

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 НА СОСТОЯНИЕ МЕЗЕНТЕРАЛЬНЫХ СОСУДОВ И ТОНКОГО КИШЕЧНИКА ПРИ ИШЕМИЧЕСКИ-РЕПЕРФУЗИОННОМ ПОРАЖЕНИИ

© 2017 г. М.Г. Шарапов, А.Е. Гордеева, Р.Г. Гончаров, И.В. Тихонова,
В.К. Равин, А.А. Темнов, Е.Е. Фесенко, В.И. Новоселов

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

E-mail: novoselov-vi@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.07.17 г.

Основой патогенеза ишемически-реперфузионного поражения является окислительный стресс. Применение экзогенных антиоксидантов позволяет подавить окислительный стресс и скорректировать тяжесть ишемически-реперфузионного поражения. Кишечник является одним из наиболее чувствительных органов к действию ишемии-реперфузии. В работе была использована модель ишемически-реперфузионного поражения тонкого кишечника крысы, выполненная путем окклюзии верхней мезентеральной артерии. В качестве экзогенного антиоксиданта был использован рекомбинантный пероксиредоксин 6 – представитель древнего семейства пероксидаз, который способен нейтрализовать широкий спектр перекисных субстратов (как органической, так и неорганической природы). Внутривенное введение экзогенного пероксиредоксина 6 перед ишемией-реперфузией приводит к минимизации повреждений тканей и снижению апоптотической гибели клеток кишечника и мезентеральных сосудов. Показано влияние экзогенного Ptx6 на рост уровня NO в крови животных, что коррелирует с увеличением уровня экспрессии индуцибельной NO-синтазы. Таким образом, применение экзогенного пероксиредоксина 6 при ишемически-реперфузионном поражении кишечника и мезентеральных сосудов способствует нормализации окислительно-восстановительного гомеостаза в тканях, сохранению их структуры и восстановлению микроциркуляторного русла.

Ключевые слова: пероксиредоксин 6, ишемия-реперфузия, кишечник, мезентеральные сосуды, экспрессия генов.

Для поддержания нормального функционального состояния живой ткани требуется постоянный приток кислорода и питательных веществ, а также вывод продуктов метаболизма. При остановке кровотока (ишемии) быстро повреждаются метаболически-активные ткани, однако при реперфузии – восстановлении потока крови, насыщенной кислородом, – в ишемизированных тканях происходит лавинообразное образование активных форм кислорода (АФК), которые приводят к повреждению всех биологических макромолекул и развитию окислительного стресса [1,2]. В настоящее время хорошо известно, что ишемически-реперфузионные (И-Р) повреждения являются главным фактором развития многих патологических состояний [3]. Ки-

шечник является одним из наиболее чувствительных органов к действию ишемии-реперфузии [4]. Известно, что И-Р-поражения кишечника являются причиной высокой смертности у пациентов при травмах или хирургических вмешательствах. Одним из возможных подходов в терапии И-Р-поражений является использование антиоксидантных препаратов, которые способствуют нейтрализации развившегося окислительного стресса, при этом наиболее перспективным направлением является использование ферментов-антиоксидантов, так как они, в отличие от низкомолекулярных антиоксидантов, обладают большей эффективностью. Среди ферментов-антиоксидантов большой интерес представляет семейство пероксиредоксинов (Ptx), которые, помимо способности к нейтрализации широкого спектра АФК, обладают другими важными функциями, такими как шаперонная и сигнально-регуляторная [5,6]. У млекопитающих обнаружено шесть типов пероксиредоксинов (Ptx1–6), которые по числу остатков цис-

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, И-Р – ишемически-реперфузионное, Ptx – пероксиредоксины, ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия, ПЦР – полимеразная цепная реакция, РФА – реактивные формы азота.

теина и механизму пероксидазной реакции подразделяются на 2-Cys-типичные (Prx1–4), 2-Cys-атипичные (Prx5) и 1-Cys-пероксиредоксины (Prx6). Уровень пероксиредоксинов увеличивается при развитии патологий, сопровождающихся развитием окислительного стресса, способствуя нормализации уровня АФК в пораженных тканях. В частности, была показана защитная роль эндогенного Prx6 при различных патологиях: кожи [7,8], легких [9,10], печени [11], почек [12], глаз и нервной системы [13,14]. В нашей лаборатории была продемонстрирована высокая терапевтическая активность экзогенного Prx6 на различных животных моделях: при тотальном облучении рентгеновскими лучами [15], при химических и термических ожогах верхних дыхательных путей [16], И-Р-поражении почки [17] и кишечника [18]. В данной работе проведено исследование защитного действия экзогенного Prx6 на сохранность мезентеральных сосудов и слизистой тонкого кишечника крысы при И-Р-поражении, а также обсуждаются возможные механизмы этой защиты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение рекомбинантного пероксиредоксина 6. Рекомбинантный Prx6 был получен ранее в нашей лаборатории [19]. Белок содержит шесть остатков гистидина на карбоксильном конце полипептидной цепи, благодаря чему он был очищен аффинной хроматографией на Ni-NTA-агарозе, с чистотой не менее 95%, согласно электрофорезу в 12% полиакриламидном геле в присутствии 0,1% ДСН. Пероксидазная активность Prx6 составляла 200 нмоль/мин/мг в отношении H_2O_2 и 75 нмоль/мин/мг в отношении гидропероксида *трет*-бутила [15,19].

Животные. Были использованы крысы-самцы линии Wistar (масса тела 200–220 г, возраст 6–8 недель), которых содержали в условиях вивария ИБК РАН (Пушино Московской области). Работу с лабораторными животными проводили в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для эксперимента и других научных целей, 1986» и руководством по работе с лабораторными животными ИБК РАН №57.30.12.2011.

Модель ишемически-реперфузионного поражения тонкого кишечника. Модель И-Р-поражения кишечника была выполнена по модифицированной методике Ким и соавт. [20]. Крысу наркотизировали внутривенным введением смеси растворов: 0,5 мл 3,5% Золетила 100 (Virbac Sante Animale, Франция) и 0,1 мл Рометара

(Bioveta, Чехия). Белок Prx6 (10 мкг/г массы животного) в физиологическом растворе (2 мл) вводили крысам через хвостовую вену за 15 мин до ишемии. В качестве отрицательного контроля вводили физиологический раствор (2 мл). Ишемию тонкого кишечника проводили путем наложения сосудистого зажима на верхнюю мезентеральную артерию на уровне ее отхождения от аорты для полного блокирования притока крови. Через 60 мин сосудистый зажим снимали и начинался период реперфузии, который длился 120 мин. В качестве контроля были использованы животные, подвергнутые аналогичной хирургической процедуре, включающей вскрытие брюшной полости на срок 180 мин без лигирования верхней мезентеральной артерии.

Определение уровня перфузии крови в кишечной ткани. Исследование уровня перфузии кишечной ткани кровью проводили методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), с помощью лазерного анализатора микроциркуляции крови ЛАКК-01 (НПП «ЛАЗМА», Россия). Регистрация показателя микроциркуляции в относительных перфузионных единицах проводилась независимо в трех участках тонкого кишечника: 1) проксимальный отдел, 20–25 см от пилорического клапана; 2) анатомическая середина органа; 3) дистальный отдел, 20–25 см от илеоцекального клапана [21]. Запись ЛДФ-сигнала проводили непрерывно в течение всего И-Р-периода. В конце реперфузионного периода получали образцы тонкого кишечника и мезентеральных сосудов с трех экспериментальных участков для гистологического анализа, иммуноблоттинга и исследования экспрессии генов.

