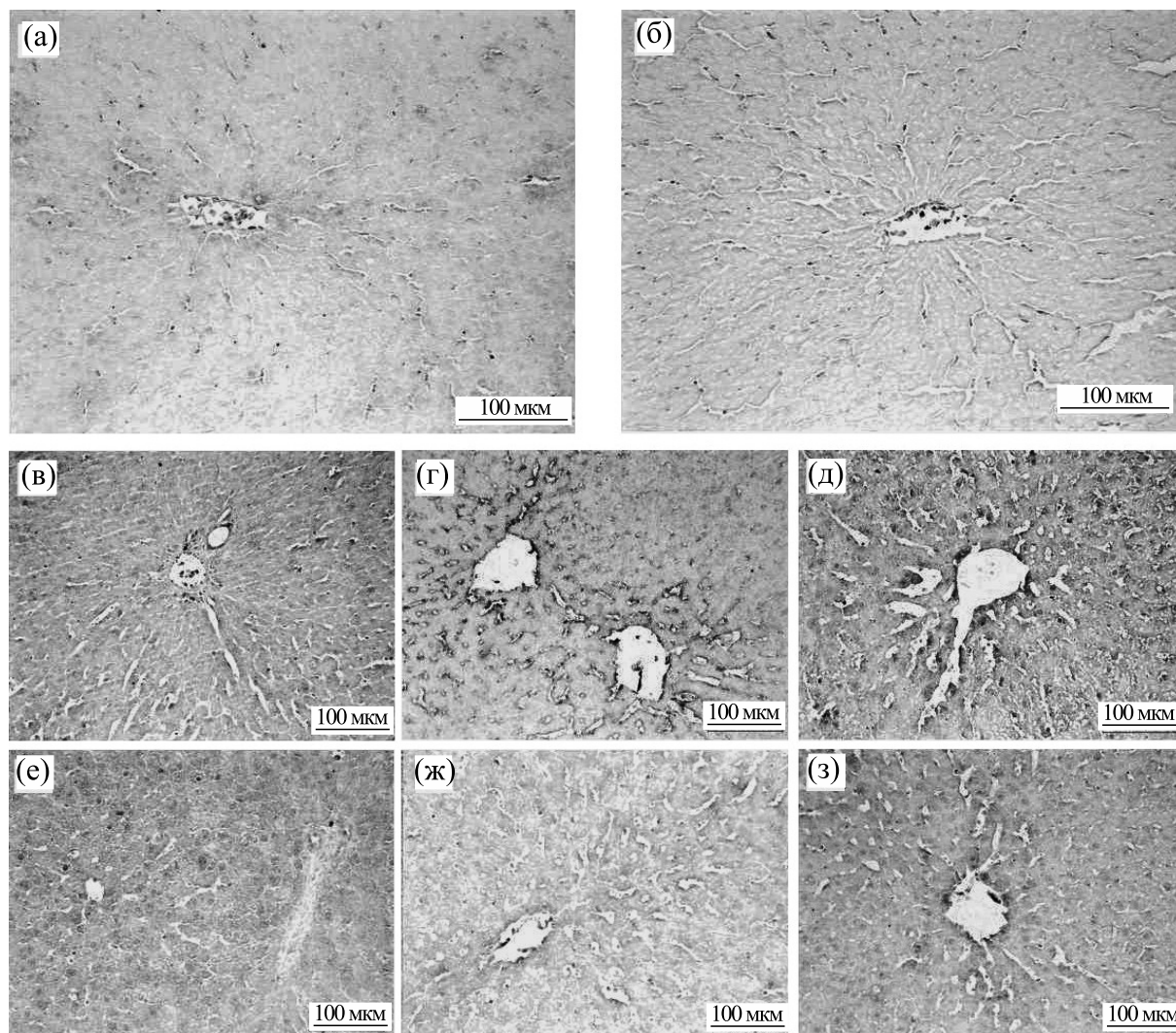


Рис. 2. Локализация каспазы-3 в печени при И-Р почки: (а) — интактная печень, положительный контроль; (б) — интактная печень, отрицательный контроль; (в)—(д) — печень после И-Р почки (группа № 3); (е)—(з) — печень после И-Р почки в условиях введения Ргх6 (группа № 4); (в) и (е) — реперфузия 2 ч, (г) и (ж) — реперфузия 5 ч, (д) и (з) — реперфузия 24 ч; Поликлональные антитела против каспазы-3.

