

тіє у різних концентраціях. Шкірні виділення *V. variegata*, які характеризувалися найвищою активністю ($HD50 = 0,5$ мкг/мл), були використані для подальших досліджень, де визначали вплив осмотичних протекторів, двовалентних катіонів, антиоксидантів, хелатуючого агента та інгібітора серинових протеаз на здатність досліджуваного секрету до лізису клітин. Усі досліджені катіони інгібували гемолітичну активність секрету *V. variegata* залежно від дози, тоді як інгібітор серинової протеази, фенілметилсульфонілфторид (PMSF), помітно знизив гемолітичну активність досліджуваного шкірного секрету. Можна припустити, що біоактивні пептиди секрету шкірних залоз *V. variegata* мають ферментативний механізм дії.

Ключові слова: біологічно активні молекули, амфібії, гемолітична активність, секрет шкірних залоз.

Е. Кирьяченко, студ.,
А. Осирко, студ.,
И. Удовиченко, асп.,
Т. Галенова, канд. биол. наук,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СЕКРЕТОВ КОЖНЫХ ЖЕЛЕЗ АМФИБИЙ, РАСПРОСТРАНЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ

Выделения кожных желез амфибий являются потенциальным источником разнообразных ценных биоактивных молекул. На сегодня среди компонентов кожных секретов различных видов рода *Ampibia* найдено большое количество веществ, обладающих различными терапевтическими активностями. Показано, что они обладают антибактериальными, противогрибковыми, антипротозойными, антидиабетическими, антинеопластическими, обезболивающими и снотворными свойствами. Учитывая это, получить основную информацию о свойствах компонентов кожных секретов некоторых видов земноводных, населяющих территорию Украины, является передовым заданием современной биохимии для дальнейшего исследования наиболее перспективных из них. Анализ гемолиза эритроцитов является распространенным методом проверки цитотоксичности исследуемых веществ. Лиофилизированные кожные выделения, состоящие из различных биоактивных веществ, были проверены на их токсичность. Целью этого исследования было проанализировать гемолитическую активность кожных выделений *Vombina vombina*, *Vombina variegata*, *Bufo viridis*, *Rana temporaria*, *Pelophylax ridibundus* и *Pelobates fuscus* и получить данные о возможном механизме их токсикологического действия на мембраны клеток крови. Секреты шести видов амфибий, указанных выше, инкубировали с суспензией эритроцитов в различных концентрациях. Кожные выделения *V. variegata*, которые характеризовались высокой активностью ($HD50 = 0,5$ мкг/мл), были использованы для дальнейших исследований, где определяли влияние осмотических протекторов, двухвалентных катионов, антиоксидантов, хелатирующего агента и ингибитора серинових протеаз на способность исследуемого секрета к лизису клеток. Все исследованные катионы ингибировали гемолитическую активность секрета *V. variegata* в зависимости от дозы, тогда как ингибитор сериновых протеаз, фенілметилсульфонілфторид (PMSF), заметно снизил гемолитическую активность исследуемого кожного секрета. Можно предположить, что биоактивные пептиды секрета кожных желез *V. variegata* имеют ферментативный механизм действия.

Ключевые слова: биологически активные молекулы, амфибии, гемолитическая активность, секреты кожных желез.

УДК 577.122.8

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.10-15

A. Stavniichuk, Ph.D. stud.,
O. Savchuk, Dr. Sc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
Abdul Hye Khan, Ph.D.,
Wojciech K. Jankiewicz, stud.,
John D. Imig, Ph.D.,
Department of Pharmacology & Toxicology
The Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA,
Daniel Merk, Ph.D.,
Institute of Pharmaceutical Chemistry,
Goethe-University of Frankfurt, Frankfurt am Main, Germany

