

# ЦИТОКИНЫ И ВОСПАЛЕНИЕ

Cytokines & Inflammation

Том 7, № 2, 2008

- **Индукция антител к IFN $\gamma$  и IL-4 пептидами**
- **Варианты развития острого системного воспаления**
- **Энтеральные вакцины для индукции иммунологической толерантности**
- **EGF при псориазе и атопическом дерматите**
- **Влияние хирургического стресса на гемопоэтические стволовые клетки**
- **Ревматоидный увеит: системная и местная продукция цитокинов**
- **БЕТАЛЕЙКИН в лечении туберкулеза**
- **Болезни почек у детей в промышленных районах**



## ОБЗОРЫ • REVIEWS

- **Энтеральные вакцины, индуцирующие развитие толерантности к вводимому антигену** ----- 3  
*Верещагин Е.И., Хощенко О.М., Душкин М.И.*  
**Enteral vaccines tolerogenic to exogenous antigens**  
*Vereschagin E.I., Khoshchenko O.M., Dushkin M.I.*
- **Варианты развития острого системного воспаления** ----- 9  
*Гусев Е.Ю., Юрченко Л.Н., Черешнев В.А., Зотова Н.В., Журавлева Ю.А., Зубова Т.Э., Руднов В.А., Кузьмин В.В., Макарова Н.П., Лейдерман И.Н., Левит Д.А., Суханов В.А., Сипачев А.С., Бражников А.Ю., Решетникова С.Ю., Засорин А.А., Дрозд А.В.*  
**The variants of acute systemic inflammation evolution**  
*Gusev E.Y., Yurchenko L.N., Chereshevnev V.A., Zotova N.V., Zhuravleva J.A., Zubova T.E., Rudnov V.A., Kuzmin V.V., Makarova N.P., Leiderman I.N., Levit D.A., Sukhanov V.A., Sipachev A.S., Bragnikov A.Y., Reshetnikova S.Y., Zasorin A.A., Drozd A.V.*

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ • ORIGINAL ARTICLES

- **Оценка про- и противовоспалительных факторов иммунитета у женщин с онкологической патологией и с дисплазией генитальной сферы** ----- 18  
*Аутеншилюс А.И., Лыков А.П., Шкунов А.Н., Вараксин Н.А., Пустошилова Н.М., Морозов В.Д., Прохोजев В.Б., Михайлова Е.С., Кретинин Г.А., Туманов Ю.В., Красильников С.Э.*  
**Evaluation of the inflammatory and antiinflammatory factors of immunity in women with genital cancer and epithelial dysplasia**  
*Autenshilius A.I., Lykov A.P., Shkunov A.N., Varaksin N.A., Pustoshilova N.M., Morozov V.D., Prokhozhev V.B., Mikhailova E.S., Kretinin G.A., Tumanov Yu.V., Krasilnikov S.E.*
- **Индукция антител к IFN $\gamma$  и IL-4 у мышей иммунизацией пептидами, воспроизводящими иммунодоминантные В-эпитопы** ----- 23  
*Шевелев С.В., Митин А.Н., Андреев С.М., Ярилин А.А.*  
**Induction of antibodies to IFN $\gamma$  and IL-4 in mice by immunization with immunodominant B-epitopes rendering peptides**  
*Shevelev S.V., A.N. Mitin, S.M. Andreev, A.A. Yarilin*
- **Исследование противовоспалительных свойств глипролинов на экспериментальной модели острого перитонита у крыс** ----- 28  
*Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Гончарова Е.Л., Багликова К.Е.*  
**A study of anti-inflammatory properties of glyprolines using experimental model of the acute peritonitis in rats**  
*Bakaeva Z.V., Samonina G.E., Umarova B.A., Kopylova G.N., Goncharova E.L., Baglikova K.E.*
- **Исследование уровней sCD4, sICAM-1 и цитокинов IL-2, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  у детей с заболеваниями почек в условиях воздействия экопатогенов** ----- 33  
*Кудин М.В., Скрипкин А.В., Леонов В.П.*  
**Investigation of levels of sCD4 and sICAM-1 and cytokines IL-2, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$  in children with kidney diseases under the exposure of ecopathogens**  
*Kudin M.V., Skripkin A.V., Leonov V.P.*
- **Лечебный эффект системной антицитокиновой терапии ингибитором ядерной гистондеацетилазы SAHA на модели ишемической реперфузионной острой почечной недостаточности у мышей** ----- 38  
*Соловьев А.Г., Melnikov V., Reznikov L.L., Назаров П.Г., Dinarello C.A.*  
**The therapeutic effect of systemic anti-cytokine therapy with histone deacetylase SAHA in the ischemia – reperfusion model of acute renal failure in mice**  
*Soloviev A.G., Melnikov V., Reznikov L.L., Nazarov P.G., Dinarello C.A.*
- **Влияние хирургического стресса на уровень циркулирующих CD34<sup>+</sup>-гемопоэтических стволовых клеток: анализ возможных факторов мобилизации** ----- 45  
*Алиев М.А., Беляев Н.Н., Рысулы М.Р., Ахметов Е.А., Сейдалин А.О., Супниязова Т.А., Перфильева Ю.В., Тлеулиева Р.Т., Жумабаева Б.А., Кодасбаев А.Т., Батталова К.С., Сатыбалдиева Ж.А.*  
**The influence of surgical stress on the level of circulating CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells: analysis of possible mobilization factors**  
*Aliiev M.A., Belyaev N.N., Rysuly M.R., Akhmetov E.A., Seidalin A.O., Supniyazova T.A., Perfilieva Yu.V., Tleulieva R.T., Zhumabaeva B.A., Kodasbaev A.T., Battalova K.S., Satybaldieva Zh.A.*

• <b>Содержание эпидермального фактора роста у больных псориазом и атопическим дерматитом</b> -----	<b>49</b>
<i>Кашутин С.Л., Дегтяр Ю.С.</i>	
<b>The levels of epidermal growth factor in patients with psoriatic disease and atopic dermatitis</b>	
<i>Kashutin S.L., Degtyar U.S.</i>	
• <b>Особенности системной и местной продукции цитокинов при ревматоидном увеите</b> -----	<b>52</b>
<i>Зайнутдинова Г.Х., Мальханов В.Б., Шевчук Н.Е.</i>	
<b>Characteristics of systemic and local cytokine production in rheumatoid uveitis</b>	
<i>Zainutdinova G.Kh., Malkhanov V.B., Shevchuk N.Ye.</i>	
<b>НОВОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ • LABORATORY DIAGNOSTICS HIGHLIGHTS</b>	
• <b>ЗАО «БиоХимМак»</b> -----	<b>56</b>
• <b>ООО «Цитокин»</b> -----	<b>57</b>
<b>КОНФЕРЕНЦИИ • CONFERENCES</b> -----	<b>17, 59</b>
<b>НОВЫЕ КНИГИ • BOOKS REVIEWS</b> -----	<b>58</b>

