

ДЕЙСТВИЕ МОДУЛЯТОРОВ АКТИВНОСТИ МЕВАЛОНАТНОГО БИОХИМИЧЕСКОГО ПУТИ НА РЕАКТИВНОСТЬ МАКРОФАГОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ НЕФРОСКЛЕРОЗЕ

Шварц Я.Ш.¹, Белогородцев С.Н.², Филимонов П.Н.³,
Селедцова Г.В.²

¹ ГУ НИИ терапии СО РАМН, г. Новосибирск

² ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, г. Новосибирск

³ ФГУ Новосибирский НИИ туберкулеза МЗСР РФ, г. Новосибирск

Резюме. В модели длительного рабдомиолизиндуцированного повреждения почек у мышей C57Bl/6 изучали влияние холестериновой (ХС) диеты, внутрибрюшинного введения мевалоновой кислоты (Мев) и их сочетания на продукцию оксида азота (NO) перитонеальными макрофагами, а также на биохимические показатели нарушения функции почек, на выраженность альтеративно-инфильтративных изменений и на уровень нефросклероза в почечной ткани. Действие ХС, Мев и их сочетания на выраженность нефросклероза оценивали также в модели унилатеральной обструкции мочеточника. У нормальных животных и особенно у мышей с поражением почек продемонстрировано драматическое снижение ЛПС-индуцированной продукции NO под действием ХС диеты, и в то же время значительное усиление этой продукции под действием Мев. При введении Мев на фоне ХС диеты Мев частично отменял эффект ХС. Одновременно показано, что ХС диета усиливала фиброз, слабо влияя на альтеративно-инфильтративный компонент, тогда как Мев усиливал альтеративный компонент и несколько ослаблял фиброзный ответ. Сделан вывод, что ингибиторы (ХС диета) и активаторы (мевалонат) мевалонатного биохимического пути разнонаправленно действуют на течение и исход хронической нефропатии, оппозитным образом влияя на M1-M2 поляризацию макрофагов.

Ключевые слова: нефросклероз, макрофаги, холестерин, мевалонат, оксид азота.

Schwarz Ya.Sh., Belogorodtsev S.N., Filimonov P.N., Seledtsova G.V.

EFFECTS OF MEVALONATE PATHWAY MODULATORS UPON REACTIVITY OF MACROPHAGES IN EXPERIMENTAL NEPHROSCLEROSIS

Abstract. The effects of cholesterol (Ch) diet, i.p. administration of mevalonic acid (Mev) and their combined application upon nitric oxide (NO) production in peritoneal macrophages, as well as upon biochemical characteristics of kidney function derangements, and histological parameters of tissue alterations, infiltration and fibrosis were studied in experimental model of chronic rhabdomyolysis-induced renal injury induced in C57Bl/6 mice. The effects of Ch diet, Mev and their combination on the degree of renal fibrosis were also studied in a model of unilateral ureteral obstruction. In normal animals, and, especially, in nephrotic mice, Ch diet was shown to cause a dramatic decrease of LPS-induced NO production, whereas Mev did enhance NO production significantly.

Адрес для переписки:

Шварц Яков Шмульевич,
630004, г. Новосибирск, ул. Урицкого, 35, кв. 7.
Тел.: (3892) 229-51-57.
Факс: (4967) 229-51-57.
E-mail: yshschwartz@mail.ru

Administration of Mev during Ch treatment abolished, in part, the suppressive effect of Ch. Ch diet was shown to enhance fibrotic response, without significant effect upon tissue alteration and mononuclear infiltration, whereas Mev enhanced alternative component and slightly diminished fibrosis. We conclude that Ch diet and Mev exert opposite effects upon the course and outcome of chronic nephropathy for their inhibitory (Ch) and stimulating (Mev) effect on mevalonate pathway, which is involved in the control of macrophage M1-M2 polarization. (*Med. Immunol.*, vol. 11, N 6, pp 499-508)

Введение

По современным представлениям индукция в макрофагах (Мф) экспрессии про- и противовоспалительных факторов связана с формированием оппозитных функциональных фенотипов М1 и М2. Классическими маркерами М1-макрофагов являются высокая индукция NO-синтазы и низкая — аргиназы, а М2-макрофагов — слабая индукция NO-синтазы и высокая — аргиназы [12, 25]. Продуктом NO-синтазы является оксид азота, поэтому его высокая продукция — критерий М1-фенотипа, а низкая — М2-фенотипа. Макрофаги М1-фенотипа реализуют биоцидно-деструктивные функции, тогда как М2-фенотип связан с низким провоспалительным ответом и осуществлением репаративно-фиброзных функций [1, 24, 34].

Функциональное состояние Мф является критическим для судьбы множества воспалительных заболеваний, в том числе для хронических воспалительных заболеваний почек. Одно из наиболее характерных и ранних событий при этих заболеваниях — моноцитарная инфильтрация гломерулярного и тубулоинтерстициального компартментов [5, 11]. Параллельно с инфильтрацией при любой хронической нефропатии развивается интерстициальный нефросклероз, который в финальной стадии хронической почечной недостаточности четко коррелирует со степенью нарушения функции почек. Нефросклеротическая трансформация считается практически необратимым состоянием, и усилия большинства авторов направлены на предотвращение ее развития [39]. При тубулоинтерстициальных нефропатиях в зависимости от фенотипа/реактивности Мф в зоне инфильтрации в почках развивается либо нефросклероз с прогрессирующей утратой функции органа, либо значительное ограничение интерстициального фиброза и ускоренное восстановление нормальной структуры ткани [18, 27, 38]. Мф инфильтрата М2-фенотипа служат движущей силой нефросклеротических преобразований, будучи основными продуцентами ключевого фиброгенного цитокина — TGF- β 1, а также др. фиброгенных факторов. Работы об антифиброзной роли мононуклеарных фагоцитов инфильтрата указывают, что этими клетками могут быть Мф М1-фе-

нотипа [7, 11, 22, 27]. Вместе с тем М1-Мф могут усиливать, а М2 — снижать повреждение почечной ткани [38].

