

DOI: 10.15825/1995-1191-2021-3-122-133

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО ПЕРОКСИРЕДОКСИНА 6 НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ИЗОЛИРОВАННОЙ ПОЧКИ КРЫСЫ

А.Е. Гордеева, М.Г. Шарпов, В.И. Новоселов

Институт биофизики клетки ФИЦ «ПНЦБ РАН», Пушкино, Российская Федерация

Цель: исследовать роль пероксиредоксина 6 как средства для сохранения морфофункционального состояния ишемизированной изолированной почки при перфузии. **Материалы и методы.** В работе была использована модель изолированной перфузируемой почки крысы. Срок ишемии составил 5 и 20 минут, перфузия – 50 минут. Для оценки эффективности пероксиредоксина 6 при разной продолжительности ишемии использовали общепринятые критерии функционирования почки и гистологические методы. **Результаты.** На коротких сроках тепловой ишемии экзогенный Prx6 улучшает морфофункциональное состояние изолированной почки при перфузии. В этот период основные критерии функционирования изолированной ишемизированной почки достигают допустимых значений, почечная паренхима без выраженных повреждений. К концу перфузии отмечается увеличение скорости потока мочи, скорости клубочковой фильтрации, фракционной реабсорбции глюкозы, концентрации мочевины в моче и доли первичной мочи от 1,5 до 2 раз по сравнению с контрольным поражением. При 20-минутной ишемии изолированную почку можно признать нежизнеспособной по критериям функционирования, и положительный эффект пероксиредоксина 6 нивелируется. **Заключение.** Применение рекомбинантного пероксиредоксина 6 как средства для сохранения морфофункционального состояния изолированных почек может быть эффективным подходом в предупреждении ишемически-реперфузионных поражений органов.

Ключевые слова: изолированная почка, ишемия, перфузия, пероксиредоксин.

THE EFFECT OF EXOGENOUS PEROXIREDOXIN 6 ON THE MORPHOFUNCTIONAL STATE OF ISOLATED RAT KIDNEY

A.E. Gordeeva, M.G. Sharapov, V.I. Novoselov

Institute of Cell Biophysics, Pushchino, Moscow, Russian Federation

Objective: to investigate the role of peroxiredoxin 6 (PRX6) in preserving the morphofunctional state of ischemic isolated kidney during perfusion. **Materials and methods.** The model of an isolated perfused rat kidney was used. Ischemia time was 5 and 20 minutes, perfusion was 50 minutes. To evaluate the effectiveness of PRX6 at different ischemia times, we used the conventional criteria of kidney function and histological methods. **Results.** During short warm ischemia times, exogenous PRX6 improves the morphofunctional state of an isolated kidney during perfusion. During this period, the main criteria for functioning of the isolated ischemic kidney reach acceptable values, renal parenchyma is without severe damage. By the end of perfusion, there was an increase in urine flow rate, glomerular filtration rate, fractional glucose reabsorption, urine urea concentration and proportion of primary urine from 1.5 to 2 times compared with the control lesion. At 20-minute ischemia, the isolated kidney can be recognized as non-viable according to the functioning criteria; the positive effect of PRX6 is leveled. **Conclusion.** The use of recombinant peroxiredoxin 6 for preserving the morphofunctional state of isolated kidneys can be an effective approach in preventing ischemia–reperfusion injury.

Keywords: isolated kidney, ischemia, perfusion, peroxiredoxin.

Для корреспонденции: Гордеева Алина Евгеньевна. Адрес: 142290, Пушкино, ул. Институтская, д. 3. Тел. (496) 773-05-61. E-mail: gordeeva1310@yandex.ru

Corresponding author: Alina Gordeeva. Address: 3, Institutsкая str., Pushchino, 142290, Russian Federation. Phone: (496) 773-05-61. E-mail: gordeeva1310@yandex.ru

ВВЕДЕНИЕ

Популярность использования изолированной почки в качестве предмета исследования обусловлена удобством ее применения для изучения секреторной функции почек, метаболизма лекарственных препаратов, скрининга клинически значимых лекарственных взаимодействий и многих аспектов почечного метаболизма без системных влияний, таких как артериальное давление, гормоны или нервная иннервация [1–3]. Изолированная почка представляет собой модель *ex vivo*, которая состоит из целой почки, изолированной от сосудистой сети. Можно выделить две модификации модели. Большинство исследователей используют модификацию, описанную Nishitsutsuji-Uwo et al., – перфузия почки через верхнюю мезентеральную артерию без периода ишемии [4, 5]. Вторая модификация – перфузия почки ретроградно, через брюшную аорту без периода ишемии [3, 6]. Для интерпретации результатов важно, чтобы изолированная почка функционировала в течение всего периода перфузии. Для оценки функционирования используют ряд критериев [1]. В настоящей работе мы использовали модель ретроградной перфузии почки, принципиальным моментом было наличие периода ишемии изолированной почки.

Ишемия и последующая реперфузия органа приводит к активации патологических процессов, в частности, запускает лавинообразный рост активных форм кислорода и развитие окислительного стресса, тем самым приводя к структурно-функциональному поражению тканей [7, 8]. Именно ишемически-реперфузионное поражение (И-РП) является основной причиной первичной дисфункции трансплантата и снижения его жизнеспособности [9]. В этом случае для снижения концентрации активных форм кислорода и уменьшения поражения изолированных органов основным направлением терапии может стать использование антиоксидантных препаратов, в частности, использование антиоксидантных ферментов семейства пероксиредоксинов, в связи с их широким распространением в организме и мультифункциональностью [10–13]. Среди представителей семейства пероксиредоксину 6 (Prx6) посвящено наибольшее количество работ, указывающих на его протекторную роль при свободно-радикальных патологиях [8, 14–16], в том числе и в защите изолированных органов от И-РП [17, 18]. Учитывая протекторную роль Prx6, следует изучить возможность его применения для сохранения морфофункционального состояния изолированной ишемизированной почки.

Цель: исследовать роль пероксиредоксина 6 как средства для сохранения морфофункционального состояния ишемизированной изолированной почки при перфузии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах были использованы крысы-самцы линии Вистар весом 230 г. Животных содержали в условиях вивария ИБК РАН (г. Пущино 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». Основной документ, регламентирующий проведение настоящего исследования, – «Руководство по работе с лабораторными животными ИБК РАН» № 57 от 30.12.2011.

Рекомбинантный Prx6 был получен в лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки РАН по ранее описанной методике [19].

В работе была использована модель изолированной перфузируемой почки (ИПП) предложенная J. Czogalla et al., с некоторыми модификациями [3]. Крысы были наркотизированы путем внутривенного введения 0,5 мл 3,5% (3 мг/кг) зоветила 100. Для предотвращения свертываемости крови использовали гепарин (5000 ЕД/мл). Ишемия была инициирована проведением декапитации. Было выбрано два временных периода ишемии: 5 и 20 минут. Время перфузии составляет 50 минут. В качестве раствора для перфузии использовали питательную среду DMEM (GIBCO, Invitrogen) с содержанием глюкозы 4,5 г/л. В среду включали мочевины (5 мМ/литр), креатинин (80 мкМ/литр), 6% БСА и 0,6% БСА. Перед перфузией раствор оксигенировали смесью O_2/CO_2 (95%/5%), pH 7,4. Температура раствора субнормотермическая (30–35 °C). Алгоритм перфузии изолированной почки представлен на рис. 1.

