

ЗАЩИТНЫЙ ЭФФЕКТ ХИМЕРНОГО ФЕРМЕНТА-АНТИОКСИДАНТА PSN ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОМ ПОРАЖЕНИИ ПОЧЕК

© 2020 г. Р.Г. Гончаров*, **, Г.И. Фильков**, А.В. Трофименко**, В.В. Бояринцев**, В.И. Новоселов*, **, М.Г. Шарапов*, **

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

**Московский физико-технический институт,
141700, Долгопрудный Московской области, Институтский пер., 9

E-mail: sharapov.mg@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.11.2019 г.

После доработки 03.02.2020 г.

Принята к публикации 05.02.2020 г.

Наиболее опасным этапом ишемически-реперфузионного поражения является стремительный рост концентрации свободных радикалов и активных форм кислорода на стадии реперфузии. Лавинообразный рост уровня активных форм кислорода и вторичных продуктов свободнорадикального окисления биологических макромолекул приводит к развитию окислительного стресса. Применение экзогенных антиоксидантов позволяет снизить концентрацию активных форм кислорода в пораженных тканях, подавить или скорректировать течение окислительного стресса, тем самым существенно снизить тяжесть ишемически-реперфузионного поражения. Среди большого списка патологий, вызванных ишемией—реперфузией, одной из наиболее социально значимых является ишемическая острая почечная недостаточность. На животной модели билатерального ишемически-реперфузионного поражения почек был показан нефропротекторный эффект химерного фермента-антиоксиданта PSN, состоящего из пероксиредоксина 6 человека и Mn-содержащей супероксиддисмутазы *Escherichia coli*. Благодаря наличию супероксиддисмутазной и пероксидазной активностей рекомбинантный химерный белок PSN способен нейтрализовать максимально широкий спектр активных форм кислорода. С помощью гистологических, биохимических и молекулярно-биологических методов показано, что предварительное введение химерного белка PSN перед ишемией—реперфузией способствует существенному снижению степени поражения тканей почек и приводит к быстрой нормализации их структурно-функционального состояния. Кроме того, введение фермента PSN увеличивает более чем в 1,5 раза выживаемость экспериментальных животных. Применение рекомбинантного химерного фермента PSN может быть эффективным подходом в предупреждении и лечении ишемически-реперфузионных поражений почек, а также для сохранения изолированной почки при трансплантации.

Ключевые слова: пероксиредоксин, супероксиддисмутаза, химерные ферменты, окислительный стресс, ишемия—реперфузия, почки.

DOI: 10.31857/S0006302920020180

В настоящее время хорошо известно, что ишемически-реперфузионные (И-Р) поражения являются основным фактором развития многих патологических состояний организма, которые связаны с нарушением нормального кровотока. К ним относятся такие заболевания, как шоковое поражение органов, ишемический инсульт, инфаркт миокарда, острая почечная недостаточ-

ность и др. [1, 2]. Кроме этого, многие лечебно-диагностические вмешательства связаны с И-Р-повреждением. В частности, при трансплантационной хирургии органы подвергаются частично или полному прекращению кровотока (ишемии) различной продолжительности, с последующим восстановлением кровотока — реперфузией. В ходе И-Р происходит развитие сложных взаимосвязанных патобиохимических процессов. На сегодняшний день хорошо известно, что ключевую роль в патогенезе И-Р-поражений играет окислительный стресс, который вызван гиперпродукцией активных форм кислорода (АФК), способных повреждать структурно-функцио-

Сокращения: И-Р — ишемия—реперфузия, АФК — активные формы кислорода, PSN — Prx6-MnSOD-His-tag, химерный белок, состоящий из пероксиредоксина 6 человека и Mn-содержащей супероксиддисмутазы, ПЦР — полимеразная цепная реакция, МДА — малоновый диальдегид.

нальную целостность всех метаболически активных тканей [3, 4]. В современной терапии И-Р-повреждений существует несколько подходов. Во-первых, это использование ишемического preconditionирования, вызванного кратковременным пережатием питающих сосудов, или фармакологических препаратов, вызывающих гипоксию, разобщение дыхания в митохондриях и др. [5]. Ишемическое preconditionирование способствует росту уровня АФК и компенсаторному росту уровня эндогенных антиоксидантов в тканях благодаря стимуляции различных транскрипционных факторов NIFs, NRF-2 и др., способных регулировать уровень экспрессии ферментов-антиоксидантов [6, 7]. Несомненно, ишемическое preconditionирование обладает рядом преимуществ, однако его клиническое использование ограничено из-за сложности прогноза оптимального времени ишемического preconditionирования для достижения эффективной защиты органа от И-Р-повреждения [8]. В этой связи более перспективным подходом в лечении И-Р-поражений является применение экзогенных антиоксидантов, которые нейтрализуют АФК и тем самым подавляют первопричину И-Р-поражения. В антиоксидантной терапии И-Р-поражений особую роль могут играть ферменты-антиоксиданты, так как их эффективность значительно превышает таковую для низкомолекулярных антиоксидантов [9]. Среди известных ферментов-антиоксидантов особый интерес представляют пероксиредоксины, которые способны нейтрализовать широкий спектр АФК как органической, так и неорганической природы, поэтому применение этих ферментов представляется наиболее перспективным подходом в предупреждении и лечении заболеваний, вызванных И-Р-поражениями. Так, нами была показана высокая терапевтическая эффективность рекомбинантного Prx6 при лечении травм кожи [10], ожогов верхних дыхательных путей [11], И-Р-поражении кишечника [12] и почек [13], а также был обнаружен радиопротекторный эффект этого фермента [14, 15]. Важно отметить, что среди семейства пероксиредоксинов Prx6 характеризуется наиболее широким спектром нейтрализуемых гидропероксидов, а также обладает активностью фосфолипазы A2 (aiPLA), которая играет важную роль в межклеточной сигнализации [16, 17]. Для расширения спектра нейтрализуемых АФК и усиления терапевтических свойств на основе Prx6 человека и Mn-содержащей супероксиддисмутазы *E. coli* был создан химерный белок PSN (Prx6-MnSOD-His-tag), проявляющий две антиоксидантные активности — супероксиддисмутазную и пероксидазную [18]. В настоящей работе проведено исследование нефропротекторных свойств химерного белка PSN на модели билатеральной И-Р-почек мыши. Полученные результаты могут

представлять интерес при разработке нового класса терапевтического препаратов антиоксидантного действия, для предупреждения/лечения патологий, вызванных окислительным стрессом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение ферментов. Генно-инженерная конструкция, кодирующая фермент PSN, была получена и экспрессирована ранее в клетках *E. coli* BL21(DE3) [18]. Рекомбинантный белок PSN содержит на карбоксильном конце His-tag, поэтому очистку фермента проводили с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (Thermo Fisher Scientific, США), в соответствии с рекомендациями производителя [18]. Согласно гель-электрофорезу в 10%-м полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, чистота полученного химерного фермента PSN составляла не менее 95%.

