

В.И.Новоселов

Роль пероксиредоксинов при окислительном стрессе в органах дыхания

УРАН "Институт биофизики клетки РАН": 142290, Московская обл., г. Пущино, ул. Институтская, 3

V.I.Novoselov

A role of peroxiredoxins in oxidative stress in the respiratory system

Key words: oxidative stress, antioxidant enzymes, peroxiredoxins, peroxiredoxin-6.

Ключевые слова: окислительный стресс, ферменты-антиоксиданты, пероксиредоксины, пероксиредоксин-6.

В настоящее время считается общепризнанным, что острые патологические процессы в организме человека сопровождаются мощным окислительным стрессом (гиперпродукцией активных форм кислорода – АФК), который является одним из основных поражающих факторов. При этом лавинообразное неконтролируемое образование АФК представляет собой огромную потенциальную опасность. В первую очередь, это касается различных патологий органов дыхания – участие АФК в их формировании доказано экспериментально.

К основным видам биологически важных молекул, задействованных в окислительном стрессе, относятся свободные радикалы и прооксиданты, способные образовывать свободные радикалы. Соответственно в организме должны существовать мощные регуляторные механизмы, ограничивающие накопление высокотоксичных свободнорадикальных интермедиатов, что привело к созданию целого набора ферментов-антиоксидантов, каждый из которых способен нейтрализовать определенный тип АФК. Это супероксиддисмутаза (СОД), предотвращающая образование супероксидрадикала, и ферменты, препятствующие накоплению вторичных радикалов (каталаза, глутатион-зависимые ферменты глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы). В эту группу антиоксидантов следует включить и пероксиредоксины – новый класс интенсивно исследуемых тиол-зависимых ферментов-антиоксидантов, которые являются наиболее древними формами восстанавливающих гидропероксида белков. Данный обзор посвящен антиоксидантной система органов дыхания, основной акцент в нем будет сделан на новом классе белков-антиоксидантов – пероксиредоксинов – и их роли в нейтрализации АФК в органах дыхания при нормальном и патологическом состоянии.

Как уже отмечалось, вклад свободных радикалов в этиологию разных заболеваний теоретически обоснован, имеет убедительные экспериментальные подтверждения и охватывает очень большое количе-

ство разных заболеваний [1]. В первую очередь к ним относятся заболевания дыхательной системы (пневмония, бронхиальная астма (БА), эмфизема, саркоидоз и др.). Кроме того, в отличие от других органов, легкие и респираторный тракт подвергаются непосредственному действию кислорода в воздухе, а также оксидантов, поступающих при его вдыхании.

Эпителий воздухоносных путей является уникальной мишенью для окислительного повреждения. Респираторный тракт подвергается воздействию свободных радикалов различных источников – как эндогенных, так и экзогенных [2]. Небольшое количество АФК, включая гидроксильный радикал (ОН), супероксиданион-радикал (O_2^-) и перекись водорода (H_2O_2) постоянно генерируются в аэробных организмах в ответ на эндогенные и экзогенные стимулы.

Легкие взрослого человека имеют большой респираторный объем – 3 000 мл [3] и соответственно обширную площадь поверхности (75–85 м²), обильно снабжаемую кровью. Вдыхание загрязненного воздуха в течение продолжительного периода может привести к значительному токсическому повреждению органов дыхания даже при низкой концентрации загрязняющих веществ. У пациентов с заболеваниями легких (бронхит, пневмония, БА) наблюдается усиление радикальных окислительных процессов в легочной ткани, интенсификация процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сыворотке крови и снижение антиоксидантной активности [4].

При воспалительных процессах в легких продукты ПОЛ влияют на липидный состав и структурные свойства клеток, а также на их энергетику посредством прямого действия на процессы окислительного фосфорилирования в митохондриях [5].

Легкие очень чувствительны к повреждающему действию эндогенных и экзогенных АФК, поэтому клетки органов дыхания выработали ряд защитных механизмов, направленных на предотвращение и восстановление повреждений, вызванных окислительным стрессом [6].