ОБСУЖДЕНИЕ

ОПП — совокупность механизмов, связанных с повреждением ренальных структур и приводящих к дисфункции органа, в результате нарушения процессов клубочковой фильтрации и экскреции, с последующими нарушениями системного гомеостаза. Смертность от ОПП составляет 11% и возрастает до 45–60%, если оно сопровождается дисфункцией других органов [19]. Распространенным и опасным осложнением при ОПП является дисфункция печени, которое в 80–90% случаев приводит к летальному исходу [1–4]. Точные механизмы поражения печени при ОПП пока неизвестны. Предполагается, что поражение может происходить посредством индукции воспаления за счет роста уровня провоспалительных факторов, инфильтрации цитотоксических Т-кле-

ток и нейтрофилов в интерстиций печени, увеличения экспрессии фактора адгезии мРНК ICAM-1 и экспрессии фермента спермин/спермидин-N1-ацетилтрансферазы, активность которого повышается на ранних стадиях повреждения печени, роста активности источников АФК — ксантиноксидазы, миелопероксидазы, НАДФ-оксидазы, циклоксигеназы, NO и активации проапоптических путей [1–3, 5–8, 10, 11]. Среди механизмов повреждения печени при ОПП также выделяют развитие метаболического ацидоза [20], аккумуляцию индоксилсульфата, который активизирует НАДФ-оксидазу [21], повышение концентрации мочевины, снижение синтеза аргинина и нарушение орнитинового цикла в печени [22], гиперфосфатемию [23]. Тем не менее, исследователи указывают, что среди всех меха-