Определение пероксидазной активности. Пероксидазную активность фермента в отношении пероксида водорода (H_2O_2) и *трет*-бутилгидропероксида (*t*-BOOH) определяли по методике, подробно описанной нами ранее [19]. Пероксидазная активность рекомбинантного Prx6 в составе PSN составила 200 ± 30 нмоль/мин/мг (в отношении H_2O_2) и 90 ± 15 нмоль/мин/мг (в отношении *t*-BOOH).

Определение активности супероксиддисмутазы. Определение супероксиддисмутазной активности Mn-содержащей супероксиддисмутазы (*E. coli*) в составе химерного фермента PSN проводили с помощью готового набора реактивов — Superoxide Dismutase Assay Kit (Calbiochem, США), в соответствии с инструкцией производителя. Активность Mn-содержащей супероксиддисмутазы (*E. coli*) в составе PSN составила 17 ед./мл.

Животные. Использовали мышей-самцов линии BALB/c восьминедельного возраста с массой тела 25–30 г (виварий ИБК РАН, Пушкино). Животным обеспечивали свободный и неограниченный доступ к питьевой воде и корму, однако в течение 24 ч до хирургического вмешательства животные голодали, но получали воду.

Модель ишемически-реперфузионного поражения почек мыши. Анестезию проводили путем введения смеси Zoletil-100 (Virbac Sante Animale, Франция) и Rometar-20 (Bioveta, Чехия) внутримышечно в 0,9% растворе NaCl в концентрациях 40 и 7 мг соответственно на 1 г веса мыши. Действие анестезии длилось в течение полутора-двух часов. Операцию на животных проводили согласно процедуре, описанной ранее [20], с небольшими модификациями. После начала действия анестезии животным делали небольшие латеральные надрезы кожных и мышечных слоев с двух сторон

тела, открывая тем самым доступ к почечным артериям и венам. Далее с помощью кровоостанавливающих зажимов проводили одновременное пережатие левых и правых почечных артерий и вен, что приводило к блокированию притока и оттока крови к тканям почек, т. е. ишемии. Внешним признаком начала ишемии является изменение цвета почки с бледно-розового до темно-пурпурного. Ишемия длилась в течение 30 мин, после чего снимали зажимы для восстановления притока и оттока крови (стадия реперфузии). Внешним признаком начала реперфузии является изменение цвета почек с темно-пурпурного до бледно-красного. Латеральные разрезы зашивали и обрабатывали антисептиком. После операции животные были обеспечены кормом и водой *ad libitum*. Спустя 24 и 72 ч животных умерщвляли декапитацией и проводили забор почек, которые делили на три равные части согласно схеме, описанной в работе [21].

Для проверки терапевтического действия раствор рекомбинантного PSH вводили через хвостовую вену в конечной концентрации 20 мкг/г массы мыши за 15 мин до начала ишемии. Подбор способа введения и концентрации раствора белка осуществляли на основе предыдущих исследований [13–15, 22].

Гистологический анализ почечной ткани. Ткани почки фиксировали в 10%-м растворе формальдегида, затем образцы дегидратировали в повышающемся градиенте этанола и заключали в парафин. С помощью микротомы (Thermo Electron Corporation, США) готовили парафиновые срезы толщиной 3 мкм. Полученные срезы окрашивали гематоксилин-эозином (Biovitrum, Россия). Гистологический анализ проводили с использованием микроскопа Leica DM6000 (Leica, Германия). Для каждого гистологического образца проводили анализ 15–20 полей трех различных срезов при увеличении 200–500×.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Для оценки времени циркуляции экзогенного PSH в крови животного 1 мг PSH вводили внутривенно трем самцам мышей *BALB/c* с последующим отбором крови (~ 50 мкл) из хвостовой вены через 10, 60, 120 и 240 мин для анализа изменения содержания PSH в системном кровотоке. Экзогенный рекомбинантный PSH содержит метку His-tag на C-конце, которая позволяет специфически отслеживать присутствие рекомбинантного белка. Для определения уровня индукции каспазы-3 в тканях почек проводили отбор ~ 40 мг ткани у контрольных и опытных животных до И-Р-поражения и спустя 24–72 ч после И-Р-поражения. Образцы белков почек и сыворотки крови проводили в денатурирующих условиях (в присутствии SDS) по стандартной методике Лэммли на оборудовании Mini Vertical Unit (Amersham,

США). В работе использовали 5%-й концентрирующий и 10%-й разделяющий полиакриламидные гели. Белки, разделенные в полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0.45 мкм Hybond-C (Amersham, США) с помощью прибора для полусухого переноса TRANS-BLOT SD (Bio-Rad, США). Были использованы следующие первичные антитела: моноклональные антитела кролика против His-tag (1:1000, #12698, Cell Signaling technology, США); моноклональные антитела кролика против Caspase 3 (1:1000, 9H19L2, Thermo Fisher Scientific, США); антитела кролика против Actin-β (1 : 1000, #4967, Cell Signaling, США). Использовали вторичные антитела против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (1:1000, P-GAR Iss, IMTEK, Россия). Все процедуры в процессе иммуноблоттинга проводили в соответствии с рекомендациями производителей. Белки выявляли, используя диаминобензидин (Amresco, США), денситометрический анализ осуществляли, применяя программное обеспечение ImageJ (www.imagej.nih.gov). Данные были нормированы относительно β-актина.

Анализ уровня экспрессии генов в почечной ткани. Уровень экспрессии генов определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с этапом обратной транскрипции. Общую РНК из образцов ткани получали с помощью реактива ExtractRNA («Евроген», Россия). Качество РНК оценивали элетрофоретически в 2%-м агарозном геле. Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000c (Thermo Fisher Scientific, США). Для обратной транскрипции использовали по 2 мкг общей РНК, обратную транскриптазу MMLV и стандартный олигонуклеотид dT₁₅ («Евроген», Россия). Полученную кДНК использовали для ПЦР с ген-специфическими олигонуклеотидами (табл. 1).