Антиоксидантная защита дыхательной системы

Эпителиальные клетки воздухоносных путей и легких отделены от внешней среды слизистой пленкой бронхоальвеолярного секрета, который представляет собой 1-ю линию защиты против воздействия атмосферных поллютантов [6]. Антиоксидантную защиту легких и воздухоносных путей осуществляют многие низкомолекулярные антиоксиданты, однако основную роль в защите эпителия трахеи, бронхов и альвеол от окислительного повреждения роль играют ферменты-антиоксиданты. Наиболее важными представителями ферментов-антиоксидантов являются: супероксид дисмутазы (SODs), каталаза, глутатион-пероксидазы (GPxs), глутатион-S-трансфераза (GSTs), глутамилцистеин-синтазы (GCSs), глутаредоксины (Grxs), тиоредоксины (Trxs) и пероксиредоксины (Prxs). Как было показано, у человека наиболее важные антиоксидантные ферменты экспрессируются в воздухоносных путях.

Пероксиредоксины

Пероксиредоксины – это семейство высококонсервативных антиоксидантных белков с пероксидазной активностью. Впервые они были обнаружены в дрожжах [7], а затем и во всех других организмах, в т. ч. в бактериях, растениях, животных и разнообразных паразитах [8]. У млекопитающих различают 6 типов пероксиредоксинов (Prx1 – Prx6), и их большая часть была идентифицирована в базах данных сравнительно недавно в процессе поиска гомологии с первоначально открытым пероксиредоксином. Их пероксидазная активность была подтверждена экспериментально уже впоследствии. В клетке пероксиредоксины находятся в основном в цитозоле, а также в митохондриях, пероксисомах, хлоропластах. Две изоформы пероксиредоксинов (Prx4 и Prx6) являются секреторными белками [9]. Концентрация пероксиредоксинов во многих клетках необыкновенно высока – от 0,1 до 1 % общего водорастворимого клеточного белка в зависимости от вида ткани, что делает их редокс-буфером, контролирующим уровень внутриклеточных перекисей.

Пероксиредоксины катализируют восстановление H_2O_2 и органических перекисей до воды и спирта соответственно. Кроме того, некоторые изоформы пероксиредоксинов способны разрушать пероксинитрит – высоко реакционный и токсичный побочный продукт реакции между оксидом азота и супероксид-анионом. Впервые пероксинитритредуктазная активность была обнаружена у бактериальных пероксиредоксинов, а затем подтверждена и для пероксиредоксинов эукариот [10]. Причем нейтрализация перекисей и пероксинитрита пероксиредоксинами происходит по одному и тому же каталитическому механизму.

После открытия пероксиредоксинов появились многочисленные данные о том, что они способны предохранять клетки от окислительного стресса. Уровень экспрессии генов различных типов пер-

оксиредоксинов существенно повышен во многих патологических состояниях, сопровождаемых окислительным стрессом. Эта корреляция указывает на то, что клетки увеличивают уровень экспрессии генов пероксиредоксинов для нейтрализации повышенного содержания реактивных форм кислорода во время окислительного стресса. У мышей с нокаутированным геном, кодирующим пероксиредоксин Prx1, были обнаружены признаки раннего старения, сопровождаемые гемолитической анемией и различными опухолями [11]. Мыши с нокаутированным геном, кодирующим Prx6, развивались нормально, но были чувствительны к окислительному стрессу [12]. В то же время трансгенные мыши с избыточной экспрессией гена Prx6 обладали высокой резистентностью к окислительным повреждениям, вызванным гипероксией. Таким образом, подобно другим антиоксидантным ферментам, пероксиредоксины предохраняют клетки от окислительного стресса.

Пероксиредоксин-6

Одним из типов пероксиредоксинов, выполняющих особую функцию в органах дыхания, является пероксиредоксин-6 (Prx6). Секреторный водорастворимый Prx6 был впервые выделен в Институте биофизики клетки РАН (28 кДа-1-Cys-пероксиредоксин-6) из обонятельного эпителия крысы [13, 14]. Была определена частичная, а затем полная аминокислотная последовательность этого белка (EMBL, № Y17295). Анализ его первичной структуры показал, что данный белок является представителем подсемейства 1-Cys тиол-специфических белков-антиоксидантов и содержит единственный цистеин в положении 47, который одновременно входит в состав каталитического центра белка (рис. 1) [15]. В нативном состоянии он представляет собой димер, образованный, по-видимому, за счет водородных связей [13].