Гистологический анализ тканей кишечника и мезентеральных сосудов. Для проведения морфологических исследований образцы тонкого кишечника и мезентеральных сосудов экспериментальных животных фиксировали в Murrsky's Fixative (Merck, США) и заключали в парафин. Серии срезов толщиной 3 мкм были получены на микротоме (Thermo Electron Corporation, USA). Срезы окрашивали гематоксилин-эозином (Vistostain Biovitrum, Россия). Микроскопический анализ срезов проводили на микроскопе Leica DM 6000 с цифровой камерой Leica DFC 490. Итоговый уровень повреждения был оценен в соответствии с критериями, описанными Чиу и соавт. [22].

Электрофорез и иммуноблоттинг. Образцы кишечника и мезентеральных сосудов помещали в физиологический раствор (1 : 10 по весу), содержащий коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США), и разрушали с помощью гомогенизатора TissueLyser (Qiagen, Германия). Полученные экстракты тканей использовали для

электрофореза в 10% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях на оборудовании Mini Vertical Unit (Amersham, Великобритания) по стандартной методике Лэммли. Белки с полиакриламидным гелем переносили на PVDF-мембрану Hybond-P (Amersham, Великобритания) с помощью прибора для полусухого переноса TRANS-BLOT SD (Bio-Rad, США). Для иммуноблоттинга использовали первичные моноклональные антитела кролика к каспазе-3 (8G10, Cell Signaling Technology, США) и цитоскелетному актину (4967S, Cell Signaling Technology, США), вторичные антитела овцы к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (P-GAR1ss, «ИМТЭК», Россия), в соответствии с рекомендациями производителей. Детекцию проводили с помощью диаминобензидаина (Amresco, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Денситометрический анализ осуществляли с помощью программы ImageJ. Нормирование данных приводили относительно цитоскелетного актина.

Определение уровня NO в крови. Продукцию NO в сыворотке крови крысы определяли по концентрации нитритов, являющихся конечным продуктом метаболизма короткоживущего соединения NO. Количество нитритов измеряли с использованием реактива Грисса, содержащего 0,1% раствора N-нафтил-этилендиамин дигидрохлорида (AppliChem, Германия) и 1% раствора сульфаниламида в 2,5% растворе фосфорной кислоты («Компонент-Реактив», Россия). Образец сыворотки крови смешивали со свежеприготовленным реактивом Грисса в соотношении 1 : 1 и инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем измеряли оптическую плотность ($\lambda = 546$ нм) на приборе Multiscan (Labsystem Plus, Финляндия).

Анализ уровня экспрессии генов в кишечной ткани и мезентеральных сосудах. 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 электрофоретически в 2% агарозном геле. Концентрацию РНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000c (США). Для обратной транскрипции использовали по 2 мкг общей РНК, обратную транскриптазу MMLV («Евроген», Россия) и стандартный олигонуклеотид dT₁₅. Полученную кДНК использовали для ПЦР с ген-специфическими олигонуклеотидами (таблица).

ПЦР в реальном времени проводили с помощью амплификатора BioRad iQ5 (BioRad,

США) с использованием Taq ДНК-полимеразы HS («Евроген», Россия) и SYBR Green II (Bio-Dye, Россия) в качестве флуоресцентного индикатора. 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 BioRad (США). 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].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние экзогенного P_{rx6} на морфологию кишечной ткани при И-Р-поражении. Для исследования влияния P_{rx6} на сохранение структуры тонкого кишечника при И-Р-поражении был проведен гистологический анализ кишечной ткани. У интактных животных кишечные ворсинки и крипты хорошо различимы, их поверхность выстлана однослойным призматическим эпителием (рис. 1а).

Уровень повреждений в контрольной интактной группе принята за ноль [22]. После 60-минутной ишемии появляются очаги поражения апикальной части ворсинок и отмечается развитие субэпителиальных пространств, что характерно для первой степени поражения «1» – развитие субэпителиальных пространств на вершине ворсинок [18]. В группе животных, не получавших внутривенное введение P_{rx6}, через 60 мин ишемии и последующей 10-минутной реперфузии отмечается деструкция эпителия ворсинок с обнажением стромы и лифтингом (рис. 1б). В строме ворсинок наблюдаются очаги кровоизлияний. Степень поражения структур тонкого кишечника варьирует между значениями «3» и «4» [22], где степень «3» – значительное отслоение эпителия по всей длине ворсинок и оголенные участки ворсинок, а степень «4» – обнажение ворсинок с появлением собственной пластинки и расширение капилляров. Через 120 мин реперфузии после ишемии в группе животных, не получавших P_{rx6}, наблюдается значительное поражение тканей кишечника, что отражается в существенном отеке субэпителиальных пространств и отслоении эпителия (рис. 1в). Степень поражения структур тонкого кишечника ближе к значению «4» [22]. Внутривенное введение P_{rx6} значительно снижает последствия И-Р-поражения тканей кишечника.

Олигонуклеотиды для ПЦР с обратной транскрипцией в реальном времени

	Ген	GenBank #	Последовательность 5'-3'	Размер ПЦР-фрагмента (п.н.)
1	Actb	NM_007393.4	F: AGCCATGTACGTAGCCATC R: CTCTCAGCTGTGGTGGTGA	149
2	Catalase	AAB42378.1	F: GTGCGGACATTCTATACGAAGG R: CTTAGGCTTCTGGGAGTTGTAC	191
3	SOD1	BC082800.1	F: TGGGCAATGTGGCTGCTGGAA R: AGAAACAAGATGACTTGGGC	130
4	SOD2	AAH70913.1	F: AGGCTATCAAGCGTGACTIONT R: GAAGATAGTAAGCGTGCTCCCA	218
5	SOD3	EDL99891.1	F: GCCTTCTTGTCTGCAACCTG R: CTGTACCCTGCAGACTGCGT	212
6	GPx1	FQ211052.1	F: AATGATCTGCAGAAGCGTCTGG R: AAAGTTGGGCTCGAACCCAC	150
7	GPx2	BG664050	F: ACACCCAGCTCAATGAGTTGCA R: GGGTAAGACTGAAGGTGGGCTG	168
8	GPx3	AAH62227.1	F: CCTCTTTGTCAACGTAGCCAGC R: AGGATCTCCGAGTTCTCGCCT	156
9	GPx7	FQ229888.1	F: CAAGCTGGTGTCTGCTGGAGA R: GCAAGGGAAAGCAAGCACGT	154
10	GPx8	FQ229597.1	F: TCCTGAAGCCGAGAATCAACAG R: CAGCTCCCTGAGGGTCTCGTAA	161
11	Prx1	BC058450.1	F: TAAGAAACTCAACTGCCAAG R: GAGCAATGGTTCGCTTGGGA	143
12	Prx2	BC058481.1	F: CCACGCTGAGGACTTCCGAAAG R: TCTGGGACAAGCTTTTAGTCAC	160
13	Prx3	AF106944.1	F: CGAGCACTATTTTCCGGAGT R: CTAAAGTCGTCGAGACTC	227
14	Prx4	AAH59122.1	F: TTGCTCCTGCCGCTCTGCTGC R: TGGCTTGAAATCTTGGCTTT	195
15	Prx5	AAH78771.1	F: AGGTATTTGAAGGGGAACCTGG R: GTGGCCTGTCTGAGT GTTAATG	192
16	Prx6	AF014009.1	F: CGACGATAAGGACAGGGACCT R: GATGCTGTCAGCTGGAGGGAGT	207
17	NF-κB	NM_008689	F: CCACGCTCAGCTTGTGAGGGAT R: GGCCAAGTGCAGAGGTGTCTGAT	106
18	NRF2	NM_010902	F: CTCGCTGGAAAAAGAAGTG R: CCGTCCAGGAGTTCAGAGG	240
19	Caspase 3	NM_009810	F: AAGGAGCAGCTTTGTGTGTG R: GAAGAGTTTCGGCTTCCAG	145
20	Ki67	NM_001081117	F: ATCATTGACCGCTCCTTTAGGT R: GCTCGCCTTGATGGTTCCT	104
21	TNFα	NM_013693	F: ATGAGAAGTTCCTCAAATGGC R: CTCCACTTGGTGGTTTGCTA	125
22	IL-6	NM_031168	F: TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC R: TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	76
23	nNOS	NM_052799.1	F: CAGCCAACACAGGAGCTACA R: GCCAGGGGTCCAGTACTTTC	119
24	eNOS	NM_021838.2	F: GAACCTGAGGGTGCCAG R: TCCGATTCAACAGTGTCTCCT	71
25	iNOS	NM_012611.3	F: GCTACACTTCCAACGCAACA R: CATGGTGAACACGTTCTTGG	115