Период ишемии. С началом ишемии в течение 5 минут производили изолирование правой почки от общей сосудистой системы путем последовательного наложения лигатур на сосуды и катетеризацию почечной артерии через брюшную аорту. Дополнительно проводили отсечение нижней полой вены с ее последующей катетеризацией. Правый мочеточник был изолирован, катетеризирован и помещен в резервуар для сбора мочи [3, 20]. Через 5 минут ишемии производили удаление крови из сосудистого русла изолированной почки путем ее промывки перфузионным буфером в течение 5 минут. Для определения эффектов экзогенного пероксиредоксина 6 в перфузионный буфер добавляли Prx6 в концентрации 0,2 мг/мл и перфузировали им изолированную почку на этапе удаления крови из сосудистого русла. Скорость перфузии на данном этапе – 3 мл/мин. Концентрация экзогенного Prx6 в перфузионном растворе была выбрана на основании полученных ранее данных по эффективному снижению И-Р поражения тонкого кишечника и почек с помощью Prx6 [8, 14].

Период перфузии. По окончании ишемии производили перфузию изолированной почки перфузионным буфером в течение 50 минут. На данном этапе Prx6 в перфузионном буфере отсутствует. Первые 20 минут перфузии – стабилизационный период. В течение всего срока перфузии каждые 10 минут осуществляли сбор мочи из мочеточника. По окончании перфузии почечная ткань фиксировалась для дальнейшего исследования. Все крысы были разделены на 10 групп (n = 5) (табл. 1).

Для оценки эффективности Prx6 как средства для сохранения морфофункциональных характеристик изолированной почки в течение всего периода перфузии анализировали несколько общепринятых критериев функционирования [1]. Величину этих критериев определяли в исследуемых пробах мочи каждые 10 минут.

– Перфузионное давление (ПД), мм рт. ст., поддерживалось на уровне 90–100 мм рт. ст. и регулировалось изменением скорости перфузионного

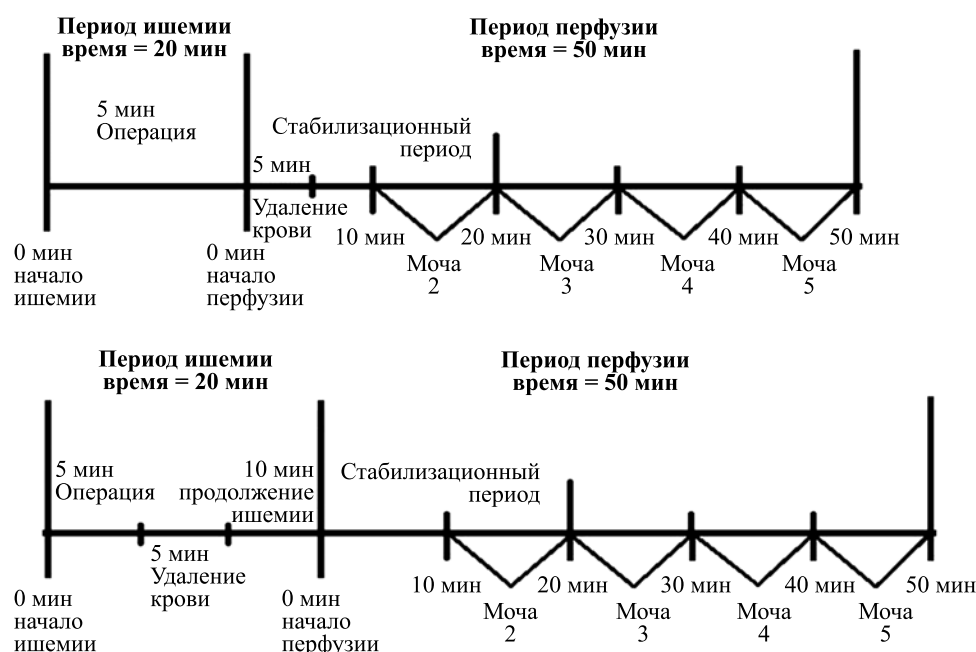


Рис. 1. Алгоритм перфузии изолированной почки: а – период ишемии 5 минут; б – период ишемии 20 минут. Prx6 (0,2 мг/мл) был добавлен в перфузионный буфер на этапе удаления крови. На этапе перфузии Prx6 в перфузионном буфере отсутствует

Fig. 1. Isolated kidney perfusion algorithm: а – ischemia time 5 min; б – ischemia time 20 min. Prx6 (0,2 mg/ml) was added to perfusion buffer at the stage blood removal. There is no Prx6 in the perfusion buffer during the perfusion period

Таблица 1

Экспериментальные группы

Experimental groups

Экспериментальная группа	Время ишемии (мин)	Добавка / этап внесения добавки в перфузионный буфер
1	5	6% БСА / перфузионный период
2		0,6% БСА / перфузионный период
3		Без добавок
4		Prx6 / этап удаления крови
5	20	6% БСА / перфузионный период
6		0,6% БСА / перфузионный период
7		Без добавок
8		Prx6 / этап удаления крови
9	0	Перфузии нет
10	90	Перфузии нет

Примечание. БСА находился в перфузате на этапе перфузии. Prx6 находился в перфузате на этапе удаления крови. Группа 9 – почки интактных животных, группа 10 – почки, без периода перфузии.

Note. BSA was in perfusate at the perfusion period. Prx6 was in perfusate at the blood removal period. Group 9 – kidneys of intact animals, group 10 – kidneys, without perfusion period.

потока (СПП). СПП считалась удовлетворительной, если соответствовала скорости почечного кровотока в норме – 4–5,3 мл/мин·г почки [21].

- Скорость потока мочи (СПМ), мкл/мин, рассчитывали путем деления собранного объема мочи из мочеоточника на время. Первый сбор мочи стартовал через 20 мин после начала перфузии, так как первые 15 минут мочеиспускание было нерегулярным. Значения СПМ ниже 30 мкл/мин неудовлетворительные и указывают на отсутствие процессов ультрафильтрации [1].
- Скорость клубочковой фильтрации (СКФ), мл/мин·г, определяли по клиренсу креатинина с использованием уравнения [5]:

$$СКФ = \frac{M_{кр} \times СПМ}{P_{кр}},$$

где $M_{кр}$ – концентрация креатинина в моче (мг/мл); СПМ – скорость потока мочи (мл/мин); $P_{кр}$ – концентрация креатинина в перфузате (мг/мл). Минимально допустимое значение для СКФ >0,5 мл/мин [6]. Концентрацию креатинина в исследуемых пробах мочи и перфузата определяли на приборе Reflotron Plus («Roche Diagnostics», Швейцария) каждые 10 минут.

- Фракция реабсорбированной глюкозы (ФРГ), %, выражается как доля глюкозы из ультрафильтрата, реабсорбированного почками [1, 5]:

$$ФРГ = 1 - \frac{СПМ \times M_{гл}}{СКФ \times P_{гл}},$$

где $M_{гл}$ – концентрация глюкозы в моче; $P_{гл}$ – концентрация глюкозы в перфузате; СКФ – скорость клубочковой фильтрации. Концентрацию глюкозы в исследуемых пробах мочи определяли на глюкометре Ассу-Chek (Roche, Germany) каждые 10 минут. ФРГ отражает функциональность проксимальных каналов и в модели ИПП должна быть не менее 90% [1, 2].