#### Редакционная коллегия:

##### ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

П.Г. Назаров (Санкт-Петербург)

##### ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

С.А. Кетлинский (Санкт-Петербург)

В.А. Козлов (Новосибирск)

Ф.И. Ершов (Москва)

Н.М. Калинина (Санкт-Петербург)

А.В. Караулов (Москва)

О.И. Киселев (Санкт-Петербург)

А.Н. Маянский (Нижний Новгород)

В.А. Нагорнев (Санкт-Петербург)

Е.Л. Насонов (Москва)

Р.В. Петров (Москва)

А.В. Полевщиков (Санкт-Петербург)

Н.С. Сапронов (Санкт-Петербург)

С.В. Сенников (Новосибирск)

А.С. Симбирцев (Санкт-Петербург)

И.С. Фрейдлин (Санкт-Петербург)

Р.М. Хаитов (Москва)

В.А. Черешнев (Екатеринбург)

В.С. Ширинский (Новосибирск)

В.И. Шишкин (Санкт-Петербург)

А.А. Ярилин (Москва)

##### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

Н.М. Бережная (Киев), Л.Н. Бубнова (С.-Петербург), Т.П. Ветлугина (Томск), И.А. Горланов (С.-Петербург), И.И. Долгушин (Челябинск), А.М. Ищенко (С.-Петербург), В.Б. Климович (С.-Петербург), В.К. Козлов (С.-Петербург), В.И. Коненков (Новосибирск), Е.А. Корнева (С.-Петербург), В.И. Мазуров (С.-Петербург), Е.В. Маркелова (Владивосток), С.В. Машко (Москва), Н.В. Медуницын (Москва), С.А. Недоспасов (Москва), Г.И. Нежинская (С.-Петербург), В.Г. Нестеренко (Москва), И.В. Нестерова (Москва), Е.Ф. Панарин (С.-Петербург), Б.В. Пинегин (Москва), М.П. Потаннев (Минск), В.И. Пуринь (С.-Петербург), Т.Н. Саватеева (С.-Петербург), В.И. Селедцов (Новосибирск), Р.И. Сепиашвили (Москва), Н.Б. Серебряная (С.-Петербург), Т.П. Сесь (С.-Петербург), Л.П. Сизякина (Ростов-на-Дону), Ю.Г. Суховой (Тюмень), А.А. Тотолян (С.-Петербург), В.Х. Хавинсон (С.-Петербург), Е.Р. Черных (Новосибирск).

##### Зав. редакцией

О.Я. Михайлова

##### Перевод

О.В. Трусова

##### Оформление, компьютерная верстка

И.Р. Поздняков

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

Издание Северо-Западного отделения РАМН и Российского цитокинового общества. Журнал зарегистрирован в Министерстве Российской Федерации по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций. ПИ № 77-11439 от 21 декабря 2001 г. Рассылка целевая.

Журнал включен ВАК Минобразования РФ в «Перечень периодических научных изданий, рекомендуемых для публикации научных работ, отражающих основное научное содержание кандидатских диссертаций» (редакция — апрель 2008 г.)

Журнал включен в Реферативный журнал и Базы данных ВИНИТИ. Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной справочной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals Directory».

##### Подписка осуществляется:

– через Агентство «Вся Пресса»; тел. (495) 234-03-08;

– ООО «Интер-почта»; тел. (495) 500-00-60, <http://www.interpochta.ru>;

– Интернет-магазин: <http://www.setbook.ru>. Тел.: (495) 160-58-56, 160-58-47/48. E-mail: [pelena@setbook.ru](mailto:pelena@setbook.ru).

**Адрес редакции:** 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12, тел. (812) 234-16-69, факс: (812) 543-52-14.

E-mail: [cytokines\\_inflammation@yahoo.com](mailto:cytokines_inflammation@yahoo.com), [cytokines@yandex.ru](mailto:cytokines@yandex.ru), [pnazarov@PN4093.spb.edu](mailto:pnazarov@PN4093.spb.edu)

Подписано в печать 10.06.08. Формат бумаги 60 x 90 1/8. Печать офсетная. Отпечатано в типографии «L-PRINT».

Тираж установочный.

## Лечебный эффект системной антицитокиновой терапии ингибитором ядерной гистондеацетилазы SAHA на модели ишемической–реперфузионной острой почечной недостаточности у мышей

А.Г. Соловьев<sup>1</sup>, V. Melnikov<sup>2</sup>, L.L. Reznikov<sup>3</sup>, П.Г. Назаров<sup>4</sup>, С.А. Dinarello<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Учреждение ГУЗ Городская Больница № 12 — Центр Гемокоррекции, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> North-Eastern Ohio University college of Medicine, Kent, USA;

<sup>3</sup> University of Colorado, School of Medicine, Denver, Colorado, USA;

<sup>4</sup> Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург, Россия

На ишемически-реперфузионной модели острой почечной недостаточности (ОПН) у мышей разработана схема предупреждения ОПН с помощью введения препарата SAHA (ингибитора гистондеацетилазы субероиланилидгидроксамовой кислоты), надежно обеспечивающая хороший ренопротективный эффект. Эффект SAHA, вероятнее всего, обусловлен подавлением продукции провоспалительных цитокинов (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 и др.). Перспективным для разработки терапевтических антицитокиновых фармакологических схем кажется сочетание SAHA с ингибиторами ангиотензин-конвертирующего фермента (например, каптоприлом), блокаторами iNO-синтазы (пентоксифиллином, L-NAME) и др. Результаты исследования могут быть полезны при разработке стратегий лечения больных в сердечно-сосудистой хирургии, медицине катастроф (геморрагические, токсические шоки с гипотензией), неотложной токсикологии и инфекционно-токсических шоках, практике лечения синдрома полиорганной недостаточности в отделениях ОАРИТ. (Цитокины и воспаление. 2008. Т. 7, № 2. С. 38–44.)

