

ЭКСПРЕССИЯ КАСПАЗЫ-3 И УРОВЕНЬ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ РЕПЕРФУЗИОННОМ СИНДРОМЕ НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6

© 2017 г. А.В. Кубышкин, С.В. Новоселов*, И.И. Фомочкина, В.З. Харченко, А.А. Писарев, А.Е. Гордеева*, А.А. Бекетов, А.В. Кочкина*, М.И. Федосов, Л.В. Анисимова, Р.Г. Гончаров*

Медицинская академия имени С.И. Георгиевского Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского, 295051, Симферополь, Республика Крым, бульвар Ленина, 3

E-mail: scipro@csmu.strace.net

*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: novoselov-vi@rambler.ru

Поступила в редакцию 19.04.17 г.

Ишемически-реперфузионное повреждение представляет собой серьезную проблему, патогенетические механизмы которой требуют расшифровки и поиска возможных путей коррекции. Целью работы являлось изучение содержания цитокинов, экспрессии проапоптотических белков, включая каспазу-3, при экспериментальном ишемически-реперфузионном повреждении, а также анализ эффективности применения пероксиредоксина 6. Исследования проведены на 56 белых крысах-самцах линии Wistar массой 180–200 г, у которых моделировали ишемически-реперфузионное повреждение путем наложения жгутов на обе задние конечности. Изучали провоспалительные цитокины в сыворотке крови, проводили анализ экспрессии каспазы-3 в клетках сосудов, легких и почек после ишемически-реперфузионного повреждения и на фоне превентивного введения пероксиредоксина 6. Установлено, что развитие ишемически-реперфузионного повреждения сопровождается активацией продукции провоспалительных цитокинов в крови крыс: максимальные значения интерлейкина-1 β , почти в 10 раз превышающие контроль, отмечены к 12 часам реперфузии. Ишемически-реперфузионное повреждение сопровождается увеличением каспазы-3 в клетках сосудов конечностей и легкого крыс через 6 ч после реперфузии. Введение пероксиредоксина 6 нейтрализует окислительный стресс прежде всего в сосудах лап, уменьшая степень разрушения тканей сосудов задних конечностей, что следует рассматривать в качестве цели для терапии ишемически-реперфузионного повреждения.

Ключевые слова: ишемия-реперфузия, цитокины, каспаза-3, пероксиредоксин 6.

Ишемически-реперфузионное повреждение (И/Р) является одним из наиболее актуальных предметов обсуждения современной медицины, поэтому патогенетические механизмы его развития и возможные пути их коррекции требуют тщательного изучения [1–3]. Синдром ишемии-реперфузии представляет собой серьезную проблему, поскольку вызывает как локальное повреждение, так и негативное дистантное влияние, обусловленное воспалительными реакциями и окислительным стрессом [4,5]. Установлено, что в качестве органов-мишеней при И/Р выступают легкие, сердце, мозг, печень, почки и сосуды, однако молекулярные механизмы их

повреждений на сегодняшний день изучены недостаточно хорошо.

Согласно современным данным, при синдроме ишемии-реперфузии могут активироваться каскадные воспалительные реакции, которые в тяжелых ситуациях приводят к поражению органов-мишеней, запускают локальный некроз/некроптоз и апоптоз [6,7]. В настоящее время считается, что гибель клеток при И/Р осуществляется путем некроптоза, который морфологически характеризуется увеличением объема клеток, набуханием органелл, разрывами плазматической мембраны и индуцируется на фоне низкой активности каспаз [8]. К активаторам некроптоза относят стимуляцию толл-подобных рецепторов третьего типа или патоген-ассоциированных молекулярных структур [9].

Сокращения: И/Р – ишемически-реперфузионное повреждение, ФНО – фактор некроза опухоли, ИЛ-1 β – интерлейкин-1 β , ИЛ-6 – интерлейкин-6, ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Наиболее распространенным вариантом при ишемически-реперфузионном повреждении является ФНО-индуцированный некроптоз (ФНО – фактор некроза опухоли) [10]. Ишемическое повреждение вызывает высвобождение ФНО, который стимулирует продукцию других провоспалительных цитокинов лейкоцитами и эндотелиальными клетками, инициируя цитокиновый шторм [11]. С другой стороны, есть доказательства апоптотического повреждения, индуцированного цитокинами (в частности, семейством ФНО). Более того, апоптотические клетки сами могут являться источником ряда провоспалительных цитокинов и хемокинов [12]. Согласно классическим представлениям, в развитии клеточного апоптоза важную роль играет каспаза-3, которая активируется в клетках каспазами-8, -9 и -10 посредством внешних и внутренних путей инициации и является основным эффектором внутриклеточной апоптотической программы [13]. Вклад активации каспаз в патогенез апоптоза, индуцированного ишемически-реперфузионным повреждением, не раскрыт полностью до настоящего времени. В современной литературе встречаются данные об увеличении активности каспаз при формировании И/Р; отмечено также протекторное действие ингибиторов каспаз, однако выводы этих исследований неполны и противоречивы [14,15]. По-видимому апоптоз, развивающийся после ишемии, может выступать одним из ключевых механизмов органной дисфункции, и проверка достоверности этого предположения диктует необходимость проведения дальнейших исследований.