Хотя формирование того или иного фенотипа Мф при воспалении детерминирует течение и исход процесса, реактивность и функциональное состояние Мф при развитии реальных воспалительных процессов *in vivo*, особенно при их хроническом течении — малоисследованная проблема. Каковы ключевые молекулярные механизмы регуляции макрофагальной фенотипической дифференцировки и какие молекулярные «переключатели» при воспалении, в том числе при тубулоинтерстициальных поражениях почек, могут менять М1-фенотип на М2 или М2 на М1 — неизвестно.

Мы предположили, что одним из основных механизмов регуляции реактивности/фенотипа Мф при нефропатиях может быть активность мевалонатного биохимического пути, контролируемая ключевым ферментом этого пути — 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А редуктазой (ОМГР). Согласно данному предположению при длительном повреждении почечной ткани ХС и др. ингибиторы ОМГР снижают реактивность Мф и вызывают М2-поляризацию, тогда как активация мевалонатного пути должна приводить к переключению М2- на М1-фенотип. Соответственно, М2-поляризация может приводить к снижению альтерации и, возможно, усилению фиброзного процесса, а М1-поляризация, вероятно, — к противоположному эффекту. Ранее нами была показана индукция гипореактивности Мф/М2-фенотипа ингибиторами ОМГР и ее отмена мевалоновой кислотой (Мев) в моделях гепатофиброза [2].

Настоящая работа посвящена верификации гипотезы о возможной роли мевалонатного пути в модуляции реактивности/фенотипа Мф при развитии экспериментального нефросклероза. В качестве модели использовали хроническое тубулоинтерстициальное поражение почек у мышей, вызванное глицерининдуцированным рабдомиолизом, где основным механизмом патогенеза считается формирование миоглобинурии, вызванный ей окислительный стресс, липопероксидация, последующее рекрутирование клеток-эффекторов воспаления в очаг и вторичная

альтерация, зависящая от реактивности рекрутированных клеток. При этом первичной мишенью поражения является эпителий извитых канальцев [30, 42]. Дополнительно использовали модель унилатеральной обструкции мочеточника, где тубулоинтерстициальное поражение также является ведущим. Для ингибирования ОМГР использовали ХС диету [10, 17, 33], а отмену эффектов ингибирования/повышение активности мевалонатного пути вызывали введением животным мевалоната. Критерием М1-М2-фенотипа служила ЛПС-индуцибельная продукция в Мф оксида азота. Функцию почек определяли по уровню мочевины и креатинина, а нарушения липидного обмена — по уровню ХС и триглицеридов сыворотки крови. Выраженность повреждения, степень нефросклероза и величину мононуклеарной инфильтрации в почечной ткани оценивали морфологическими методами.

Материалы и методы

Экспериментальные модели и животные. Эксперименты проводили на мышах-самках линии C57Bl/6 весом 22-25 г, находившихся на стандартной лабораторной диете со свободным доступом к воде и пище, либо в тех же условиях на изокалорийной 2,5% ХС диете [19, 33]. Последняя у мышей C57Bl/6 ингибирует ОМГР/мевалонатный путь крайне эффективно [17]. Части мышей ежедневно внутрибрюшинно вводили лактон мевалоновой кислоты (Sigma) в дозе 50 мг/кг согласно [2]. Для индукции тубулоинтерстициальной нефропатии пользовались стандартной моделью глицерининдуцированного поражения почек (рабдомиолизиндуцированная миогемоглобинурия) [20, 26]. С этой целью животным внутримышечно вводили 50% раствор глицерина в дозе 4,3 мл/кг (200 мкл/мышь). Для хронизации поражения и усиления нефросклеротических изменений инъекции глицерина делали с интервалом 1 нед. 3-кратно. В работе было использовано 60 животных, которые разделялись на 8 экспериментальных групп не менее чем по 7 животных в каждой группе: 1. Интактные мыши, мыши, получавшие. 2. ХС. 3. Мев. 4. ХС + Мев. 5. Глицерин. 6. Глицерин + ХС. 7. Глицерин + Мев. 8. Глицерин + ХС + Мев. Глицерин, Мев и ХС диету мыши начинали получать с 1-го дня эксперимента, на 10-е сутки и 24-е после последней инъекции глицерина (соответственно 24-е и 38-е сутки от начала эксперимента/развития патологического процесса в почках) животных умерщвляли декапитацией и получали материал для дальнейших исследо-

ваний. Кроме того, влияние ХС диеты и Мев на развитие нефросклероза у мышей C57Bl/6 оценивали в модели унилатеральной обструкции мочеточника (УОМ). Для этого животным, получавшим в течение 10 суток ХС диету и/или Мев, в асептических условиях под эфирным наркозом производили перевязку левого мочеточника, затем в течение еще 10 суток продолжали давать ХС и/или Мев, далее мышей умерщвляли и из левой почки получали материал для исследований. В данной модели было 4 экспериментальных группы по 5 животных в каждой: 1. УОМ. 2. УОМ + ХС диета. 3. УОМ + Мев. 4. УОМ + ХС диета + Мев. ХС и Мев назначались в тех же дозах, что и в модели с рабдомиолизом.