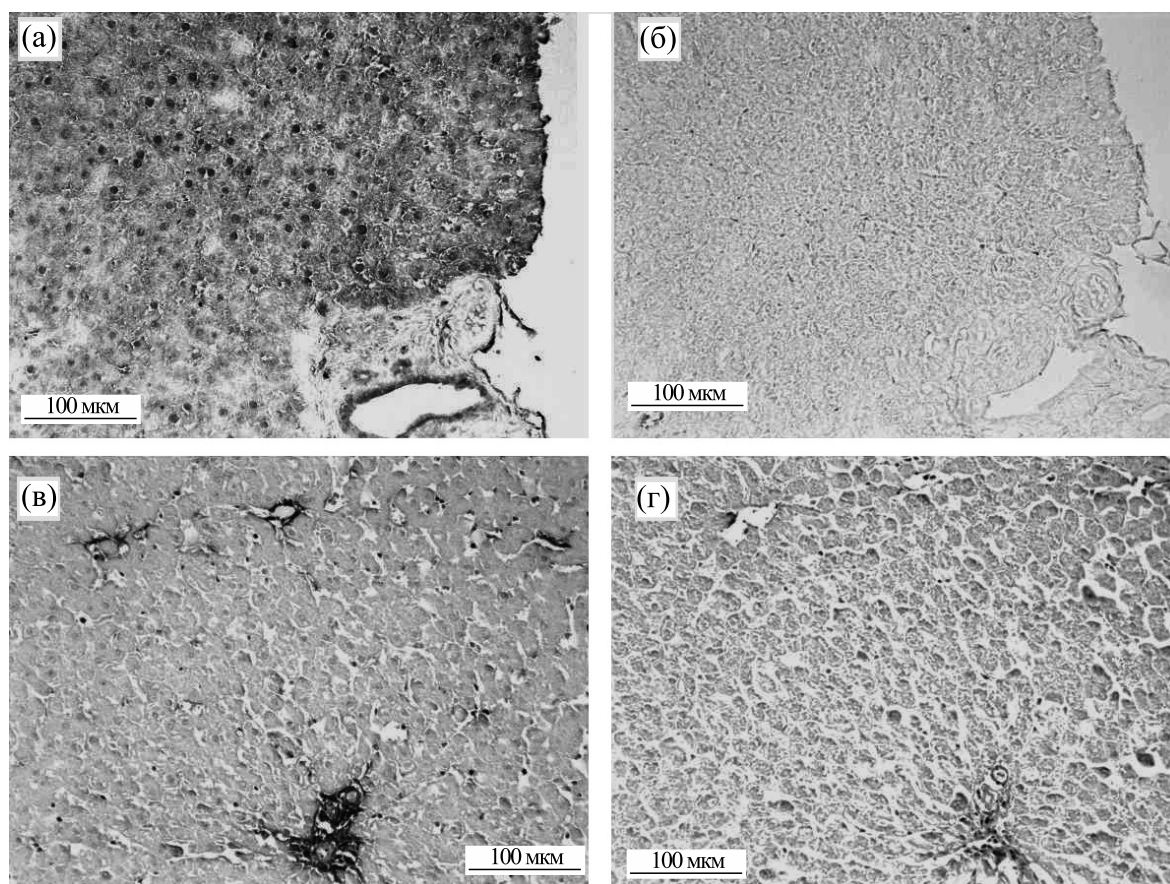


Рис. 3. Локализация эндогенного и экзогенного Prx6 в печени. (а) – Эндогенный Prx6, положительный контроль; (б) – отрицательный контроль; кроличьи антитела против Prx 6. (в) – Экзогенный Prx6-His-tag, положительный контроль; (г) – отрицательный контроль; кроличьи антитела против His-tag.

низмов поражения печени при ОПП первостепенную роль играет гиперпродукция АФК и окислительный стресс на фоне снижения резервов эндогенной антиоксидантной системы [3, 8, 10–14].

В связи с ключевой ролью нарушения окислительного гомеостаза при ОПП для предупреждения дисфункции печени используют вещества, нейтрализующие АФК или реакции с их участием при И-Р почек [3, 10–14]. Например, описано

Таблица 1. Активность печеночных ферментов в крови после И-Р почки

Время, ч	Нефрэктомия	И-Р	И-Р + Prx6
Аланинаминотрансфераза, Ед/л			
2	71 ± 6	65 ± 2	61 ± 8
5	70 ± 10	111 ± 11*	68 ± 6 [#]
24	52 ± 8	72 ± 7*	79 ± 8
Аспаратаминотрансфераза, Ед/л			
2	275 ± 35	343 ± 100	225 ± 18
5	382 ± 60	819 ± 89*	518 ± 155 [#]
24	270 ± 13	258 ± 70	252 ± 24

Примечание. Установлены статистически значимые отличия между группами: * – $p < 0.05$ относительно групп нефрэктомии в пределах одного времени реперфузии, [#] – $p < 0.05$ относительно групп ишемия-реперфузия в пределах одного времени реперфузии. В крови интактных крыс активность АЛТ – 42 Ед/л, АСТ – 96 Ед/л.