THE EFFECT OF COMPOUND DM509 ON KIDNEY FIBROSIS IN THE CONDITIONS OF THE EXPERIMENTAL MODEL

Kidney fibrosis is a key event in the development of chronic kidney disease, leading to end-stage renal failure. Unfortunately, there are now few drugs capable of preventing fibrosis in the kidneys, which is accompanied by the progression of chronic kidney disease in the terminal stage of renal failure. The results show the effectiveness of the use of a new dual-acting agent DM509 in the prevention of renal fibrosis using a model of unilateral obstruction of the ureter in mice. DM509 is both a farnesoid X-receptor agonist and a soluble epoxide hydrolase inhibitor. In this study, there were 8-12 week old C57BL/6J males undergoing surgery, which led to the development of unilateral ureteral obstruction and a control group. Mice received DM509 (10 mg/kg/day) or DM509-free solution together with drinking water for 10 days the day before surgery. Samples of kidney and blood tissues were collected at the end of the experiment. In the unilateral ureteral obstruction group, kidney dysfunction was detected, which was accompanied by increased urea nitrogen content in the blood compared to the control group (63 ± 7 vs. 34 ± 6 mg/d). The reduction of urea nitrogen in the blood by 36% in mice with unilateral ureteral obstruction treated with DM509 is shown compared to mice with this pathology without treatment, which in turn proved the effectiveness of DM509 in preventing renal dysfunction. In mice with unilateral ureteral obstruction, which did not receive DM509, the development of kidney fibrosis with a high content of hydroxyproline in the kidneys and also increased collagen content in histological sections of the kidneys were detected. In the DM509 group, the renal and collagen hydroxyproline content were 34-66% lower, indicating the effectiveness of this agent in the treatment of renal fibrosis. Thus, we have shown that the new DM509 is effective in preventing renal dysfunction and renal fibrosis using a murine model of unilateral ureteral obstruction.

Keywords: soluble epoxide hydrolase inhibitor, farnesoid x receptor agonist, kidney fibrosis.

Introduction. Renal fibrosis is considered as critical pathophysiological event in the development and progression of chronic kidney disease (CKD). Progressive CKD results in end-stage renal disease (ESRD), which is the common clinical end point for all progressive renal diseases [3]. The common CKD etiologies and the consequent ESRD include diabetes, hypertension, glomerulonephritis, acute kidney injury, and chronic pyelonephritis. ESRD is a major burden to the health care

system and a large percentage of the patients are inevitably placed on dialysis and ultimately require transplantation [3, 16]. The ESRD burden on health care is caused largely due to the lack of an effective anti-fibrotic agents that can target CKD.

Indeed, little success has been made over the past decade in developing agents or therapies that can prevent renal fibrosis to slow the progression of CKD to ESRD [23]. Currently, angiotensin-converting enzyme

inhibitors and angiotensin II receptor blockers are used to reduce proteinuria and slow CKD progression [6]. Nevertheless, these renin-angiotensin system drugs have incomplete efficacy in preventing renal fibrosis and CKD progression. Clinical trials targeting other mechanisms have failed, including the nuclear factor E2-related factor 2 inducer bardoxolone [4]. and the endothelin receptor blocker avosentan [17].

We recently developed a bifunctional molecule DM509, that concurrently acts as a farnesoid X receptor (FXR) agonist and soluble epoxide hydrolase inhibitor (sEH) and demonstrated its marked anti-fibrotic action in liver disease models [10]. FXR is a ligand activated transcription factor and is a member of the nuclear receptor superfamily that is highly expressed in liver and kidney [19, 22]. Several recent studies demonstrated anti-fibrotic action for FXR agonists in liver and kidney disease models [7, 16, 21]. A strong renal anti-fibrotic action is also known for sEH in several published studies [2, 12, 13, 14]. Considering the promising anti-fibrotic action in liver disease and potential to treat kidney fibrosis, we determined anti-fibrotic action for the novel bifunctional FXR agonist and sEH, DM509, in a mouse renal fibrosis model.

