

УДК 577.3

## ПЕРОКСИРЕДОКСИН 6 ПРЕДОТВРАЩАЕТ РЕПЕРФУЗИОННОЕ ПОРАЖЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННОЙ ПОЧКИ КРЫСЫ

© 2022 г. А.Е. Гордеева<sup>\*,#</sup>, М.Г. Шарапов<sup>\*</sup>, Р.Г. Гончаров<sup>\*</sup>, В.И. Новоселов<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Институт биофизики клетки — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институтская ул., 3, Пушкино Московской области, 142290, Россия

<sup>#</sup>E-mail: gordeeva1310@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.05.2022 г.

После доработки 12.05.2022 г.

Принята к публикации 17.05.2022 г.

Ишемически-реперфузионное поражение является причиной снижения жизнеспособности донорских органов после длительной консервации. В настоящей работе для повышения устойчивости донорской почки к ишемически-реперфузионному поражению использовали фермент-антиоксидант пероксиредоксин 6. Для определения эффективности применения пероксиредоксина 6 оценивали морфофункциональные критерии изолированной почки, уровень экспрессии гена для маркера поражения почек КИМ-1 и уровень малонового диальдегида в ткани. Было показано, что холоддовая консервация почки в растворе DMEM, неадаптированном под эти цели, приводит к гибели органа при перфузии. Напротив, использование раствора «Кустодиола» позволяет почке пережить эпизод длительной ишемии и перфузии. Комбинирование пероксиредоксина 6 с раствором «Кустодиола» показало лучшие результаты при перфузии. На фоне снижения поражения структур нефрона отмечено падение уровня малонового диальдегида в 2.3 раза, что указывает на нейтрализацию гиперпродукции активных форм кислорода. В четыре раза возрастает скорость выделения мочи, скорость клубочковой фильтрации и количество мочевины в моче, что указывает на сохранение тубулярных структур и подтверждается снижением уровня маркера поражения почек КИМ-1 в полтора раза. Таким образом, использование экзогенного белка-антиоксиданта пероксиредоксина 6 при перфузии повышает устойчивость донорской почки к ишемически-реперфузионному поражению после продолжительной холодовой консервации в растворе «Кустодиола».

*Ключевые слова:* изолированная почка, пероксиредоксины, перфузия.

DOI: 10.31857/S0006302922040172, EDN: IUYPNA

В современном мире наиболее оптимальным методом заместительной почечной терапии является трансплантация самой почки. Одной из важных задач трансплантологии является сохранение органов и тканей вне организма физиологически полноценными и пригодными для практического применения в течение длительного срока. Для уменьшения повреждений донорских почек в клинической практике широко используют статическую холоддовую консервацию и гипотермическую пульсационную аппаратную перфузию. Стандартными консервирующими растворами, которые сейчас применяют при взятии донорских органов (в частности донорской почки) являются Celsior, раствор Висконсинского университета (UW) и «Кустодиол» [1]. Несмотря на консервацию, в любом эксплантационном органе

развивается целый каскад патобиологических процессов, при этом отсутствие кровотока и дефицит кислорода в ткани играют ведущую роль. Второй повреждающий компонент — реперфузия, которая многократно усиливает ущерб, нанесенный при ишемии. Ишемически-реперфузионное (И-Р) поражение вызвано в первую очередь гиперпродукцией активных форм кислорода, ростом свободнорадикальных процессов в донорских тканях и повреждением их структуры. Это осложнение возникает практически всегда и является основной причиной первичной дисфункции трансплантата и снижения его жизнеспособности [2–5]. В связи с этим основным направлением в трансплантации может стать применение высокоэффективных ферментов-антиоксидантов, направленных на подавление гиперпродукции активных форм кислорода в клетках/тканях.

*Сокращения:* И-Р — ишемия-реперфузия, Ptx6 — пероксиредоксин 6, МДА — малоновый диальдегид.

Среди множества ферментов антиоксидантного действия наибольший интерес представляет семейство пероксиредоксинов. Эти ферменты широко распространены в организме, многофункциональны и играют важную роль в гомеостазе редокс-статуса [6–9]. Среди представителей семейства пероксиредоксин 6 (Ргх6) обладает идеальными антиоксидантными свойствами (широкий спектр нейтрализуемых гидропероксидов) и одновременно имеет высокую биодоступность благодаря способности проникать в клетки, повышая их антиоксидантный статус [10]. Неоднократно было показано, что Ргх6 – эффективный терапевтический агент при свободнорадикальных патологиях [11–15], в том числе для preconditionирования трансплантата сердца у крыс [16]. Целью данного исследования была оценка возможности применения Ргх6 в перфузионных растворах для повышения устойчивости донорской почки к И-Р-поражению.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах были использованы крысы-самцы линии Вистар массой 230 г.

Рекомбинантный Ргх6 был получен в лаборатории механизмов рецепции Института биофизики клетки РАН по ранее описанной методике. Пероксидазная активность Ргх6 составляет 200 нмоль/мг/мин по  $H_2O_2$  и 100 нмоль/мг/мин по трет-бутилпероксиду.

**Перфузия изолированной почки.** Модель перфузии изолированной почки включала стадии эксплантации почки, хранения почки в консервационном растворе, этап перфузии изолированного органа.