- Доля терминальной мочи (ДТМ), %, выражается как отношение: количество терминальной мочи в пробе / СКФ. Данный критерий отражает % ультрафильтрата, который выделяется как терминальная моча [22].
- Количество мочевины в моче (КММ), мкмоль/10 мин, определяли как произведение: концентрация мочевины в пробе мочи × количество вторичной мочи в пробе. Концентрацию мочевины в исследуемых пробах мочи определяли на приборе Reflotron Plus («Roche Diagnostics», Швейцария) каждые 10 минут. Концентрация мочевины в перфузате 5 мМ.

Выполняли гистологическое исследование почечной ткани, включающее окраску парафиновых срезов ренальной ткани гематоксилин-эозином (VITROSTAIN Biovitrum, Россия). Толщина среза

3 мкм. Микроскопический анализ срезов проводили на микроскопе Leica DM 6000 с цифровой камерой Leica DFC 490.

Статистический анализ и построение графиков выполняли с использованием программного обеспечения SigmaPlot 11.0 Software (Systat Software Inc). Результаты выражали как среднее значение ± стандартное отклонение. Значение $p < 0,05$ принимали статистически достоверным.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка функционального состояния изолированной ишемизированной почки

Группы 1–4 были подвергнуты периоду ишемии, равному 5 минутам, период перфузии 50 минут. Дизайн эксперимента представлен на рис. 1.

При введении в перфузионный буфер 6% БСА (группа 1) не наблюдалось образования мочи, хотя ПД и СПП соответствовали нормальным значениям в течение всего периода перфузии. Отсутствие мочи делает невозможной оценку исследуемых функциональных критериев. В группе 2 (0,6% БСА) к окончанию перфузионного периода из всех критериев только СПП и СПМ соответствуют минимально допустимым значениям ($5,7 \pm 0,5$ мл/мин·г и $49 \pm 2,5$ мкл/мин соответственно).

Динамика критериев функционирования изолированной ишемизированной почки при перфузии в группах 3–4 представлена на рис. 2. ПД и СПП были постоянными в течение перфузии в обеих группах и имели допустимые значения. $P_{гхб}$ не оказывал влияния на динамику этих критериев (рис. 2, а). Для СПМ наблюдается рост в течение перфузии и значения критерия выше минимально допустимых в течение всего периода перфузии в обеих группах. При использовании $P_{гхб}$ происходит достоверное увеличение СПМ к концу перфузии в 1,5 раза относительно группы 3 (115 ± 23 и 178 ± 28 мкл/мин соответственно) (рис. 2, б, табл. 2). В группе 3 СКФ не изменяется в течение периода перфузии и к окончанию перфузии не достигает минимально допустимых значений ($0,2 \pm 0,04$ мл/мин·г) (рис. 2, в); ФРГ, несмотря на рост в течение перфузии, к концу перфузионного периода также не достигает минимально допустимых значений и составляет 71% (рис. 2, д, табл. 2). Использование $P_{гхб}$ выводит эти критерии на значения выше минимальных. Данные выявили статистически значимую разницу между группами 3 и 4 по этим критериям к концу перфузионного периода (табл. 2). ДТМ выше в группе 3, здесь 63% первичного ультрафильтрата выводилось как терминальная моча, напротив, в группе с $P_{гхб}$ этот показатель в 1,5 раза ниже ($p < 0,05$) (рис. 2, г). В обеих группах наблюдается рост КММ к концу перфузии, однако значение этого критерия достоверно выше

в 2 раза в группе с Rgx6 ($7,3 \pm 1,8$ мкмоль/10 мин и $13 \pm 1,7$ мкмоль/10 мин соответственно) (рис. 2, е). В табл. 2 приведены значения критериев функциональности почки в группах 1–4 в конце перфузии.

Группы 5–8 были подвергнуты периоду ишемии равному 20 минутам, период перфузии 50 минут. Дизайн эксперимента представлен на рис. 1.

При введении в перфузионный буфер 6% БСА (группа 5) не наблюдалось образования мочи, СПП не соответствовала минимально допустимым значениям. Отсутствие мочи делает невозможной оценку исследуемых параметров функционирования. В группе 6 (0,6% БСА) к окончанию перфузионного периода из всех критериев только СПП соответствует мини-