Следует особо отметить, что особенно губительным для клеток является не отсутствие кислорода, а его появление после гипоксии – реперфузия. Реперфузия приводит к резкому повышению концентрации кислорода в ткани, что способствует образованию активных метаболитов кислорода и повреждению ткани. В здоровом организме антиоксидантный статус поддерживается набором ферментов-антиоксидантов, однако при реперфузии в условиях гиперпродукции активных форм кислорода эта система ферментов-антиоксидантов не способна в полной мере справиться с нейтрализацией свободно-радикальных процессов. Данная проблема может быть решена с помощью экзогенных ферментов-антиоксидантов и одним из кандидатов на эту роль является пероксиредоксин 6 – фермент-антиоксидант. Данный фермент показал очень высокую эффективность на ряде моделей И/Р-поражения: почки, тонкого кишечника, изолированного сердца [16–18].

Целью настоящей работы было изучение содержания цитокинов и экспрессии каспазы-3 при экспериментальном ишемически-реперфузионном повреждении, а также анализ эффективности превентивного применения пероксиредоксина 6.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования проведены на 56 белых крысах-самцах линии Wistar массой 180–200 г. Животных содержали в стандартных лабораторных условиях, исследования проводили в соответствии с требованиями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в исследовательских и других научных целях» (Strasbourg, 18.03.1986).

Синдром ишемии-реперфузии моделировали путем наложения резиновых жгутов на обе задние конечности на уровне паховой складки сроком на 6 ч под эфирным наркозом. Ширина пережатия тканей составила 2–3 мм [19]. Критерием состоятельности наложения жгута являлось отсутствие отека конечностей и бледность их окраски. Реваскуляризацию проводили одномоментно путем рассечения жгутов.

Проведены две серии экспериментальных исследований. В первой серии изучали изменения в системе провоспалительных цитокинов в сыворотке крови экспериментальных животных с моделью синдрома ишемии–реперфузии в различные его сроки. В зависимости от времени, прошедшего после снятия жгутов, животные первой серии были разделены на несколько групп. В первой группе взятие крови для исследования осуществляли до снятия жгутов, во второй – в момент снятия жгутов, в третьей, четвертой и пятой – через 6, 12 и 24 ч соответственно. Во второй серии экспериментов проводили анализ экспрессии генов в клетках сосудов, легких и почек после И/Р и на фоне превентивного введения экзогенного пероксиредоксина 6 в дозе 20 мг/кг массы тела. Считается, что экзогенные препараты пероксиредоксина 6 снижают активность свободных радикалов кислорода, оказывают мембраностабилизирующее и цитопротекторное действие [20].

Эвтаназию животных осуществляли под наркозом «Золетил 100» из расчета 2 мг/100 г массы путем декапитации. Сыворотку крови для определения в ней уровня основных провоспалительных цитокинов получали из нестабилизированной крови путем центрифугирования в течение 15 мин при 3000 об/мин после предварительного охлаждения.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, используемые для ПЦР

	Ген	№ в GenBank	Последовательность 5'-3'	Длина фрагмента, п.н.
1	Цитоскелетный актин	NM_007393.4	F: AGCCATGTACGTAGCCATC R: CTCTCAGCTGTGGTGGTGA	149
2	Фактор элонгации	NM_175838.1	F: AGGTGATTATCCTGAACCATCC R: AGTGGAGGGTAGTCAGAGAAGC	234
3	Каспаза-3	NM_009810	F: AAGGAGCAGCTTTGTGTGTG R: GAAGAGTTTCGGCTTTCCAG	145

Определение концентрации основных провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α , в сыворотке крови экспериментальных животных осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием стандартных наборов реагентов – «RayBio Rat TNF- α Kit», «RayBio Rat IL-1 β Kit», «RayBio Rat IL-6 Kit» (RayBio, США). По данным производителя, чувствительность и диапазон измерений при использовании наборов составляет: для ФНО- α – 25 пкг/мл, для ИЛ-1 β – 80 пкг/мл, для ИЛ-6 – 30 пкг/мл. Полученные результаты укладывались в диапазон измеряемых концентраций.