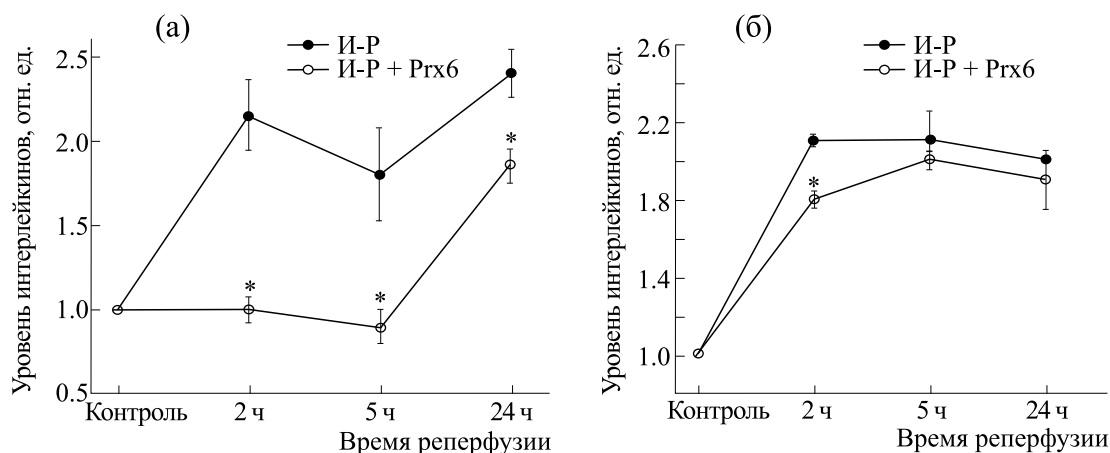


Рис. 4. Уровень интерлейкинов в печени при И-Р почки: (а) — Ab IL-6 (1 : 500) (Santa Cruz Biotechnology); (б) — Ab IL-10 (1 : 1000) (Abscam). Установлены статистически значимые отличия между группами: $*p < 0.05$. Относительные значения, контроль принят за единицу, $N = 9$ для каждой группы.

применение наноантиоксидантов, которые успешно используются при И-Р почек [24, 25]. Однако при выборе потенциальных антиоксидантных протекторов необходимо учитывать тот факт, что опасность реперфузионного поражения заключается в молниеносности нарушения окислительно-восстановительного гомеостаза, когда концентрации АФК растут, а системы их элиминации еще не активированы, что обуславливает повреждение клеток уже в начальный период реперфузии [16]. Следует отметить, что активация ферментов антиоксидантного ответа (GPx1-8, GST) происходит при концентрации АФК 200 мкМ и выше, когда уже инициирован окислительный стресс и происходит гибель клеток.

Этот аспект требует использования антиоксидантных протекторов, которые способны защитить клетки уже с началом реперфузии в начальный момент образования АФК и предотвратить тем самым развитие окислительного поражения и гибели клеток. Среди таких протекторов можно выделить ферменты-антиоксиданты семейства пероксиредоксинов, которые проявляют антиоксидантную активность при минимальной концентрации АФК от 1 мкМ [16].

В настоящей работе для предупреждения дисфункции печени при ОПП был использован представитель семейства пероксиредоксинов — экзогенный рекомбинантный Prx6 и изучен его гепатопротекторный эффект в начальный репер-

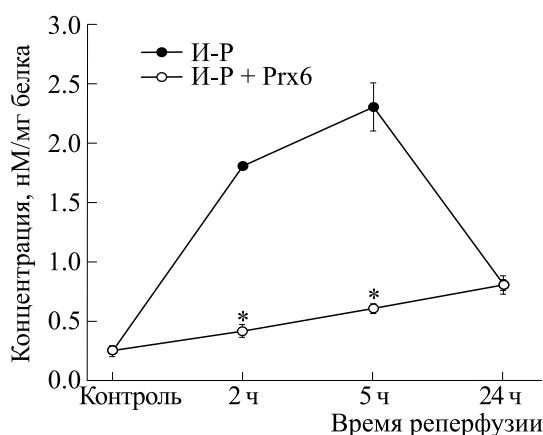


Рис. 5. Концентрация ТБК-реактивных продуктов в печени при И-Р почки. Установлены статистически значимые отличия между группами: $*p < 0.05$. Абсолютные значения, $N = 9$ для каждой группы.