Гистологическое исследование. Образцы почечной ткани фиксировали 10% формалином, заключали в парафин, готовили гистологические срезы, окрашивали гематоксилин-эозином или сириусом красным с прочным зеленым по Lopez-de Leon [21], и затем анализировали под световым микроскопом Axio Imager A1 со встроенной камерой (Carl Zeiss, Германия). Выраженность морфологических нарушений почечной ткани оценивали полуколичественно преимущественно в кортикальной зоне. Для этого на срезах, окрашенных гематоксилин-эозином, величину мононуклеарной инфильтрации определяли по 4-балльной шкале (0 — отсутствует, 1 — слабая, 2 — умеренная/средняя, 3 — значительная), образование цилиндров — по 3-балльной шкале (0 — отсутствуют, 1 — умеренное количество, 2 — большое количество). Выраженность фибросклеротических поражений гломерулярного и интерстициального компартментов оценивали по величине депозитов коллагена на срезах, окрашенных сириусом красным, пользуясь 4-балльной шкалой (0 — количество коллагена соответствует нормальной почке, 1 — в склеротическую трансформацию вовлечено до 10 % почечной ткани/клубочков, 2 — до 25%, 3 — до 50% и более). При рабдомиолиз-индуцированной нефропатии нефросклеротические изменения оценивали на 38 сутки эксперимента (24 сутки после последней инъекции глицерина), так как на этом сроке величина отложений коллагена была максимальной и наименее вариабельной. При унилатеральной обструкции мочеточника изменения коллагенообразования оценивали в гломерулярном аппарате, так как обширность УОМ-индуцированного интерстициального нефросклероза мешала детекции слабых воздействий. Препараты исследовались двойным слепым методом, оценивалось не менее 10 полей зрения, выбранных случайным образом, при

ТАБЛИЦА. СОДЕРЖАНИЕ АЛЬБУМИНА, МОЧЕВИНЫ, КРЕАТИНИНА, ОБЩЕГО ХС И ТРИГЛИЦЕРИДОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У МЫШЕЙ C57BL/6 ПРИ НЕФРОПАТИИ, ВЫЗВАННОЙ 3-КРАТНЫМ ГЛИЦЕРИНДИНДУЦИРОВАННЫМ РАБДОМИОЛИЗОМ НА 24-е И 38-е СУТКИ ЭКСПЕРИМЕНТА

Группы животных	Альбумин, г/л		Мочевина, ммоль/л		Креатинин, мкмоль/л		Холестерин, ммоль/л		Триглицериды, ммоль/л	
	24 сут.	38 сут.	24 сут.	38 сут.	24 сут.	38 сут.	24 сут.	38 сут.	24 сут.	38 сут.
Интактные	33,4±2,1		6,2±0,7		45,9±3,9		2,4±0,1		0,8±0,04	
Глицерин	28,2±1,4*	29,2±1,7	8,9±0,5**	7,9±0,3*	49,5±2,7	47,3±2,0	2,0±0,2	2,2±0,1	1,1±0,1	1,2±0,04***
ХС	34,7±1,0	33,2±0,6	7,8±0,6	7,2±0,4	45,6±2,2	49,0±2,2	2,9±0,1**	2,8±0,3	1,1±0,1**	0,9±0,1
Мевалонат (Мев)	31,6±1,8	35,2±0,5	7,8±0,5	6,3±0,5	47,2±1,0	46,6±3,9	2,2±0,3	2,8±0,1*	1,2±0,2	1,2±0,2
Глицерин + ХС	35,1±1,1**	32,6±0,6	9,1±0,6**	9,3±0,4***	43,8±0,9	51,3±1,0***	2,9±0,2**	2,7±0,3	0,9±0,1	1,0±0,1
Глицерин + Мев	30,8±1,3	35,0±1,3#	7,5±0,6	6,4±0,2**	50,0±2,3#	50,6±1,9***	2,1±0,2	2,3±0,2	1,1±0,1***	1,1±0,1*
Глицерин + ХС + Мев	33,4±1,1\$	32,4±0,5	8,7±0,4**	8,7±0,3***	45,4±0,7	49,6±1,7**	3,2±0,1***	2,7±0,2	0,9±0,1	1,1±0,1

Примечание. * – различия по сравнению с интактным контролем, \$ – с группой, получавшей глицерин, и # – с группой, получавшей глицерин + ХС, достоверны при $p < 0,05$; ** – при $p < 0,01$; *** – при $p < 0,001$.

увеличении $\times 400$. Результаты подсчитывались как среднее значение исследуемого показателя в каждой экспериментальной группе.

Сыворотка крови. Уровни мочевины, креатинина, холестерина, триглицеридов, и альбумина в сыворотке крови определяли унифицированными методами с помощью коммерческих наборов реагентов «Bioscon» (Германия) согласно инструкции производителя с использованием автоматизированной системы «Labsystem» (Финляндия).

Продукция NO. Поскольку при ЛПС-индуцированном воспалительном ответе, при нефротических процессах или при гиперхолестеринемии, вызванной ХС диетой, экспрессия TGF- $\beta 1$ и продукция NO в Мф почек и в перитонеальных Мф регулируются сходным образом [6, 31, 32, 37, 40], об ЛПС-стимулированной продукции NO в воспалительных Мф судили по реакции на ЛПС перитонеальных Мф. С этой целью получали клетки перитонеального лаважа, Мф выделяли методом прилипания к подложке и далее культивировали при 37 °С, 5% CO₂, и 100% влажности в количестве 250 тыс./лунку в 24-луночных планшетах Linbro в бессывороточной среде RPMI1640, содержащей 2мМ HEPES и смесь антибиотиков для культивирования клеток (MP Biomedicals) в присутствии или отсутствии 100 нг/мл ЛПС *E. Coli* 0111:B4. Монослои культивировали в течение 48 часов, затем инкубационную среду собирали, замораживали при -20 °С и хранили несколько суток. Продукцию NO оценивали по аккумуляции нитритов в культуральной среде колориметрическим методом с реагентом Грисса (Griess) [13]. Контролем служила такая же культуральная среда, инкубированная в отсутствие клеток. Концентрацию нитритов, используя в качестве стандартной калибровочной кривой последовательные разведения 1 мМ раствора нитрита натрия.