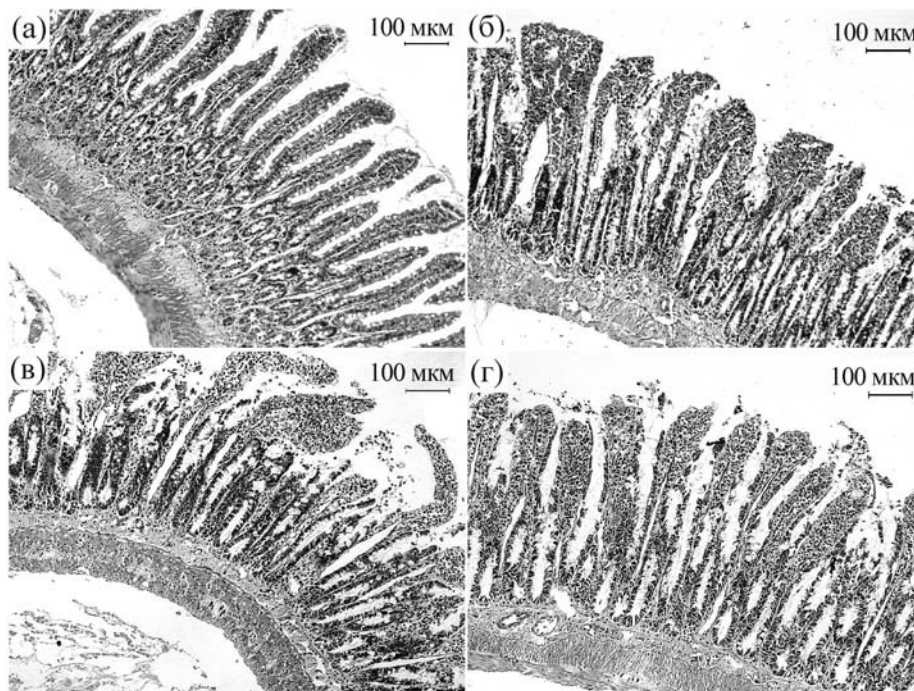


Рис. 1. Гистологический анализ тонкого кишечника крысы: (а) – intactное животное, (б) – после ишемии-реперфузии (60 мин – 10 мин), (в) – после ишемии-реперфузии (60 мин – 120 мин), (г) – после введения экзогенного Rgh6 за 15 мин до ишемии-реперфузии (60 мин – 120 мин). Окраска гематоксилин-эозином.

Спустя 120 мин после реперфузии наблюдается сохранение структуры ворсинок, строма ворсинок с умеренным отеком, наблюдается умеренная гиперемия, хорошо различаются клетки одностороннего эпителия, кроме апикальных участков ворсинок (рис. 1г). Степень поражения структур тонкого кишечника между значениями «1» и «2» [22], где «2» – расширение субэпителиальных пространств с умеренным отслоением эпителия от собственной пластинки.

Влияние экзогенного Rgh6 на морфологию мезентеральных сосудов при И-Р-поражении. В используемой нами экспериментальной модели И-Р-поражения тонкого кишечника крысы (путем окклюзии верхней мезентеральной артерии) нисходящие после места окклюзии сосуды, питающие кишечник, также подвергаются И-Р-поражению. На рис. 2 представлены гистологические данные мезентеральных сосудов (артерии и вены) intactных животных, подверженных действию ишемии-реперфузии и получавших внутривенную инъекцию рекомбинантного Rgh6 перед И-Р-поражением кишечника.

Действие ишемии-реперфузии на ранней стадии (60 мин – 10 мин) не вызывает серьезных изменений в морфологии мезентеральных артерий и вен, наблюдается лишь увеличение просвета сосудов (рис. 2б,е), на более поздней стадии ишемии-реперфузии (60 мин – 120 мин) происходит еще большее увеличение просвета

сосудов и развитие повреждений сосудистой стенки, отмечается десквамация эндотелиоцитов, в просвете артерий и вен наблюдается скопление агрегатов эритроцитов, что свидетельствует о гиперемии (рис. 2в,ж). Наиболее чувствительными к действию ишемии-реперфузии оказались брыжеечные вены, что, по-видимому, связано с их более тонкой (по сравнению с артериями) сосудистой стенкой. При введении экзогенного Rgh6 перед ишемией-реперфузией также отмечается адаптационное расширение просвета сосуда и агрегация эритроцитов, но при этом наблюдается снижение степени поражения сосудов, проявляющаяся в большей сохранности эндотелия в артериях и венах (рис. 2г,з).

Влияние экзогенного Rgh6 на апоптоз клеток тонкого кишечника и мезентеральных сосудов. При И-Р-поражении тонкого кишечника происходит активация апоптоза. На рис. 3 представлен иммуноблотинг тканей кишечника и мезентеральных сосудов. При И-Р-поражении тканей кишечника происходит активация эффекторной каспазы-3 примерно в восемь раз (рис. 3б), по сравнению с intactным контролем, что проявляется в увеличении содержания ее активной формы на блоте. Активация каспазы-3 в мезентеральных сосудах менее выражена. Введение экзогенного Rgh6 перед И-Р-поражением способствует подавлению апоптоза

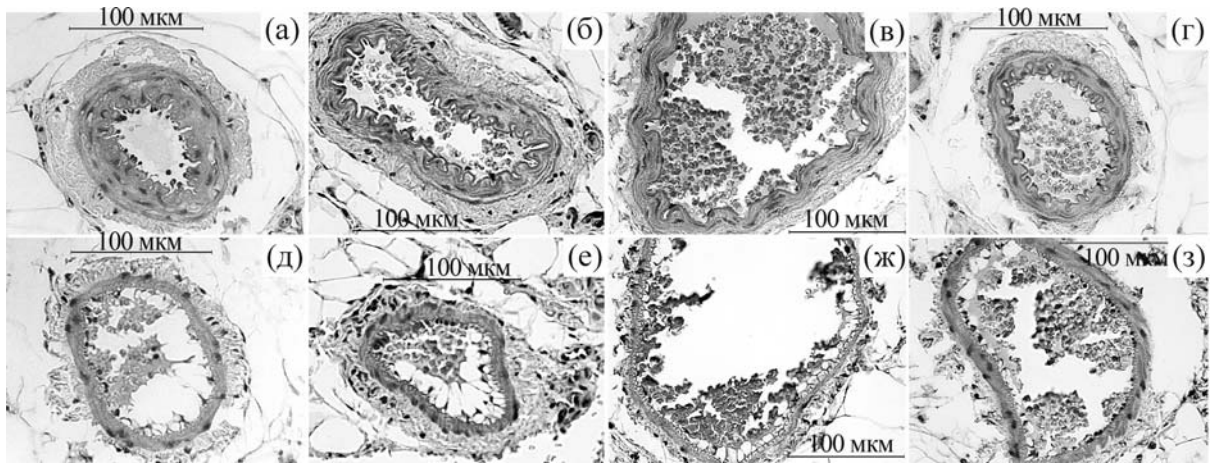


Рис. 2. Гистологический анализ мезентеральных сосудов тонкого кишечника крысы: артерия (а-г), вена (д-з). (а, д) – Интактное животное; (б, е) – ишемия-реперфузия (60 мин – 10 мин); (в, ж) – ишемия-реперфузия (60 мин – 120 мин); (г, з) – введение экзогенного Prx6 за 15 мин до ишемии-реперфузии (60 мин – 120 мин). Окраска гематоксилин-эозином.