фузионный период после ишемии почки. ОПП было инициировано ренальной И-Р с одновременной левосторонней нефрэктомией у крыс. Было показано, что только нефрэктомия одной почки не приводила к изменениям в печени, за исключением сосудистой реакции, которая носила временный характер и пропадала через 24 ч нефрэктомии, что связано с оперативным вмешательством. Напротив, ОПП вызванное И-Р почки и нефрэктомией второй почки, приводило к повреждению печени, которое развивалось с началом реперфузионного периода. Через 2 ч реперфузии в печени был зафиксирован значительный рост ТБК-реактивных продуктов, который достигал максимума через 5 ч, что указывает на развитие перекисного окисления липидов под действием АФК. Источником гиперпродукции АФК в печени служат лейкоциты, которые были активированы кислородными радикалами при реперфузии почки. Активированные лейкоциты и макрофаги служат не только источниками АФК, но и цитокинов. На фоне гиперпродукции АФК наблюдался рост концентрации ИЛ-6 и ИЛ-10 в ткани печени и их повышенный уровень в течение 24 ч. Печеночные ИЛ-6 и ИЛ-10 вместе с другими цитокинами (фактор некроза опухолей α , ИЛ-17A, MCP-1) связаны с воспалительными изменениями в печени [3, 5, 8]. ИЛ-6 является главным цитокином в реакции печени на воспаление, он стимулирует синтез компонентов острофазового ответа, активирует пролиферацию и дифференцировку В- и Т-клеток. В пользу участия воспалительных процессов в развитии дисфункции печени указывает тот факт, что мыши дикого типа, получавшие цитокин-нейтрализующие антитела, и мыши с нокаутом по фактору некроза опухолей α и ИЛ-6 имеют менее тяжелое повреждение печени вследствие ишемического ОПП [5]. Первыми с избытком АФК и воспалительными компонентами встречаются сосуды, что приводит к их изменениям. При реперфузии почки в печени отмечалась выраженная сосудистая реакция — дилатация, полнокровие и отек в портальной и центральной зонах — в местах повышенной инфильтрации лейкоцитов. В этих зонах через 5 ч реперфузии были обнаружены очаги деструкции и апоптоза гепатоцитов, а через 24 ч — гидропическая дистрофия и некроз. Отмечается, что И-Р почки увеличивает экспрессию молекул ICAM-1 на мембране эндотелия, которые обеспечивают адгезию лейкоцитов к сосудам, что приводит к активации, а затем к дисфункции эндотелия [7]. Поражение гепатоцитов приводило к росту активности в крови внутриклеточных печеночных ферментов АЛТ и АСТ. Рост активности печеноч-

ных ферментов в крови прямо указывает на повреждение клеток печени [1]. Пик активности ферментов был зафиксирован через 5 ч реперфузии. Аналогичная картина описана в работе [3] — И-Р почки в печени приводит к цитоплазматическим дегенеративным изменениям гепатоцитов, апоптозу, некрозу, повышению сосудистой проницаемости и лейкоцитарной инфильтрации.

Таким образом, ОПП, вызванное И-Р почки, приводит к активации окислительного стресса и воспалительного ответа в печени, повышению инфильтрации лейкоцитов в интерстиций печени, к гистопатологическим повреждениям гепатоцитов и сосудов, к росту активности АСТ и АЛТ в крови, а в итоге — к дисфункции печени. Пик патологических изменений наблюдался через 5 ч реперфузии почки с тенденцией к уменьшению с увеличением времени реперфузии, что может говорить о включении компенсаторно-приспособительных резервов организма в стрессовой ситуации. Тем не менее, в ранний реперфузионный период происходит поражение не только ишемизированного органа, но и удаленных органов, что в итоге может привести к недостатку эндогенных резервов адаптации и привести к критическим изменениям в системах организма.