Статистика. Статистическую значимость различий параметров между группами оценивали, используя критерий Манна–Уитни (при отсутствии нормальности распределения) или t-критерий Стьюдента. Данные представлены в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки.

Результаты

Хронический рабдомиолиз. При рабдомиолизе основными морфологическими изменениями в почках были дистрофические изменения эпителия извитых канальцев, иногда –

мелкогранулярные белковые массы в просвете канальцев, закупорка части канальцев зернистыми или гомогенными цилиндрами, в интерстициально-стромальных структурах коркового слоя — очаговая мононуклеарная инфильтрация (рис. 1). Одновременно развивались фибросклеротические изменения в виде значительных фокальных отложений коллагена в интерстициальной и периваскулярной ткани и нередко — признаки гломерулосклероза. Такая картина поражения типична для поздней фазы рабдомиолиз-индуцированной нефропатии [36]. В сыворотке крови на 24-е и 38-е сутки наблюдалась гипоальбуминемия, вероятно, в связи с потерей белка плазмы из-за протеинурии, и происходило значительное увеличение концентрации мочевины, обусловленное нарушением ее клиренса (таблица). Изменения уровня креатинина были менее манифестны.

ХС диета, мевалонат. Введение интактным мышам Мев не вызывало практически никаких морфологических изменений, за исключением небольшого цилиндробразования, а ХС диета вызывала у таких мышей скудную мононуклеарную инфильтрацию и очень слабые неспецифические нарушения (рис. 1). Мев и ХС у этих животных не меняли уровни альбумина и креатинина, уровень мочевины под действием ХС повышался, а под действием Мев либо не менялся, либо повышался. Содержание общего ХС крови у мышей всех экспериментальных групп кроме тех, которые находились на ХС диете, менялось недостоверно, а в группах, получавших ХС, наблюдалась умеренная гиперхолестеринемия. Уровень триглицеридов во всех группах слабо превышал значения в интактной группе.

Рабдомиолиз + ХС, рабдомиолиз + Мев. ХС диета у животных с длительным повреждением почечной ткани/рабдомиолизом крайне слабо влияла на воспалительный компонент процесса, так что уровень мононуклеарной инфильтрации и цилиндробразования не отличались от соответствующих значений в рабдомиолизном контроле. Вместе с тем фиброзные изменения в почечной ткани под действием ХС достоверно усиливались, и обширность отложений коллагена возрастала в 1,43 раза. В противоположность ХС, Мев усиливал воспалительный ответ, то есть вызванную длительным повреждением почек воспалительную инфильтрацию и цилиндробразование. При этом, в отличие от ХС, на уровень фибросклеротических изменений Мев влиял недостоверно.