**Эксплантация почки.** Перед началом операции крысы были наркотизированы путем внутривенного введения 0.5 мл 3.5%-го (3 мг/кг) золетила 100 (Virbac Sante Animale, Франция). Гепарин (5000 ЕД/мл) использовали для предотвращения тромбозов. После декапитации животного в течение 5 мин проводили изолирование правой почки от общей сосудистой системы путем последовательного наложения лигатур на сосуды и катетеризацию почечной артерии через брюшную аорту. Проводили отсечение нижней полой вены. Правый мочеточник был изолирован и катетеризован [12, 17]. Удаляли кровь из сосудистого русла изолированной почки путем ее перфузии раствором «Кустодиола» (Dr. Franz Kohler Chemie GMBH, Германия) ( $t^0 = 5–8^\circ C$ ) в течение 5–8 мин. Скорость перфузии 3 мл/мин, давление 90–110 мм рт. ст. (в месте ввода каноли в корень почечной артерии). По окончании санации кровяного русла почку эксплантировали и помещали в стерильную емкость с раствором «Кустодиола». Емкость обкладывали льдом и далее хранили поч-

ку в течение 6 ч,  $t^0 = 4^\circ C$ . Общее время ишемии составляло 6 ч.

**Этап перфузии.** После ишемии изолированная почка была перфузирована перфузионным буферным раствором DMEM (GIBCO-Invitrogen, США) с содержанием глюкозы 1.0 г/л. В DMEM включали мочевины (5 мМ/л) и креатинин (80 мкМ/л). Перед перфузией раствор оксигенировали смесью  $O_2/CO_2$  (95%/5%), рН 7.4,  $t^0 = 35–37^\circ C$ .

Для определения эффектов Ргх6 в 10 мл перфузионного буфера DMEM добавляли Ргх6 в концентрации 0.2 мг/мл и перфузировали им изолированную почку на начальном этапе перфузии в течение 5 мин. Скорость перфузии на данном этапе – 3 мл/мин.

Общее время перфузии изолированной почки – 50 мин. Скорость от 6 до 10 мл/мин, что соответствовало перфузионному давлению 90–100 мм рт. ст. В течение всего срока перфузии каждые 10 мин осуществляли сбор мочи из мочеточника. По окончании перфузии почечную ткань использовали для дальнейшего исследования.

Животные были разделены на три группы по 10 особей: 1) для холодной статической консервации изолированной почки использовали среду DMEM; 2) использовали раствор «Кустодиола»; 3) использовали раствор «Кустодиола» и на начальном этапе перфузии Ргх6. В группах анализировали морфологические, функциональные и биохимические показатели почки через 50 мин перфузии.

**Гистология и морфометрия.** Гистологические исследования проводили на парафиновых срезах почечной ткани, окрашенных гематоксилин-эозином (VITROSTAIN Biovitrum, Россия). Микроскопический анализ проводили на микроскопе Leica DM 6000 с цифровой камерой Leica DFC 490. Морфометрическое исследование паренхиматозных структур почки проводили с помощью стандартной программы для анализа на микроскопе Leica DM 6000.

**Анализ критериев функционирования изолированной почки.** Определяли [18]: 1) перфузионное давление, которое поддерживали на уровне 90–100 мм. рт. ст и регулировали изменением скорости перфузии; 2) скорость выделения мочи; 3) скорость клубочковой фильтрации [12, 19]; 4) потребление глюкозы [12, 18, 19]; 5) количество мочевины в моче [12]. Концентрацию креатинина и мочевины в исследуемых пробах мочи определяли на приборе Reflotron Plus (Roche Diagnostics, Швейцария), концентрацию глюкозы – на глюкометре Accu-Chek (Roche, Германия).

**Определение уровня малонового диальдегида в почечной ткани.** Уровень малонового диальдегида

(МДА), отражающий степень перекисного окисления липидов в почечных тканях, определяли с помощью 1-метил-2-фенилиндола (Sigma-Aldrich, США) по методике, описанной в работе [20].

**Определение уровня мРНК гена КИМ-1 в почечной ткани.** Уровень экспрессии гена КИМ-1 определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с этапом обратной транскрипции. Общую РНК из образцов почечной ткани получали с помощью реактива ExtractRNA («Евроген», Россия). Для обратной транскрипции использовали по 2 мкг общей РНК, обратную транскриптазу MMLV («Евроген», Россия) и стандартный олигонуклеотид dT<sub>15</sub>. Полученную кДНК использовали для ПЦР с ген-специфическими олигонуклеотидами:

rKIM1-F (5'-ATGGGCTCTCTGAGCTTTGT-3'),  
rKIM1-R (5'-GATGCACAATCGCTGCGTTC-3').

Для нормирования результатов использовали housekeeping ген Rplp2 (60S acidic ribosomal protein P2) с соответствующими олигонуклеотидами:

Rplp2-F (5'-CTCAACAAGGTCATCAGTGA-3'),  
Rplp2-R (5'-AGCAGAAACAGCCACAGCCCCAC-3').

ПЦР в реальном времени проводили в амплификаторе «DTprime» («ДНК-Технология», Россия) с использованием HSTaq ДНК полимеразы и интеркалирующего красителя SYBR GreenII («Евроген», Россия). Определение значений порогового цикла *Ct* проводили с помощью программного обеспечения «ДНК-Технология» (Россия). Расчет  $\Delta\Delta Ct$  проводили по формуле  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Контроль}) - \Delta Ct(\text{опыт})$ . Каждое значение  $\Delta Ct$  рассчитывали, как  $\Delta Ct = Ct(\text{КИМ-1}) - Ct(\text{Rplp2})$  [21].