**Ключевые слова:** острая почечная недостаточность, цитокины, лечение, субероиланилидгидроксамовая кислота.

Острая почечная недостаточность (ОПН) была и остается одним из грозных осложнений в практике врачей различных специальностей и в значительной степени влияет на общий исход основного патологического процесса и смертность. Особую значимость это осложнение приобретает в практике врачей отделений интенсивной терапии. По данным медицинского страхования США (Medicare), на ОПН приходится 23,8 случаев на каждую 1000 всех поступлений в клиники США [30], смертность в течение 90 дней после выписки из стационара при этом остается высокой — 34,5% при изолированной ОПН и 48,6% при вторичной ОПН — как результат основного заболевания [18, 30]. Также установлено, что при ОПН, возникшей вследствие сепсиса, смертность значительно выше (74,5% [21]), чем при ОПН, возникшей как осложнение других состояний (45,2% [21]). ОПН при критических состояниях

возникает как компонент синдрома полиорганной недостаточности, но на данный момент также имеются доказательства того, что тяжесть подобных состояний не может быть объяснена исключительно исходными патологическими факторами. Т. е. ОПН — это состояние, которое, возникнув, может самостоятельно приводить к дальнейшим почечным осложнениям, значительно снижающим выживаемость, и должно рассматриваться не как курабельное осложнение основного заболевания [16], а как самостоятельный синдром. Важную роль играет также предотвращение ОПН при сердечно-сосудистых операциях [10], трансплантациях почек, тяжелых эндотоксикозах.

В мировой медицинской литературе широко освещаются различные факторы, воздействие которых приводит к острому и хроническому повреждению почечной паренхимы (гломерулосклерозу, тубулоинтерстициальным повреждениям, аккумулярованию экстрацеллюлярного матрикса и др.) [6, 14, 28].

Соловьев Андрей Георгиевич, e-mail: dlvsi@gmail.com

Публикации последних лет ясно показывают, что развитие прогрессирующих почечных заболеваний более связано с патологическими событиями в тубулоинтерстициальном компартменте независимо от того, какой индуцирующий фактор имел место, а развитие этих процессов не может быть объяснено исключительно ишемическими, склеротическими или токсическими влияниями. Возрастает уверенность в том, что прогрессирование почечных заболеваний в значительной степени связано с клеточными и/или воспалительными механизмами и, следовательно, более глубокое понимание этих механизмов может указать пути для повышения эффективности терапевтических вмешательств и, возможно, будет способствовать разработке новых подходов к лечению патологии почек.

По данным R. Schrier, W. Wang [24], главными повреждающими событиями в почечной паренхиме при сепсисе являются следующие.

1. Гипотензия → активация симпатической нервной системы и нейро-эндокринного ответа ЦНС (аргинин-вазопрессин или АДГ) → выброс катехоламинов и активация ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, эндотелин 1 [1] → вазоконстрикция сосудов почек → ишемия.

2. Активация iNOS-синтазы, повышение синтеза эндотелиальной и внутриклеточной NO → системная артериальная вазодилатация и снижение артериального давления → снижение фильтрационного давления в почках и ишемия → активация NFκB и связанного с ним провоспалительного цитокинового каскада.

3. LPS индуцирует синтез TNFα и радикалов кислорода, которые, кроме того, что обладают собственным повреждающим действием, способны еще реагировать с NO с образованием токсичного пероксинитрида → повреждение канальцев, снижение уровня фильтрации в клубочках.

4. Цитокины, хемокины, адгезионные молекулы: при ангиоспазме в ранней стадии активируются каспазы → индукция синтеза IL-1β, IL-18 → увеличение выработки адгезионных молекул, нейтрофильная инфильтрация и дальнейшая экспрессия цито- и хемокинов в рамках запущенного воспалительного процесса.

5. LPS и C-реактивный белок активируют систему комплемента и повышение содержания компонента комплемента C5a, обладающего прокоагулянтными свойствами, что приводит к микротромбозам и дальнейшему ишемическому повреждению.

6. Гиперкатехоламинемия → гипергликемия → нарушение функций лейкоцитов и макрофагов → воспаление.

7. Развитие ДВС синдрома (Disseminated Intravascular Coagulation Syndrome) → тромбоз сосудов микроциркуляции → ишемия.

Данные литературы широко освещают цитокиновые провоспалительные каскады, которые

запускаются в результате названных процессов. Так, прессорный гормон ренин-ангиотензиновой системы ангиотензин 2 инициирует выработку IL-1β, TNFα, IL-8 [25], эндотоксины (LPS) также индуцируют еще и IL-12 [7] в клетках крови человека *in vitro*. LPS вызывает синтез IL-6, TNFα, эндотелина 1 [1], окиси азота (NO) эндотелиальной и активируемой NO-синтазами (e-NOS и i-NOS, соответственно) клетками почечного эпителия крыс *in vitro* [20]. Эндотелин 1 сам по себе способен активировать провоспалительную цитокиновую цепочку транскрипционного фактора NFκB, а также усиливать выработку свободных радикалов кислорода (ET-ROS) под влиянием эндотелина [11].

Многие авторы указывают на значительную повреждающую роль IL-18 [18, 22], IL-1β и NO [13] (как одного из индукторов синтеза TNFα и IL-1β [13]) при использовании ишемически-реперфузионной модели ОПН. Доказано, что LPS, TNFα и IL-1β вызывают апоптоз клеток почечных канальцев человека *in vitro* [12]. Предлагается использовать оценку содержания IL-18 в моче человека в качестве диагностического критерия острого канальцевого некроза [22].