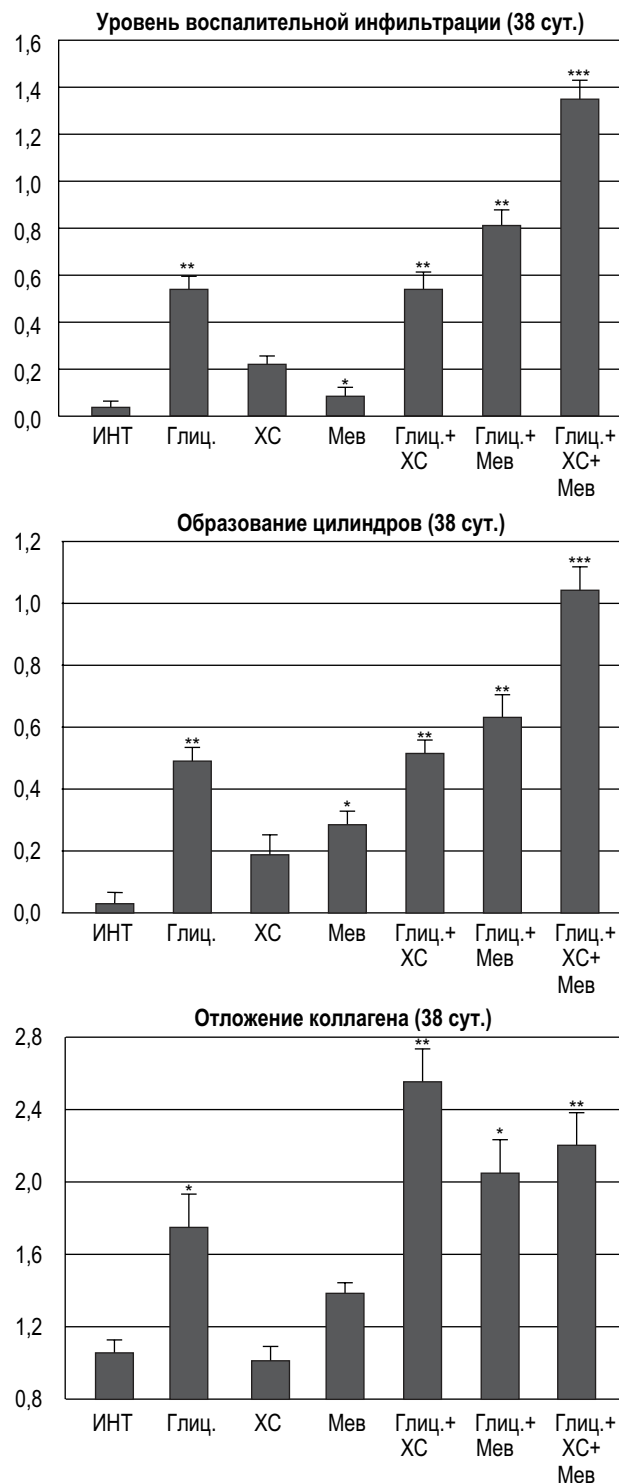


Рисунок 1. Влияние ХС диеты и введения мевалоновой кислоты на выраженность воспалительной мононуклеарной инфильтрации, образование цилиндров и величину отложений коллагена в почечной ткани при нефропатии, вызванной 3-кратным глицерин-индуцированным рабдомиолизом у мышей C57Bl/6

Примечание. Значения признаков выражены в баллах в соответствии с оценочными критериями, описанными в разделе «Материалы и методы». * — различия по сравнению с интактным контролем достоверны при $p < 0,05$; ** — при $p < 0,01$; *** — при $p < 0,001$.

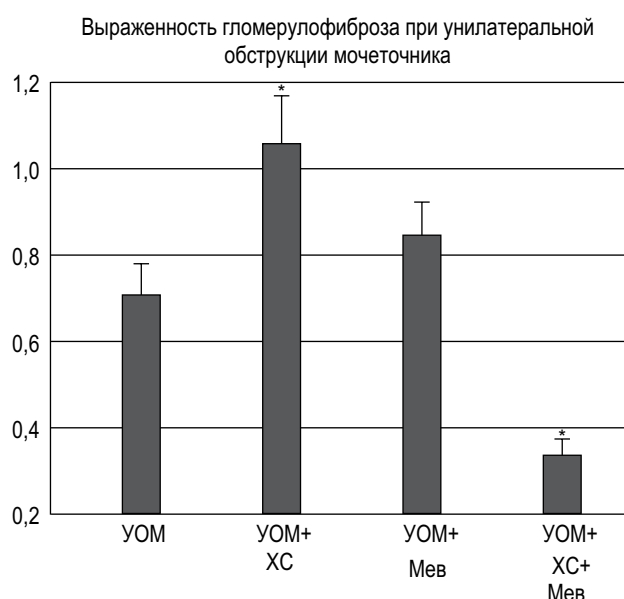


Рисунок 2. Влияние ХС диеты и введения мевалоновой кислоты на выраженность гломерулофиброза при нефропатии, вызванной односторонней перевязкой мочеточника (УОМ) у мышей C57Bl/6

Примечание. Распространенность гломерулофиброза оценена по отложениям коллагена в клубочках и выражена в баллах в соответствии с критериями, описанными в разделе «Материалы и методы». * – различия по сравнению с УОМ контролем достоверны при $p < 0,05$.

Профиброзное действие ХС сопровождалось ростом содержания мочевины в сыворотке крови, тогда как Мев снижал уровень мочевины до нормальных значений.

Рабдомиолиз + ХС + Мев. При совместном действии ХС и Мев на мышей, получавших инъекции глицерина, в почечной ткани резко усиливались цилиндрообразование и воспалительная инфильтрация, однако усиления фиброзного процесса и увеличения отложений коллагена не наблюдалось и, соответственно, концентрация мочевины в сыворотке крови не повышалась. Более того, у мышей с рабдомиолизом Мев вызывал некоторую тенденцию к снижению фиброгенного и уремического (мочевина) эффектов ХС.

Таким образом, у интактных животных ХС диета или введение Мев оказывали слабое действие на структуру и функции почек, однако при патологии почек ХС диета значительно усиливала нефросклероз, почти не влияя на альтеративно-инфильтративный процесс. Мев, наоборот, слабо влиял на фиброгенез, но усиливал альтерацию. При совместном введении Мев уменьшал фиброгенное действие ХС диеты.

Обструкция мочеточника. Принципиально близкие данные были получены в модели УОМ.

Ведущими морфологическими нарушениями были значительное истончение коркового слоя и тяжелые тубулоинтерстициальные повреждения, в том числе резкое расширение просвета канальцев, уплощение и атрофия тубулярного эпителия, диффузная моноклеарная инфильтрация, мощный интерстициальный фиброз и часто гломерулосклероз. ХС диета у таких животных приводила к увеличению отложений коллагена, тогда как Мев отменял ХС-индуцированное усиление фиброгенеза (рис. 2).

Продукция NO. О функциональном состоянии системы Мф судили по спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции NO в перитонеальных Мф на 38 сут эксперимента. В контрольной (бесклеточной) инкубационной среде уровень нитритов был недетектируемым, а уровень спонтанной генерации NO в Мф во всех группах животных примерно одинаков (рис. 3). ЛПС-стимуляция Мф приводила к росту продукции NO в группах интактных мышей и животных с рабдомиолизом соответственно в 7,6 и 17,8 раза. У контрольных животных, находившихся на ХС диете, ЛПС-стимулированная продукция NO была в 1,6 раза ниже, чем в интактной группе. Мев, наоборот, повышал эту продукцию в 1,8 раза. Наиболее разительное снижение реактивности Мф ХС диета вызывала у мышей с рабдомиолизом – ЛПС практически не влиял на генерацию NO, т.е. под действием ХС формировалось состояние толерантности/ареактивности Мф. В то же время Мев усиливал ЛПС-стимулированную генерацию NO, найденную при рабдомиолизном поражении, в 1,8 раза. Введение Мев мышам с длительным рабдомиолизным поражением почек на фоне ХС диеты частично отменяло толерогенный эффект ХС.