**Электрофорез и иммуноблоттинг.** Ткань почек гомогенизировали, центрифугировали и супернатант использовали для электрофореза в полиакриламидном геле и последующего переноса на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C (Amersham, США). Пробы нормировали по концентрации белка. Выявление КИМ-1 проводили с помощью первичных кроличьих антител к белку КИМ-1 (Cell Signaling Technology, США), вторичные антитела – иммуноглобулины кролика («ИМТЭК», Россия), конъюгированные с пероксидазой хрена. Связавшиеся антитела детектировали с помощью набора для хемилюминесцентной детекции Novex ECL (Invitrogen, США) на установке iBright Imaging Systems (Thermo Fisher Scientific, США).

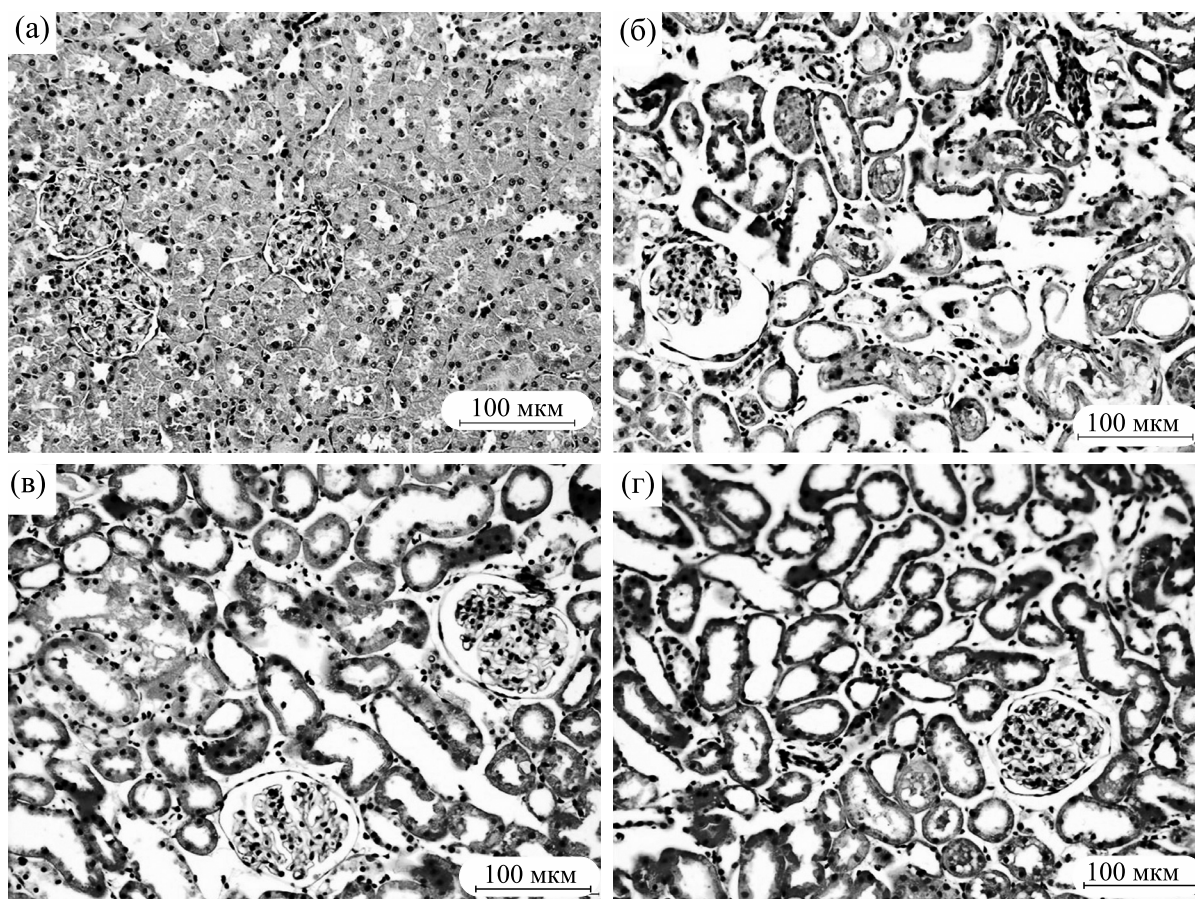
Статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения SigmaPlot 11.0 Software (Systat Software Inc., США). Результаты выражали как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Значение  $P < 0.05$  принимали статистически достоверным.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Морфологические показатели.** После шестичасовой консервации и последующей перфузии изолированной почки наблюдается повреждение нефронов и изменение общей архитектуры почечной паренхимы во всех экспериментальных группах по сравнению с интактным контролем (рис. 1). В морфометрическом аспекте отмечено увеличение площади капсулы Боумена и площади ее просвета, а также изменение архитектуры извитых каналов, особенно дистальных (рис. 2). Наибольшее поражение в структуре нефронов отмечено при использовании DMEM в качестве консервационного раствора (группа 1) (рис. 1б). В корковом слое почки к концу перфузии наблюдается полное разрушение структуры 60% нефронов. Для сохраненных нефронов отмечено увеличение площади капсулы Боумена и площади ее просвета (рис. 2а). В извитых канальцах наблюдается дистрофия эпителия и расширение канальцев, особенно дистальных (рис. 2б). Просвет канальцев заполнен гомогенными массами и клеточным мусором. При использовании раствора «Кустодиола» (группа 2) отмечено снижение повреждения нефронов по сравнению с группой 1 (рис. 1в): уменьшение площади капсулы Боумена и площади ее просвета в 1.3 раза (рис. 2а); уменьшение очагов дистрофии и десквамация эпителия в извитых канальцах (рис. 1в). Морфометрия сохраненных извитых канальцев в группе 1 и 2 достоверно не отличается (рис. 2б). В условиях использования RxB морфология нефронов сходна с группой 2 (рис. 1г), однако в морфометрическом аспекте отмечается уменьшение площади капсулы Боумена и площади ее просвета в 1.2 и 1.7 раза; для дистальных каналов – уменьшение внутреннего диаметра в 1.3 раза (рис. 2).