Биохимические исследования показали, что Prx6 в присутствии некоторых тиолов обладает способностью нейтрализовать как органические, так и неорганические перекиси и его протекторная активность определяется в основном пероксидазной активностью [16, 10]. Характерная особенность Prx6 заключается в том, что его пероксидазная активность проявляется при малых концентрациях пере-

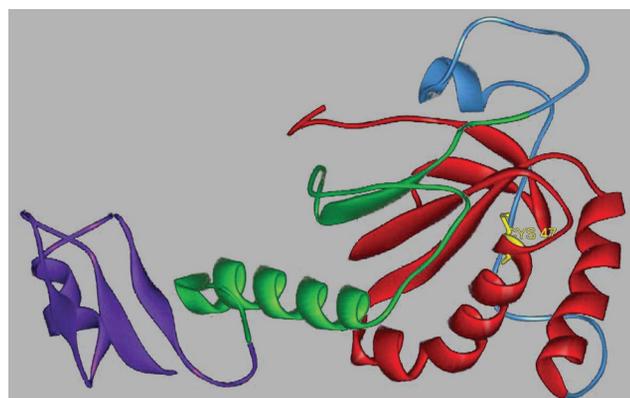


Рис. 1. Структура пероксиредоксина-6 человека

кисей (5–100 мкМ), при которых другие ферменты-антиоксиданты малоэффективны [16]. В отличие от остальных пероксиредоксинов, Ргхб, помимо пероксидазной активности, проявляет слабую фосфолипазную активность (Ca_2^+ -независимая фосфолипаза А2), которая была обнаружена при исследовании метаболизма фосфолипидов легких (в сурфактанте) и может иметь большое значение в метаболизме фосфолипидов эпителиальных клеток легких [17, 18].

Иммуногистохимические исследования, проведенные на световом и электронно-микроскопическом уровнях, и эксперименты по гибридизации *in situ* показали, что Ргхб в основном локализован в обонятельном эпителии, бронхах и эпидермисе кожи (рис. 1). Небольшое количество этого белка присутствует также в клетках почек, мозга и матки [19]. В трахее и бронхах он синтезируется бокаловидными клетками и клетками Клара и секретируется в слизь, где является мажорным среди водорастворимых белков слизи (рис. 2) [16, 19, 20]. Наконец, было показано, что вклад Ргхб в нейтрализацию АФК в трахее и бронхах достигает 70 % [21, 22].

Антиоксидантная функция Ргхб

В настоящее время возросло количество исследований, в которых удалось доказать, что Ргхб функционирует в организме (в первую очередь в органах дыхания) как мощный антиоксидант (антиоксидантный фермент).

Сверхэкспрессия Ргхб в легких интактных мышей посредством переноса аденовирусного гена Ргхб, защищала их от гипероксического повреждения [23]. При изучении легких мышей со сверхэкспрессией Ргхб было показано снижение ПОЛ, окисление белков, уменьшение отека и воспаления легких, в отличие от контроля. Одновременно в экспериментах на крысах и мышках, где животные подвергались воздействию 100%-ного кислорода, получено удвоение экспрессии Ргхб [24].

Чтобы выявить вклад Ргхб как антиоксиданта в систему защиты при остром воспалительном процессе органов дыхания, вызванном бактериальными эндотоксинами – липополисахаридами (ЛПС), был проведен сравнительный анализ динамики содержания в трахее стрессовых белков, ряда цитокинов (интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-6 (IL-6), фактора некроза опухоли- α (TNF- α)) и пероксиредоксина. Было показано, что уровень экспрессии стрессовых белков повышался через час после аппликации ЛПС и возвращался на исходный уровень через 2 ч, уровень экспрессии цитокинов (IL-2, IL-6, TNF- α и др.) повышался через 4–6 ч после аппликации ЛПС и возвращался к исходному значению через 9–12 ч. В то же время уровень секреции Ргхб существенно увеличивался сразу после аппликации ЛПС и оставался высоким в течение всего периода развития воспалительного процесса, что свидетельствует о продолжительном оксидативном стрессе в эпителии трахеи и бронхов. Таким образом, Ргхб, по-видимому, является одним из основных факто-