ПЦР в реальном времени проводили с помощью аплификатора DTLite («ДНК-Технология», Россия) с использованием набора qPCRmix-HS SYBR («Евроген», Россия), где в качестве флуоресцентного интеркалирующего красителя используется SYBR Green II. Режим ПЦР: (1) – «горячий старт» при 95°C, 5 мин; (2) – денатурация при 95°C, 15 с; (3) отжиг праймеров и синтез ДНК при 60°C, 30 с. Этапы (2) и (3) повторяли 40 раз. Определение значений порогового цикла – *Ct* – проводили с помощью программного обеспечения DTmaster (ДНК-Технология, Россия). Нормирование проводили относительно гена цитоскелетного бета-актина (*Actb*). Расчет $\Delta\Delta Ct$ проводили по формуле $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (Контроль) – ΔCt (опыт); каждое значение ΔCt рассчитывали по формуле $\Delta Ct = Ct$ (исследуемый ген) – *Ct* (*Actb*) [23].

Таблица 1. Ген-специфические олигонуклеотиды для ПЦР в реальном времени

№	Наименование	Последовательность олигонуклеотида 5' – 3' (F+R)	Размер, п.н.	# GenBank
1	bAct	CCTTCCTTCTTGGGTATGGAATCC CACCAGACAGCACTGTGTTGGCA	115	NM_007393.4
2	CASP3	AAGGAGCAGCTTTGTGTGTG GAAGAGTTTCCGGCTTTCCAG	145	NM_009810
3	eNOS	GAACCTGAGGGTGCCCAG TCCGATTCAACAGTGTCTCCT	71	NM_021838.2
4	iNOS	GCTACACTTCCAACGCAACA CATGGTGAACACGTTCTTGG	115	NM_012611.3
5	IL-6	TAGTCCTTCCCTACCCCAATTTCC TTGGTCCCTTAGCCACTCCTTC	76	NM_031168
6	IL-18	GTGTTCCAGGACACAACAAG CTTCCTTTTGGCAAGCAAGA	74	NM_008360.1
7	NF-κB	CCACGCTCAGCTTGTGAGGGAT GGCCAAGTGCAGAGGTGTCTGAT	106	NM_008689
8	KIM-1	CTCGCTGGA AAAAAGAAGTG CCGTCCAGGAGTTCAGAGG	240	NM_010902

Определение уровня малонового диальдегида в тканях почек. Определение уровня малонового диальдегида (МДА) проводили по стандартной методике с использованием тиобарбитуровой кислоты. К 20–30 мг ткани почек последовательно добавляли 450 мкл 1% H_3PO_4 и 150 мкл 0,8% тиобарбитуровой кислоты и гомогенизировали с использованием тефлонового пестика. Затем смесь нагревали на кипящей водяной бане в течение 45 мин. После охлаждения добавляли 380 мкл *n*-бутанола и тщательно перемешивали. Отделяли слой *n*-бутанола путем центрифугирования. Оптическую плотность водной фракции определяли с помощью прибора Multiskan (Labsystem Plus, Финляндия), длина волны 546 нм.

Биохимический анализ крови. Отбор крови осуществляли у контрольных и опытных животных, который проводили до И-Р-поражения и спустя 24–72 ч после И-Р-поражения почек. Биохимический анализ крови проводили на биохимическом экспресс-анализаторе Reflotron Plus (Roche Diagnostics, Швейцария) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистическая обработка. Статистический анализ выполняли с использованием программы SigmaPlot 11 (Systat Software Inc, США). Результаты выражали как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Внутригрупповые статистические различия определяли с помощью одностороннего анализа ANOVA, а статистическую значимость между отдельными экспериментальными группами — с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента. Значение $P < 0.05$ принимали как статистически достоверное различие.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка времени циркуляции рекомбинантного PSH в кровотоке животных. Для доказательства того, что терапевтический эффект PSH при И-Р-поражении почки определялся его присутствием в органах животного, с помощью иммуноблоттинга была проведена оценка изменения содержания рекомбинантного фермента PSH в сыворотке крови животных после внутривенного введения (рис. 1).

Результаты показали, что в первый час после внутривенного введения PSH в крови животного присутствует более 80% от исходного количества вводимого белка. С течением времени количество экзогенного фермента PSH в сыворотке крови животных снижается и через три часа уменьшается примерно в 1,6 раза. Таким образом, экзогенный рекомбинантный фермент PSH присутствует в крови животного в течение всего ишемического периода (30 мин) в количестве не менее 80–90%, а при последующей реперфузии, по крайней мере в течение первых четырех часов реперфузионного периода значительная часть введенного фермента циркулирует в периферической крови. Ранее было показано, что начальным периодом повреждения почек при И-Р-поражении являются первые четыре-шесть часов [24], а своего пика степень повреждений достигает спустя 24 ч после И-Р, что является хорошим критерием для оценки защитных свойств рекомбинантного фермента.

Выживаемость животных после ишемически-реперфузионного поражения и предварительного введения PSH. На первом этапе работы была исследована выживаемость животных в течение пяти

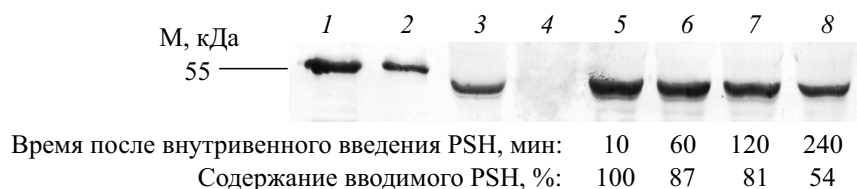


Рис. 1. Иммуноблоттинг сыворотки крови мышей после внутривенного введения PSH: 1, 2 — чистый препарат рекомбинантного PSH (500 и 100 нг соответственно); 3, 4 — плазма крови контрольных животных с добавленным к ней препарата рекомбинантного PSH; 5 — плазма крови контрольных животных, не получавших инъекцию рекомбинантного PSH; 5–8 — пробы плазмы крови мыши спустя 10, 60, 120 и 240 мин после внутривенного введения 1 мг PSH.

суток после И-Р-поражения обеих почек и предварительного введения PSH за 15 мин до начала тридцатиминутной ишемии (рис. 2).