**Функциональные показатели донорской почки.** Введение RxB в перфузионный раствор приводит к улучшению функциональных показателей донорской почки по сравнению с другими группами к концу перфузии. На фоне снижения в полтора раза скорости перфузии в четыре раза возрастают скорость клубочковой фильтрации, скорость выделения мочи и количество мочевины в моче. При консервации в растворе «Кустодиола» и DMEM показатели не отличаются. При использовании DMEM не отмечено потребления глюкозы изолированной почкой (рис. 3).

**Уровень МДА в тканях почек.** Оценка уровня перекисного окисления липидов в ренальной ткани показала, что после шестичасовой консервации изолированной почки в растворе DMEM (группа 1) и последующей перфузии изолированной почки наблюдается двадцатикратный рост уровня МДА относительно контроля. Использование для консервации почки раствора «Кустодиола» снижает уровень МДА в семь раз относи-



**Рис 1.** Ткань изолированной почки после шестичасовой консервации и последующей перфузии: (а) — контроль; (б) — для консервации использовали среду DMEM; (в) — для консервации использовали раствор «Кустодиола»; (г) — для консервации использовали раствор «Кустодиола» и Rgh6 (0.2 мг/мл) на начальном этапе перфузии.

тельно показателей в группе 1. Комбинирование рекомбинантного Rgh6 с раствором «Кустодиола» снижает уровень МДА более чем в 15 раз относительно показателей в группе 1, что указывает на мощное антиоксидантное действие экзогенного Rgh6 (рис. 4).

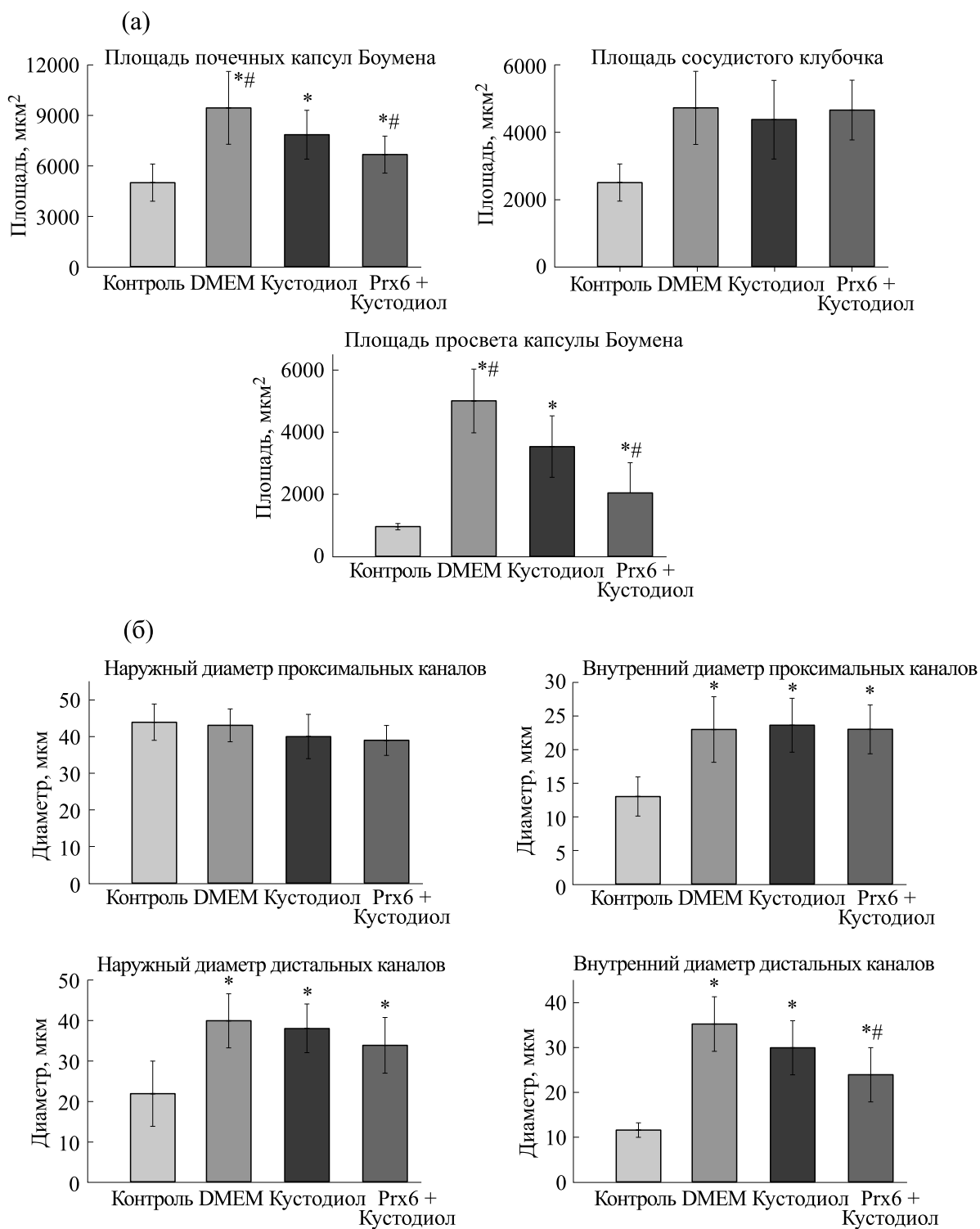
**Экспрессия КИМ-1.** Оценка уровня мРНК гена КИМ-1 показала, что после шестичасовой консервации изолированной почки в растворе DMEM (группа 1) и последующей перфузии изолированной почки наблюдается рост экспрессии этого гена в 2.5 раза. При этом консервация изолированной почки в растворе «Кустодиола» или комбинирование рекомбинантного Rgh6 с раствором «Кустодиола» достоверно снижают экспрессию гена КИМ-1 до значений контрольной почки (рис. 5). Иммуноблоттинг почечной ткани показал примерно двенадцатикратный рост уровня белка КИМ-1 после шестичасовой консервации изолированной почки в растворе DMEM. При этом консервация изолированной почки в растворе «Кустодиола» или комбинирование рекомбинантного Rgh6 с раствором «Кустодиола» приво-