Анализ экспрессии генов. Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени был проведен анализ экспрессии генов в клетках сосудов, легких и почек после И/Р и введения экзогенного пероксида водорода до наложения жгутов. В качестве контроля исследовали ткани интактных животных. Тотальную РНК из тканей выделяли с помощью реактива ExtractRNA («Евроген», Россия). Качество РНК оценивали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле в ТАЕ-буфере, в присутствии бромистого этидия (1 мкг/мл). Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000с (Thermo Fisher Scientific, США). Для удаления возможной примеси геномной ДНК полученную РНК обрабатывали ДНКазой RQ1 (Promega, США). Для осуществления обратной транскрипции использовали 2 мкг тотальной РНК, набор MMLV RT kit («Евроген», Россия). кДНК, полученную в результате обратной транскрипции, использовали в ПЦР с ген-специфическими праймерами (табл. 1) производства «Евроген» (Россия). ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе BioRad CFX96 (BioRad, США) с использованием набора qPCRmix-HS («Евроген», Россия), содержащего SYBR Green II в качестве флуоресцентного интеркалирующего красителя. Режим ПЦР был следующий: 1) «горячий старт» (для исключения неспецифического отжига праймеров) при 95°C, 5 мин; 2) денатурация при 95°C, 15 с;

3) отжиг праймеров при 58–60°C, 20 с, синтез ДНК при 72°C, 20 с. Этапы 2–4 повторяли 40 раз. Определение значений порогового цикла (C_t – threshold cycle) проводили с помощью программного обеспечения BioRad (США). Нормирование уровня экспрессии исследуемых генов проводили относительно цитоскелетного актина и фактора элонгации. Расчет изменения экспрессии проводили по стандартной методике [21]. Расчеты $\Delta\Delta C_t$ проводили по формуле $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (контроль) – ΔC_t (опыт), каждое значение ΔC_t рассчитывали по формуле $\Delta C_t = \Delta C_t$ (исследуемый ген) – ΔC_t (референсный ген цитоскелетного актина или фактора элонгации).

Статистическая обработка полученных данных проведена с применением методов вариационной статистики с вычислением средних величин (M), оценкой вероятности расхождений (m), оценкой достоверности изменений с использованием t -критерия Стьюдента ($p < 0,05$). Все измерения и исследования осуществлялись на оборудовании, прошедшем метрологическую проверку и экспертизу.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проведенных экспериментов отмечены определенные изменения уровней провоспалительных цитокинов в сыворотке крови, которые зависели от сроков длительности ишемически-реперфузионного повреждения (табл. 2). Основные сдвиги в динамике уровней цитокинов проявлялись следующими тенденциями. В период шестичасовой ишемии выявлено снижение уровня ИЛ-1 β в сыворотке крови экспериментальных животных: показатель был в 1,8 раза ниже контрольного значения. В период 12 ч развития синдрома ишемии-реперфузии выявлена тенденция к увеличению уровня ИЛ-1 β , а именно: через 6 ч после ревазуляризации конечностей уровень ИЛ-1 β возрос в 4,1 раза по сравнению с контролем, через 12 ч – в 9,6 раза, при этом достигнув максимального значения.

Таблица 2. Динамика изменений уровней цитокинов в сыворотке крови крыс при развитии синдрома ишемии-реперфузии ($M \pm m$)

Срок	ИЛ-1 β , пг/мл	ИЛ-6, пг/мл	ФНО- α , пг/мл
Контроль ($n = 11$)	555,2 \pm 40,3	28,2 \pm 5,5	4,4 \pm 0,8
Ишемия без реперфузии ($n = 10$)	306,8 \pm 78,3**	70,5 \pm 10,3***	25,0 \pm 4,9***
6 ч после реперфузии ($n = 10$)	2289,5 \pm 86,2*	376,1 \pm 5,1*	96,9 \pm 15,9*
12 ч после реперфузии ($n = 10$)	5303,8 \pm 289,5*	670,1 \pm 49,0*	71,1 \pm 11,0*
24 ч после реперфузии ($n = 9$)	4884,3 \pm 323,3*	1244,2 \pm 266,3***	149,3 \pm 27,4*

Примечание. Достоверность отличий по отношению к контролю: * – $p < 0,001$, ** – $p < 0,05$, *** – $p < 0,01$.