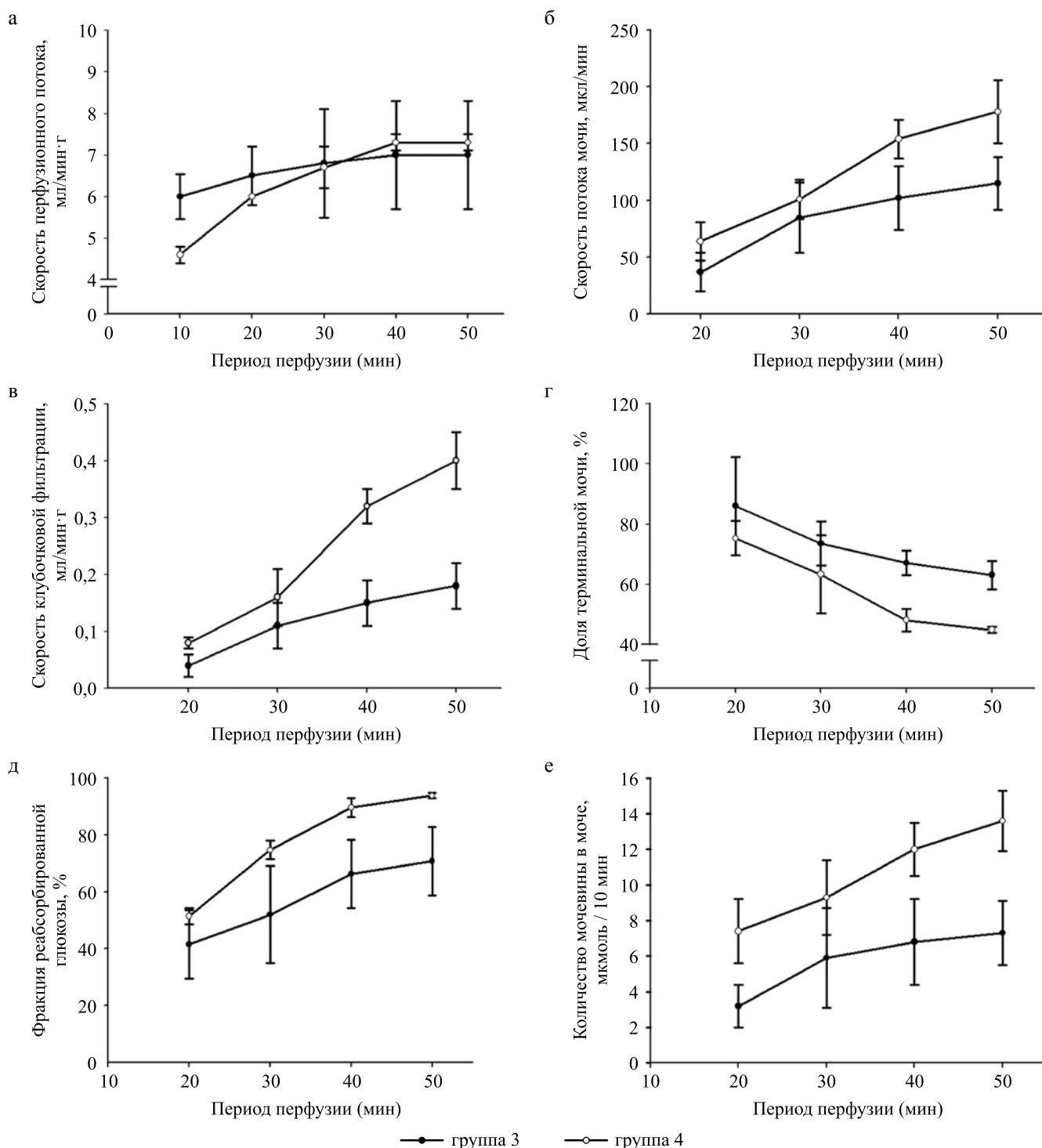


Рис. 2. Динамика критериев функционирования изолированной ишемизированной почки при перфузии (ишемия 5 минут / перфузия 50 минут). Первые 20 минут перфузии – стабилизационный период

Fig. 2. The dynamic of the criteria of the functioning of an isolated ischemic kidney during perfusion (ischemia 5 minutes / perfusion 50 minutes). The first 20 minutes of perfusion is the stabilization period

мально допустимым значениям ($44 \pm 4,6$ мкл/мин). В обеих группах наблюдалось повышение давления при снижении скорости перфузионного потока.

Динамика критериев функционирования изолированной ишемизированной почки при перфузии в группах 7–8 представлена на рис 3. Перфузионное давление и скорость перфузионного потока были постоянными в течение перфузии в обеих группах и имели допустимые значения. Rgx6 не оказывал влияния на динамику этих параметров (рис. 3, а). СПМ была выше минимально допустимых значений в течение всего периода перфузии в обеих группах. При использовании Rgx6 не наблюдалось достоверного увеличения СПМ к концу перфузии относительно группы 3 (137 ± 40 и 146 ± 41 мкл/мин соответственно) (рис. 3, б, табл. 2). Значения СКФ и ФРГ ниже минимально допустимых в течение всего перфузионного периода в обеих группах. Использование Rgx6 не выводит СКФ и ФРГ на значения выше минимальных даже к окончанию перфузии ($0,16 \pm 0,05$ мл/мин и 44% соответственно) (рис. 3, в, д). В группах 7–8 не наблюдается достоверного изменения ДТМ и КММ в течение перфузии. К концу перфузии значения этих критериев достоверно не отличаются между группами (рис. 3, г, е, табл. 2).

В табл. 2 представлены значения критериев функционирования почки в экспериментальных группах в последний 10-минутный интервал перфузии.

Оценка морфологического состояния изолированной ишемизированной почки

На рис. 4 представлена морфология ренальной ткани из разных экспериментальных групп. Почки интактных животных имеют различные отделы нефрона в корковом слое: почечное тельце и почечные извитые канальцы: проксимальный (клет-

ки канала имеют выраженную щеточную каемку) и дистальный (рис. 4, а). Полуторачасовой период ишемии и отсутствие перфузии приводят к развитию очагов некробиоза и некроза в почечной паренхиме, десквамативным изменениям в каналах, а также к очаговому капиллярно-венозному полнокровию коркового вещества с эритростазами (рис. 4, б). На коротких сроках ишемии в изолированной почке после перфузии наблюдается сохранение общей морфофункциональной структуры нефрона (рис. 4, в, г). Для группы 3–4 отмечена общая морфологическая картина: гидропическая дистрофия в юкстамедуллярной зоне, очаги поражения каналов, отсутствие клеточного мусора. При использовании Rgx6 наблюдается снижение поражения канальцевого эпителия, отмечена выраженная щеточная каемка нефроцитов проксимальных каналов. Дистальные каналы без изменений (рис. 4, г). С увеличением сроков ишемии изолированной почки до 20 минут в группах 7–8 к окончанию периода перфузии наблюдается сходная морфологическая картина, в частности, нарушение морфофункциональной структуры нефрона. Отмечено наличие зернистых масс в просвете капсулы и очаговый спазм капиллярных петель. Очаги гидропической дистрофии эпителия каналов, отсутствие щеточной каемки нефроцитов проксимальных каналов, некроз отдельных эпителиоцитов и групп клеток. Для канальцев отмечено истощение за счет снижения высоты эпителия и расширения просветов. В просвете каналов отмечены гомогенные массы и слущенные эпителиоциты. Поражение имеет зональность и выражено в корковом слое. Степень поражения снижается к латеральному краю. Использование Rgx6 не

Таблица 2

Критерии функционирования в конце периода перфузии
Functioning criteria at the end of the perfusion period

Критерий			СПП, мл/мин·г	СПМ, мкл/мин	СКФ, мл/мин	ФРГ, %	КММ, мкмоль / 10 мин	ДТМ, %
Мин. значения			4–5,3	>30	>0,5	>90		
Ишемия 5 мин	№ 1	6% БСА	$7,5 \pm 2,8$	–	–	–	–	–
	№ 2	0,6% БСА	$5,7 \pm 0,5$	$49 \pm 2,5$	$0,01 \pm 0,01$	50	$4,2 \pm 0,5$	$61 \pm 0,5$
	№ 3	Без добавок	$6,9 \pm 1,3$	115 ± 23	$0,18 \pm 0,04$	71 ± 12	$7 \pm 1,8$	$64 \pm 4,7$
	№ 4	Rgx 6	$7,3 \pm 0,2$	178 ± 28	$0,4 \pm 0,05$	94 ± 1	$13 \pm 1,7$	45 ± 1
Ишемия 20 мин	№ 5	6% БСА	$2 \pm 0,7$	–	–	–	–	–
	№ 6	0,6% БСА	$3,4 \pm 1$	$44 \pm 4,6$	$0,05 \pm 0,01$	21 ± 6	$2,8 \pm 3,6$	$92 \pm 6,5$
	№ 7	Без добавок	$5,6 \pm 1$	137 ± 40	$0,16 \pm 0,05$	46 ± 13	$9,6 \pm 3$	$85 \pm 3,2$
	№ 8	Rgx 6	$5,1 \pm 0,3$	146 ± 41	$0,16 \pm 0,04$	44 ± 13	$9,6 \pm 1$	$91 \pm 2,3$

приводит к изменению морфологического состояния ренальной ткани и снижению повреждения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Модель ИПП является признанной для исследования функций почек [1, 23], а также имеет важное практическое значение для оценки методов консер-

вации [22, 24]. В модели ИПП три взаимосвязанных процесса почечного транспорта – фильтрация, секреция и реабсорбция – по критериям функционирования близки к их показателям *in vivo*, кроме того, сохраняются функции клубочков и проксимальных канальцев. К недостаткам модели можно отнести нарушение почечной гемодинамики из-за высокой