Показано, что спустя 72–120 ч в группе с И-Р и без предварительного введения рекомбинантного фермента антиоксиданта выживаемости животных составила 20% (рис. 2). В группе с предварительным введением PSH процент выживаемости за тот же период увеличился в 1,7 раза по сравнению с И-Р-группой. Полученные результаты демонстрируют, что критическим периодом для выживания животных являются первые 72 ч после И-Р-поражения обеих почек.

Морфологический анализ почек после ишемически-реперфузионного поражения и предварительного введения PSH. Для оценки морфологических изменений в почечной ткани после И-Р и предварительного введения (за 15 мин) рекомбинантного фермента PSH перед тридцатиминутной ишемией и последующей реперфузией (24–72 ч) был проведен гистологический анализ тканей (рис. 3).

Гистологический анализ срезов ткани почек контрольной группы показал, что тридцатиминутная ишемия и последующая 24-часовая реперфузия почек мышей приводят к полнокровию интерстиция и капиллярных петель клубочков. Целостность клубочков нефрона не нарушена, однако наблюдается увеличение их размеров. В эпителии почечных канальцев, обнаружены выраженные дистрофические повреждения, с разрушением апикальных отделов эпителиоцитов. В некоторых извитых канальцах отмечен некроз и десквамация клеток канальцевого эпителия. Просвет канальцев при этом был заполнен белковым детритом (рис. 3б). Через 72 ч после восстановления кровотока в почках сохранялось умеренное полнокровие капиллярных петель клубочков. В эпителии извитых канальцев выявлена баллонная дистрофия с деструкцией апикальных отделов клеток. Отчетливая эозинофилия цитоплазмы эпителиальных клеток, вероятно, связана с массовой денатурацией белков. Расширенные просветы извитых канальцев почек были обусловлены деструктивными изменениями клеток эпителия (рис. 3д). Дистрофические изменения,

но без клеточной деструкции отмечены и в эпителии прямых канальцев.

Введение фермента PSH за 15 мин до тридцатиминутной ишемии и последующая 24-часовая реперфузия также приводят к полнокровию капиллярных петель клубочков и интерстиции почечной ткани. Однако целостность клубочков нефрона не нарушена, хотя отмечается увеличение в размерах. Наблюдаются дистрофические и деструктивные изменения эпителия извитых и прямых канальцев (рис. 3в). Через 72 ч сохраняется полнокровие капиллярных петель клубочков и интерстиция, однако дистрофия извитых и прямых канальцев ниже, чем двумя сутками ранее. В просвете извитых канальцев наблюдается скопление белковых масс, а выстилающий их эпителий уплощен с выраженной гидропической дистрофией и умеренной деструкцией эпителиальных клеток (рис. 3е). Суммарные результаты гистологического анализа почечной ткани после И-Р и предварительного введения PSH перед И-Р представлены в табл. 2.

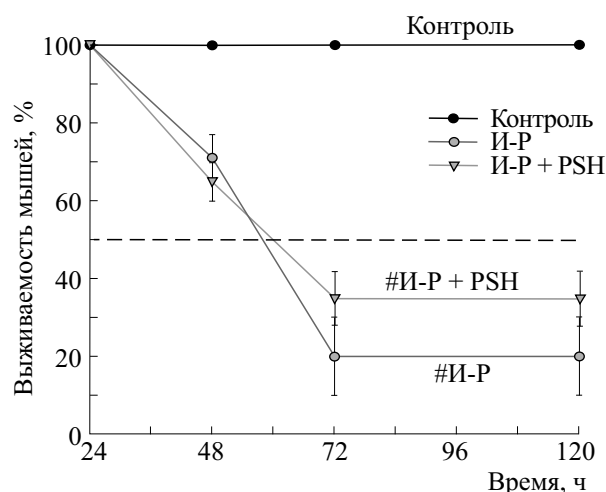


Рис. 2. Выживаемость мышей в течение пяти суток после тридцатиминутной ишемии обеих почек и последующей реперфузии, а также после предварительного введения рекомбинантного фермента PSH за 15 мин до ишемии.