Обсуждение

Итак, введение животным ХС при длительной рабдомиолизиндуцированной нефропатии вызывает гипореактивность Мф и усиливает фиброз, слабо влияя на альтеративно-инфильтративный компонент процесса. Мев, напротив, повышает реактивность Мф, усиливает альтеративную составляющую процесса и несколько ослабляет фиброгенный эффект ХС. Можно утверждать, что ХС индуцирует М2-, а Мев – М1-фенотип Мф.

Ранее нами было показано, что ХС диета снижает провоспалительный ответ Мф, стимулирует экспрессию TGF- β 1 и усиливает фиброгенез при разных вариантах воспаления в печени, а Мев частично отменяет фиброгенное действие ХС [2].

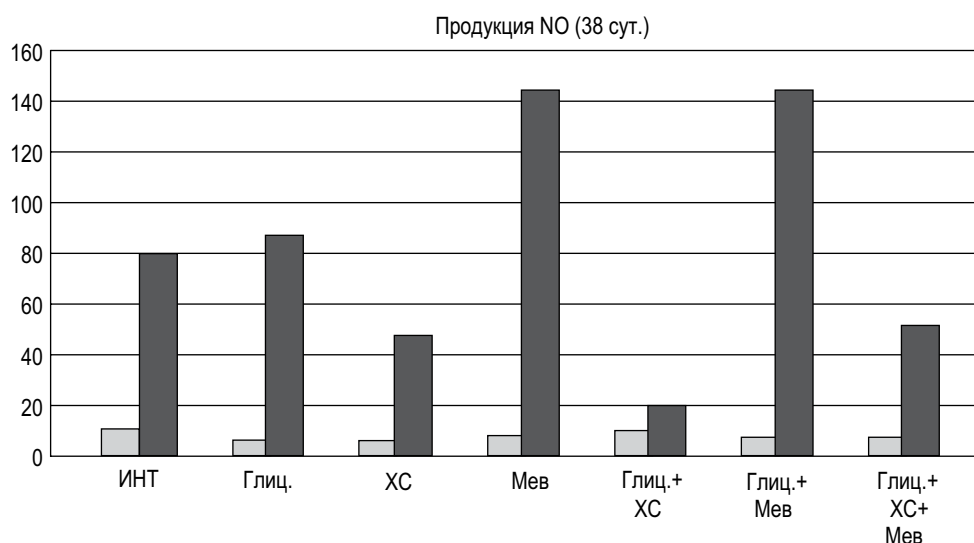


Рисунок 3. Влияние ХС диеты и введения мевалоновой кислоты на ЛПС-индуцированную продукцию NO перитонеальными макрофагами мышей C57Bl/6 при нефропатии, вызванной 3-кратным глицерин-индуцированным рабдомиолизом на 38 сут. эксперимента (24 сут. после последней инъекции глицерина)

Примечание. Показаны репрезентативные данные одного из трех независимых экспериментов. Данные получены в реакции Грисса, как описано в разделе «Материалы и методы», и представлены в виде концентрации нитрита в инкубационной среде (мкМ). Светлые столбцы – продукция оксида азота при инкубации Мф без ЛПС, черные – в присутствии ЛПС.

Аналогичные данные были нами получены ранее *in vitro* в культуре перитонеальных Мф при инкубации клеток с ХС и с Мев: ХС стимулировал продукцию TGF- β 1, а Мев отменял ХС-индуцированную *up*-регуляцию TGF- β 1 [3]. В работах с использованием статинов на моноцитах человека также демонстрировалась роль ингибирования ОМГР/мевалонатного пути в *up*-регуляции TGF- β 1 [29]. Учитывая эти данные, а также современные представления о ключевой роли TGF- β 1 в развитии нефросклероза [4], можно предполагать, что ХС-зависимое усиление фиброгенеза при воспалении в почечной ткани связано с индукцией экспрессии белка TGF- β 1 мононуклеарными фагоцитами инфильтрата. Это предположение согласуется с описанной в литературе ХС-индуцированной стимуляцией экспрессии мРНК TGF- β 1 и ростом выраженности интерстициального фиброза в почке в моделях односторонней нефрэктомии [8, 9], и пуромидин-индуцированного нефроза у крыс [6]. Это предположение также согласуется со способностью TGF- β ингибировать индуцибельную NO-синтазу и блокировать продукцию NO в Мф [14, 23, 35]. Очевидно, показанное в настоящей работе ингибирование продукции NO в Мф животных, получавших ХС, объясняется продукцией этими клетками TGF- β 1. Это тем более вероятно, что сниженная генерация NO свидетельствует о приобретении

клетками М2-фенотипа [25], для которого характерна повышенная продукция TGF- β 1 [34].

Действие Мев, отменяющее ХС-индуцированную макрофагальную толерантность/блокаду продукции NO, на наш взгляд, обусловлено отменой эффектов ХС-индуцированного ингибирования ОМГР. Иными словами, ХС блокирует активность ОМГР/мевалонатного биохимического пути, а Мев восстанавливает эту активность. Поскольку Мев усиливает синтез ХС в почках [41], логично полагать, что отмена вызванной ХС М2-поляризации обусловлена промежуточными продуктами мевалонатного пути. По-видимому, такими промежуточными продуктами являются нестероидные изопреноиды, в том числе пренилирующие агенты геранилгеранил и фарнезол. Рядом работ в системе *in vitro* в культивируемых Мф установлена способность ингибиторов ОМГР, статинов, подавлять экспрессию индуцибельной NO-синтазы и генерацию NO и выявлена способность Мев, геранилгеранил-пирофосфата и фарнезол-пирофосфата отменять этот эффект [15, 16, 28]. Очевидно, ХС уменьшает, а Мев повышает внутриклеточный пул этих соединений в Мф.