дила к значимому снижению уровня белка КИМ-1 (рис. 6), как и в случае с мРНК.

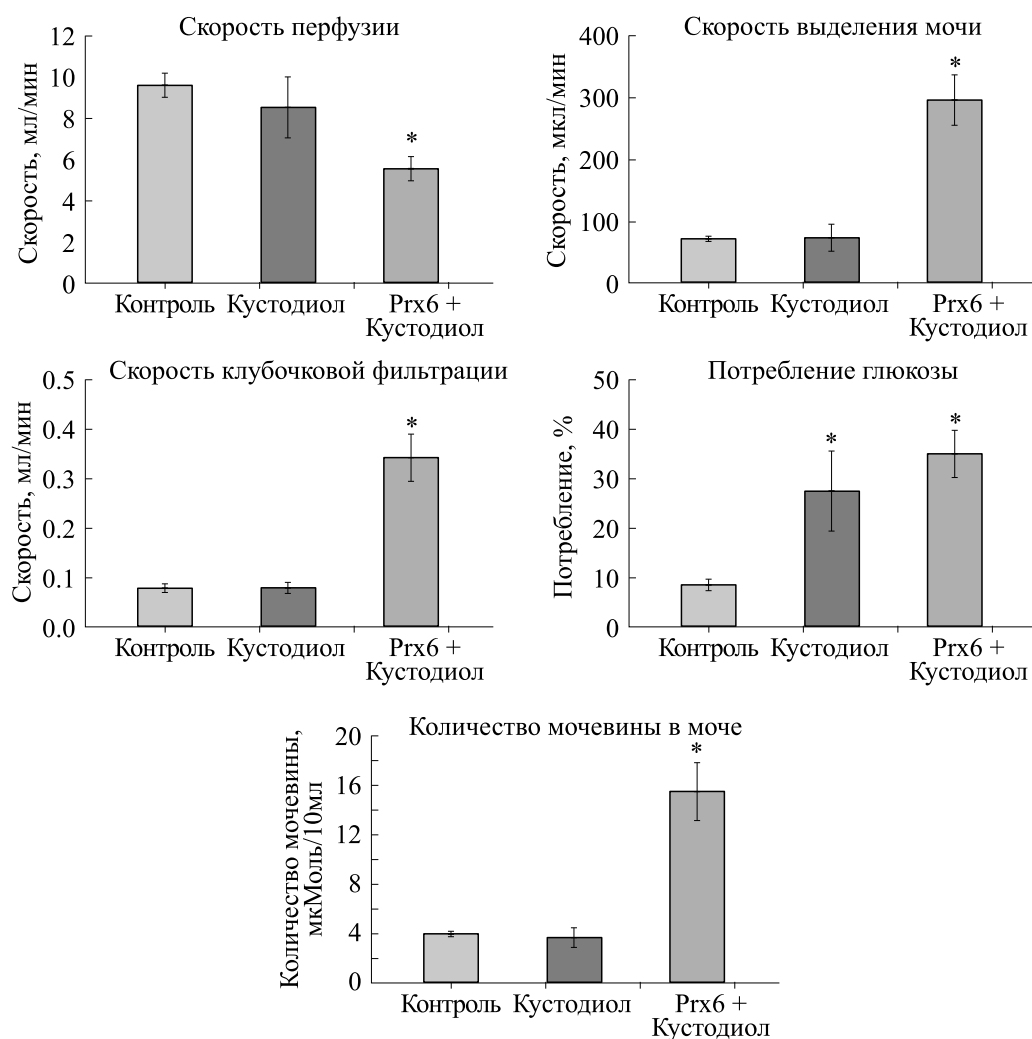
## ОБСУЖДЕНИЕ

Одна из важных задач трансплантологии — донести почечный аллограф от донора к реципиенту с минимальными повреждениями. Для решения этой задачи обычно используют консервационные растворы Celsior, раствор Висконсинского университета (UW) или «Кустодиол», которые должны обеспечивать защиту трансплантата от отека, служить буфером для поддержания баланса pH, нести энергетические субстраты для жизнедеятельности клеток, а также обеспечивать защиту от И-Р-поражения. Однако повреждение, опосредованное консервацией, является основным фактором, способствующим ранней дисфункции трансплантата. Исследователи называют И-Р-повреждение основной причиной ранней дисфункции трансплантата [1–4].