В то же время специфическая антицитокиновая терапия, направленная на снижение воспаления по тому или иному пути, демонстрирует неплохой эффект. Так, защита почек была достигнута применением IL-10 при ишемическом и токсическом (цисплатин) повреждении почек у мышей [8], блокадой рецептора эндотелина 1 с помощью антагониста CPU0213 [4, 11] на модели острого повреждения толстой кишки (сепсис) у крыс, блокадой TNFα, IL-18, IL-1β. Ренопротективный эффект был также достигнут блокадой iNO-синтазы и ICAM-1 пентоксифиллином [29], что привело к депрессии синтеза TNFα и IL-1β у мышей. Красноречивые результаты по лечению ОПН у мышей были получены после упреждающего ишемического повреждение применения растворимого рецептора TNFα (TNFRp55) [13] или анти-IL-18 сыворотки [18]. Дефицитные по каспазе-1 [18] или лишенные нейтрофилов нормальные [19] мыши были в значительной степени устойчивы к ишемическому повреждению без всякого лечения. Заслуживают также внимания опыты по блокированию провоспалительного действия ренин-ангиотензин-альдостероновой системы *in vivo* и *in vitro*. В частности, каптоприл блокирует TNFα-индуцированный синтез IL-1β моноцитами человека [2, 25], а сочетание препаратов лизиноприла (ингибитора ангиотензин-конвертирующего фермента (ACEi)) и L-аргинина снижало уровень эндотелина 1 и имело клинический эффект при пассивном нефрите Хейманна [31].

Поскольку большинство патологических событий в паренхиме почек при эндотоксикозе (LPS-модель), токсическом воздействии (HgCl<sub>2</sub> или цисплатин) и ишемии так или иначе связано с активацией провоспалительных цитокиновых каскадов, мы

предположили, что рациональная неспецифическая антицитокиновая терапия должна эффективно предупреждать развитие ОПН. В качестве модели повреждения почек была выбрана ишемически-реперфузионная модель ОПН у мышей, поскольку ишемия является компонентом повреждающего воздействия при сепсисе, а также может встречаться изолированно. Другими словами, ишемия — более «универсальный» повреждающий фактор. Антицитокиновым агентом был выбран препарат SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid).

**SAHA и его свойства.** Процессы регуляции экспрессии генов в ядре регулируются парой групп ферментов: гистонацетилтрансферазой (HACs) и гистондеацетилазой (HDACs) [17], которые отвечают за состояние ядерных белков гистонов, т. е. за доступность генетической информации к считыванию в РНК. Ингибирование тех или иных HDACs приводит к нарушению транскрипции небольшого количества генов и, как следствие, к остановке роста, дифференциации и/или апоптозу опухолевых клеток различной природы [17]. В 2001 г. в Мемориальном центре исследований рака Слоан-Кеттеринга в Нью-Йорке была синтезирована целая группа сложных гибридных полярных молекул с активностью как индукторов дифференциации опухолевых клеток, так и их апоптоза [5]. Все эти соединения обладали мощным свойством ингибировать HDACs. SAHA — один из новых препаратов этого класса, и сейчас идет его широкое тестирование в качестве противоопухолевого препарата [5, 23] в экспериментальных и клинических условиях.

Учитывая механизм его фармакологического действия, следует ожидать от SAHA множества разных эффектов, помимо цитостатического действия. В частности, многими отмечается его неспецифический антицитокиновый эффект *in vivo* и *in vitro*. Так, SAHA блокирует LPS-индуцированный синтез TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 и IFN $\gamma$  у мышей [15]; в зависимости от дозировки, снижает синтез NO в культуре макрофагов мышей, стимулированных сочетанным воздействием TNF $\alpha$  и IFN $\gamma$  [15]; LPS-стимулированная культура периферических мононуклеаров крови человека также отвечала значительным снижением синтеза всего каскада провоспалительных интерлейкинов TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IFN $\gamma$ , IL-18 в присутствии SAHA в дозе 100–200 нМ.

## Материалы и методы

**Определение содержания интерлейкинов** производили методом жидкостной электрохемиллюминесценции (ЭХЛ) [9]. Очищенные моноклональные мышиные антитела против измеряемого цитокина метили биотином (Igen Inc., USA). Другие мышиные антитела к тому же цитокину (R&D Systems, USA),

реагирующие с другим эпитопом, метили хелатом рутения (II) по методике производителя измерительного прибора Origen Analyzer (Igen Inc. USA). 25 мкл биотинилированного антитела (1 мг/мл в ЭХЛ-буфере [9]) инкубировали 30 мин при комнатной температуре с 25 мкл суспензии покрытых стрептавидином парамагнитных бус (1 мг/мл, Dynal, USA). Затем к смеси добавляли 25 мкл супернатанта, исследуемого на содержание цитокина, или стандартных концентраций рекомбинантного цитокина. Наконец, добавляли 25 мкл рутенилированных антител (1 мкг/мл в ЭХЛ-буфере), пробирки встряхивали в течение 2 ч или ночи при комнатной температуре. Реакцию гасили добавлением 200 мкл фосфатного буфера и измеряли на приборе Origen Analyzer (Igen Inc., USA).

**Протокол ишемии-реперфузии почек.** Данный протокол принят и одобрен комитетом по этике и гуманному отношению и использованию лабораторных животных Health Science Centre University of Colorado, USA. Самцы мышей линии C57BL/6 массой 20–25 г получали общую анестезию и наркоз внутривенным введением препарата Авертин (Avertin, 2,2,2-tribromoethanol; Sigma-Aldrich, USA). Выполняли срединный разрез, выделяли почечную сосудистую ножку и клампировали симметрично с двух сторон на 22 мин микрососудистым зажимом. Время для ишемии выбирали с целью вызвать обратимую ОПН и избежать смерти животных. Затем зажимы снимали, почки оценивали на предмет восстановления кровотока — реперфузии, брюшную стенку глухо ушивали двухслойным швом, внутривенно вводили антибиотик пенициллин в дозе согласно массе тела. Контрольной группе операцию проводили так же, но сосудистые ножки не пережимали (группа ложнопериоперированных животных). Экспериментальной группе вводили SAHA в/б и *per os* в разных дозах в пределах от 10 до 100 мг/кг. Время и путь введения подбирали предварительно. В течение 24 ч реперфузионного периода животные находились в инкубаторе при температуре 29 °C. Образцы крови получали трансторакальным пунктированием сердца через 24 ч после операции. Креатинин и азот мочевины крови (BUN) определяли на автоматическом анализаторе Astra Autoanalyzer (Beckman Instruments Inc., USA) в соответствии с инструкцией производителя.