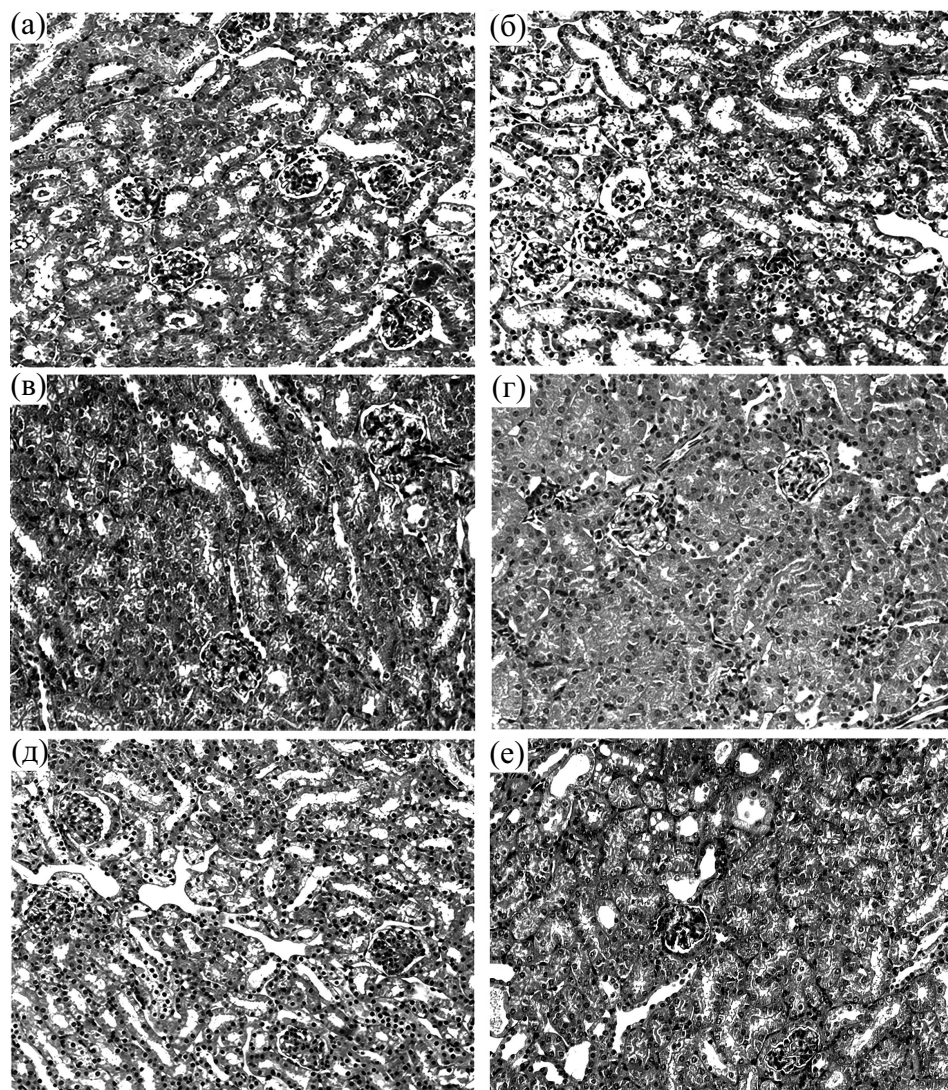


Рис. 3. Структура коркового слоя почки мыши после ишемии-реперфузии и предварительного введения рекомбинантного PSH. (а) — Интактный контроль; (б) — 30-минутная ишемия, реперфузия — 24 ч, без лечения; (в) — внутривенное введение PSH (е) за 15 мин до 30-минутной ишемии, реперфузия — 24 ч; (г) и (д) — 30-минутная ишемия, реперфузия — 72 ч, без лечения; (е) — внутривенное введение PSH (е) за 15 мин до 30-минутной ишемии, реперфузия — 72 ч. Окраска: гематоксилин-эозин; $n = 10$ для каждой из групп.

На основании гистологического анализа коркового слоя почки спустя 24 и 72 ч после И-Р можно заключить, что использование рекомбинантного фермента PSH за 15 мин до тридцатиминутной ишемии по сравнению с контрольной группой И-Р без лечения снижает поражение почечной ткани, способствуя ее более быстрому восстановлению у выживших животных.

Биохимический анализ крови животных после ишемически-реперфузионного поражения и предварительного введения PSH. Важным параметром нормальной работы почек является их экскреторная функция. Общепринятыми биохимическими маркерами, позволяющими оценить нормальное функционирование почки, являются концентра-

ции мочевины и креатинина в крови [25]. Данные показатели являются важными критериями оценки терапевтической эффективности предварительного введения рекомбинантного PSH перед И-Р. Оценку уровней мочевины и креатинина в крови животных проводили в течение трех последующих суток после И-Р (табл. 3. и 4).

Спустя 24 ч после И-Р наблюдается увеличение концентрации мочевины в крови примерно в пять раз, а креатинина — более чем в шесть раз по сравнению с интактной группой (табл. 3 и 4). Аналогичный результат с использованием похожей животной модели был получен в работах других авторов [26, 27]. В группе с предварительным введением PSH концентрация мочевины в крови

Таблица 2. Оценка морфометрических параметров тканей почек после И-Р и предварительного введения химерного фермента-антиоксиданта PSH перед И-Р

Параметр	Контроль		И-Р		PSH	
	24 ч	72 ч	24 ч	72 ч	24 ч	72 ч
Расширение капсулы Боумена	—	—	+	+	+	++
Полнокровие интерстиция	—	—	++	++	++	++
Интерстициальный инфильтрат	—	—	+	+	+	+
Застой в кровеносных сосудах	—	—	++	++	++	+
Дистрофия извитых канальцев	—	—	++	++	++	+
Дистрофия прямых канальцев	—	—	++	++	++	+
Расширение извитых канальцев	—	—	+	+	+	++
Десквамация клеток эпителия	—	—	++	++	++	+
Разрушение эпителиоцитов	—	—	++	++	++	+

Примечание. Гистологические изменения оценивались по шкале: (—) — нормальные, (+) — легкие изменения, (++) — средние изменения, (+++) — заметные изменения; $n = 10$ для каждой из групп.

Таблица 3. Концентрация мочевины в крови животных в течение трех суток после И-Р-поражения обеих почек

Группа животных	Концентрация мочевины, мг/дл		
	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль	57 ± 9	54 ± 7	56 ± 8
И-Р	$290 \pm 40^*$	$140 \pm 10^*$	90 ± 10
И-Р + PSH	$220 \pm 30^*$	$120 \pm 10^*$	70 ± 10

Примечание. $n = 50$ для каждой из групп, *— $p < 0.05$ относительно интактного контроля.

Таблица 4. Концентрация креатинина в крови мыши в течение трех суток после И-Р поражения обеих почек

Группа животных	Концентрация креатинина, мг/дл		
	24 ч	48 ч	72 ч
Контроль	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.02
И-Р	$1.8 \pm 0.3^*$	$1.1 \pm 0.3^*$	$0.7 \pm 0.2^*$
И-Р + PSH	$1.55 \pm 0.2^*$	$0.7 \pm 0.2^*$	$0.6 \pm 0.1^*$

Примечание. $n = 50$ для каждой из групп, *— $p < 0.05$ относительно интактного контроля.

примерно на 25%, а креатинина — на 15–20% ниже, чем в контрольной группой без лечения. Спустя 48 ч после И-Р во всех группах отмечается заметное снижение концентрации мочевины и креатинина в крови животных на 40–50%. Через 72 ч количество мочевины в крови выживших животных во всех группах стабилизируется на значениях чуть выше физиологической нормы. Таким образом, предварительное введение рекомбинантного PSH за 15 мин до тридцатиминутной ишемии способствует сохранению экскреторной функции почек на протяжении трех суток реперфузионного периода у выживших животных.

Уровень малонового диальдегида в ткани почки после ишемически-реперфузионного поражения и предварительного введения PSH. Известно, что при окислительном стрессе под действием АФК происходит модификация/повреждение всех биологических макромолекул, в том числе перекисное окисление липидов мембран клеток. Одним из конечных продуктов перекисного окисления липидов является малоновый диальдегид [4]. Был проведен анализ содержания МДА в тканях почек животных спустя 24 ч после И-Р и предварительного введения PSH (табл. 5).