В дальнейшем наблюдалась обратная динамика, связанная со снижением значения указанного показателя. Так, через 24 ч после реперфузии отмечалось незначительное снижение уровня ИЛ-1 β , на 8% по сравнению с максимальным уровнем при сроке 12 ч, при этом показатель оставался в 8,8 раза выше контрольного значения.

Динамика изменений уровня ИЛ-6 в сыворотке крови экспериментальных животных характеризовалась прогрессивным увеличением этого показателя в течение 24 ч после реперфузии. Так, через 6 ч после наступления ишемии уровень ИЛ-6 возрос в 2,5 раза, через 6 ч после реперфузии – в 13,3 раза, через 12 ч – в 23,8 раза, через 24 ч – в 44,1 раза, достигнув максимального значения по сравнению с контролем.

В динамике изменений уровня ФНО- α в течение первых 24 ч развития И/Р выявлен прогрессивный рост этого показателя. При этом через 6 ч после наступления ишемии уровень ФНО- α возрос по сравнению с контролем в 5,7 раза, через 6 ч после реперфузии – в 22 раза, через 12 ч после реперфузии снизился в сравнении со значением для срока 6 ч на 27%, однако оставался выше контрольного значения в 16,2 раза. Через 24 ч после реперфузии уровень ФНО- α достиг максимального значения и был в 33,9 раза выше контрольного.

В результате анализа экспрессии генов установлено, что через 6 ч после восстановления кровотока в ранее ишемизированных конечностях многократно увеличивалась экспрессия ключевого фактора апоптотического каскада – каспазы-3 – в сосудах задних конечностей крыс (рисунок).

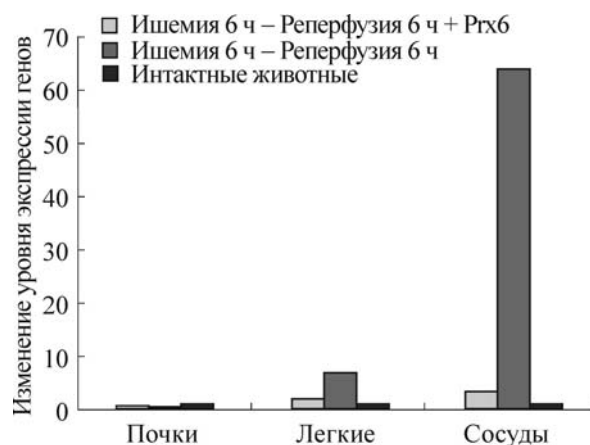
При изучении экспрессии каспазы-3 в ткани легких наблюдали аналогичную сосудам картину, однако изменения были выражены в меньшей степени. Так, при шестичасовом экспериментальном синдроме ишемии-реперфузии экспрессия каспазы-3 увеличивалась в 6,9 раза по

сравнению с показателями интактных животных. Анализ экспрессии каспазы-3 в ткани почки не показал достоверных различий при моделировании синдрома ишемии-реперфузии в эксперименте.

Превентивное введение в кровь экспериментальных животных пероксиредоксина 6 существенно улучшало ситуацию с экспрессией маркеров апоптоза (рисунок). Так, в сосудах задних конечностей крыс при моделировании шестичасового И/Р-повреждения наблюдалось значительное снижение экспрессии каспазы-3. Изменения от превентивного введения пероксиредоксина 6 в легких носили аналогичный характер, но были выражены несколько меньше.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что в качестве важного первичного события при ишемически-реперфузионном повреждении рассматривают чрезмерную секрецию ФНО- α [22]. Кроме того, известно, что при И/Р индуцируется гибель клеток, что может главным образом или, по меньшей мере, час-



Анализ уровня экспрессии каспазы-3 в клетках сосудов задних конечностей, ткани легких и почек при моделировании экспериментальной ишемии-реперфузии и на фоне применения пероксиредоксина 6.

тично, объясняться окислительным стрессом [23]. По-видимому, цитокиновый шторм способствует активации свободно-радикального окисления, которое, в свою очередь, приводит к повреждению клеточной мембраны, окислению ДНК и нарушению митохондриальной ультраструктуры [24]. В то же время активные кислородные радикалы в значительной степени способствуют развитию апоптоза [25].