**Гистологическое исследование.** Фиксированные 4% параформальдегидом и импрегнированные парафином, образцы почек нарезали микротомом толщиной 4 мкм, прокрашивали гематоксилином и эозином, а также по Шиффу, используя стандартные методики. Гистологические изменения, соответствующие острому канальцевому некрозу, количественно оценивали исходя из следующих критериев: подсчет процента канальцев, демонстрирующих канальцевый некроз (потеря щетинистой каемки, отслойка, расширение канальца: 0 = нет, 1 = < 10%, 2 = 11–25%, 3 = 26–45%, 4 = 46–75%, 5 = > 76%). При увеличении  $\times 200$  на каждом стекле оценивали 5–10 полей. Полученный показатель в баллах (ATN-score, или индекс острого некроза канальцев) отражает степень анатомического повреждения почечной паренхимы.

**Иммуногистохимия.** Иммуногистохимическое исследование проводили на фиксированных параформальдегидом и импрегнированных парафином срезах почек. Препараты обрабатывали в соответствии с протоколом авидин-биотинового иммунопероксидазного метода. Парафиновые срезы депарафинировали, регидратировали, активность эндогенной пероксидазы ингибировали, препараты инкубировали с 3% сывороткой крови

осла в забуференном фосфатами физиологическом растворе (ЗФР) в течение 1 ч. Затем препараты инкубировали с козьими поликлональными анти-IL-18 антителами (разведение 1:50). После инкубирования с вторичными биотинилированными антителами препараты обрабатывали авидин-биотин-пероксидазным комплексом (все реагенты от Santa Cruz Biotechnology Inc.). Связанную с антителами пероксидазу визуализировали с помощью хромогена 3,3'-диаминобензидаина. Снимки делали с помощью оптического микроскопа высокого разрешения и цифровой камеры Nikon (Nikon Instruments Inc., USA).

**Статистический анализ.** Ненормально распределенные данные анализировали непараметрическим тестом Манна — Уитни, сравнение между группами производили тестом ANOVA с поправкой Newman-Keuls. Программное обеспечение Statview™ 512+ (BrainPower, Inc. Calabasas, CA) для Apple Mac.

## Результаты и обсуждение

Модель развития ОПН у мышей после ишемии-реперфузии почек и характер описана и охарактеризована в работе [18]. На рис. 1 показана схема эксперимента по мышам (рис. 1а) и результаты измерения содержания креатинина сыворотки крови у оперированных животных (рис. 1б).

Пик нарушения функции почек приходится на первые 24–48 ч после реперфузии и является обратимым в течение 7 суток. Это помогло определиться со временем для констатации ОПН: забор материала осуществляли через 24 ч. Нами была проведена оптимизация эксперимента по времени и по пути введения препарата SAHA.

Лечебная схема в виде введения препарата SAHA в момент клампирования почечных сосудов или через 30 мин после клампирования результатов не дала. Эффект от SAHA наблюдался только при заблаговременном введении препарата за 30 мин до планируемой ишемии. Сравнение разных путей введения дало следующие результаты. Внутривенный путь не рассматривался как технически трудно осуществимый у мышей в условиях данной операции. Использовали внутрибрюшинный (*i.p.*) и пероральный пути введения (*p.o.*). SAHA вводили в дозах 10, 30, 100 мг/кг. Расчетную дозу препарата разводили в 250 мкл стерильного ЗФР.

Ренопротективный эффект SAHA зависел от дозы и пути введения. Более эффективным следует признать пероральный путь введения препарата, который обеспечил значимое снижение содержания креатинина при меньшей дозе. Эффективной дозой, статистически значимо защищающей почки от ишемии, была уже доза 10 мг/кг (*p.o.*), в то время как внутривенный путь введения

достигал цели только при дозе 100 мг/кг. Предположительно, объяснением может служить наличие реактивного перитонита у оперированных мышей

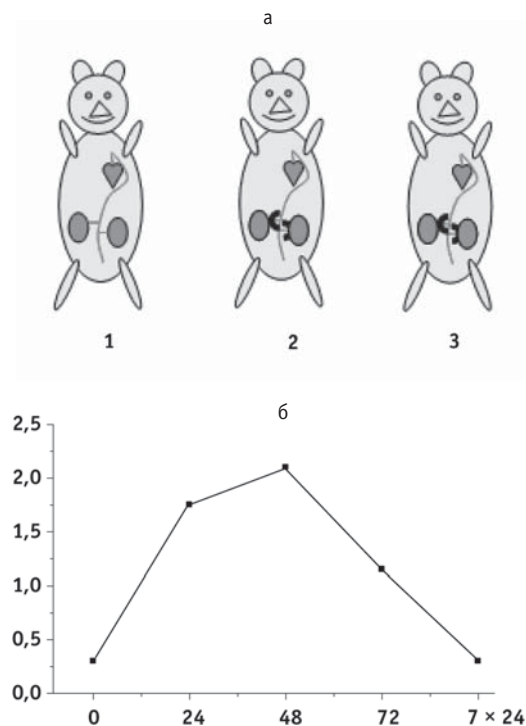


Рис. 1. Модель эксперимента по ишемии-реперфузии почек у мышей

а) Характеристика групп: 1 — ложнооперированные (контроль, ишемия нет); 2 — клампирование сосудов почек (ишемия без лечения); 3 — клампирование сосудов + SAHA в дозах от 10 до 100 мг/кг (*per os* и *i. p.*).

б) Динамика уровня креатинина крови у мышей, подвергшихся клампированию сосудов почек. По оси абсцисс — время в часах, по оси ординат — содержание креатинина плазмы крови в мг/дл.

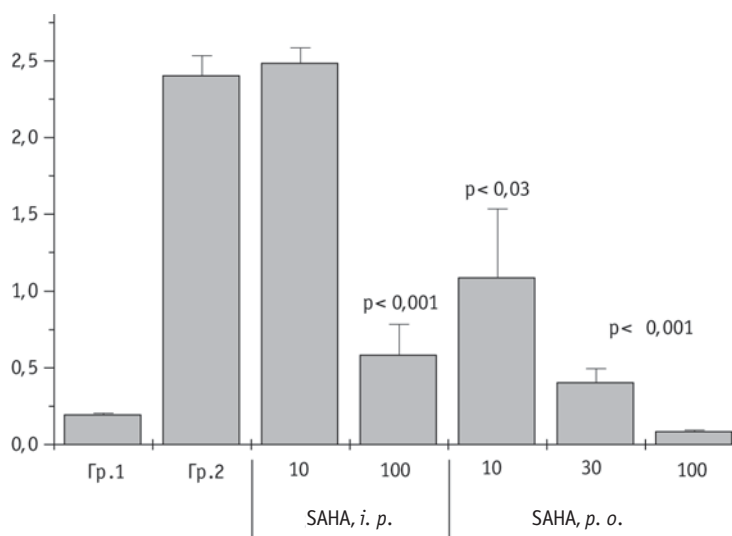


Рис. 2. Эффект SAHA на интенсивность острой почечной недостаточности у мышей, вызванной ишемией почек

По оси абсцисс — группы животных: 1, 2 — контрольные группы (см. рис. 1а), далее — животные группы 3, получившие SAHA *i. p.* в дозах 10 и 100 мг/кг, и *p. o.* в дозах 10, 30 и 100 мг/кг. По оси ординат — уровень креатинина сыворотки крови, мг/дл.