Показано, что И-Р-поражение приводит к десятикратному увеличению концентрации МДА в

Таблица 5. Содержание малонового диальдегида в тканях почек животных после И-Р и предварительного введения фермента PSH перед И-Р

Группа животных	Концентрация МДА в ткани почки, нмоль/г
Контроль	197 ± 40
И-Р	2000 ± 300*
И-Р + PSH	600 ± 100*#

Примечание. $n = 5$ для каждой из групп, *— $p < 0.05$ относительно интактного контроля, # — И-Р.

Таблица 6. Изменение уровня экспрессии генов спустя 24 ч после И-Р-поражения относительно интактных животных

Ген	Изменение уровня экспрессии относительно контроля		
	Контроль	И-Р	И-Р + PSH
AP-1	1.0	7.5 ± 0.8	3.5 ± 0.8*#
Casp-3	1.0	4.5 ± 0.7	3.0 ± 0.5*
NRF-2	1.0	7.5 ± 0.8	2.5 ± 0.5*#
NF-κB	1.0	5.5 ± 0.7	3.5 ± 0.7*
IL-6	1.0	2.5 ± 0.8	2.5 ± 0.5*
IL-18	1.0	7.0 ± 1.0	0.7 ± 0.3#
iNOS	1.0	14.0 ± 3.0	3.0 ± 0.5*#
eNOS	1.0	22.0 ± 4.0	3.0 ± 1.0*#
KIM-1	1.0	106 ± 30	75 ± 15*

Примечание. $n = 5$ для каждой из групп, *— $p < 0.05$ относительно интактного контроля, # — И-Р.

почечной ткани в первые сутки реперфузионного периода, в то время как предварительное введение PSH снижает образование МДА в почечной ткани в 3.0–3.5 раза. Таким образом, внутривенное введение PSH за 15 мин до тридцатиминутной ишемии снижает уровень перекисного окисления липидов в почечной ткани, что, вероятно, связано с подавлением процессов окислительного стресса в пораженных тканях почки.

Оценка экспрессии генов в тканях почек после ишемически-реперфузионного поражения и предварительного введения PSH. Для понимания молекулярных механизмов защитного действия экзогенного PSH был проведен анализ изменения уровня экспрессии некоторых маркерных генов (табл. 1). В табл. 6 представлены данные по изменению уровня экспрессии некоторых маркерных генов в тканях почек спустя сутки после И-Р и предварительном введении PSH. Необходимо отметить, что в табл. 6 представлены данные по генам, уровень которых достоверно изменялся. Также важно отметить, что спустя 48–72 ч после И-Р значения экспрессии генов нормализуются, приближаясь к значениям у интактных животных (данные не показаны).

Молекула почечного повреждения-1 (KIM-1), гликопротеин клеточной мембраны I типа, явля-

ется общепризнанным чувствительным маркером почечного повреждения [28]. Действительно, анализ изменения уровня экспрессии KIM-1 в группах с И-Р показал его значительный рост более чем в 100 раз, что указывает на повреждения в ткани почки спустя 24 ч после тридцатиминутной ишемии. В группе с предварительным введением PSH уровень KIM-1 на 20–30% ниже, чем в контрольной группе И-Р без предварительной инъекции фермента. Это доказывает, что предварительное введение PSH перед И-Р-поражением способно уменьшать повреждение почек.

Транскрипционный фактор NRF2 является основным транскрипционным фактором, который регулирует уровень экспрессии генов антиоксидантного ответа, тем самым он играет ключевую роль в поддержании редокс гомеостаза тканей. Кроме того, NRF2 взаимодействует с другими редокс-чувствительными транскрипционными факторами NF-κB и AP-1, тем самым оказывая влияние на их транскрипционную активность и клеточные процессы, которые они регулируют [29]. Как отмечалось ранее, И-Р сопровождается лавинообразным ростом уровня АФК в пораженных тканях, что индуцирует активацию NRF2 [30]. При И-Р-поражении обеих почек мышей в контрольной группе наблюдается рост экс-

прессии NRF2 (в семь с половиной раз). Активация транскрипционного фактора NRF-2 при И-Р-поражении почек свидетельствует об увеличении уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты антиоксиданты, за счет взаимодействия с цис-регуляторным элементом ARE (antioxidant responsive element). Предварительное введение PSH перед И-Р уменьшает уровень индукции NRF-2 примерно на 30% в сравнении с контрольной группой, что доказывает нормализацию окислительно-восстановительного гомеостаза тканей по сравнению с контрольной группой И-Р без лечения.

Одним из ключевых транскрипционных факторов, участвующих в поддержании нормального гомеостаза в клетке в стрессовых условиях является транскрипционный фактор NF-κB [31]. Уровень экспрессии транскрипционного фактора NF-κB при И-Р-поражении повышен более чем в пять раз, что свидетельствует о запуске процессов регенерации клеток. На фоне повышенных значений NF-κB можно отметить заметное увеличение уровня экспрессии генов IL-6 (в два с половиной раза) и IL-18 (в семь раз), что, вероятно, свидетельствует о стимуляции иммунного ответа. Предварительное введение ферментов PSH уменьшает уровень NF-κB более, чем на 30% в сравнении с контрольной И-Р группой без лечения. Снижение уровня экспрессии NF-κB после введения PSH, возможно, связано со снижением уровня АФК в клетках почки. Было показано, что некоторые антиоксиданты (L-цистеин, N-ацетилцистеин, тиолы, витамин Е и его производные) способны блокировать активацию NF-κB [32], возможно, что PSH благодаря супероксиддисмутазной и пероксидазной активности оказывает аналогичное действие. Интересно отметить, что введение PSH перед И-Р вызывает подавление экспрессии NF-κB и IL-18, но при этом способствует росту уровня IL-6 по сравнению с И-Р-группой. Известно, что IL-6 может оказывать не только провоспалительный эффект, но также может стимулировать регенеративные процессы в клетке [33].

Уровень экспрессии генов синтаз оксида азота (индуцибельной iNOS и эндотелиальной eNOS) при И-Р-поражении существенно увеличен: iNOS в 14 раз, а eNOS — в 22 раза, что приводит к адаптивному росту уровня NO в крови [34]. В ряде работ отмечена важная роль оксида азота (NO) в уменьшении сосудистого тромбообразования во время реперфузионного периода. Кроме того, NO препятствует миграции и слипанию моноцитов в сосудах, регулирует канальцево- клубочковую обратную связь в почках, что приводит к изменению соотношения тонуса приносящих и выносящих артериол клубочка, экскреции натрия и регуляции уровня ангиотензина, который является важным элементом в ренин-ангиотензин-альдостероновой системе, посредством которого происхо-

дит регуляция сосудистого тонуса [35]. При предварительном введении рекомбинантного фермента PSH не наблюдается такого резкого роста iNOS и eNOS, хотя и отмечается их повышение относительно контрольной группы примерно в три раза. Снижение активации iNOS и eNOS может быть связано с подавлением активности NF-κB под действием PSH [36].