Materials and methods. This study was approved and conducted according to guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee of the Medical College of Wisconsin. The Biomedical Resource Center at the Medical College of Wisconsin housed animals with free access to water and food and a 12/12h light-dark cycle. Male C57Bl/6J mice (8-10 weeks old) were purchased from Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME. Mice were administered 2.0 % isoflurane to induce anesthesia prior to UJO surgery. UJO surgery was conducted by obstructing the left ureter proximal to the renal pelvis using a 6-0 silk tie [14, 19]. Mice with sham surgery went through the same procedure as the UJO mice except that the ureter was not ligated. An experimental protocol was designed to investigate if our novel molecule DM509 can prevent the development of renal fibrosis. Mice went through UJO surgery 24 hours after the start of DM509 treatment (10 mg/kg/d, p.o., n = 6) or vehicle (n = 6) and blood and kidney tissue were collected 10 days following UJO induction. A schematic of the experimental protocol is shown in Fig. 1. DM509 drinking solution was prepared with a mixture of DMSO (0.05 %) and cyclodextrin (0.5 %). The vehicle was combination of DMSO (0.05 %) and cyclodextrin (0.5 %) given to mice in drinking water. At the end of the experimental protocol, mice were euthanized for blood and kidney tissue collection. The kidney tissue was processed for biochemical, histology, and gene expression analysis. Serum was separated from the blood and used for biochemical analysis of blood urea nitrogen (BUN). Kidney hydroxyproline levels were measured using a commercially available kit (Sigma Aldrich, USA). BUN was measured using a kit from Arbor Assay, USA and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) was measured using kit from R&D Systems, Inc., USA. Renal mRNA expression of several fibrotic [fibronectin, α -smooth muscle actin (α -SMA)] and inflammatory (TNF- α , IL1 β , IL-6) were studied by Real Time-PCR (RT-PCR) analysis. RNeasy Mini Kit (QIAGEN, CA, USA) was used according to the manufacturer's protocol and messenger RNA (mRNA) was prepared from each sample homogenate. The mRNA samples were quantified spectrophotometrically and 1 μ g of total RNA was reverse-transcribed to cDNA using iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Gene expression was quantified by iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR green using the MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA, USA). Dissociation curve analysis was accomplished with iQ5 Optical System Software, Version 2.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and each amplified sample analysed for homogeneity. Denaturation was done at 95 °C for 2 min followed by 40 cycles conducted at 95 °C for 10s and at 60 °C for 30s. All samples were run in triplicate and fold change in gene expression compared to controls determined by comparative threshold cycle (C_t) method. Target gene expression levels were determined by normalizing C_t values to two housekeeping genes. Statistical analyses were carried out using six samples from each experimental group and comparing to the control group. Renal tissues were fixed in 10 % formalin, sectioned a 4 μ m thickness, mounted on slides, and stained with Picrosirius Red (PSR) (Alfa Aesar, Tewksbury, MA) for histological examination at a 200x magnification using NIS Elements AR version 3.0 imaging software (Nikon instruments Inc., Melville, NY, USA). PSR stained kidney tissue sections was used to determine collagen-positive renal interstitial fibrosis levels. Histopathological changes were scored as published previously and scores presented as a percentage area-fraction relative to the total area analysed. Kidney interstitial fibrosis (PSR-collagen positive areas) scoring was performed in a blinded fashion by two observers. All data are expressed as mean \pm S.E.M. GraphPad Prism® Version 4.0 software was utilized to conduct a one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test to establish statistical significance between groups (Graph Pad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Two-tailed unpaired Student's t-test was applied to determine statistical significance between groups. A P < 0.05 was deemed significant.