В данной работе мощный фермент-антиоксидант Rgh6 был использован для предотвращения



**Рис 2.** (а) – Морфометрические показатели капсулы Боумена; (б) – морфометрические показатели извитых канальцев почки после шестичасовой консервации и последующей перфузии. Контроль – почки здоровых животных; DMEM – для консервации использовали среду DMEM; Кустодиол – для консервации использовали раствор «Кустодиола»; Кустодиол + Prx6 – для консервации использовали раствор «Кустодиола» и Prx6 (0.2 мг/мл) на начальном этапе перфузии; \* –  $p < 0.05$  относительно контроля, # –  $p < 0.05$  относительно раствора «Кустодиола».



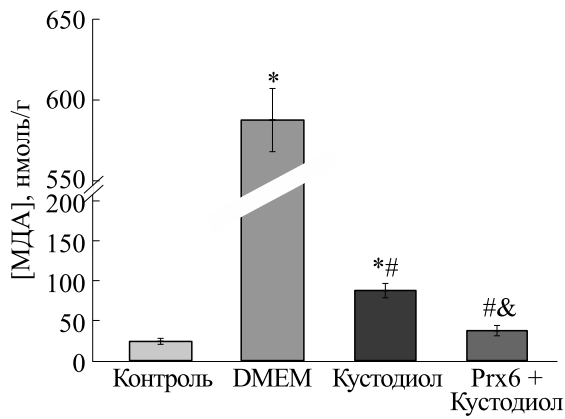
**Рис. 3.** Показатели функционирования почки после шестичасовой консервации и последующей перфузии. Контроль – почки здоровых животных; DMEM – для консервации использовали среду DMEM; Кустодиол – для консервации использовали раствор «Кустодиола»; Кустодиол + Prx6 – для консервации использовали раствор «Кустодиола» и Prx6 (0.2 мг/мл) на начальном этапе перфузии; \* –  $p < 0.05$  относительно DMEM.

свободнорадикального повреждения почечного трансплантата при И-Р. Ранее было показано, что экзогенный Prx6 эффективен в повышении антиоксидантного статуса в тканях при свободнорадикальных патологиях [11–15]. Использование Prx6 для защиты изолированных органов от реперфузионного поражения – новое направление. Экспериментальные исследования показали, что Prx6 эффективен в предупреждении реперфузионных поражений изолированного сердца и его сохранении при трансплантации [16]; показана эффективность Prx6 на коротких сроках тепловой ишемии при перфузии изолированной почки синтетическими средами [12].

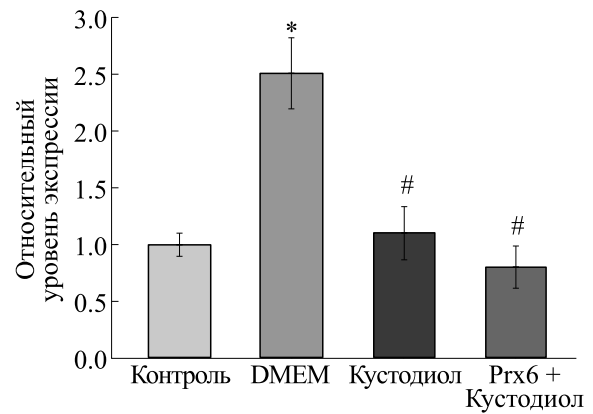
В настоящей работе мы сравнивали состояние изолированной почки при ее перфузии после холодной шестичасовой консервации в различных растворах. Использовали питательную среду

DMEM, которая не предназначена для целей консервации, стандартный консервационный раствор «Кустодиола», который продлевает устойчивость органов к гипоксии, и стандартный консервационный раствор «Кустодиола» в комбинации с антиоксидантным белком-ферментом Prx6.

Реперфузионное поражение было максимальным после использования в качестве консервационного раствора среды DMEM. Это полное разрушение структуры 60% нефронов на фоне глобального окислительного стресса, на что указывал двадцатикратный рост уровня МДА. Напротив, использование раствора «Кустодиола» существенно снижало уровень МДА, поражение нефронов и в итоге уменьшало выраженность реперфузионного поражения почечной паренхимы на этом фоне.