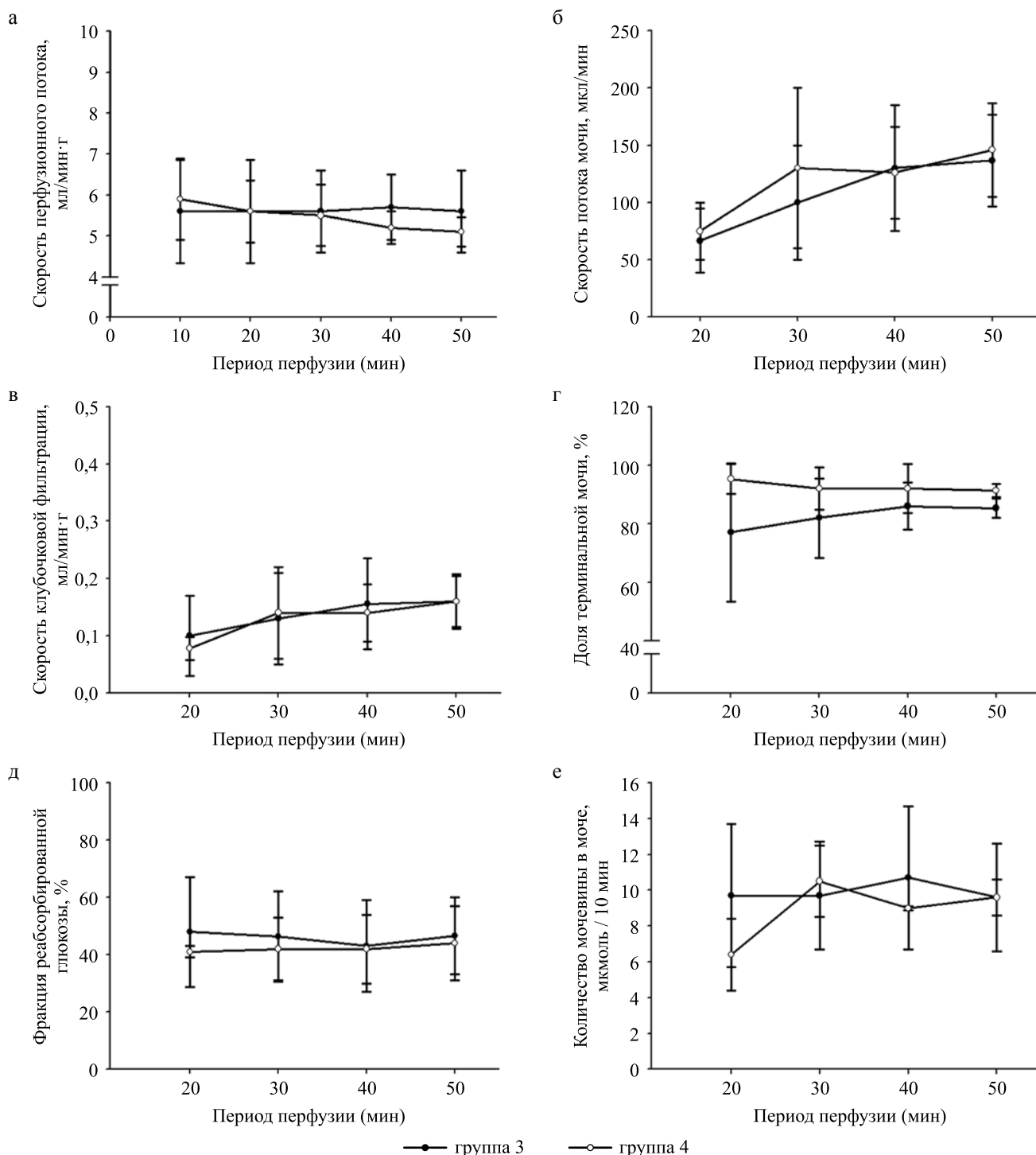


Рис. 3. Динамика критериев функционирования изолированной ишемизированной почки при перфузии (ишемия 20 минут / перфузия 50 минут). Первые 20 минут перфузии – стабилизационный период

Fig. 3. The dynamic of the criteria of the functioning of an isolated ischemic kidney during perfusion (ischemia 5 minutes / perfusion 50 minutes). The first 20 minutes of perfusion is the stabilization period

скорости перфузионного потока и нарушение функций дистальных канальцев [1].

В настоящей работе мы использовали модель ретроградной перфузии изолированных почек