Results and discussion. In the present study we determined the ability of our novel dual acting molecule, DM509, to prevent kidney dysfunction in a mouse renal fibrosis model. We assessed renal dysfunction by measuring the BUN level. BUN is considered an important marker for kidney dysfunction. BUN measures urea in the blood and urea is the primary metabolite derived from dietary protein and tissue protein turnover. Urea is freely filtered at the glomerulus but not secreted, and it is reabsorbed by the renal tubules. In addition, as urine flow rates decrease, more urea is reabsorbed [1]. Therefore, BUN levels are inversely correlated with the decline of kidney function. The results of the current study demonstrate that there is kidney dysfunction with a 2-fold higher BUN level in the UJO mice compared to sham (63 ± 7 vs. 34 ± 6 mg/dL). Interestingly, DM509 prevented BUN level elevation and it was 36 % lower in the DM509 treated mice compared to the mice treated with vehicle (40 ± 8 mg/dL). These finding indicate that DM509 prevents kidney dysfunction in the UJO renal fibrosis model. It is important to note that sEH inhibitors and farnesoid receptor agonists are known to have beneficial effects on kidney function. The protective effects of sEH inhibitor have been reported in renal fibrosis [13, 14] hypertensive kidney injury and diabetic kidney injury models [5, 10]. Similar kidney protective effects are also reported for farnesoid receptor agonists in renal fibrosis [15], diabetic nephropathy [21] and renal ischemia reperfusion injury [7]. The present study demonstrates the novel finding that the dual acting molecule that simultaneously act as sEH inhibitor and farnesoid receptor agonist, DM509, prevents renal fibrosis progression in the UJO mouse model. Renal fibrosis is the clinical hallmark for CKD and considered the most important predictor of long-term CKD prognosis [16]. Renal fibrosis progression is the result of an excess accumulation of connective tissue, primarily collagen. In the present study, we have used quantitative method to

determine kidney collagen content by measuring tissue hydroxyproline levels. The spectrophotometric-based hydroxyproline assay is one of the few that allows for actual quantitation of collagen content. The assay is based on the fact that all collagens contain globular domains and share the common structural motif of triple helical segments. This triple helical structure is composed of three α -(polypeptide) chains and each chain consists of a repeating triplet amino acid sequence containing hydroxyproline. Hence, based on the absolute hydroxyproline quantitation, the collagen amount and concentration in tissues can be determined [8]. As such, in the present study, we measured kidney hydroxyproline content in the experimental groups. We found that the

UJO mice developed marked kidney fibrosis with elevated kidney hydroxyproline content (213 ± 11 vs. $49 \pm 9 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein) and DM509 treatment prevented the elevation of hydroxyproline level by 34 % ($140 \pm 9 \mu\text{g}/\text{mg}$ protein). The effect of DM509 treatment on kidney fibrosis was further assessed using a semi-quantitative histological method. Our data found that DM509 treatment prevents kidney fibrosis by reducing collagen positive kidney fibrotic area in UJO mice. The vehicle treated UJO mice had higher collagen positive area compared to sham ($13 \pm 2\%$ vs. $1.1 \pm 0.1\%$) and DM509 reduced the collagen positive area by 66 % ($4.4 \pm 0.7\%$) (Fig. 1).