Нашими предыдущими исследованиями установлена активация свободно-радикального окисления липидов при экспериментальном И/Р-повреждении [26]. Высвобождение активных форм кислорода и свободных радикалов (в частности, за счет усиления перекисного окисления липидов), может, в свою очередь, приводить к повышению в крови уровня трансаминаз, увеличению воспалительного инфильтрата, фрагментации хроматина [27]. Вышеописанные изменения приводят к выраженной альтерации, апоптозу и некрозу клеток в период острой реперфузии. В современной литературе представлены данные, что именно апоптоз является фактором, способствующим гибели клеток миокарда во время И/Р [28].

Обнаруженное в нашем исследовании прогрессивное повышение концентрации провоспалительных цитокинов при развитии экспериментального синдрома ишемии-реперфузии в сыворотке крови в течение первых 24 ч после реперфузии, а также увеличение экспрессии ключевого фактора апоптотического каскада каспазы-3 в сосудах задних конечностей и легких крыс подтверждают гипотезу о запуске проапоптотического сигнального пути, который приводит к поражению органов-мишеней и может являться одним из ключевых факторов развития полиорганной недостаточности. Хронологически патогенез в данной ситуации выглядит следующим образом: увеличение экспрессии каспазы-3 в сосудах задних конечностей крыс в ранние сроки реперфузии (6 ч) инициирует апоптоз; апоптотические клетки становятся источником ряда провоспалительных цитокинов, максимальное содержание которых наблюдается в более поздние сроки (24 ч). Цитокиновый шторм поддерживает воспалительный каскад и запускает повреждение легких и других внутренних органов. Отдельно следует отметить, что при реперфузионном повреждении легкие являются органом-мишенью первого порядка, о чем свидетельствует значительно более выраженная экспрессия каспазы-3 по сравнению с аналогичным показателем в ткани почки.

В качестве дополнительного аргумента в поддержку высказанного предположения можно рассматривать результаты превентивного

введения пероксиредоксина 6, который, блокируя свободно-радикальное окисление, по-видимому, уменьшает апоптотическое повреждение, что подтвердилось в наших исследованиях, свидетельствующих о снижении экспрессии ключевых маркеров апоптоза.

ВЫВОДЫ

1. Развитие экспериментального синдрома ишемии-реперфузии сопровождается активацией провоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс. Максимальные значения ИЛ-1 β , почти в 10 раз превышающие контроль, выявлены к 12 ч после реперфузии, а показатели ИЛ-6 и ФНО- α , более чем в 40 раз превышающие контроль, – через 24 ч после реваскуляризации.

2. Ишемически-реперфузионное повреждение в эксперименте сопровождается значительным увеличением экспрессии ключевого фактора апоптотического каскада каспазы-3 в клетках сосудов задних конечностей и ткани легкого крыс через 6 ч после восстановления кровотока в ранее ишемизированных конечностях.

3. Введение пероксиредоксина 6 нейтрализует окислительный стресс прежде всего в сосудах лап, уменьшая степень разрушения тканей сосудов задних конечностей, что следует рассматривать в качестве перспективы для терапии И/Р-повреждения, поскольку подавление апоптоза может разорвать «порочный круг» и уменьшить органную дисфункцию.

Работа выполнена в рамках реализации проекта академической мобильности «Развитие научных исследований в области экспериментальной медицины» Программы развития Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского» и при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-04-00356).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. К. А. Корейба, И. В. Ключкин, А. В. Максимов и др., Вестн. соврем. клин. медицины **5**, 67 (2013).
2. A. T. Turer and J. A. Hill, *Am. J. Cardiol.* **106**, 360 (2010).
3. M. T. Dirksen, G. J. Laarman, M. L. Simoons, et al., *Cardiovasc. Res.* **74**, 343 (2007).
4. J. Li, H. Zhang, and C. Zhang, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **52**, 865 (2012).
5. T. P. Tran, H. Tu, I. I. Pipinos, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **650**, 328 (2011).
6. S. Zhang, C. Wotzkow, A. K. Bongoni, et al., *Bone* **97**, 278 (2017).