Таким образом, в данной работе впервые в условиях *in vivo* при хроническом поражении почек продемонстрирована существенная роль мевалонатного биохимического пути в формировании фенотипа Мф и детерминации течения и исхода нефропатического/нефросклеротического

процесса. Показаны ХС-индуцированное смещение фенотипа Мф в сторону гипореактивности/М2-поляризации и усиление фиброгенного ответа, а с другой стороны, мевалонат-зависимое переключение функционального состояния Мф в сторону гиперреактивности/М1-фенотипа, нефропротективное и фиброзлимитирующее действие мевалоната. Не исключено, что в будущем модуляция активности мевалонатного пути и изменение пула его промежуточных метаболитов послужат новым подходом к поиску путей фармакологического вмешательства и лечения прогрессивных нефросклеротических процессов.

Список литературы

1. Маянский Д.Н., Шварц Я.Ш., Цырендоржиев Д.Д., Кутина С.Н. Функциональные перестройки системы моноклеарных фагоцитов при экспериментальном циррозе печени // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1988. — Т. 105. — № 2 — С. 214-216
2. Шварц Я.Ш., Душкин М.И., Комарова Н.И., Воронцова Е.В., Кузнецова И.С. Холестерининдуцированная стимуляция поствоспалительного гепатофиброза // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2008. — Т. 145. — № 6. — С. 638-641.
3. Шварц Я.Ш., Хощенко О.М., Душкин М.И., Феофанова Н.А. Действие холестерина и агонистов ядерных гормональных рецепторов на продукцию трансформирующего фактора роста-бета (ТФР-β) в макрофагах // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2009. — Т. 147.
4. Böttinger E.P., Bitzer M. TGF-β Signaling in Renal Disease // J. Am. Soc. Nephrol. — 2002. — Vol. 13. — P. 2600-2610.
5. Diamond J.R. Macrophages and progressive renal disease in experimental hydronephrosis // Am. J. Kidney Dis. — 1995. — Vol. 26. — P. 133-140.
6. Ding G., van Goor H., Frye J., Diamond J.R. Transforming growth factor-beta expression in macrophages during hypercholesterolemic states // Am. J. Physiol. — 1994. — Vol. 267. — P. 937-943.
7. Duffield J.S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde // Clin. Sci. — 2003. — Vol. 104. — P. 27-38.
8. Eddy A.A. Interstitial inflammation and fibrosis in rats with diet-induced hypercholesterolemia // Kidney Int. — 1996. — Vol. 50. — P. 1139-1149.
9. Eddy A.A. Interstitial fibrosis in hypercholesterolemic rats: role of oxidation, matrix synthesis, and proteolytic cascades // Kidney Int. — 1998. — Vol. 53. — P. 1182-1189.
10. Feingold K.R., Pollock A.S., Moser A.H., Shigenaga J.K., Grunfeld C. Discordant regulation of proteins of cholesterol metabolism during the acute phase response // J. Lipid Res. — 1995. — Vol. 36. — P. 1474-1482.
11. Ferenbach D., Kluth D.C., Hughes J. Inflammatory cells in renal injury and repair // Semin. Nephrol. — 2007. — Vol. 27. — P. 250-259.
12. Goerdts S., Orfanos C.E. Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells // Immunity. — 1999. — Vol. 10. — P. 137-142.
13. Griess Reagent System Technical Bulletin TB229, Promega, 06/2005. — P. 1-7.
14. Hausmann E.H., Hao S.Y., Pace J.L., Parmely M.J. Transforming growth factor beta 1 and gamma interferon provide opposing signals to lipopolysaccharide-activated mouse macrophages // Infect. Immun. — 1994. — Vol. 62. — P. 3625-3632.
15. Huang K.C., Chen C.W., Chen J.C., Lin W.W. Statins induce suppressor of cytokine signaling-3 in macrophages // FEBS Lett. — 2003. — Vol. 555. — P. 385-389.
16. Huang K.C., Chen C.W., Chen J.C., Lin W.W. HMG-CoA reductase inhibitors inhibit inducible nitric oxide synthase gene expression in macrophages // J. Biomed. Sci. — 2003. — Vol. 10. — P. 396-405.
17. Hwa J.J., Zollman S., Warden C.H., Taylor B.A., Edwards P.A., Fogelman A.M., Lusis A.J. Genetic and dietary interactions in the regulation of HMG-CoA reductase gene expression // J. Lipid Res. — 1992. — Vol. 33. — P. 711-725.
18. Ikezumi Y., Hurst L., Atkins R.C., Nikolic-Paterson D.J. Macrophage-mediated renal injury is dependent on signaling via the JNK pathway // J. Am. Soc. Nephrol. — 2004. — Vol. 15. — P. 1775-1784.
19. Jenke H-S., Lowel M., Berndt J. In Vivo Effect of Cholesterol Feeding on the Short Term Regulation of Hepatic Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A Reductase during the Diurnal Cycle // J. Biol. Chem. — 1981. — Vol. 258. — P. 9622-9626.
20. Lieberthal W. and Nigam S.K. Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable // Am. J. Physiol. Renal Physiol. — 2000. — N 278. — P. F1-F120.