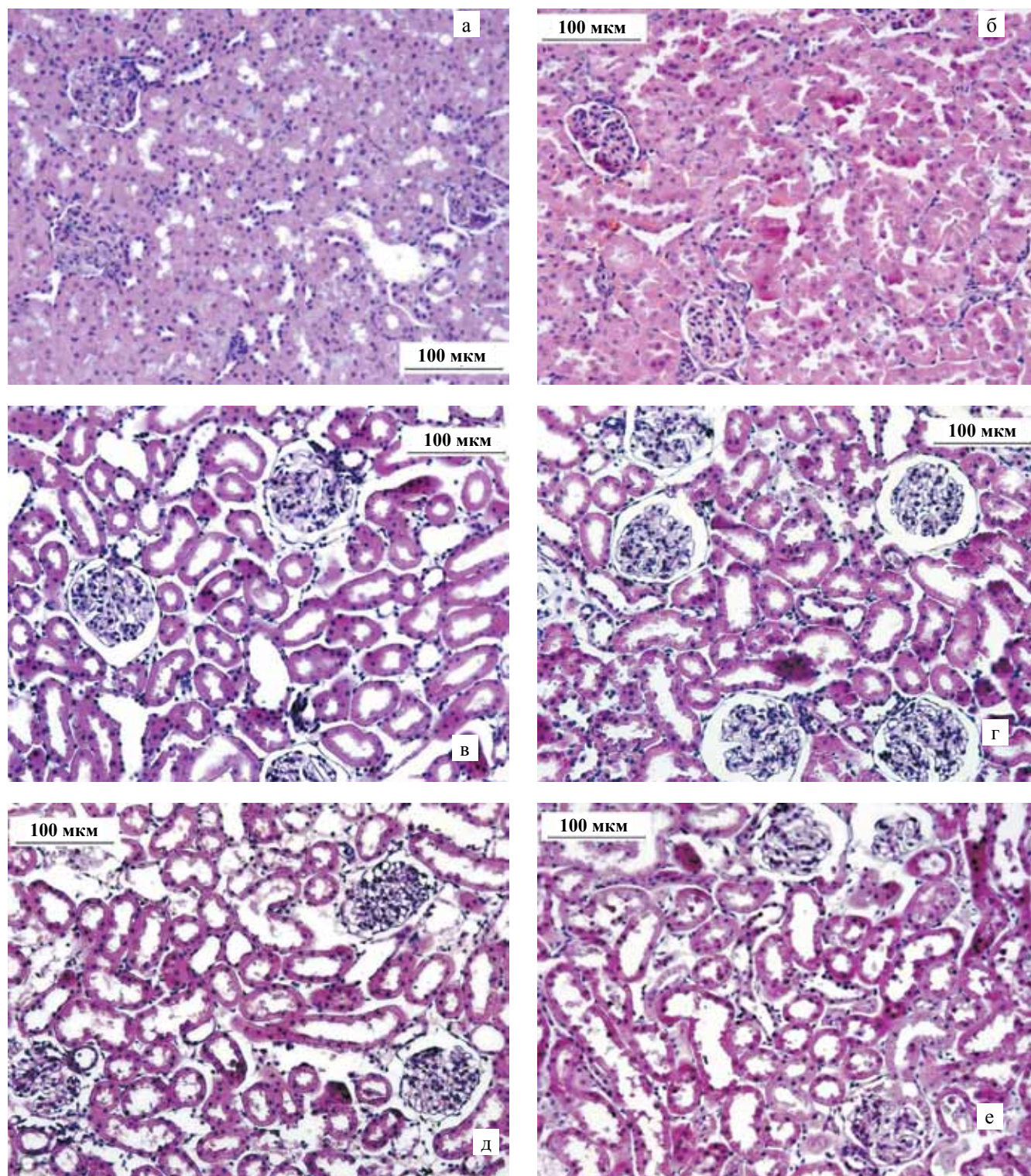


Рис. 4. Морфология ренальной ткани: а – почки intactных животных; б – почки, без перфузии, ишемия 90 минут; в – группа 3 (ишемия 5 минут / перфузия 50 минут, без Prx6); г – группа 4 (ишемия 5 минут / перфузия 50 минут, + Prx6); д – группа 7 (ишемия 20 минут / перфузия 50 минут, без Prx6); е – группа 8 (ишемия 20 минут / перфузия 50 минут, + Prx6). Эозин-гематоксилин, $\times 200$

Fig. 4. Morphology of renal tissue: а – native control; б – kidney, no perfusion, ischemia 90 minutes; в – group 3 (ischemia period 5 min / perfusion period 50 min, no Prx6); г – group 4 (ischemia period 5 min / perfusion period 50 min, + Prx6); д – group 7 (ischemia period 20 min / perfusion period 50 min, no Prx6); е – group 8 (ischemia period 20 min / perfusion period 50 min, + Prx6). Eosin-hematoxylin, $\times 200$

крыс [3]. Перфузия производилась синтетической средой DMEM. В нашей модели ИПП принципиальным моментом было наличие периода тепловой ишемии сроком 5 и 20 минут. Период 5 минут выбран как минимальный срок прерывания кровотока. 20-минутный период тепловой ишемии описывают как наиболее оптимальный для последующего восстановления функций изолированной почки при трансплантации [26]. Известно, что ишемия запускает ряд патологических реакций, которые приводят к нарушению функций жизненно важных структур клетки. Последующая реперфузия приводит к прогрессированию патологических процессов. Исследования последних лет неоднократно указывают на ключевую роль окислительного стресса в патогенезе И-РП почек. Основными участниками цепи событий, приводящих к окислительному стрессу, являются активные формы кислорода и азота: в клетках почки происходит резкое усиление генерации этих свободных радикалов [7]. В настоящей работе для защиты изолированного органа от повреждающего действия И-РП и улучшения морфофункциональных характеристик изолированной ишемизированной почки был использован экзогенный фермент-антиоксидант Rgx6. Rgx6 в составе перфузионного раствора вводился локально в изолированную почку с началом ишемии. Таким образом, Rgx6 находился в ткани почки в течение всего периода ишемии и на начальном этапе перфузии. Ранее было показано, что при перфузии изолированной почки экзогенным Rgx6 белок распределяется по сосудам почечных клубочков и сосудам, сопровождающим тонкий каналец [20]. Кроме того, в почечной ткани имеется собственный пул Rgx6 в трубчатых сегментах нефрона, при И-РП именно в этих местах наблюдается усиление экспрессии Rgx6 [27]. Для оценки эффективности Rgx6 как средства для сохранения морфофункциональных характеристик изолированной ишемизированной почки анализировали несколько общепринятых критериев функционирования: ПД, СПП, СПМ, СКФ, ФРГ, ДТМ [1, 22] и КММ.

ПД поддерживалось на уровне 90–110 мм рт. ст. изменением СПП от 2 до 7,5 мл/г/мин·г в разных группах (табл. 2). К окончанию перфузионного периода максимальная СПП отмечена при 5-минутной ишемии на фоне 6% БСА; минимальная – при 20-минутной ишемии на фоне 6% БСА. Несмотря на высокую СПП в группе 1 (6% БСА) не происходило образования мочи. Отмечается, что внесение высоких доз БСА в буфер приводит к снижению СКФ, напротив, изолированные почки, перфузированные синтетической средой без добавления БСА, имеют тенденцию к росту показателей СКФ и ФРГ [22]. Макроскопически было отмечено увеличение размера изолированных почек при перфузии примерно в 1,5 раза. Это является естественным процессом, так

как имеются факторы, способствующие скоплению жидкости в канальцах – отсутствие нервного контроля афферентных артериол и блок лимфатических сосудов [4].

Мониторинг основных критериев функционирования изолированной почки начинался после установления гемодинамического равновесия, когда СПП и ПД принимали постоянные значения (стабилизационный период – 20 минут).

При 5-минутной ишемии во всех группах критерии функционирования изолированной почки выше минимальных значений (табл. 2). Для группы 2 (0,6% БСА) и 3 (без добавок) к этим параметрам можно отнести ПД, СПП, СПМ. Для СКФ и ФРГ значения ниже минимально допустимых. При гистологической оценке ренальной ткани в этих группах обнаружены очаги поражения внутренней организации каналов. Повреждение проксимальных каналов уже на ранних сроках ишемии объясняется их высоким уровнем метаболической активности [25]. Использование Rgx6 расширяет список критериев функционирования изолированной почки с допустимыми значениями: ПД, СПП, СПМ, СКФ, ФРГ. При использовании Rgx6 происходит увеличение СПМ, СКФ, ФРГ и снижение ДТМ по сравнению с группой 3. Такая картина указывает на улучшение процессов фильтрации, секреции и реабсорбции ультрафильтрата при использовании Rgx6 при перфузии ишемизированной изолированной почки. Значение ФРГ выше 90% при использовании Rgx6 указывает на сохранение функциональности тубулярных структур, изолированной ишемизированной почки к окончанию перфузионного периода. Это подтверждается результатами гистологического анализа. Снижение поражения тубулярных структур при использовании Rgx6 также подтверждается увеличением количества мочевины в терминальной моче почти в 2 раза по сравнению с группой 3. Так как основные места, ответственные за транспорт мочевины, – проксимальный каналец и тонкий сегмент восходящей части петли Генле [25], можно говорить о протекции именно этих структур канальца. Рост КММ может быть не связан напрямую с сохранением канальцевых структур, однако полученные морфологические данные говорят о существенном вкладе именно этого процесса в транспорт мочевины. Таким образом, по критериям функционирования экзогенный Rgx6 существенно улучшает функциональное состояние изолированной почки при перфузии после коротких сроков тепловой ишемии.