Исследование уровня экспрессии транскрипционного фактора AP-1 (регулирующего апоптоз клеток) в почечной ткани показало, что в группе с И-Р наблюдается увеличение уровня экспрессии более чем в семь раз. В тех же группах наряду с повышенным уровнем AP-1, наблюдается увеличение уровня эффекторной каспазы-3 (Casp-3) примерно в 3.5–4.0 раза. Это увеличение может быть связано с тем, что в почечной ткани наблюдается повышение гибели клеток по апоптотическому/некротическому пути. В группах с предварительным введением PSH уровень экспрессии AP-1 и Casp-3 увеличен примерно в 3.0–3.5 раза, что на 30–40% ниже, чем в группе с И-Р без предварительного PSH.

Для подтверждения того, что повышение уровня экспрессии каспазы-3, действительно, связано с ее индукцией в клетках почечной ткани и запуском апоптоза при И-Р поражении, был проведен иммуноблоттинг тканей почек спустя 24 ч после И-Р и предварительного введения PSH перед И-Р (рис. 4.)

Показано, что в группе с И-Р без предварительного введения PSH наблюдается повышенный уровень активации каспазы-3 (примерно в 2.5–3.0 раза по сравнению с интактной группой). Эти результаты указывают на увеличение апоптотической гибели клеток в почечной ткани. Предварительное введение PSH перед И-Р подавляет активацию каспазы-3 в клетках ткани примерно на 30%, что приводит к снижению гибели клеток и сохранению структурной целостности почечной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что предварительное введение рекомбинантного химерного фермента антиоксиданта PSH за 15 мин до тридцатиминутной ишемии способно уменьшить степень И-Р-поражения почки. Это приводит к снижению смертности животных и сохранению морфофизиологических параметров тканей почек. Нефропротекторный эффект PSH обусловлен наличием пероксидазной и супероксиддисмутазной активностей, которые позволяют химерному ферменту антиоксиданту нейтрализовать окислительный стресс, развивающийся при И-Р-поражении. Кроме того, терапевтический эффект может быть обусловлен участием PSH в сигнально-регуляторных путях клетки [15,

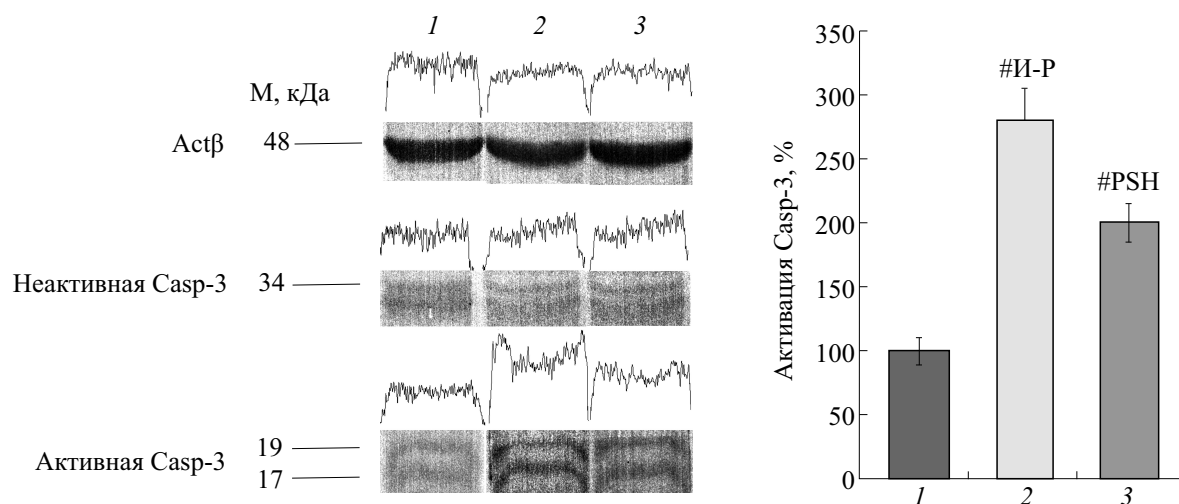


Рис. 4. Иммуноблоттинг почечной ткани для Actβ и Casp-3 после тридцатиминутной ишемии и предварительного введения фермента PSH за 15 мин перед тридцатиминутной ишемией с последующей 24-часовой реперфузией: 1 – интактные мыши; 2 – ишемия – 30 мин, реперфузия – 24 ч, без лечения; 3 – внутривенное введение PSH. Данные нормализованы по Actβ. Уровень активации Casp-3 определялся отношением pro-Casp-3 (35 кДа) к расщепленной Casp-3 (17–19 кДа). $n = 5$ для каждой из групп, # – $p < 0.05$.

37]. Полученные данные коррелируют с данными о протекторной роли PSH в условиях окислительного стресса на моделях ретроградной перфузии изолированного сердца [38].

Применение химерных антиоксидантных ферментов, в частности PSH, может быть перспективным подходом в предупреждении и лечении ишемически-реперфузионных поражений [39]. Известно, что длительное применение белковых препаратов может привести к иммунологическим реакциям, поэтому на практике наиболее вероятно кратковременное применение рекомбинантного фермента PSH при острой фазе И-Р-поражений. Мы предполагаем, что наиболее перспективным подходом может быть использование PSH в составе перфузионных сред для сохранения изолированной почки при трансплантации, что требует проведения дополнительных исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 17-04-00356-а, 19-04-00080-а) и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с международно-правовыми нормами, указанными в Европейской конвенции ETS №123 «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [40], и «Руководством по работе с лабораторными животными ИБК РАН» № 57 от 30.12.2011 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Cadenas, Free Radic. Biol. Med. **117** (11), 76 (2017).
2. S. Uchino, J. A. Kellum, R. Bellomo, et al., JAMA **294** (7), 813 (2005).
3. D. N. Granger and P. R. Kvietys, Redox Biol. **6**, 524 (2015).
4. E. Y. Plotnikov, A. V. Kazachenko, M. Y. Vyssokikh, et al., Kidney Int. **72** (12), 1493 (2007).
5. Y. E. Yoon, K. S. Lee, K. H. Choo, et al, PLoS One **10** (4), 1 (2015).
6. И. В. Зарубина, А. В. Горяинов и П. Д. Шабанов, Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии **8** (2), 3 (2010).
7. M. Scortegagna, K. Ding, Y. Oktay, et al., Nature Genetics **35** (4), 331 (2003).
8. P. P. Kapitsinou and V. H. Haase, Am. J. Physiol. Renal Physiol. **309** (10), 821 (2015).
9. Е. Б. Меньщикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков и др., *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты* (Слово, М., 2006).
10. В. И. Новоселов, В. К. Равин, М. Г. Шарапов и др., Биофизика **56** (5), 873 (2011).
11. A. G. Volkova, M. G. Sharapov, V. K. Ravin, et al, Russian Pulmonology **6** (2), 84 (2017).