21. Lopez-de Leon, Rojkind M. A simple micromethod for collagen and total protein determination in formalin-fixed paraffin-embedded sections // *J. Histochem. Cytochem.* — 1985. — Vol. 33. — P. 737-743.
22. Lupher Jr M.L., Gallatin W.M. Regulation of fibrosis by the immune system // *Adv. Immunol.* — 2006. — Vol. 89. — P. 245-288.
23. Matsuno R., Aramaki Y., Tsuchiya S. Involvement of TGF-beta in inhibitory effects of negatively charged liposomes on nitric oxide production by macrophages stimulated with LPS // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2001. — Vol. 281. — P. 614-616.
24. Mayanski D.N., Schwartz Y.Sh., Kutina S.N., Zubakhin A.A., Mayanskaya N.N., Tsyrendorjiev D.D. Mononuclear phagocyte system responsiveness in CCl4-induced liver cirrhosis // *Int. J. Exp. Path.* — 1993. — Vol. 74. — P. 229-236.
25. Mills C.D., Kincaid K., Alt J.M., Heilman M.J., Annette M. H. M1/M2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm // *J. Immunol.* — 2000. — Vol. 164. — P. 6166-6173.
26. Nath K.A., Balla G., Vercellotti G.N., Balla J., Jacob H.S., Levitt M.D., Rosenberg M.E. Induction of heme oxygenase is a rapid and protective response in rhabdomyolysis in the rat // *J. Clin. Invest.* — 1992. — Vol. 90. — P. 267-270.
27. Nishida M., Hamaoka K. Macrophage Phenotype and Renal Fibrosis in Obstructive Nephropathy // *Nephron Exp. Nephrol.* — 2008. — Vol. 110. — P. 31-36.
28. Pahan K., Sheikh F.G., Namboodiri A.M., Singh I. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages // *J. Clin. Invest.* — 1997. — Vol. 100. — P. 2671-2679.
29. Porreca E., Di Febbo C., Baccante G., Di Nisio M., Cuccurullo F. Increased transforming growth factor-beta(1) circulating levels and production in human monocytes after 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase inhibition with pravastatin // *J. Am. Coll. Cardiol.* — 2002. — Vol. 39. — P. 1752-1757.
30. Rosenberger C., Goldfarb M., Shina A., Bachmann S., Frei U., Eckardt K. U., Schrader T., Rosen S., Heyman S.N. Evidence for sustained renal hypoxia and transient hypoxia adaptation in experimental rhabdomyolysis-induced acute kidney injury // *Nephrol. Dial. Transplant.* — 2008. — Vol. 23. — P. 1135-1143.
31. Salimuddin, Nagasaki A., Gotoh T., Isobe H., Mori M. Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide // *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab.)* — 1999. — Vol. 277. — P. 110-117.
32. Sato K., Miyakawa K., Takeya M., Hattori R., Yui Y., Sunamoto M., Ichimori Y., Ushio Y., Takahashi K. Immunohistochemical expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in reversible endotoxic shock studied by a novel monoclonal antibody against rat iNOS // *J. Leukoc. Biol.* — 1995. — Vol. 57. — P. 36-44.
33. Saucier S.E., Kandutsch A.A., Gayen A.K., Swahn D.K., Spencer T.A. Oxysterol regulators of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in liver. Effect of dietary cholesterol // *J. Biol. Chem.* — 1989. — Vol. 264. — P. 6863-6869.
34. Song E., Ouyang N., Hörbelt M., Antus B., Wang M., Exton M.S. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts // *Cell Immunol.* — 2000. — Vol. 204. — P. 19-28.
35. Takaki H., Minoda Y., Koga K., Takaesu G., Yoshimura A., Kobayashi T. TGF-β1 suppresses IFNγ-induced NO production in macrophages by suppressing STAT1 activation and accelerating iNOS protein degradation // *Genes Cells.* — 2006. — Vol. 11. — P. 871-882.
36. Ustundag S., Yalcin O., Sen S., Cukur Z., Ciftci S., Demirkan B. Experimental myoglobinuric acute renal failure: the effect of vitamin C // *Ren. Fail.* — 2008. — Vol. 30. — P. 727-735.
37. Waddington S.N., Tam F.W.K., Cook H.T., Cattell V. Arginase activity is modulated by IL-4 and HOArg in nephritic glomeruli and mesangial cells // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* — 1998. — Vol. 274. — P. 473-480.
38. Wang Y., Wang Y.P., Zheng G., Lee V.W., Ouyang L., Chang D.H., Mahajan D., Coombs J., Wang Y.M., Alexander S.I., Harris D.C. *Ex vivo* programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease // *Kidney Int.* — 2007. — Vol. 72. — P. 290-299.
39. Yamate J. Heterogeneity of Macrophage populations and myofibroblasts appearing in rat renal interstitial fibrosis // *J. Toxicol. Pathol.* — 2007. — Vol. 20. — P. 185-195.

40. Yu Zh., Xia X., Kone B.C. Expression profile of a human inducible nitric oxide synthase promoter reporter in transgenic mice during endotoxemia // Am. J. Physiol. Renal Physiol. — 2005. — Vol. 288. — P. 214-220.

41. Zager R.A., Shah V.O., Shah H.V., Zager P.G. Johnson A.C.M., Hanson S. The mevalonate pathway during acute tubular injury. selected determinants and

consequences // Am. J. Pathol. — 2002. — Vol. 161. — P. 681-692.

42. Zager R. Rhabdomyolysis and myoglobinuric renal failure // Kidney Int. — 1996. — Vol. 49. — P. 314-326.

поступила в редакцию 14.04.2009

принята к печати 27.04.2009