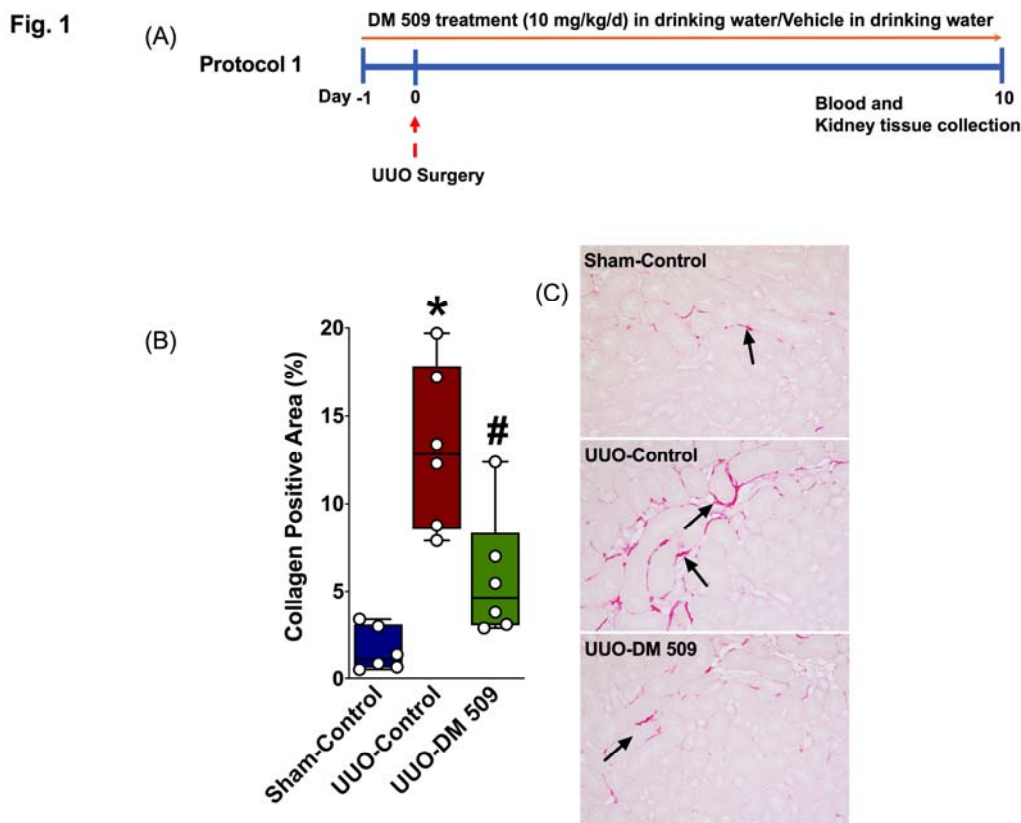


Fig. 1: A schematic describing the experimental protocol (A). Semi-quantitative measurement of collagen positive fibrotic kidney area in different experimental groups (B). A representative photomicrograph depicting collagen positive kidney fibrotic area (black arrows) in different experimental groups (C). *P vs. Sham-Control; #P vs. UUO-Control, N = 5-7

Prevention of renal fibrosis has been demonstrated by sEH inhibitors in several experimental disease models including UJO renal fibrosis models [11, 13, 14]. Anti-fibrotic action for farnesoid x receptor agonists has also been reported in several disease models including UJO renal fibrosis model [15, 21]. In the present study we provide novel evidence that the dual acting molecule that acts as a sEH inhibitor and farnesoid x receptor agonist, DM509, has excellent ability to prevent renal fibrosis in UJO mice model.

In the present study, we assessed kidney fibrotic mediators and inflammation in UJO mice treated with DM509. Fibrotic marker genes express several critical proteins that form the extracellular matrix in the kidney. It

is important to note that kidney extracellular matrix formation is an important event in the kidney fibrotic process [16]. We found that the vehicle treated UJO mice had 2-3-fold higher kidney expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and fibronectin compared to sham, and DM509 treatment reduced expression of these fibrotic genes in the UJO mice by 40-60 % (Fig. 2). We also found that UJO mice had higher kidney expression of several pro-fibrotic inflammatory markers (TNF- α , IL1 β , IL6) in the vehicle treated UJO mice compared to sham, and DM509 treatment prevented inflammatory gene expression in the UJO mice (Fig. 2).