12. A. E. Gordeeva, A. A. Temnov, A. A. Charnagalov, et al., *Digestive Dis. Sci.* **60** (12), 3610 (2015).
13. R. G. Goncharov, K. A. Rogov, A. A. Temnov, et al., *Cell Tissue Res.* **378** (2), 319 (2019).
14. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, E. E. Fesenko, et al., *Free Radic. Res.* **51** (2), 148 (2017).
15. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, and S. V. Gudkov, *Antioxidants* **8** (1), 15 (2019).
16. Y. Manevich, T. Shuvaeva, C. Dodia, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **485** (2), 139 (2009).
17. I. V. Peshenko and H. Shichi, *Free Radic. Biol. Med.* **31** (3), 292 (2001).
18. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, and V. K. Ravin, *Biochemistry* **81**, 420 (2016).
19. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, and V. K. Ravin, *Mol. Biol. (Moscow)* **43** (3), 465 (2009).
20. Q. Wei and Z. Dong, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **303** (11), 1487 (2012).
21. S. Kuure, *Kidney Development* **886**, 147 (2012).
22. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, N. V. Penkov, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **134**, 76 (2019).
23. T. D. Schmittgen and K. J. Livak, *Nature Protocols* **3** (6), 1101 (2008).
24. P. Williams, H. Lopez, D. Britt, et al., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **37** (1), 1 (1997).
25. S. Gowda, P. B. Desai, S. S. Kulkarni, et al., *North Am. J. Med. Sci.* **2** (4), 170 (2010).
26. E. E. Hesketh, A. Czopek, and M. Clay, *Visual. Exp. J.*, **15** (88), 1 (2014).
27. T. M. Yu, K. Palanisamy, K. T. Sun, et al., *Sci. Rep.* **6** (7), 1 (2015).
28. J. V. Bonventre, *Trans. Am. Clin. Climatol. Ass.* **125**, 293 (2014).
29. Е. Б. Меньшикова, В. О. Ткачѳв и Н. К. Зенков, *Молекуляр. биология* **44** (3), 389 (2010).
30. M. A. Aminzadeh, S. B. Nicholas, and K. C. Norris, *Nephrol. Dialysis Transpl.* **28** (8), 2038 (2013).
31. B. Pires, R. Silva, G. Ferreira, et al., *Genes* **9** (1), 24 (2018).
32. Y. Yamamoto, M. J. Yin, and R. B. Gaynor, *J. Biol. Chem.* **274** (38), 27307 (1999).
33. J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1813** (5), 878 (2011).
34. E. G. Shesely, N. Maeda, H. S. Kim, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** (97), 13176 (1996).
35. T. Ishimura, F. Fujisawa, S. Isotani, et al., *Transplant. Int.* **15**, 635 (2002).
36. T. Wang, X. Zhang, and J. J. Li, *Immunopharmacol. Int.* **2** (11), 1509 (2002).
37. M. G. Sharapov, V. K. Ravin, and V. I. Novoselov, *Mol. Biol. (Moscow)* **48** (4), 600 (2014).
38. Е. В. Карадулева, Э. К. Мубаракшина, М. Г. Шар-
пов и др., *Бюл. эксп. биол. мед.* **160** (11), 584 (2015).
39. A. V. Maksimenko and A. V. Vavaev, *Heart Int.* **7** (3), 14 (2012).
40. European convention for the protection of vertebrate
animals used for experimental and other scientific pur-
poses, *Cets* **170**, 123 (1986).

Protective Effect of Chimeric PSH Antioxidant Enzyme in Renal Ischemia-Reperfusion Injury

R.G. Goncharov*, **, G.I. Filkov, A.V. Trofimenko**, V.V. Boyarintsev**,
V.I. Novoselov*, **, and M.G. Sharapov*, ****

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

***Moscow Institute of Physics and Technology, Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700 Russia*

The most dangerous stage of ischemia-reperfusion injury is a rapid increase in the concentration of free radicals and reactive oxygen species at the reperfusion stage. An avalanche-like increase in the level of reactive oxygen species and secondary products of free radical oxidation of biological macromolecules leads to the development of oxidative stress. The use of exogenous antioxidants can reduce the concentration of reactive oxygen species in the affected tissues, suppress or correct the course of oxidative stress, thereby significantly reducing the severity of ischemia-reperfusion injury. A comprehensive list of pathologies associated with ischemia-reperfusion includes ischemic acute renal failure which is one of the most important social problems. An animal model of bilateral ischemia-reperfusion renal injury was used to show the nephroprotective effect of the chimeric antioxidant enzyme PSH which included human peroxiredoxin 6 and the *Escherichia coli* Mn-containing superoxide dismutase. Because of the presence of superoxide dismutase and peroxidase activities, the recombinant chimeric protein PSH is able to neutralize as wide a range of reactive oxygen species as possible. Using histological, biochemical, and molecular biological methods, it has been shown that the preliminary administration of the PSH chimeric protein before ischemia-reperfusion significantly reduces the degree of renal tissue injury leading to a quick normalization of their structural and functional state. In addition, the introduction of the PSH enzyme increases the survival of experimental animals by a factor of more than 1.5. The use of the recombinant chimeric PSH enzyme can be an effective approach in the prevention and treatment of renal ischemia-reperfusion injury, as well as for maintaining an isolated kidney during transplantation.

Keywords: peroxiredoxin, superoxide dismutase, chimeric enzymes, oxidative stress, ischemia-reperfusion, kidney