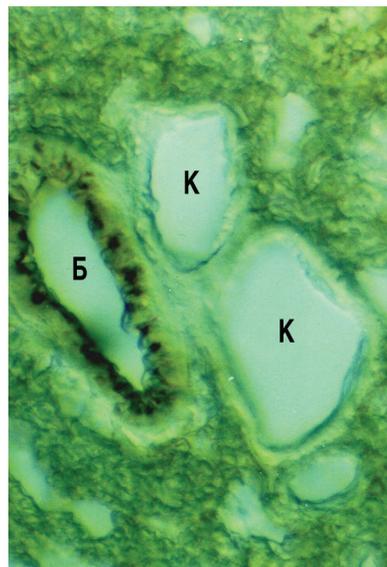


Рис. 2. Локализация пероксиредоксина-6 в легком
Примечание: иммуногистохимическое выявление с помощью антител против пероксиредоксина; Б – бронхиола; К – капилляр.

ров, определяющих течение острого воспалительного процесса в органах дыхания.

Аналогичные результаты были получены при исследовании термического ожога верхних дыхательных путей. В течение 1-й нед. после ожога уровень экспрессии Ргхб увеличивался в несколько раз и потом постепенно снижался в течение месяца. Более того, при исследовании динамики экспрессии Ргхб в течение первых часов после ожога было показано, что его содержание в трахее существенно возрастало в течение 1-го часа после ожога. По-видимому, это в основном связано с повышенной секрецией Ргхб бокаловидными клетками. Последующее резкое повышение уровня Ргхб в эпителии уже не может быть объяснено повышенной секрецией Ргхб, т. к. при этом произошло бы истощение бокаловидных клеток. Таким образом, после ожога включается механизм резкого повышения экспрессии Ргхб в бокаловидных клетках, что было подтверждено иммуногистохимическими исследованиями (рис. 3). Таким образом, активация синтеза Ргхб бокаловидными клетками является одним из ключевых звеньев в активации защитных систем в эпителии после термического ожога [25].

Выявление важной роли Ргхб в защитных механизмах эпителиальных тканей органов дыхания, которые, в первую очередь, включают в себя активацию экспрессии Ргхб в клетках при различных патологических состояниях, позволило сделать предположение о том, что использование экзогенного Ргхб может существенно ускорить процессы восстановления пораженных эпителиев в органах дыхания. Данная гипотеза была проверена на моделях острого воспалительного процесса в трахее крысы, вызванного бактериальными эндотоксинами, и термического ожога верхних дыхательных путей.

На рис. 4 представлены гистологические результаты аппликации Ргхб в трахею крысы после введения ЛПС непосредственно в трахею. Аппликация Ргхб позволила предотвратить отслоение эпителия трахеи и существенно сохранить его структуру. Сходные результаты были получены при исследовании