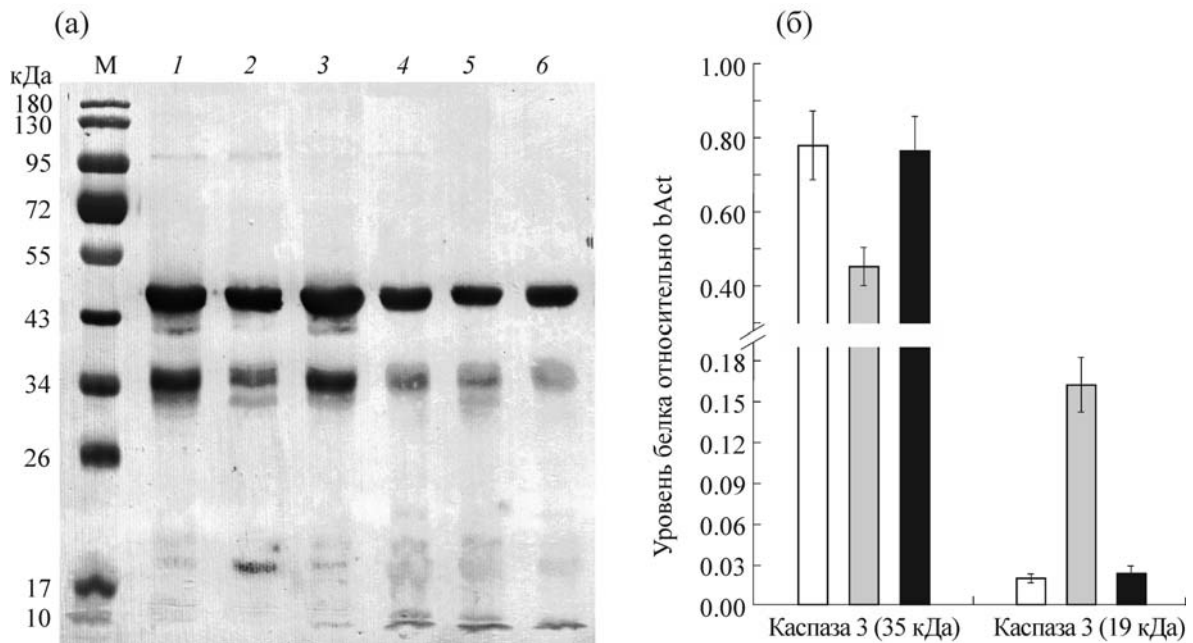


Рис. 3. (а) – Иммуноблоттинг тканей кишечника (1–3) и мезентеральных сосудов (4–6) с применением моноклональных антител к цитоскелетному актину (45 кДа), прокаспазе-3 (35 кДа) и активной каспазе-3 (17–19 кДа): 1, 4 – интактные животные, 2, 5 – при И-Р-поражении, 3, 6 – при введении экзогенного Prx6 за 15 мин перед И-Р-поражением. (б) – Представлены средние значения уровня прокаспазы-3 и активной каспазы-3 в ткани кишечника $\pm SE$ (стандартная ошибка), $n = 5$. Светлые столбики – интактные животные, серые столбики – при И-Р-поражении, темные столбики – при введении экзогенного Prx6 за 15 мин перед И-Р-поражением. Данные нормированы относительно цитоскелетного актина (bAct), уровень которого принят за единицу.

клеток, в частности происходит подавление активации каспазы-3 и снижение уровня ее активной формы до нормальных значений (рис. 3).

Экспрессия генов в кишечной ткани и мезентеральных сосудах при И-Р-поражении и внутривенном введении Prx6. Для оценки изменения окислительного-восстановительного го-

меостаза в кишечной ткани и мезентеральных сосудах под действием ишемии-реперфузии, а также влияния экзогенного Prx6 на эти процессы, был проведен анализ изменения экспрессии генов ферментов антиоксидантного ответа (NRF2, SOD1-3, Prx1-6, GPx1-8, каталаза) и ключевых регуляторов воспаления (NF- κ B,

TNF α , IL-6, ki67) и апоптоза (каспаза 3). В ответ на ишемию-реперфузию в кишечной ткани вследствие развития окислительного стресса наблюдается значительный рост уровня экспрессии генов антиоксидантного ответа: P γ x2, P γ x6 (в два раза), NRF2 (в два-три раза), SOD1 (в два-три раза), SOD3 (в четыре-пять раз), GPx1, GPx2, GPx3 (в два-три раза), GPx7 и GPx8 (в три раза). Наблюдается рост уровня экспрессии генов NF- κ B, IL-6, TNF α (в два-три раза) и каспазы 3 (в три раза) (рис. 4а).

Картина экспрессии генов в мезентеральных сосудах, подверженных И-Р-поражению, в целом схожа с результатами, полученными на кишечной ткани, однако в количественном отношении эти изменения более значительны и в среднем в три-десять раз больше (рис. 4б). Введение экзогенного P γ x6 перед ишемией-реперфузией способствует нормализации уровня экспрессии генов антиоксидантного ответа и апоптоза как в кишечной ткани, так и в мезентеральных сосудах, приближая их к значениям интактных животных, что косвенно указывает на нормализацию окислительно-восстановительного гомеостаза в тканях. Необходимо отметить, что введение экзогенного P γ x6 перед ишемией-реперфузией как в кишечной ткани, так и в мезентеральных сосудах приводит к еще большему росту уровня экспрессии NF- κ B (10–16 раз), IL-6 (5–45 раз), а также к росту экспрессии ki67 (3–5 раз), что является маркером активации пролиферации клеток (рис. 4).

Влияние экзогенного P γ x6 на состояние микроциркуляторного русла тонкого кишечника при И-Р-поражении. Микроциркуляторное русло является неотъемлемой частью структуры слизистой тонкого кишечника. При ишемии-реперфузии в первую очередь повреждаются кровеносные сосуды микроциркуляторного русла [24]. На основе приведенных выше данных (рис. 1, 2) можно заключить, что при И-Р-поражении происходит значительное разрушение микрососудов в ворсинках тонкого кишечника, а также нарушение структуры мезентеральных сосудов. Подобные деструктивные процессы должны сопровождаться снижением уровня перфузии кровью кишечной ткани. Для проверки данного предположения с помощью лазерной доплеровской флоуметрии было исследовано изменение уровня перфузии (показатель микроциркуляции) кровью тонкого кишечника при И-Р-поражении и при применении экзогенного P γ x6 перед ишемией-реперфузией. Необходимо отметить, что значения показателя микроциркуляции полученные с трех анатомически разных участков тонкого кишечника в интактном состоянии практически не отличаются. На

рис. 5 представлен ЛДФ-сигнал, отражающий динамику изменения уровня перфузии при И-Р-поражении во втором участке, т.е. анатомической середине тонкого кишечника.

При отсутствии воздействия значение показателя микроциркуляции составляет около 65 отн. ед. При окклюзии верхней мезентеральной артерии, что соответствует началу ишемии, происходит снижение показателя микроциркуляции более чем в четыре раза до 15 отн. ед. и остается таковым в течение всего периода ишемии (60 мин). С началом реперфузии наблюдается повышение показателя микроциркуляции в сторону нормальных значений, но в течение 4–5 минут продолжающейся реперфузии происходит спад уровня показателя микроциркуляции почти до 50% (30–35 отн. ед.) от исходного значения и остается на этом уровне до конца периода реперфузии (120 мин). Введение экзогенного P γ x6 перед ишемией-реперфузией способствует большему восстановлению кровотока, и концу периода реперфузии (120 мин) уровень показателя микроциркуляции составляет 75–80% (50–55 отн. ед.) от исходного значения (рис. 5). Таким образом, применение P γ x6 способствует восстановлению уровня показателя микроциркуляции практически до нормальных значений, что, по-видимому, связано с минимизацией поражения структуры микроциркуляторного русла и слизистой тонкого кишечника, а также возможным влиянием экзогенного P γ x6 на миогенный тонус сосудов.