и, следовательно, нарушение проницаемости брюшины. Однако вопрос о причинах меньшей эффективности внутрибрюшинного пути введения SAHA по сравнению с пероральным требует дальнейших исследований.

Результаты гистологического исследования почек мышей с ОПН в виде индекса острого канальцевого некроза (Acute Tubular Necrosis, или ATN-score) представлены на рис. 3. Как видно из рис. 3, несмотря на то что функцию почек удалось защитить введением SAHA (индекс канальцевого некроза достоверно снижался под влиянием SAHA по сравнению с нелеченым контролем), анатомические признаки частичного некроза почечных канальцев все же оставались, поскольку индекс некроза не падал до уровня ложнопериоперированных животных.

С чем связан защитный эффект SAHA в наших экспериментах? По результатам работ V. Melnikov, T. Ecdar et al. (2001), ведущую роль в ишемическом повреждении паренхимы почек играет IL-18. Это было доказано в опытах нейтрализации IL-18 антисывороткой [18]. В нашей работе мы попытались установить присутствие

IL-18 в области поражения паренхимы почек как традиционным измерением концентрации интерлейкина в почечных экстрактах методом ЭХЛ, так и путем визуализации IL-18 в ткани почек иммуногистохимическими методами.

Как видно из рис. 4, у мышей с ишемическим поражением почек, не получавших лечения (группа 2), ткань почек содержит значительно

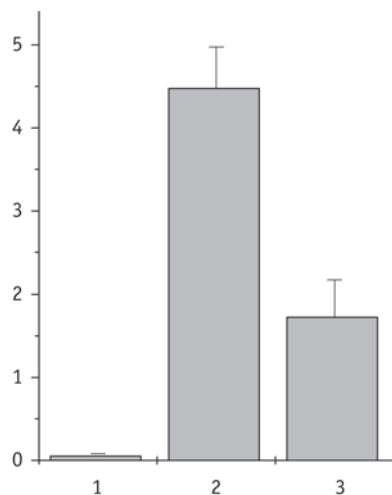


Рис. 3. Степень гистологического повреждения почек у мышей с острой почечной недостаточностью, получавших SAHA

По оси абсцисс: I — ложнопериоперированные, II — ишемия почек + физ. раствор, III — ишемия почек + SAHA. По оси ординат — гистологический индекс острого канальцевого некроза (Acute Tubular Necrosis, или ATN-score).

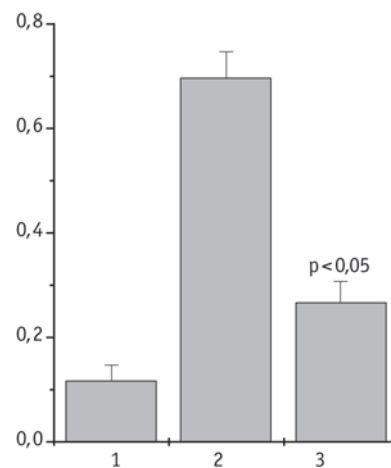


Рис. 4. Содержание IL-18 в экстрактах ткани почек у мышей с поражением почек, получавших и не получавших препарат SAHA

По оси абсцисс — группы мышей: 1 — ложнопериоперированные; 2 — мыши с поражением почек, получившие растворитель; 3 — мыши с поражением почек, получившие SAHA в дозе 100 мг/кг i.p. По оси ординат — содержание IL-18 в ткани, нг/мг.

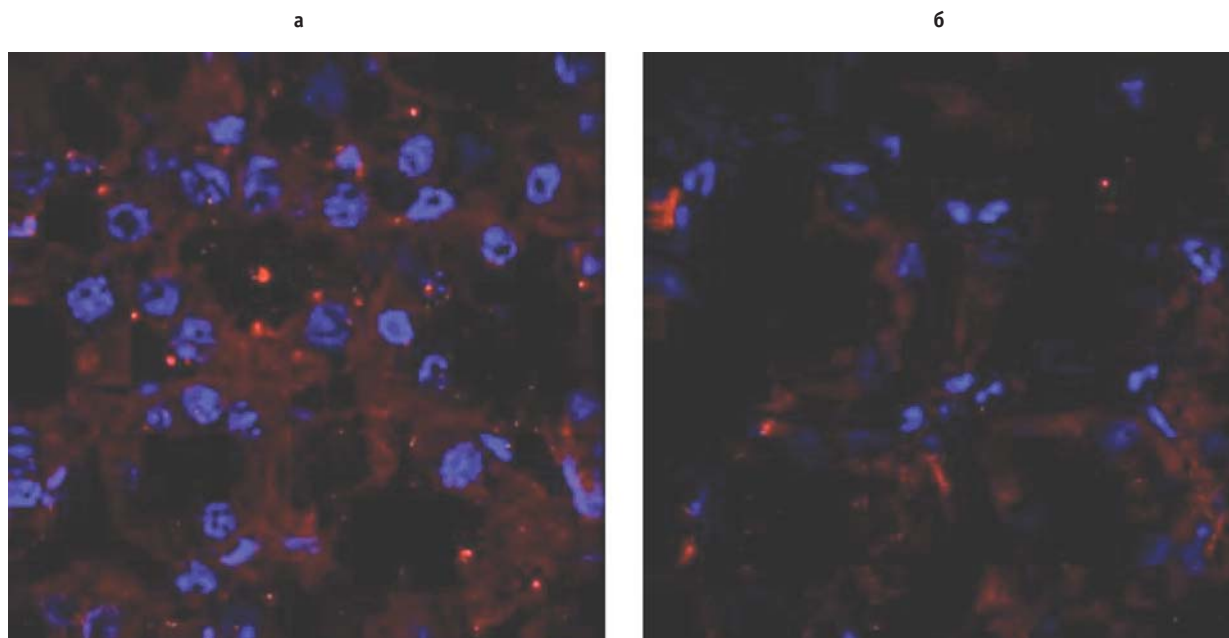


Рис. 5. Гистохимическая окраска IL-18 на гистологических срезах паренхимы почек мышей с ишемической острой почечной недостаточностью

а — ОПН без лечения (позитивный контроль). Синим светится IL-18. Заметно что IL-18 собирается в просветах канальцев.