Оценка состояния изолированной почки после 20-минутной ишемии показала, что при увеличении сроков ишемии среди критериев функционирования только СПМ имеет допустимые значения. Остальные критерии имеют значения ниже минимальных (табл. 2). Использование Rgx6 не выводит эти критерии на более высокие значения. Внутри времен-

ной группы отсутствие БСА в перфузате приводит к росту показателей СКФ и ФРГ, но не выводит их на необходимый уровень. Низкие показатели ФРГ указывают на нарушение процессов реабсорбции глюкозы в проксимальных каналах [28]. Аналогичная ситуация наблюдается и с КММ, наблюдается рост ее концентрации в отсутствие БСА в растворе. Таким образом, через 20 минут ишемии почку можно признать нежизнеспособной. Отсутствие функционирования почки связано, вероятнее всего, с тем, что принципиальное значение для выживаемости изолированного органа играет длительность ишемии. В ишемизированной почке с началом перфузии возникают очаги гипо- и гиперперфузии. На фоне острого канальцевого некроза происходит спазм приносящих артериол клубочков, что может приводить к нарушению внутриорганный кровотока и развитию синдрома «no-reflow» [26]. Наличие поражения канальцев было подтверждено результатами гистологического анализа. Ранее было показано, что увеличение сроков ишемии до 45 минут приводит к критическому поражению паренхимы и снижению СПМ до менее 30 мкл/мин. Использование Rgx6 на этих сроках приводит к уменьшению поражения изолированной почки по сравнению с контрольным повреждением. Однако, несмотря на протекторный эффект Rgx6 на критических сроках ишемии, поражение почечной паренхимы остается на высоком уровне [20].

Таким образом, использование синтетических сред в модели ИПП целесообразно только на ранних сроках ишемии. В этот период некоторые критерии функционирования изолированной почки достигают допустимых значений. Структура почечной ткани сохранена, однако имеются очаги дистрофических изменений в юкстамедуллярной зоне и проксимальных каналах. С увеличением сроков ишемии поражение почечной ткани усиливается, наблюдается развитие канальцевого некроза, что выражается в снижении значений критериев функциональности и прекращении функционирования изолированного ишемизированного органа. Использование экзогенного Rgx6 положительно влияет на морфофункциональное состояние изолированной почки только на ранних сроках ишемии. В этом случае значения критериев выше, чем минимально допустимые, что может указывать на функционирование изолированной ишемизированной почки определенный период при ее перфузии синтетической средой. Морфологически на ранних сроках ишемии отмечена морфоструктурная целостность нефронов.

Пероксиредоксин 6 является полифункциональным ферментом-антиоксидантом, обладающим пероксидазной активностью, небольшой фосфолипазной активностью, а также участием во многих процессах в клетке [10–13]. Тот факт, что пероксире-

доксин 6 защищает изолированную почку на малых периодах ишемии, свидетельствует о том, что в данном случае основной вклад в защиту органа вносит пероксидазная активность пероксиредоксина 6. Опыт использования рекомбинантного Rgx6 для протекции изолированных органов описан ранее. Защитный эффект Rgx6 был показан на модели перфузии изолированного сердца крысы. Было отмечено, что использование Rgx6 приводит к нормализации пульса, поддержанию сократительной активности миокарда и предотвращению перекисного окисления липидов [17]. Экзогенный Rgx6 показал свой протекторный эффект для preconditionирования трансплантата сердца крысы. Показано, что Rgx6 уменьшает тяжесть И-РП сердца и способствует нормализации его морфофункционального состояния при гетеротопической трансплантации [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели изолированной перфузируемой почки был показан ренопротекторный эффект экзогенного рекомбинантного пероксиредоксина 6, введенного локально перед ишемией. При интерпретации полученных данных учитывался принципиальный фактор – отклик изолированной почки отличается от естественного из-за подавления гуморальной регуляции и отсутствия иннервации [4]. В связи с этим действие Rgx6 в изолированной почке, вероятно, может отличаться от его протекторных эффектов в почке *in vivo* [8].

На основании полученных данных есть основание предполагать, что применение экзогенного рекомбинантного Rgx6 может быть эффективным подходом для сохранения изолированной почки при трансплантации, так как включение Rgx6 в состав известных перфузионных растворов в качестве мощного антиоксидантного агента будет способствовать снижению процессов свободно-радикального окисления. В этом отношении требуются дальнейшие экспериментальные исследования.

Для получения микрофотографий, представленных в публикации, использовали оборудование, предоставленное «Сектором оптической микроскопии и спектrophотометрии» ЦКП ФИЦ «ПНЦ БИ РАН».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Taft DV. The isolated perfused rat kidney model: a useful tool for drug discovery and development. *Current Drug Discovery Technologies*. 2004; 1: 97–111. doi: 10.2174/1570163043484824.