Определение уровня NO в крови при И-Р-поражении кишечника и внутривенном введении P γ x6. Как отмечалось выше, при И-Р-поражении тонкого кишечника наблюдается увеличение просвета мезентеральных сосудов, что может быть связано с изменением уровня монооксида азота (NO) в крови, который, как известно, является главным регулятором миогенного тонуса сосудов [25]. Оказалось, что при ишемии-реперфузии тонкого кишечника крысы уровень NO в крови возрастает в 2,5 раза относительно интактного контроля (рис. 6а).

Введение P γ x6 интактным животным приводит к росту уровня NO в 3,5 раза, а введение перед ишемией-реперфузией – более чем в пять раз относительно контрольных значений ($p < 0,05$). Таким образом, экзогенный P γ x6 при внутривенном введении влияет на уровень NO в крови животного и тем самым может влиять на миогенный тонус сосудов.

Экспрессия генов NO-синтаз в мезентеральных сосудах кишечника при И-Р-поражении кишечника и внутривенном введении P γ x6. Увеличение уровня NO в крови крыс, подверженных И-Р-поражению тонкого кишечника

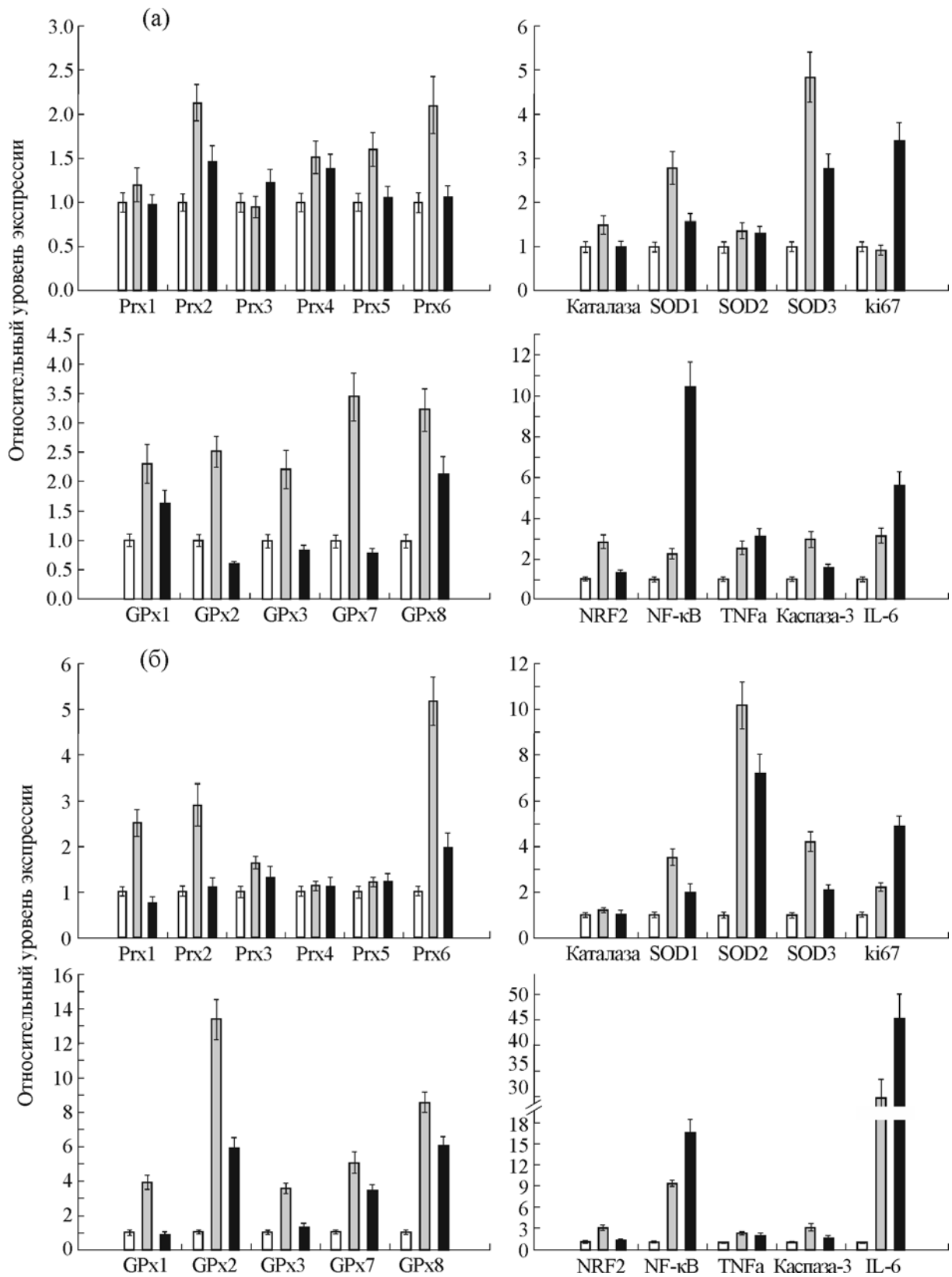


Рис. 4. Экспрессия генов антиоксидантного ответа и маркеров функционального состояния клеток в кишечной ткани (а) и в мезентеральных сосудах (б): светлые столбики – интактные животные, серые столбики – при И-Р-поражении, темные столбики – при введении экзогенного Prx6 за 15 мин перед И-Р-поражением.

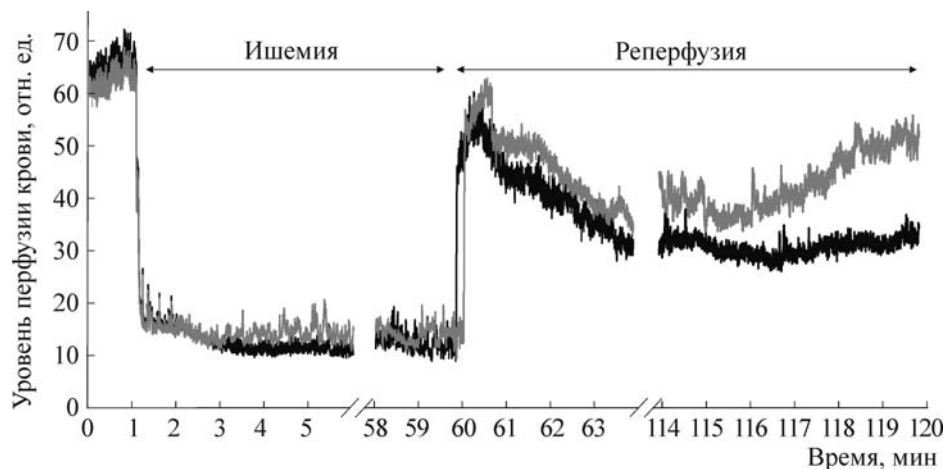


Рис. 5. ЛДФ-сигнал локального кровотока тонкого кишечника при И-Р-поражении (темная кривая) и при использовании экзогенного Rghb перед И-Р-поражением (серая кривая). ЛДФ-сигнал в состоянии покоя (0–1 мин), в период ишемии (1–60 мин) и в период реперфузии (61–120 мин).