б — ОПН + SAHA 100 мг/кг i.p. Явное снижение синего окрашивания, характерного для IL-18.

больше IL-18, чем у ложнопериорированных мышей. У мышей, предварительно получивших SAHA (группа 3), содержание IL-18 достоверно ниже, чем в предыдущей группе. Наши данные свидетельствуют о том, что SAHA статистически значимо снижает продукцию IL-18, с чем, по-видимому, и связан ренопротективный эффект препарата. Рис. 5 показывает характер гистохимической окраски IL-18 на гистологических срезах паренхимы почек у мышей с ОПН без лечения и после введения SAHA. Можно видеть, что IL-18 накапливается в эпителии и просвете канальцев. У мышей, получивших SAHA, интенсивность люминесценции IL-18 существенно ниже.

Представленные данные свидетельствуют о том, что ишемическое поражение почек *in vivo* у мышей связано с участием IL-18. Разработанная нами неспецифическая антицитокиновая терапия ОПН с помощью введения SAHA (были отработаны путь, доза и время введения по отношению к моменту нанесения ишемического повреждения — превентивность введения) надежно обеспечивает хороший ренопротективный эффект. Разумеется, это не значит, что повреждение мы связываем только с IL-18. Исходя из данных литературы, SAHA неспецифически блокирует синтез большинства провоспалительных цитокинов, в том числе TNF $\alpha$  и IL-1 $\beta$ . Вероятнее всего, показанный нами ренопротективный эффект SAHA обусловлен комплексным подавлением продукции множества цитокинов.

Дальнейшие исследования помогут уточнить, какие еще механизмы повреждения устраняет SAHA при ишемическом повреждении почек. К интересным наблюдениям может привести исследование свойств SAHA на других моделях ОПН — септической (индуцированной LPS), токсической (вызванной глицерином, цисплатином). Перспективным для разработки терапевтических антицитокиновых фармакологических схем представляется сочетание SAHA и таких препаратов как каптоприла (ингибитор ангиотензин-конвертирующего фермента) [25], блокаторов iNO-синтазы — пентоксифиллина [27], L-NAME [26], факторов транскрипции (NF $\kappa$ B), эндотелина 1 или его рецепторов [3]. Результаты нашего исследования могут быть полезны при разработке стратегий лечения больных в сердечно-сосудистой хирургии, медицине катастроф (геморрагические, токсические шоки с гипотензией), неотложной токсикологии и инфекционно-токсических шоках, практике лечения синдрома полиорганной недостаточности в отделениях ОАРИТ.

Авторы выражают благодарность участникам данного проекта. Исследование проводилось при непосредственном научном и финансовом участии профессора Dr. Charles A. Dinarello. Неоценимую практическую помощь также оказали Dr. Wei Wang, Dr. Giamila Fantuzzi, Danica Ljubanovic, Tania Azam, Joseph Sennello, Ariel Werman. Работа выполнена при поддержке исследовательского гранта ISN (международного общества нефрологов) и гранта РФФИ 06-04-49629.

## ЛИТЕРАТУРА

- Agapitov A.V., Haynes W.G. Role of endothelin in cardiovascular disease // *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. — 2002. — P. 1–15.
- Andersson P., Cederholm T., Johansson A.S., Palmblad J. Captopril-impaired production of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced interleukin-1 $\beta$  in human monocytes is associated with altered intracellular distribution of nuclear factor- $\kappa$ B // *J. Lab. Clin. Med.* — 2002. — Vol. 140. — P. 103–109.
- Benigni A., Corna D., Maffi R. et al. Renoprotective effect of contemporary blocking of angiotensin II and endothelin-1 in rats with membranous nephropathy // *Kidney Int.* — 1998. — Vol. 54. — P. 353–359.
- Benigni A., Zoja C., Zatelli C. et al. Vasopeptidase inhibitor restores the balance of vasoactive hormones in progressive nephropathy // *Kidney Int.* — 2004. — Vol. 66. — P. 1959–1965.
- Butler L.M., Webb Y., Agus D.B. et al. Inhibition of transformed cell growth and induction of cellular differentiation by pyroxamide, an inhibitor of histone deacetylase // *Clin. Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7. — P. 962–970.
- Campos F.G., Waitzberg D.L., Habr-Gama A. et al. Impact of parenteral n-3 fatty acids on experimental acute colitis // *Br. J. Nutr.* — 2002, Suppl. 1. — S83–88.
- Constantinescu C.S., Goodman D.B., Ventura E.S. Captopril and lisinopril suppress production of interleukin-12 by human peripheral blood mononuclear cells // *Immunol Lett.* — 1998. — Vol. 62. — P. 25–31.
- Deng J., Kohda Y., Chiao H. et al. Interleukin-10 inhibits ischemic and cisplatin-induced acute renal injury // *Kidney Int.* — 2001. — Vol. 60. — P. 2118–2128.
- Fantuzzi G., Reed D.A., Dinarello C.A. 1999. IL-12-induced IFN- $\gamma$  is dependent on caspase-1 processing of the IL-18 precursor // *J. Clin. Invest.* — 1999. — Vol. 104. — P. 761–767.
- Garwood S. Renal insufficiency after cardiac surgery // *Semin Cardiothorac Vasc.* — 2004, Anesth 8. — P. 227–241.
- He H.B., Dai D.Z., Dai Y. CPU0213, a novel endothelin receptor antagonist, ameliorates septic renal lesion by suppressing ET system and NF- $\kappa$ B in rats // *Acta Pharmacol Sin.* — 2006. — Vol. 27. — P. 1213–1221.
- Jo S.K., Cha D.R., Cho W.Y. et al. Inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce Fas-mediated apoptosis in renal tubular cells // *Nephron.* — 2002. — Vol. 91. — P. 406–415.
- Knotek M., Rogachev B., Wang W. et al. Endotoxemic renal failure in mice: Role of tumor necrosis factor independent of inducible nitric oxide synthase // *Kidney Int.* — 2001. — Vol. 59. — P. 2243–2249.
- Kribben A., Edelstein C.L., Schrier R.W. Pathophysiology of acute renal failure // *J. Nephrol.* — 1999. — Vol. 12, Suppl. 2. — S142–151.
- Leoni F., Zaliani A., Bertolini G. et al. The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2002. — Vol. 99. — P. 2995–3000.
- Levy E.M., Viscoli C.M., Horwitz R.I. The effect of acute renal failure on mortality. A cohort analysis // *Jama.* — 1996. — Vol. 275. — P. 1489–1494.
- Marks P.A., Rifkind R.A., Richon V.M., Breslow R. Inhibitors of histone deacetylase are potentially effective anticancer agents // *Clin Cancer Res.* — 2001. — Vol. 7. — P. 759–760.
- Melnikov V.Y., Ecker T., Fantuzzi G. et al. Impaired IL-18 processing protects caspase-1-deficient mice from ischemic acute renal failure // *J. Clin. Invest.* — 2001. — Vol. 107. — P. 1145–1152.
- Melnikov V.Y., Faubel S., Siegmund B. et al. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice // *J. Clin. Invest.* — 2002. — Vol. 110. — P. 1083–1091.
- Nakamura A., Johns E.J., Imaizumi A. et al. Role of angiotensin II-induced cAMP in mesangial TNF- $\alpha$  production // *Cytokine.* — 2002. — Vol. 19. — P. 47–51.
- Neveu H., Kleinknecht D., Brivet F. et al. Prognostic factors in acute renal failure due to sepsis. Results of a prospective multicentre study. The French Study Group on Acute Renal Failure // *Nephrol. Dial Transplant.* — 1996. — Vol. 11. — P. 293–299.
- Parikh C.R., Jani A., Melnikov V.Y. et al. Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis // *Am. J. Kidney Dis.* — 2004. — Vol. 43. — P. 405–414.
- Richon V.M., Zhou X., Rifkind R.A., Marks P.A. Histone deacetylase inhibitors: development of suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) for the treatment of cancers // *Blood Cells Mol Dis.* — 2001. — Vol. 27. — P. 260–264.