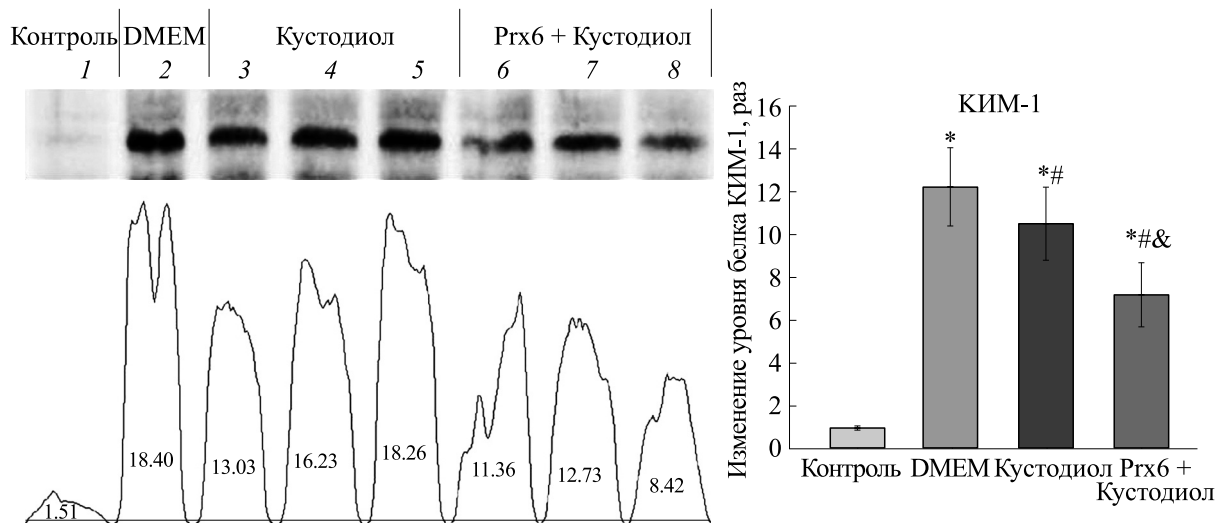
**Рис. 4.** Уровень МДА в тканях почек после шестичасовой консервации и последующей перфузии. Контроль – почки здоровых животных; DMEM – для консервации использовали среду DMEM; Кустодиол – для консервации использовали раствор «Кустодиола»; Кустодиол + Ргх6 – для консервации использовали раствор «Кустодиола» и Ргх6 (0.2 мг/мл) на начальном этапе перфузии; \* –  $p < 0.01$  относительно контроля, # –  $p < 0.05$  относительно DMEM, & –  $p < 0.05$  относительно DMEM и «Кустодиола».



**Рис. 5.** Изменение уровня мРНК гена КИМ-1 в тканях почек после шестичасовой консервации и последующей перфузии. Контроль – почки здоровых животных; DMEM – для консервации использовали среду DMEM; Кустодиол – для консервации использовали раствор «Кустодиола»; Кустодиол + Ргх6 – для консервации использовали раствор «Кустодиола» и Ргх6 (0.2 мг/мл) на начальном этапе перфузии; \* –  $p < 0.05$  относительно контроля, # –  $p < 0.05$  относительно DMEM.

С другой стороны, после использования DMEM и раствора «Кустодиола» функциональные и морфометрические показатели изолированной почки не отличались. При использовании DMEM такая ситуация может быть отражением активного компенсаторно-приспособительного процесса только для сохранившихся структур нефронов. В пользу поражения тубулярных

структур нефронов указывает отсутствие потребления глюкозы почкой, увеличение как уровня белка КИМ-1 в ренальной ткани, так и уровня экспрессии гена этого белка. Белок КИМ-1 является чувствительным маркером почечного повреждения, а уровень его экспрессии возрастает именно в проксимальном тубулярном эпителии при поражении. По-видимому, индукция синтеза



**Рис. 6.** Иммуноблоттинг почечных тканей на белок КИМ-1 после шестичасовой консервации и последующей перфузии. Контроль – почки здоровых животных; DMEM – для консервации использовали среду DMEM; Кустодиол – для консервации использовали раствор «Кустодиола»; Кустодиол + Ргх6 – для консервации использовали раствор «Кустодиола» и Ргх6 (0.2 мг/мл) на начальном этапе перфузии; \* –  $p < 0.01$  относительно контроля, # –  $p < 0.05$  относительно DMEM, & –  $p < 0.05$  относительно DMEM и «Кустодиола».

КИМ-1 является адаптивным ответом на повреждение почечных канальцев [22, 23].

Значительно большее улучшение состояния изолированной почки было отмечено при ее консервации в растворе «Кустодиола» в комбинации с антиоксидантным белком-ферментом R<sub>гхб</sub>, который использовали на начальном этапе перфузии. На это указывает уменьшение очагов поражения структур нефрона, что приводит к росту функциональных показателей изолированной почки. Рост показателей скорости перфузии, скорости клубочковой фильтрации и количества мочевины в моче указывает на улучшение процессов фильтрации, секреции и реабсорбции ультрафильтрата при использовании R<sub>гхб</sub>. Рост количества мочевины в моче напрямую указывает на наличие процессов транспорта этого метаболита через функциональные проксимальные и тонкие канальцы. Сохранение морфологии и функциональности тубулярных структур подтверждается снижением уровня экспрессии генов для маркера повреждения почек КИМ-1 и падением уровня самого белка КИМ-1 в ренальной ткани. Защитный эффект R<sub>гхб</sub> объясняется прежде всего его мощными антиоксидантными свойствами – торможение развития окислительного стресса в начальный период перфузии, на что указывает значительное снижение уровня продуктов перекисного окисления липидов в паренхиме изолированной почки при его применении. Именно с началом реперфузии наблюдается развитие окислительного стресса, что приводит к максимальному поражению ткани, в связи с этим принципиально использование антиоксидантов на данном этапе [24].