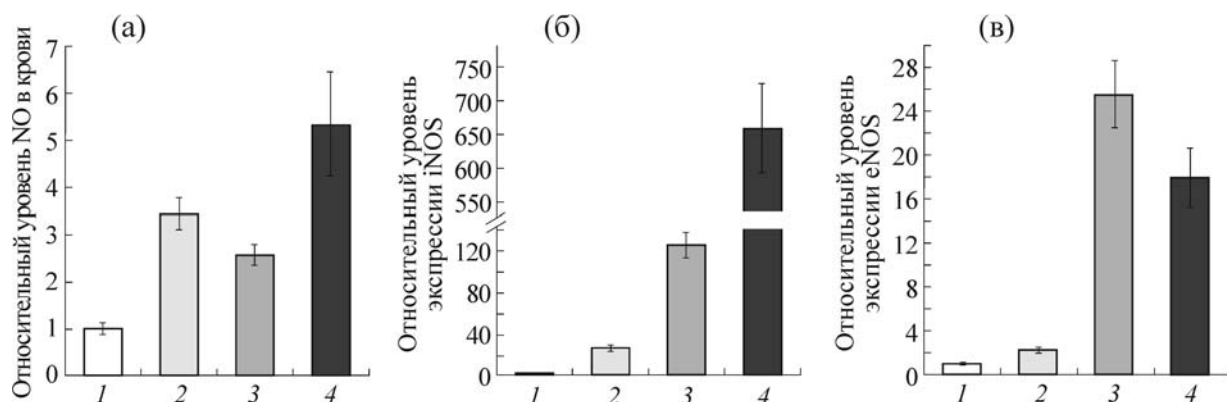


Рис. 6. Уровень NO в сыворотке крови животных (а), уровень экспрессии iNOS (б) и eNOS (в) в мезентеральных сосудах: 1 – intactные животные, 2 – intactные животные, получавшие внутривенную инъекцию Rghb, 3 – после И-Р-поражения, 4 – внутривенное введение Rghb перед И-Р-поражением. Данные рассчитаны относительно контроля $\pm SE$ (стандартная ошибка), $n = 10$. Значения в intactном контроле приняты за единицу.

(рис. бб,в), может быть связано с увеличением активности NO-синтаз. Для проверки этого предположения было проведено исследование изменения уровня экспрессии генов NO-синтаз в мезентеральных сосудах кишечника. Известно, что регуляцию уровня NO в организме млекопитающих осуществляют три типа NO-синтаз: нейрональная (NOS1, nNOS), индуцибельная (NOS2, iNOS) и эндотелиальная (NOS3, eNOS) [26]. Уровень экспрессии nNOS при ишемии-реперфузии тонкого кишечника меняется незначительно (рост в полтора–два раза). Внутривенное введение экзогенного Rghb intactным животным, а также перед И-Р-поражением кишечника не оказывает значительного влияния на уровень экспрессии nNOS. Наибольшие изменения в уровне экспрессии при ишемии-ре-

перфузии наблюдаются для iNOS и eNOS (рис. бб,в). В ответ на ишемию-реперфузию уровень eNOS возрастает более чем в 24 раза, а уровень iNOS – более чем в 120 раз. Введение экзогенного Rghb intactным животным незначительно (примерно в два раза) увеличивает уровень экспрессии eNOS, а введение Rghb перед ишемией-реперфузией приводит, напротив, к небольшому снижению уровня экспрессии eNOS по сравнению с И-Р-контролем. При внутривенном введении Rghb intactным животным наблюдается рост уровня экспрессии iNOS в ~30 раз, а после введения Rghb и последующей ишемии-реперфузии рост составил ~650 раз, что, по-видимому, приводит к росту уровня NO в крови (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологические данные свидетельствуют, что при И-Р-поражении тонкого кишечника экзогенный рекомбинантный Prx6 оказывает существенный защитный эффект, способствуя сохранению структуры слизистой оболочки кишечника и эндотелия мезентеральных сосудов брыжейки (рис. 1, 2). Увеличение просвета сосудов при ишемии-реперфузии, по-видимому, является адаптивным ответом, так как это способствует улучшению циркуляции крови в ишемизированном органе и более быстрому приливу/оттоку метаболитов, что в конечном счете влияет на сохранение его структуры и функции.

При И-Р-поражении как в сосудах, так и в кишечнике увеличивается уровень экспрессии гена каспазы-3, а также наблюдается рост уровня активной формы каспазы-3 (рис. 3, 4), что указывает на активацию гибели клеток по пути апоптоза. Известно, что после ишемии АФК, образующиеся в ранний реперфузионный период, способствуют запуску апоптотической гибели клеток [27]. АФК окисляют и активируют киназу ASK-1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1), которая, в свою очередь, фосфорилирует протеинкиназу JNK (c-Jun N-terminal kinase), активирующую транскрипционный фактор AP-1 и запуск апоптоза [28]. Было показано, что применение антиоксидантов ингибирует активацию JNK/AP-1-сигнального пути и препятствует H_2O_2 -индуцированному апоптозу клеток [29]. Введение экзогенного Prx6 перед ишемией-реперфузией снижает уровень экспрессии каспазы-3 до нормального значения, а также подавляет активацию каспазы-3 (рис. 3, 4), что свидетельствует о снижении уровня апоптотической гибели клеток и, по-видимому, обусловлено антиоксидантной функцией Prx6. Необходимо отметить, что антиапоптотический эффект пероксиредоксина может быть связан не только с их пероксидазной активностью и опосредованным влиянием на JNK/AP-1-сигнальный путь, но также благодаря непосредственному взаимодействию с эффекторными белками апоптоза (ASK-1, p66 и JNK/piGST). Известно, что Prx1 ингибирует JNK/AP-1-путь, взаимодействуя с комплексом JNK/piGST и препятствуя тем самым высвобождению JNK из комплекса и запуску сигнального каскада, ведущего к апоптозу [30]. Подобные данные для Prx6 отсутствуют, однако известно, что piGST является природным восстановителем Prx6 [31], поэтому при проникновении экзогенного Prx6 в клетку нельзя исключать его возможного взаимодействия с комплексом JNK/piGST, что может препятствовать высвобождению JNK из комплекса и развитию апоптоза. Помимо ан-

тиапоптотического действия, введение экзогенного Prx6 увеличивает (в три–пять раз) уровень экспрессии белка ki67 – маркера пролиферации клеток, что указывает на запуск регенерационных процессов в тканях кишечника и мезентеральных сосудах (рис. 4).

При И-Р-поражении в кишечной ткани и мезентеральных сосудах происходит резкий рост (в 2–15 раз) уровня экспрессии большинства исследованных генов антиоксидантного ответа, что коррелирует с полученными ранее данными других авторов [32,33]. Регуляция уровня экспрессии большинства генов антиоксидантного ответа и нормализация окислительно-восстановительного гомеостаза тканей происходят благодаря транскрипционному фактору NRF2, уровень активности которого возрастает в ответ на возросший уровень АФК [34]. Применение экзогенного Prx6 перед ишемией-реперфузией способствует нормализации уровня экспрессии генов антиоксидантного ответа благодаря снижению уровня АФК в тканях, тем самым снижая уровень активного NRF2 и потребность клеток в синтезе новых ферментов-антиоксидантов (рис. 4).