Fig. 2

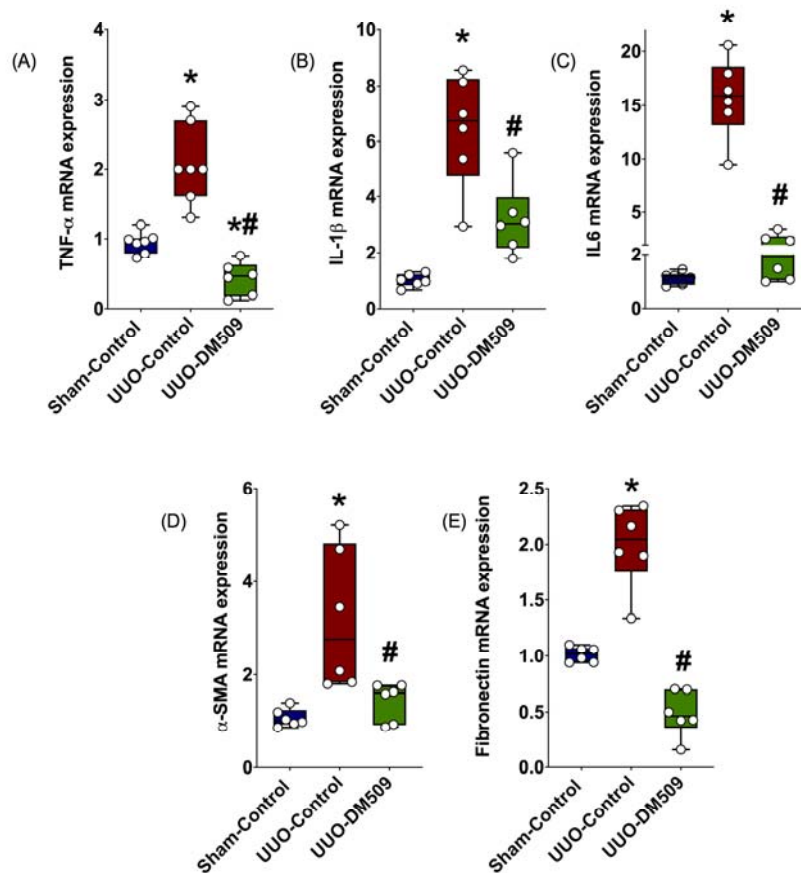


Fig. 2: Kidney mRNA expressions of inflammatory marker genes in different experimental groups (A-C). Kidney mRNA expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and fibronectin in different experimental groups. *P vs. Sham-Control; #P vs. UUO-Control, N = 5-7

These findings are consistent with previous studies demonstrating sEH inhibitors [13, 14] and farnesoid x receptor agonists [7, 15, 21] prevent gene expression of fibrotic markers and pro-fibrotic genes in several kidney disease models.

Conclusion. In the present study, we present exciting data on a novel molecule that simultaneously acts as a sEH inhibitor and farnesoid x receptor agonist, DM509. We provide convincing evidence that this novel dual-acting molecule, DM509, can prevent renal fibrosis development in the UUO renal fibrosis model. Overall, DM509 has potential to be developed as a novel kidney anti-fibrotic agent to treat CKD and prevent progression to ESRD and dialysis.

References

- Berl T. Disorders of water metabolism / T. Berl, R. W. Schrier. – Renal and electrolyte disorders. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2002. – 63 p.
- Chiang C. W. Genetic deletion of soluble epoxide hydrolase attenuates inflammation and fibrosis in experimental obstructive nephropathy / C. W. Chiang, H. T. Lee, D. C. Tarrn et al. // *Mediators Inflamm.* – 2015. – 693260.
- Collins A. J. The state of chronic kidney disease, ESRD, and morbidity and mortality in the first year of dialysis / A. J. Collins, R. N. Foley, D. T. Gilbertson [et al.] // *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* – 2009. – Vol. Suppl1, № 4. – P. 5-11.
- De Zeeuw D. Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease / D. De Zeeuw, T. Akizawa, P. Audhya [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 369, № 26. – P. 2492-2503.
- Elmarakby A. A. Role of haem oxygenase in the renoprotective effects of soluble epoxide hydrolase inhibition in diabetic spontaneously hypertensive rats / A. A. Elmarakby, J. Faulkner, C. Pye [et al.] // *B. Clin. Sci (Lond).* – 2013. – Vol. 125, № 7. – P. 349-59.
- Fried L. F. Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy / L. F. Fried, N. Emanuele, J. H. Zhang [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2013. – Vol. 369, № 20. – P. 1892-1903.
- Gai Z. Farnesoid X receptor activation protects the kidney from ischemia-reperfusion damage / Z. Gai, L. Chu, Z. Xu [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 29, № 7(1):9815.
- Hewitson T. D. Qualitative and quantitative analysis of fibrosis in the kidney / T. D. Hewitson, E. R. Smith, C. S. Samuel // *Nephrology (Carlton).* – 2014. – Vol. 19, № 11. – P. 721-6.
- Hye Khan M. A. A dual farnesoid X receptor/soluble epoxide hydrolase modulator treats non-alcoholic steatohepatitis in mice / M. A. Hye Khan, J. Schmidt, A. Stavniichuk [et al.] // *Biochem Pharmacol.* – 2019. – Vol. 166. – P. 212-221.
- Imig J. D. Prospective for cytochrome P450 epoxygenase cardiovascular and renal therapeutics / J. D. Imig // *Pharmacol Ther.* – 2018. – № 192. – P. 1-19.
- Imig J. D. Targeting epoxides for organ damage in hypertension / J. D. Imig // *J. Cardiovasc Pharmacol.* – 2010. – Vol. 56, № 4. – P. 329-35.
- Imig J. D. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology / J. D. Imig // *Physiol Rev.* – 2012. – Vol. 92, № 1. – P. 101-30.
- Kim J. Inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrosis and inflammation / J. Kim, J. D. Imig, J. Yang [et al.] // *Am. J. Physiol Renal Physiol.* – 2014. – Vol. 307, № 8. – P. 971-80.
- Kim J. Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrogenesis in obstructive nephropathy / J. Kim, S. P. Yoon, M. L. Toews [et al.] // *Am. J. Physiol Renal Physiol.* – 2015. – Vol. 308, № 2. – P. 131-9.
- Li S. The farnesoid X receptor agonist EDP-305 reduces interstitial renal fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction / S. Li, S. Ghoshal, M. Sojoodi [et al.] // *FASEB J.* – 2019. – Vol. 33, № 6. – P. 7103-7112.
- Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics / Y. Liu // *Kidney Int.* – 2006. – Vol. 69, № 2. – P. 213-217.
- Mann J. F. Avosentan for overt diabetic nephropathy / J. F. Mann, D. Green, K. Jamerson [et al.] // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2010. – Vol. 21, № 3. – P. 527-535.
- Sharma A. Novel Omega-3 Fatty Acid Epoxygenase Metabolite Reduces Kidney Fibrosis / A. Sharma, M. A. Hye Khan, S. P. Levick [et al.] // *Int J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17, № 5:751.