Использование экзогенного Prx6 изменяет характер развития патологических изменений как в почке, так и в печени. Следует подчеркнуть, что при внутривенном введении Prx6 до ишемии почки последний проникает как в ткани почки, так и в ткани печени, причем в печени экзогенный Prx6 обнаружен в сосудах портальной и центральной зон, что позволяет ему оказывать свой протекторный эффект в этих местах. Таким образом, в обоих органах происходит усиление антиоксидантного статуса. В почке отмечено снижение интенсивности окислительного стресса и нормализация профиля экспрессии маркерных генов антиоксидантного ответа, что приводит к сохранению функциональной активности почки [26]. В печени также отмечено отсутствие роста концентрации ТБК-реактивных продуктов в печени, что указывает на предотвращение перекисного окисления липидов. Такой эффект объясняется мощными антиоксидантными свойствами Prx6, которые позволяют ему нейтрализовать гиперпродукцию кислородных радикалов в начальный момент их образования [15, 16, 26].

На фоне снижения интенсивности окислительного стресса в печени был отмечен также рост провоспалительного цитокина ИЛ-10, однако не зафиксировано увеличение концентрации для воспалительного цитокина ИЛ-6 и выраженной лейкоцитарной инфильтрации в портальной и

центральной зоне, что может указывать на уменьшение индукции воспаления. В то же время в этих зонах наблюдалась слабовыраженная сосудистая реакция: наблюдается снижение деструкции гепатоцитов, их апоптоза и некроза в перипортальной и прицентральной зонах печени. В совокупности снижение поражения печеночной ткани приводит к снижению активности в крови внутриклеточных ферментов печени АЛТ и АСТ, что прямо указывает на уменьшение поражения гепатоцитов.

Стоит предположить, что снижение поражения клеток печени обусловлено не только антиоксидантным протекторным действием экзогенного R α х6 но и его сигнально-регуляторной функцией. Так, было показано, что в почке экзогенный R α х6 приводит к нормализации профиля экспрессии маркерных генов иммунного ответа [26]. С этой позиции не стоит исключать влияние R α х6 на снижение экспрессии молекул ICAM-1 в печени и таким образом на предотвращение дисфункции эндотелия.

Таким образом, использование R α х6 в условиях окислительного стресса, вызванного И-Р-повреждением почки способствует коррекции окислительно-восстановительного баланса и обрыву каскада повреждений уже с началом реперфузии почки, что, в свою очередь, предотвращает развитие дисфункции печени при остром поражении почек.