При И-Р-поражении в кишечной ткани (в два–три раза) и мезентеральных сосудах (в 10 раз), в ответ на развитие окислительного стресса происходит активация транскрипционного фактора NF-κB (рис. 4), который регулирует самые различные процессы в клетке: воспаление, репарацию ДНК, синтез ферментов антиоксидантов (SODs) и т.д. [35]. Кратковременная активация NF-κB играет важную роль в запуске регенерационных процессов и иммунном ответе, однако конститутивная активация экспрессии NF-κB может привести к негативным последствиям, в частности, при И-Р-поражениях NF-κB опосредованная активация генов, кодирующих селектины и интегрины, приводит к адгезии лейкоцитов к стенкам сосудов и локальному нарушению кровотока [36]. Было показано, что ингибирование NF-κB опосредованного сигнального пути снижает степень повреждения слизистой оболочки тонкого кишечника при И-Р-поражениях [37]. Низкомолекулярные антиоксиданты (L-цистеин, N-ацетилцистеин, витамин E и его производные) ингибируют АФК-зависимую активацию NF-κB [35], однако введение экзогенного фермента-антиоксиданта Prx6 перед ишемией-реперфузией кишечника приводит, напротив, к еще большему росту уровня экспрессии NF-κB (в 10 раз в кишечной ткани, в 16 раз – в сосудах) (рис. 4). Таким образом, введение экзогенного Prx6 перед И-Р-поражением должно было способство-

вать развитию еще большего воспалительного процесса и приводить к еще более пагубным последствиям, чего на самом деле по данным гистологии и ЛДФ не наблюдается. Известно, что экстраклеточная форма P_{rx6} может выступать в роли сигнальной молекулы и через взаимодействие с рецептором TLR4 способствует росту уровня экспрессии NF-κB [38], который в свою очередь регулирует уровень экспрессии различных цитокинов, в том числе IL-6. В ответ на И-Р-поражение происходит рост уровня экспрессии IL-6 в кишечной ткани (в три раза) и в мезентеральных сосудах (в 30 раз), а введение P_{rx6} перед ишемией-реперфузией приводит к еще большему росту уровня IL-6 (в 5 раз в кишечной ткани и в 45 раз в сосудах). IL-6 является многофункциональным цитокином, который участвует как в провоспалительных (активация иммунной системы), так и в противовоспалительных (стимуляция пролиферации эпителиальных клеток и ингибирование апоптоза) процессах в клетке, при этом сдвиг в ту или иную сторону зависит от многих внешних факторов. Например, на животной модели воспаления кишечника было показано, что IL-6 необходим для регенерации эпителия и поддержания нормальной барьерной функции кишечника. Также известно, что IL-6 играет важную роль в процессе регенерации печени. Таким образом, рост уровня экспрессии IL-6 при И-Р-поражении и еще больший рост в присутствии экзогенного P_{rx6} может играть положительную роль в STAT3 – опосредованной регенерации эпителиальных клеток кишечника и эндотелия сосудов [39].

Известно, что при ишемии-реперфузии любого органа в первую очередь повреждаются кровеносные сосуды. Эндотелиальные клетки, выстилающие внутреннюю поверхность всех кровеносных сосудов, являются весьма чувствительными к действию ишемии-реперфузии и нарушение их нормального функционирования приводит к тяжелым последствиям для всей сердечно-сосудистой системы [2]. Введение экзогенного P_{rx6} при И-Р-поражении способствует сохранению нормального морфологического состояния мезентеральных сосудов и снижению поражения эндотелиоцитов. Важная роль пероксиредоксинов в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза эндотелия сосудов была показана ранее, на первичной культуре эндотелиоцитов пупочной вены человека. Показано, что в них пероксидазная активность преимущественно обеспечивается пероксиредоксинами, а уровень мРНК P_{rx1}–6 более чем на порядок превосходит уровень

мРНК «классических» антиоксидантных ферментов [40].

После ишемии, с началом реперфузии происходит резкий рост уровня АФК в тканях, и в этот период в кишечнике происходит поражение апикальной части ворсинок, что коррелирует со снижением уровня перфузии в этот период (рис. 5). Вероятно, это связано с процессами тромбообразования, адгезией лейкоцитов к эндотелию, приводящих к сужению просвета сосудов [4]. Применение экзогенного P_{rx6} способствует восстановлению уровня перфузии кишечной ткани кровью к концу периода реперфузии практически до интактного состояния (80%), при этом в контроле И-Р-поражения без применения P_{rx6} наблюдается восстановление перфузии лишь на 50% от исходного уровня. Нормализация состояния микроциркуляторного русла в условиях ишемии-реперфузии под действием экзогенного P_{rx6} обусловлена как сохранением структуры самих сосудов, так и влиянием P_{rx6} на уровень NO в крови. Введение экзогенного P_{rx6} перед ишемией-реперфузией приводит к резкому увеличению уровня экспрессии iNOS по сравнению с И-Р-контролем (со 120 до 650 раз), что коррелирует с еще большим ростом уровня NO в крови (рис. 6а). Влияние P_{rx6} на экспрессию iNOS (рис. 6б), возможно, опосредовано взаимодействием P_{rx6} с рецептором TLR4 [38], приводящим к активации NF-κB, который в свою очередь регулирует уровень экспрессии iNOS [41]. Рост уровня NO в свою очередь ингибирует транскрипцию NF-κB, путем активации его ингибитора (I-κBa), таким образом, по принципу обратной связи происходит регуляция NO-синтаз [42].

Рост уровня NO, вызванный действием экзогенного P_{rx6}, может привести к противоположным последствиям. Положительная роль NO заключается в вазодилатации сосудов и улучшении функционирования микроциркуляторного русла, NO препятствует агрегации тромбоцитов и адгезии лейкоцитов к эндотелию сосудов [43,44]. NO выполняет антиоксидантную функцию, которая проявляется в нейтрализации супероксид аниона при непосредственном взаимодействии, так и путем ингибирования NADPH оксидазы нейтрофилов [45]. Однако кроме положительных эффектов существуют и возможные негативные последствия, так как рост уровня NO может привести в условиях повышенного содержания АФК к образованию (ре)активных форм азота (РФА), в частности к образованию токсичного пероксинитрита и его производных форм [46]. Несмотря на мощный рост уровня NO при ишемии-реперфузии и потенциальную опасность образования еще

большого количества токсичных перекисных молекул (АФК + РФА), широкая субстратная специфичность P_{rx}6 позволяет избежать этой проблемы, так как известно, что этот фермент способен к эффективной нейтрализации пероксинитрита [47].

Таким образом, защитные свойства экзогенного P_{rx}6 при нейтрализации ишемически-реперфузионных поражений складываются из нескольких составляющих. Одна составляющая – это способность P_{rx}6 к нейтрализации широкого спектра АФК/РФА, образующихся при развитии окислительного стресса на стадии реперфузии, что способствует быстрой нормализации окислительно-восстановительного гомеостаза в тканях и минимизации их структурных повреждений. Вторая составляющая – это способность P_{rx}6 к ингибированию апоптоза клеток и активации процессов регенерации через сигнально-регуляторные пути. По-видимому, в случае И-Р-поражений сигнальная функция экзогенного P_{rx}6 происходит через TLR4/NF-κB сигнальный путь, однако необходимо отметить, что сегодня для пероксиредоксинов показано участие в многочисленных сигнальных путях, среди которых можно отметить следующие: NRF2/KEAP1, PI3K-Akt, AP-1/JNK, JAK2/STAT3, mTOR/p70S6K, Nf-κB/Gli1 [34, 38, 39, 48, 49]. Мы предполагаем, что пероксиредоксины являются своего рода переключателями между этими сигнальными путями. Известно, что тиолсодержащие ферменты весьма чувствительны к изменению содержания АФК в клетках. В зависимости от концентрации АФК меняется степень окисления цистеина в активном центре пероксиредоксинов (три степени окисления), что в свою очередь влияет на их физико-химические свойства [5]. К примеру 2-Cys-пероксиредоксины (P_{rx}1–P_{rx}4) при окислении образуют олигомерные структуры, обладающие шаперонной активностью, а 1-Cys-пероксиредоксины (P_{rx}6) начинают проявлять активность фосфолипазы А2. Таким образом, пероксиредоксины могут тонко «чувствовать» изменения окислительно-восстановительного статуса клетки и направлять ее дальнейшее развитие в зависимости от степени этих изменений. Например, для P_{rx}1 в разных экспериментах показано как антиапоптотическое действие, так и, напротив, стимулирование апоптоза [30, 50]. Несмотря на большое количество исследований, посвященных сигнально-регуляторной функции пероксиредоксинов, на сегодняшний день эти данные весьма разрознены и зачастую противоречивы, их понимание требуют дальнейших исследований.