2. Georgiev T, Iliev R, Mihailova S, Hadzhibozheva P, Ilieva G, Kamburova M et al. The isolated perfused kidney models – certain aspects. *Trakia Journal of Sciences*. 2011; 9 (3): 82–87.
3. Czogalla J, Schweda F, Loffing J. The mouse isolated perfused kidney technique. *J Vis Exp*. 2016; 117: 54712. doi: 10.3791/54712.
4. Nishiitsutsuji-Uwo J, Ross B, Krebs H. Metabolic activities of the isolated perfused rat kidney. *Biochem J*. 1967; 103 (3): 852–862. doi: 10.1042/bj1030852.
5. Chang HH, Choong B, Phillips A, Loomes KM. The isolated perfused rat kidney: a Technical update. *Exp Anim*. 2013; 62 (1): 19–23. doi: 10.1538/expanim.62.19.
6. Weiss C, Passow H, Rothstein A. Autoregulation of flow in isolated rat kidney in the absence of red cells. *Am J Physiol*. 1959; 196 (5): 1115–1118. doi: 10.1152/ajplegacy.1959.196.5.1115.
7. Plotnikov EY, Kazachenko AV, Vyssokikh MY, Vasileva AK, Tcvirkun DV, Isaev NK et al. The role of mitochondria in oxidative and nitrosative stress during ischemia/reperfusion in the rat kidney. *Kidney Int*. 2007; 72 (12): 1493–1502. doi: 10.1038/sj.ki.5002568.
8. Goncharov RG, Rogov KA, Temnov AA, Novoselov VI, Sharapov MG. Protective role of exogenous recombinant peroxiredoxin 6 under ischemia-reperfusion injury of kidney. *Cell Tissue Res*. 2019; 378 (2): 319–332. doi: 10.1007/s00441-019-03073-z.
9. Багненко СФ, Мойсюк ЮГ, Скворцов АЕ, Резник ОН. Реабилитация донорских органов. Направление в консервации или новая парадигма трансплантологии? *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2009; 11 (3): 17–29. Bagnenko SF, Moysyuk YG, Skvortsov AE, Reznik ON. Rehabilitation of organ from deceased donors. New preservation trend or new paradigm in transplantology? *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2009; 11 (3): 17–29. [In Russ. English abstract]. doi.org/10.15825/1995-1191-2009-3-17-29.
10. Новоселов ВИ. Роль пероксиредоксинов при окислительном стрессе в органах дыхания. *Пульмонология*. 2012; 1: 83–87. Novoselov VI. A role of peroxiredoxins in oxidative stress in the respiratory system. *Pulmonologiya*. 2012; 1: 83–87. (In Russ.) <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2012-0-1-83-87>.
11. Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem*. 2000; 275 (37): 28421–28427. doi: 10.1074/jbc.M005073200.
12. Wood ZA, Schröder E, Harris JR, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem*. 2003; 28 (1): 32–40. doi: 10.1016/s0968-0004(02)00003-8.
13. Feldman N, Rotter-Maskowitz A, Okun E. DAMPs as mediators of sterile inflammation in aging-related pathologies. *Ageing Res Rev*. 2015; 24 (1): 29–39. doi: 10.1016/j.arr.2015.01.003.
14. Шапаров МГ, Гордеева АЕ, Гончаров РГ, Тихонова ИВ, Равин ВК, Темнов АА и др. Влияние экзогенного пероксиредоксина 6 на состояние мезентеральных сосудов и тонкого кишечника при ишемически-реперфузионном поражении. *Биофизика*. 2017; 62 (6): 998–1008. Sharapov MG, Gordeeva AE, Goncharov RG, Tikhonova IV, Ravin VK, Temnov AA et al. The effect of exogenous peroxiredoxin 6 on the state of mesenteric vessels and the small intestine in ischemia–reperfusion injury. *Biofizika*. 2017; 62 (6): 998–1008. [In Russ. English abstract]. doi: 10.1134/S0006350917060239.
15. Волкова АГ, Шапаров МГ, Равин ВК, Гордеева АЕ, Карадулева ЕВ, Мубаракшина ЕК и др. Эффект различных ферментов-антиоксидантов на регенеративные процессы в эпителии трахеи после химического ожога. *Пульмонология*. 2014; 2: 84–90. Volkova AG, Sharapov MG, Ravin VK, Gordeeva AE, Karaduleva EV, Mubarakshina EK et al. The effect of various antioxidant enzymes in the regenerative processes in the epithelium of the trachea after chemical burn. *Pulmonologiya*. 2014; 2: 84–90. doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-2-84-90.
16. Sharapov MG, Novoselov VI, Gudkov SV. Radioprotective Role of Peroxiredoxin 6. *Antioxidants (Basel)*. 2019; 8 (1): 15. doi: 10.3390/antiox8010015.
17. Karaduleva EV, Mubarakshina EK, Sharapov MG, Volkova AG, Pimenov OY, Ravin VK et al. Cardioprotective effect of modified peroxiredoxins during retrograde perfusion of isolated rat heart under oxidative stress condition. *Bull Exp Biol Med*. 2016; 160 (5): 639–642. doi: 10.1007/s10517-016-3237-1.
18. Грудинин НВ, Богданов ВК, Шапаров МГ, Буненков НС, Можейко НП, Гончаров РГ и др. Применение пероксиредоксина при preconditionировании трансплантата сердца крысы. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2020; 22 (2): 158–164. Grudin N V, Bogdanov V K, Sharapov M G, Bunenkov N S, Mozheiko N P, Goncharov R G et al. Use of peroxiredoxin for preconditioning of heterotopic heart transplantation in a rat. *Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs*. 2020; 22 (2): 158–164. [In Russ. English abstract]. doi.org/10.15825/1995-1191-2020-2-158-164.
19. Шапаров МГ, Новоселов ВИ, Равин ВК. Клонирование, экспрессия кДНК и сравнительный анализ пероксиредоксина 6 различных организмов. *Молекулярная биология*. 2009; 43 (3): 505–511. Sharapov MG, Novoselov VI, Ravin VK. Cloning, expression and comparative analysis of peroxiredoxin 6 from different sources. *Molekulyarnaya biologiya*. 2009; 43 (3): 505–511. [In Russ. English abstract].
20. Гордеева АЕ, Шапаров МГ, Евдокимов ВА, Новоселов ВИ, Фесенко ЕЕ. Влияние экзогенного пероксиредоксина 6 на функциональные параметры изолированной почки крысы. *Биофизика*. 2020; 65 (2): 340–348. Gordeeva AE, Sharapov MG, Evdokimov VA, Novoselov VI, Fesenko EE. The effect of exogenous peroxiredoxin 6 on functional parameters of isolated rat kidney. *Biofizika*. 2020; 65 (2): 340–348 [In Russ, English abstract]. doi: 10.31857/S0006302920020179.
21. Доржу УВ, Айзман РИ. Оценка объемной скорости почечного и клубочкового кровотока в постнатальном онтогенезе у крыс. *Вестник ЧГПУ им. И.Я. Яковлева*. 2018; 2 (98): 16–23. Dorzhu UV, Aizman RI. Estimation of renal and glomerular blood flow in postnatal ontogeny in rats. *Vestnik ChGPU im. I.Ya. Yakovleva*. 2018; 2 (98): 16–23.

- mation of renal blood flow and glomerular the flow rate in postnatal ontogenesis at the rats. *Vestnik ChGPU im. I.Ja. Jakovleva*. 2018; 2 (98): 16–23. [In Russ, English abstract].
22. Höchel J, Lehmann D, Fehrenberg C, Unger V, Groneberg AD, Grosse-Siestrup C et al. Effects of different perfusates on functional parameters of isolated perfused dog kidneys. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 1748–1754. doi: 10.1093/ndt/gfg285.
 23. Thein E, Sevilimis G, Muenzing S, Hammer C, Messmer K. Evaluation of a system for the perfusion of isolated, rodent organs. *Xenotransplantation*. 2001; 8 (2): 94–99. doi: 10.1034/j.1399-3089.2001.00083.x.
 24. Суконко ОГ, Пилотович ВС, Кушниренко ПС, Ролевич АИ, Жегалик АГ, Юшко ДЕ. Резекция единственной почки с изолированной перфузией охлажденным раствором «EuroCollins». *Онкоурология*. 2006; 1: 57–60. Sukonko OG, Pilotovich VS, Kushnirenko PS, Rolevich AI, Zhegalik AG, Jushko DE. Rezekcija edinstvennoj pochki s izolirovannoj perfuziej ohlazhdenym rasvorom «EuroCollins». *Onkourologija*. 2006; 1: 57–60.
 25. Савин ИА, Горячев АС. Водно-электролитные нарушения в нейрореанимации. М.: Аксиом графикс юнион, 2015. 331 с. Savin IA, Gorjachev AS. Vodno-jelektrolitnye narushenija v nejroreanimacii. М.: Axiom graphics junion, 2015. 331.
 26. Szajer M, Shah G, Kittur D, Searler B, Li L, Bruch D et al. A novel extracorporeal kidney perfusion system: a concept model. *Perfusion*. 2004; 19 (5): 305–310. doi: 10.1191/0267659104pf761oa.
 27. Godoy JR, Oesteritz S, Hanschmann EM, Oskenga W, Askermann W, Lillig CH et al. Segment-specific overexpression of redoxins after renal ischemia and reperfusion: protective roles of glutaredoxin 2, peroxiredoxin 3, and peroxiredoxin 6. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51 (2): 552. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.036.
 28. Ватазин АВ, Астахов ПВ, Зулъкарнаев АБ, Ветчинникова ОН, Кантария РО, Синютин АА и др. Неспецифические механизмы ишемического и реперфузионного повреждения почечного аллотрансплантата и способы воздействия на них. *Нефрология*. 2013; 17 (1): 42–48. Vatazin AV, Astakhov PV, Zulkarnaev AB, Vetchinnikova ON, Kantaria RO, Sinutin AA et al. Non-specific mechanisms of ischemic and reperfusion injury of renal allograft and its modalities. *Nefrologija*. 2013; 17 (1): 42–48. [In Russ, English abstract].

Статья поступила в редакцию 27.05.2021 г.
The article was submitted to the journal on 27.05.2021