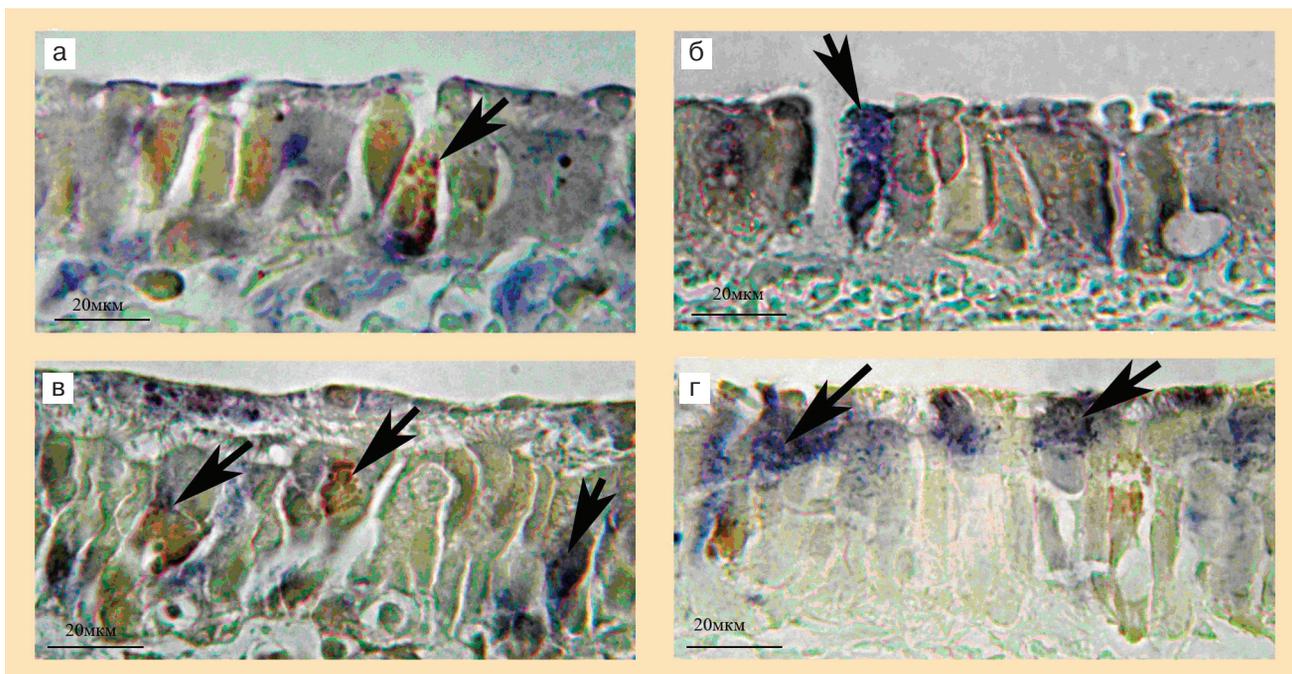


Рис. 3. Иммуногистохимическое выявление пероксиредоксина-6 после термического ожога трахеи: а – контроль; б – 1 нед. после ожога; в – 2 нед. после ожога; г – 3 нед. после ожога.

Примечание: стрелки показывают бокаловидные клетки в трахее, интенсивно синтезирующие пероксиредоксин-6.

эффекта Ргхб на модели термического и химического ожогов верхних дыхательных путей. Введение в трахею экзогенного Ргхб после термического ожога уменьшает количество погибших клеток в эпителии трахеи, восстановление эпителия происходит значительно быстрее. Наконец, сохранность эпителия трахеи крысы была продемонстрирована при введении Ргхб в качестве радиопротектора перед облучением в сублетальной дозе (рис. 5).

В контроле наблюдается полная деструкция эпителия крысы. Введение Ргхб через 0,5 ч после введения ЛПС существенно уменьшает развитие воспалительного процесса.

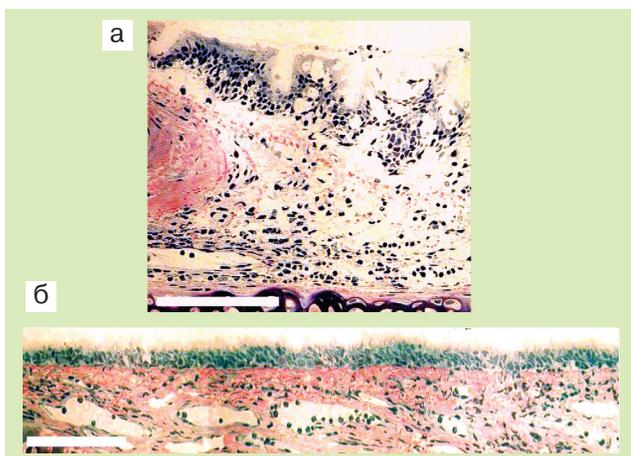


Рис. 4. Эффект аппликации пероксиредоксина-6 в структуру эпителия трахеи крысы при остром воспалительном процессе в верхних дыхательных путях при введении бактериального эндотоксина (липолисахарида) непосредственно в трахею: а – аппликация липополисахарида в трахею; б – аппликация пероксиредоксина-6 через полчаса после аппликации полисахарида

Примечание: в обоих случаях анализ проведен через 4 ч после аппликации полисахарида. В контроле наблюдается полная деструкция эпителия крысы. Введение пероксиредоксина-6 через полчаса после введения липополисахарида существенно уменьшает развитие воспалительного процесса.