С антиоксидантными свойствами R<sub>гхб</sub> прежде всего связывают его пероксидазную активность, которая позволяет нейтрализовать гиперпродукцию активных форм кислорода, образующихся при И-Р-поражении органов [9, 11, 14]. Тем не менее, R<sub>гхб</sub> – полифункциональный белок, который не только является антиоксидантом, но и участвует во многих процессах в клетке [7, 8, 10]. В связи с этим можно предположить, что реализация R<sub>гхб</sub> своих протекторных функций для повышения устойчивости донорской почки к И-Р-поражению связана не только с его антиоксидантными свойствами.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Для получения микрофотографий, представленных в публикации, было использовано оборудование, предоставленное Сектором оптической микроскопии и спектрофотометрии ЦКП ФИЦ ПНЦБИ РАН.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Пущинского научного центра биологических исследований РАН № 075-01512-22-00.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены. Основным документом, регламентирующим проведение исследования, являлось «Руководство по работе с лабораторными животными ИБК РАН» № 39 от 04.12.2018 г.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T. Kable, A. Alcaraz, K. Budde, et al., *Клинические рекомендации Европейской Ассоциации Урологов* (перевод с англ под ред. Д. В. Перлина) (АБВ-Пресс, М., 2010).
2. R. Anaya-Prado and J. A. Delgado-Vázquez, *Curr. Opin. Organ. Transplant.*, **13** (2), 129 (2008).
3. Д. В. Артемов и А. Б. Зулькарнаев. *Практическая медицина*, **16** (9), 28 (2018).
4. С. Ф. Багненко, Ю. Г. Мойсюк, А. Е. Скворцов и др., *Вестн. трансплантологии и искусственных органов*, **11**(3), 17 (2009).
5. E. Y. Plotnikov, A. V. Kazachenko, M. Y. Vyssokikh, et al., *Kidney Int.*, **72** (12), 1493 (2007).
6. S. G. Rhee, *Mol. Cells*, **39** (1), 1 (2016).
7. Z. A. Wood, E. Schröder, J. R. Harris, et al., *Trends Biochem.*, **28** (1), 32 (2003).
8. M. G. Sharapov, V. K. Ravin, V. I. Novoselov, *Mol. Biol. (Moscow)*, **48** (4), 600 (2014).
9. M. G. Sharapov, S. V. Gudkov, V. Z. Lankin, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **86** (11), 1418 (2021).
10. M. G. Sharapov, O. V. Glushkova, S. V. Parfenyuk, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108830 (2021).
11. R. G. Goncharov, K. A. Rogov, A. A. Temnov, et al., *Cell Tissue Res.*, **378** (2), 319 (2019).
12. А. Е. Гордеева, М. Г. Шарапов и В. И. Новоселов, *Вестн. трансплантологии и искусственных органов*, **23** (3), 122 (2021).
13. E. G. Novoselova, O. V. Glushkova, S. M. Lunin, et al., *J. Immunopathol. Pharmacol.*, **35**, 20587384211005645 (2021).
14. М. Г. Шарапов, А. Е. Гордеева, Р. Г. Гончаров и др., *Биофизика*, **62** (6), 998 (2017).
15. M. G. Sharapov, V. I. Novoselov, S. V. Gudkov, *Antioxidants (Basel)*, **8** (1), 15 (2019).



16. Н. В. Грудинин, В. К. Богданов, М. Г. Шарапов и др., Вестн. трансплантологии и искусственных органов, **22** (2), 158 (2020).
17. J. Czogalla, F. Schweda, and J. Löffing, J. Vis. Exp., **117**, e54712 (2016). DOI: 10.3791/54712
18. D. R. Taft, Curr. Drug Discov. Technol., **1**, 97 (2004).
19. H. H. Chang, B. Choong, A. Phillips, et al., Exp. Anim., **62** (1), 19 (2013).
20. D. Gérard-Monnie, I. Erdelmeier, K. Régnard, et al., Chem. Res. Toxicol., **11** (10), 1176 (1998).
21. T. D. Schmittgen and K. J. Livak, Nat. Protocol., **3** (6), 1101 (2008).
22. J. V. Bonventre, Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc., **125**, 293 (2014).
23. T. Ichimura, C. R. Brooks, and J. V. Bonventre, Kidney Int., **81** (9), 809 (2012).
24. A. E. Gordeeva, M. G. Sharapov, I. V. Tikhonova, et al., Cells Tissues Organs, **203** (6), 353 (2017).

## Peroxiredoxin 6 Prevents Reperfusion Injury to Isolated Rat Kidney

A.E. Gordeeva, M.G. Sharapov, R.G. Goncharov, and V.I. Novoselov

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

Ischemia-reperfusion injury causes reduction in viability of donor organs following long-term conservation. In the present study, peroxiredoxin 6 as an antioxidant enzyme was used to increase resistance of a donor kidney to IR injury. To find out the efficiency of peroxiredoxin 6 application, morphological and functional evidence of the isolated kidney, the expression level of kidney injury molecule-1 (KIM-1) as a marker of kidney damage and malonic dialdehyde level in the tissue were evaluated. It was shown that cold storage of the kidney in DMEM solution, that was not customized, resulted in organ death during perfusion. In contrast, the use of Custodiol solution allowed the kidney to survive the episode of prolonged ischemia and perfusion. The combination of peroxiredoxin 6 with Custodiol solution led to better outcome over perfusion. Along with decreased damage to nephron structures, a 2.3-fold reduction of the malonic dialdehyde level was registered, this finding suggests neutralization of reactive oxygen species hyperproduction. The urinary flow rate, glomerular filtration rate and the amount of urea in the urine increase fourfold, thereby indicating that tubular structures are preserved, as confirmed by a 1.5-fold decrease in the level of KIM-1. Thus, the use of peroxiredoxin 6, the exogenous antioxidant protein, during perfusion increases resistance of the donor kidney to ischemia-reperfusion injury after prolonged cold storage in Custodiol solution.

*Keywords: isolated kidney, peroxiredoxins, perfusion*