БЛАГОДАРНОСТИ

Микрофотографии, представленные в публикации, были получены с использованием оборудования Сектора оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ФИЦ ПНЦБИ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-24-00041).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с положениями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей. Основным документом, регламентирующим проведение настоящего исследования, являлось «Руководство по работе с лабораторными животными ИБК РАН» № 57 от 30.12.2011 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Lane, J. J. Dixon, I. MacPhee, et al., *Nephrol. Dial. Transplant.*, **28** (17), 1634 (2013).
2. M. E. Grams and H. Rabb, *Kidney Int.*, **81** (10), 942 (2012).
3. F. Golab, M. Kadkhodaei, M. Zahmatkesh, et al., *Kidney Int.*, **8**, 783 (2009).
4. А. Ю. Николаев, Эффективная фармакотерапия, **44**, 22 (2013).
5. S. W. Park, S. W. C. Chen, M. Kim, et al., *Lab. Invest.*, **91**, 63 (2011).
6. Y. Shang, S. M. Hewage, Ch. U. B. Wijerathne, et al., *Front. Med. (Lausanne)* **7**, 201 (2020).
7. J. V. Bonventre and A. Zuk, *Kidney Int.*, **66**, 480 (2004).
8. M. Serteser, T. Koken, A. Kahraman, et al., *FACS J. Surg. Res.*, **107**, 234 (2002).
9. E. Y. Plotnikov, A. V. Kazachenko, M. Y. Vyssokikh, et al., *Kidney Int.*, **72** (12), 1493 (2007).
10. E. Fadilliglu, Z. Kurcer, H. Parlakpinar, et al., *Arch. Pharm. Res.*, **31** (6), 705 (2008).
11. M. H. Emre, H. Erdogan, and E. Fadilliglu, *Gen. Physiol. Biophys.*, **25**, 195 (2006).
12. А. Е. Гордеева, Э. А. Курганова и В. И. Новоселов, *Биофизика*, **66** (5) 985 (2021).
13. Z.-Y. Fu, Z.-J. Wu, J.-H. Zheng, et al., *Drug Design Dev. Therapy*, **14**, 175 (2020).
14. J. Kaur, T. Kaur, et al., *Drug Dev. Res.*, **82**, 412 (2021).
15. М. Г. Шарапов, А. Е. Гордеева и др., *Биофизика*, **62**, 1208 (2017).
16. М. Г. Шарапов, Е. Е. Фесенко, В. И. Новоселов, *Биофизика*, **63**, 734 (2018).
17. Y. Manevich, T. Shuvaeva, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **485**, 139 (2009).
18. M. G. Sharapov, P. V. Glushkova, et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108830 (2021).
19. R. L. Metha, J. Bouchard, et al., *Intensive Care Med.*, **37**, 241 (2011).
20. Ostermann and R. W. Chang, *Crit. Care*, **13**, 142 (2009).
21. T. Shoji, A. Wada, K. Inoue, et al., *Nephron*, **105**, 99 (2007).
22. N. Salem, E. A. Salem, A. M. Maarouf, et al., *Ren. Fail.*, **32** (8), 959 (2010).
23. A. Baquerizo, D. Anselmo, and C. Shackleton, *Transplantation*, **75** (12) 2007 (2003).
24. Z. T. Rosenkrans, T. Sun, D. Jiang, et al., *Adv. Sci.*, **7**, 2000420 (2020).
25. K. Minami, S. Bae, H. Uehara, et al. *Am. J. Transpl.*, **20**, 1527 (2020).
26. R. G. Goncharov, K. A. Rogov, A. A. Temnov, et al., *Cell Tissue Res.*, **378** (2), 319 (2019).
27. X. Wang, S. A. Phelan, K. Forsman-Semb, et al., *J. Biol. Chem.*, **278**, 25179 (2003).

Use of Peroxiredoxin 6 to Prevent Liver Dysfunction in Acute Kidney Injury

A.E. Gordeeva*, E.A. Kurganova**, and V.I. Novoselov*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Pushchino State Natural Science Institute, prosp. Nauki 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Acute kidney injury causes deterioration of liver function, that is a confounding factor affecting treatment outcomes. In this work, renal ischemia reperfusion injury was used as a model. Taking into account that hyperproduction of reactive oxygen species is the major risk factor for kidney damage, the exogenous antioxidant enzyme peroxiredoxin 6, able to neutralize reactive oxygen species, has been used to prevent liver damage when kidneys are damaged. Kidney injury was initiated by a 45-minute ischemia simultaneously with a left-sided donor nephrectomy without manipulations of the liver. Peroxiredoxin 6 was administered intravenously 15 minutes before ischemia. The functional state of the liver was assessed after 2, 5 and 24 hours of reperfusion using histological and biochemical analysis. The signs of liver damage were detected in the best possible way after 5 hours of kidney reperfusion. It was found that peroxiredoxin 6 helps reduce the severity of the vascular reaction and leukocyte infiltration in the liver; lower the level of dystrophy and apoptosis of hepatocytes; keep the concentration of TBA-reactive products even and stabilize the level of cytokines, IL-6 and IL-10, in the liver tissue, as well as normalize the activity of intracellular transferases in the blood at the onset of reperfusion. The protective effect of peroxiredoxin 6 is associated primarily with its antioxidant properties, due to which hyperproduction of reactive oxygen species can be neutralized in the early phase of kidney reperfusion, but the signal-regulatory function of the protein can also contribute to a protective role peroxiredoxin 6.

Keywords: peroxiredoxins, renal ischemia reperfusion injury, reactive oxygen species, liver