В контроле хорошо наблюдается полное разрушение эпителия бронхов, в случае применения радиопротектора наблюдается сохранение структуры эпителия бронхов.

Использование пероксиредоксина в лечении различных заболеваний о том, что усиление эффективности антиоксидантных систем защиты является существенным фактором при выборе терапевтической стратегии. О том, что критической является именно антиоксидантная активность пероксиредоксина, свидетельствуют эксперименты по использованию инактивированного пероксиредоксина, который дал существенно меньший лечебный эффект.

При использования в лечении патологии легких пероксиредоксин имеет ряд преимуществ перед другими антиоксидантами. Во-первых, по сравнению с обычными низкомолекулярными антиоксидантами он существенно эффективнее нейтрализует АФК. По сравнению с каталазой пероксиредоксин способен нейтрализовать как неорганические, так и орга-

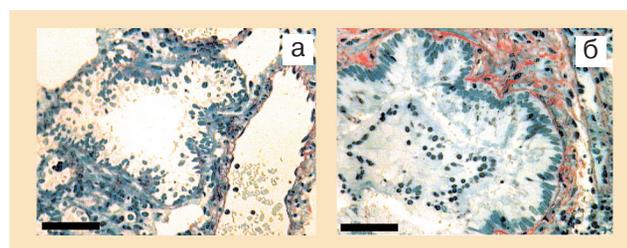


Рис. 5. Структура бронхов легких крысы через месяц после сублетальной дозы облучения (600 рентген) при использовании пероксиредоксина-6 в качестве радиопротектора: а – контроль; б – при введении пероксиредоксина в вену крысы перед облучением

Примечание: в контроле хорошо видно полное разрушение эпителия бронхов; в случае применения радиопротектора наблюдается сохранение структуры эпителия бронхов.

нические гидропероксиды, и соответственно он будет более действенным. Глутатионпероксидазе для ее функционирования необходима система восстановления глутатиона, которая, ввиду существенно меньшего содержания глутатионпероксидазы в респираторном эпителии по сравнению с пероксиредоксином, по-видимому, не сможет обеспечить эффективное функционирование экзогенной глутатионпероксидазы. В случае пероксиредоксина, который является мажорным белком эпителия трахеи и бронхов, по-видимому, в респираторном эпителии сохраняются, по крайней мере частично, системы активации пероксиредоксина, что позволяет ему эффективно функционировать. Таким образом, среди природных антиоксидантов, которые могут быть эффективны при лечении различных заболеваний верхних дыхательных путей, по-видимому, наиболее эффективным является пероксиредоксин [26].

Работа поддержана грантом Президиума РАН "Молекулярная и клеточная биология" ГК № 16.512.11.2169