7. T. Zhang, Y. Zhang, M. Cui, et al., *Nat. Med.* **22**, 175 (2016).
8. P. Vandenabeele, L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, et al., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 700 (2010).
9. S. Akira, S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Cell* **24**, 783 (2006).
10. S. Koshinuma, M. Miyamae, K. Kaneda, et al., *J. Anesth.* **28**, 235(2014).
11. J. Ahn and J. Kim, *Curr. Hypertens. Rep.* **14**, 510 (2012).
12. C. J. Kearney, C. Sheridan, S. P. Cullen, et al., *J. Biol. Chem.* **288**, 4878 (2013).
13. Y. Kiraz, A. Adan, M. Kartal Yandim, et al., *Tumour Biol.* **37**, 8471 (2016).
14. N. Matsui, R. Yoshioka, A. Nozawa, et al., *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 104 (2017).
15. H. Tony, K. Meng, B. Wu, et al., *Mediators Inflamm.*, Article ID 479123 (2015).
16. О. А. Палутина, М. Г. Шаратов, А. А. Темнов и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **160**, 305(2015).
17. A. E. Gordeeva, A. A. Temnov, A. A. Charnagalov, et al., *Dig. Dis. Sci.* **60**, 3610 (2015).
18. Е. В. Карадулева, Э. К. Мубаракшина, М. Г. Шаратов и др., *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **160**, 584 (2015).
19. О. А. Мальченко, А. В. Кубышкин, Л. В. Анисимова и др., *Тавр. мед.-биол. вестн.* **15** (1), 207 (2012).
20. В. И. Новоселов, В. К. Равин, М. Г. Шаратов и др., *Биофизика* **56**, 873 (2011).
21. T. D. Schmittgen and K. J. Livak, *Nat. Protoc.* **3**, 1101 (2008).
22. P. Zhu, J. X. Li, M. Fujino, et al., *Mediators Inflamm.*, Article ID 701970 (2013).
23. G. A. Kurian, R. Rajagopal, S. Vedantham, et al., *Oxid. Med. Cell. Longev.*, Article ID 1656450 (2016).
24. T. Kalogeris, Y. Bao, and R. J. Korthuis, *Redox. Biol.* **2**, 702 (2014).
25. D. M. Yellon and D. J. Hausenloy, *N. Engl. J. Med.* **357**, 1121 (2007).
26. О. А. Мальченко, А. В. Кубышкин, В. З. Харченко и др., *Вестн. КазНМУ* **5**, 158 (2013).
27. E. L. Chang, S. H. Lee, K.C. Mun, et al., *Transplant. Proc.* **36**, 1959 (2004).
28. H. Zhao, T. Jaffer, S. Eguchi, et al., *Cell Death Dis.* **6**, 1975 (2015).

Expression of Caspase-3 and the Level of Cytokines in the Experimental Reperfusion Syndrome when Treated with Peroxiredoxin 6

A.V. Kubyshkin*, **S.V. Novosyolov****, **I.I. Fomochkina***, **V.Z. Kharchenko***,
A.A. Pisarev*, **A.E. Gordeeva****, **A.A. Beketov***, **A.V. Kochkina****, **M.I. Fedosov***,
L.V. Anisimova*, and **R.G. Goncharov****

**Medical Academy named after S.I. Georgievsky, Vernadsky Crimean Federal University,
bulvar Lenina 5/7, Simferopol, Republic of Crimea, 295051 Russia*

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

Ischemic-reperfusion injury is a serious problem and its pathogenetic mechanisms require interpretation and search for potential ways of correction. The aim of this study was to investigate cytokine levels, the expression of proapoptotic proteins, including caspase-3, in experimental ischemic-reperfusion injury, and also to analyze the efficacy of peroxiredoxin 6 treatment. Fifty six male albino Wistar rats weighing 180–200 g were used for this study. Cross clamping was used to simulate bilateral lower limb ischemic-reperfusion injury. In the present study we investigated proinflammatory cytokines in serum, analyzed the expression of caspase-3 in vascular, lung and kidney cells after ischemic-reperfusion injury and preventive treatment with peroxiredoxin 6. It was found that the development of ischemic-reperfusion injury is followed by activation of proinflammatory cytokines in the rat blood: the maximum values of interleukin 1 β , which were almost 10 times higher than the control, was observed by 12 hours after restoration of blood flow. Ischemic-reperfusion injury was accompanied by an increase in caspase-3 in the cells of the vessels of the limbs and lung of rats subjected to 6-hours of ischemic-reperfusion. Peroxiredoxin 6 treatment neutralizes oxidative stress firstly in the vessels of the limbs, reducing the degree of destruction of the vessel tissues of the lower limbs. This fact should be considered as a target for therapy of ischemic-reperfusion damage.

Keywords: ischemia-reperfusion, cytokines, caspase-3, peroxiredoxin 6