24. Schrier R.W., Wang W. Acute renal failure and sepsis // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 351. — P. 159–169.
25. Soloviev A.G., Reznikov L.L., Nazarov P.G., Dinarello C.A. Pro-inflammatory cytokine-inducing properties of human angiotensin II and mechanism of anti-cytokine properties of ACE inhibitor captopril. — *Cytokines & Inflammation.* — 2006. — Vol. 5, № 3. — P. 40–45.
26. Vieira J.M.Jr., Rodrigues L.T., Mantovani E. et al. Statin monotherapy attenuates renal injury in a salt-sensitive hypertension model of renal disease // *Nephron. Physiol.* — 2005. — Vol. 101. — P. 82–91.
27. Wang W., Zolty E., Falk S. et al. Pentoxifylline protects against endotoxin-induced acute renal failure in mice // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* — 2006. — Vol. 291. — F1090–1095.
28. Wolf G., Butzmann U., Wenzel U.O. The renin-angiotensin system and progression of renal disease: from hemodynamics to cell biology // *Nephron. Physiol.* — 2003. — Vol. 93. — P. 3–13.
29. Wu X., Richards N.T., Johns E.J. et al. Influence of ETR-p1/f1 antisense peptide on endothelin-induced constriction in rat renal arcuate arteries // *Br. J. Pharmacol.* — 1997. — Vol. 122. — P. 316–320.
30. Xue J.L., Daniels F., Star R.A. et al. Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001 // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2006. — Vol. 17. — P. 1135–1142.
31. Zoja C., Benigni A., Camozzi D. et al. Combining lisinopril and L-arginine slows disease progression and reduces endothelin-1 in passive Heymann nephritis // *Kidney Int.* — 2003. — Vol. 64. — P. 857–863.

### The therapeutic effect of systemic anti-cytokine therapy with histone deacetylase SAHA in the ischemia – reperfusion model of acute renal failure in mice

A.G. Soloviev<sup>1</sup>, V. Melnikov<sup>2</sup>, L.L. Reznikov<sup>3</sup>, P.G. Nazarov<sup>4</sup>, C.A. Dinarello<sup>3</sup>

<sup>1</sup>State Hospital No. 12 – City Centre for Haemocorrection, St. Petersburg, Russia;

<sup>2</sup>North-Eastern Ohio University College of Medicine, Kent, USA;

<sup>3</sup>University of Colorado, School of Medicine, Denver, Colorado, USA;

<sup>4</sup>Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg, Russia

**A scheme for preventing acute renal failure was developed in ischemia-reperfusion acute renal failure in mice by administration of SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid), characterized by prominent reno-protective effect. Effect of SAHA is likely to be due to proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-18 and others) production inhibition. The authors believe that combinations of SAHA with angiotensin converting enzyme inhibitors (e.g. captopril) or with iNO synthase blockers (pentoxifylline, L-NAME) may be promising in development of novel schemes of systemic anti-cytokine therapy. The results of the study may be used in development of the treatment strategies in cardiovascular surgery, emergency medicine (hemorrhagic shock, toxic shock with hypotension), urgent toxicology, in multi-organ failure syndrome treatment. (Cytokines and Inflammation. 2008. Vol. 7, № 2. P. 38–44.)**

**Key words:** acute renal failure, cytokines, treatment, suberoylanilide hydroxamic acid.



Журнал

## “ЦИТОКИНЫ И ВОСПАЛЕНИЕ”

197376, Санкт-Петербург,  
ул. Академика Павлова, 12  
Тел.: (812) 234-1669, (812) 543-5214  
e-mail: cytokines\_inflammation@yahoo.com  
cytokines@yandex.ru

На сайте журнала  
**www.cytokines.ru:**

- Резюме статей за 2002-2008 гг.
- Полный текст любой статьи за 2002-2008 гг (pdf)
- Подборки статей за разные годы на компакт-дисках (pdf)
- Книги по иммунологии
- Условия подписки и приобретения
- Правила для авторов

Журнал не только для иммунологов