Литература

1. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы в норме и при патологических состояниях. Пособие для врачей. 2-е изд. М.: РКНПК МЗ РФ; 2001.
2. Bauer V., Bauer F. Reactive oxygen species as mediators of tissue protection and injury. *Gen. Physiol. Biophys.* 1999; 18: 7–14.
3. Палеев Н.Р. Болезни органов дыхания. М.: Медицина; 2000.
4. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З., Труфакин В.А. Окислительный стресс: Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА; 2008.
5. Семенов В.Л. Перекисное окисление липидов как механизм биоэнергетической регуляции при воспалении органов дыхания. *Пат. физиол.* 1989; 2: 17–20.
6. Cross C.E., Van der Vliet A., O'Neill C.A. et al. Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. *Environ. Health Perspect.* 1994; 102: 10. 185–191.
7. Kim T.S., Dodia C., Chen X. et al. Cloning and expression of rat lung acidic Ca²⁺-independent PLA2 and its organ distribution. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: 750–761.
8. Rhee S.G., Bae Y.S., Lee S.-R., Kwon J. Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteineoxidation 2000. *Sci. STKE* 2000; 53: 1–6.
9. Okado-Matsumoto A., Matsumoto A., Fujii J., Taniguchi N. Peroxiredoxin IV is a secretable protein with heparin-binding properties under reduced conditions. *J. Biochem. (Tokyo)* 2000; 127: 493–501.
10. Peshenko I. V., Shichi H. Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxyxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31: 292–303.
11. Neumann C.A., Krause D.S., Carman C.V. et al. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 2003; 424: 561–565.
12. Wang X., Phelan S.A., Forsman-Semb K. et al. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 25179–25190.
13. Peshenko I.V., Novoselov V.I., Evdokimov V.A. et al. Novel 28-kD secretory protein from rat olfactory epithelium. *FEBS Lett.* 1996; 381: 12–14.
14. Peshenko I.V., Novoselov V.I., Nikolaev Yu.V. et al. Identification of 28 kD secretory protein from olfactory epithelium as tiol-specific antioxidant. *Free Radic. Biol. & Med.* 1998; 25: 654–659.
15. Nekrasov A.N., Radchenko V.V., Shuvaeva T.M. et al. Information structure analysis of protein sequences. Design and purification of recombinant truncated forms of human 1-CYS peroxiredoxin (PrxVI). *J. Biomol. Struct. Din.* 2007; 24: 455–462.
16. Новоселов В.И., Пешенко И.В., Камзалов С.С. и др. Свойства каталитического центра секреторного 28 кДа (1-Cys пероксиредоксина) из обонятельного эпителия крысы. *Биофизика* 1998, 43, 610–616.
17. Fisher A.B., Dodia C., Feinstein S.I., Ho Y. S. Altered lung phospholipid metabolism in mice with targeted deletion of lysosomal-type phospholipase A2. *J. Lipid. Res.* 2005; 46: 1248–1256.
18. Coraux C., Roux J., Jolly T., Birembaut P. Epithelial cell-extracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regeneration. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2008; 5: 689–694.
19. Novoselov S.V., Peshenko I.V., Popov V.I. et al. Localisation of 28-kDa peroxiredoxin in rat epithelial tissues and its antioxidant properties. *Cell. Tissue Res.* 1999; 298: 471–480.
20. Новоселов В.И., Пешенко И.В., Новоселов С.В. и др. Протекторные свойства 28-кДа пероксиредоксина определяются его пероксидазной активностью. *Биофизика* 1999; 44: 568–570.
21. Новоселов В.И., Амелина С.Е., Кравченко И.Н. и др. Роль пероксиредоксина в антиоксидантной системе органов дыхания. *Докл. ДАН РАН* 2000; 375 (6): 831–833
22. Chuchalin A.G., Novoselov V.I., Shifrina O.N. et al. Peroxiredoxin VI in human respiratory system. *Respir. Med.* 2003; 97 (2): 147–151.
23. Wang X., Phelan S.A., Forsman-Semb K. et al. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 25179–25190.
24. Kim H.S., Manevich Y., Feinstein S.I. et al. Induction of 1-Cys Peroxiredoxin expression by oxidative stress in lung epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2003; 285: 363–369.
25. Новоселов В.И., Мубаракшина Э.К., Янин В.А. и др. Вклад антиоксидантных систем при регенерации эпителия трахеи после термического ожога верхних дыхательных путей. *Пульмонология* 2008; 6: 80–84.
26. Новоселов В.И., Равин В.К., Шаранов М.Г. и др. Модифицированные пероксиредоксины как прототипы лекарственных препаратов мощного антиоксидантного действия. *Биофизика* 2011; 56 (5): 836–842.

Информация об авторе

Новоселов Владимир Иванович – д. б. н., проф., главный научный сотрудник ИБК РАН; тел.: (4967) 73-94-18; e-mail: novoselov-vi@rambler.ru

Поступила 14.11.11
© Новоселов В.И., 2012
УДК 616.2-092