Работа поддержана грантами Российского фонда фундаментальных исследований (№№ 15-04-04021, 17-04-00356, 17-44-5003710-р), грантом Президента РФ (МК-2261.2017.4) и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. D. G. Harrison, *J. Clin. Invest.* **100**, 2153 (1997).
2. D. N. Granger and P. R. Kviety, *Redox Biol.* **6**, 524 (2015).
3. H. K. Eltzschig and T. Eckle, *Nat. Med.* **17**, 1391 (2011).
4. I. H. Mallick, W. Yang, M. C. Winslet, and A. M. Seifalian, *Dig. Dis. Sci.* **49**, 1359 (2004).
5. S. G. Rhee, *Mol. Cells* **39**, 1 (2016).
6. T. Ishii, *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 189 (2015).
7. A. Kümin, C. Huber, T. Rüllicke, et al., *Am. J. Pathol.* **169**, 1194 (2006).
8. S. Zhang, W. Wang, Q. Gu, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **69**, 96 (2014).
9. Y. Manevich and A. B. Fisher *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 1422 (2005).
10. Y. Wang, S. I. Feinstein, A. B. Fisher, *J. Cell Biochem.* **104**, 1274 (2008).
11. T. Eismann, N. Huber, T. Shin, et al., *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **296**, 266 (2009).
12. S. L. Sorrell, Z. J. Golder, D. B. Johnstone, and F. E. Karet-Frankl, *Kidney Int.* **89**, 105 (2016).
13. M.H. Park, M. Jo, Y.R. Kim, et al., *Pharmacol. Ther.* **163**, 1 (2016).
14. R. Tulsawani, L. S. Kelly, N. Fatma, et al., *BMC Neurosci.* **11**, 125 (2010).
15. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, E. E. Fesenko, et al., *Free Radic. Res.* **51**, 148 (2017).
16. M. Sharapov, A. Volkova, E. Mubarakshina, et al., *Respiratory J.* **42s**, 85 (2013).
17. О. А. Палутина, М. Г. Шарапов, А. А. Темнов и В. И. Новоселов, *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **160**, 322 (2015).
18. A. Gordeeva, A. Temnov, A. Charnagalov, et al., *Dig. Dis. Sci.* **60**, 3610 (2015).
19. М. Г. Шарапов, В. И. Новоселов и В. К. Равин, *Молекуляр. биология* **43**, 505 (2009).
20. S. I. Kim, Y. B. Kim, K. M. Koh, et al., *J. Surg. Res.* **179**, 99 (2013).
21. D. A. Hoff, H. Gregersen, and J. G. Hatlebakk, *World J. Gastroenterol.* **15**, 198 (2009).
22. C. J. Chiu, A. H. McArdle, R. Brown, et al., *Arch. Surg.* **101**, 478 (1970).
23. T. D. Schmittgen and K. J. Livak, *Nat. Protoc.* **3**, 1101 (2008).
24. D. N. Granger, M. Höllwarth, and D. Parks, *Acta Physiol. Scand. Suppl.* **548**, 47 (1986).
25. D. A. Wink, J. A. Cook, R. Pacelli, et al., *Toxicol. Lett.* **82–83**, 221 (1995).

26. S. Daff, Nitric Oxide **23**, 1 (2010).
27. G. Wang, J. Yao, Z. Li, et al., Antioxid. Redox Signal. **24**, 961 (2016).
28. Y. Ishikawa, T. Yokoo, and M. Kitamura, Biochem. Biophys. Res. Commun. **240**, 496 (1997).
29. V. Moreno-Manzano, Y. Ishikawa, J. Lucio-Cazana, and M. Kitamura, J. Biol. Chem. **274**, 20251 (1999).
30. Y. J. Kim, W. S. Lee, C. Ip, et al., Cancer Res. **66**, 7136 (2006).
31. S. Zhou, E. Sorokina, S. Harper, et al., Free Radic. Biol. Med. **94**, 145 (2016).
32. M. Kaçmaz, H. S. Oztürk, M. Karaayvaz, et al., Can. J. Surg. **42**, 4271 (1999).
33. P. R. Bertolotto, A. T. Ikejiri, F. SomaioNeto, et al., Acta Cir. Bras. **27**, 773 (2012).
34. T. Ishii, K. Itoh, S. Takahashi, et al., J. Biol. Chem. **275**, 16023 (2000).
35. F. J. Staal, M. Roederer, L. A. Herzenberg, and L. A. Herzenberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **187**, 9943 (1990).
36. B. Vollmar and M. D. Menger, Langenbecks Arch. Surg. **396**, 13 (2011).
37. L. Zou, B. Attuwaybi, and B. C. Kone, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **284**, 713 (2003).
38. X. Kuang, L. F. Wang, L. Yu, et al., Free Radic. Biol. Med. **71**, 165 (2014).
39. F. Schaper and S. Rose-John, Cytokine Growth Factor Rev. **26**, 475 (2015).
40. М. Г. Шарапов, Р. Г. Гончаров, А. Е. Гордеева и др., Докл. РАН **471**, 241 (2016).
41. X. W. Qu, H. Wang, I. G. De Plaen, et al., FASEB J. **15**, 439 (2001).
42. J. Kopincová, A. Púszterová, and I. Bernátová, Interdiscip. Toxicol. **4**, 63 (2011).
43. O. Kosonen, H. Kankaanranta, U. Malo-Ranta, and E. Moilanen, Eur. J. Pharmacol. **382**, 111 (1999).
44. M.W. Radomski, R.M. Palmer, and S. Moncada, Lancet **2**, 1057 (1987).
45. R. M. Clancy, J. Leszczynska-Piziak, and S. B. Abramson, J. Clin. Invest. **90**, 1116 (1992).
46. P. Pacher, J. S. Beckman, and L. Liaudet, Physiol. Rev. **87**, 315 (2007).
47. I. V. Peshenko and H. Shichi, Free Radic. Biol. Med. **31**, 292 (2001).
48. H. M. Yun, K. R. Park, M. H. Park, et al., Free Radic. Biol. Med. **80**, 136 (2015).
49. F. Gong, G. Hou, H. Liu, and M. Zhang, Med. Onco. **32**, 455 (2015).
50. A. Morinaka, Y. Funato, K. Uesugi, and H. Miki, Oncogene **30**, 4208 (2011).

The Effect of Exogenous Peroxiredoxin 6 on the State of Mesenteric Vessels and Small Intestine under Ischemia-Reperfusion Injury

M.G. Sharapov, A.E. Gordeeva, R.G. Goncharov, I.V. Tikhonova, V.K. Ravin,
A.A. Temnov, E.E. Fesenko and V.I. Novoselov

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

The pathogenesis of ischemia-reperfusion injury is mediated by oxidative stress. The intake of exogenous antioxidants suppresses oxidative stress and may decrease the severity of ischemia-reperfusion injury. The intestine is one of the most sensitive organs to the effect of ischemia-reperfusion. A rat model of ischemia-reperfusion injury to the small intestine, based on superior mesenteric artery, was used. Recombinant peroxiredoxin 6, an ancient family of peroxidases able to neutralize a broad range of both organic and inorganic peroxide substrates, was used as exogenous antioxidant. Intravenous injection of exogenous peroxiredoxin 6 prior to ischemia-reperfusion minimizes the injury and reduces cell death by apoptosis in the intestinal tissue and mesenteric vessels. It was shown that exogenous peroxiredoxin 6 led to elevated blood NO level in the animals, it was correlated with the enhanced inducible NO synthase expression. Thus, the use of exogenous peroxiredoxin 6 in ischemia-reperfusion injury of the intestine and mesenteric vessels promotes normalization of redox homeostasis in the tissues, preservation of their structure and restoration of the microvasculature.

Keywords: peroxiredoxin 6, ischemia-reperfusion, intestine, mesenteric vessels, gene expression