19. Suh J. M. The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney / J. M. Suh, C. T. Yu, K. Tang [et al.] // Mol. Endocrinol. – 2006. – Vol. 20, № 12. – P. 3412-3420.

20. Verbeke L. FXR agonist obeticholic acid reduces hepatic inflammation and fibrosis in a rat model of toxic cirrhosis / L. Verbeke, I. Mannaerts, R. Schierwagen [et al.] // Sci Rep. – 2016. – № 6:33453.

21. Wang X. X. Diabetic nephropathy is accelerated by farnesoid X receptor deficiency and inhibited by farnesoid X receptor activation in a type 1 diabetes model / X. X. Wang, T. Jiang, Y. Shen [et al.] // Diabetes. – 2010. – Vol. 59, № 11. – P. 2916-27.

22. Watanabe M. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c / M. Watanabe, S. M. Houten, L. Wang [et al.] // J. Clin. Invest. – 2004. – Vol. 113, № 10. – P. 1408-1418.

23. Zhong J. A perspective on chronic kidney disease progression / J. Zhong, H. C. Yang, A. B. Fogo // Am. J. Physiol. Renal Physiol. – 2017. – Vol. 312, № 3. – P. 375-384.

References (Scopus)

1. Berl T, Schrier R. W. Disorders of water metabolism. 6th ed. Schrier RW, editor. Renal and electrolyte disorders. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002. P. 1–63.

2. Chiang C. W, Lee H. T, Tarrn D. C, Kuo K. L, Cheng L. C, Lee T. S. Genetic deletion of soluble epoxide hydrolase attenuates inflammation and fibrosis in experimental obstructive nephropathy. Mediators Inflamm. 2015;693260.

3. Collins A. J, Foley R. N, Gilbertson D. T. et al. The state of chronic kidney disease, ESRD, and morbidity and mortality in the first year of dialysis. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 2009;4(Suppl1):S5–S11.

4. De Zeeuw D, Akizawa T, Audhya P. et al. Bardoxolone methyl in type 2 diabetes and stage 4 chronic kidney disease. N. Engl. J. Med. 2013;369(26):2492–2503.

5. Elmarakby A. A, Faulkner J, Pye C, Rouch K, Alhashim A, Madipati K. R., Baban B. Role of haem oxygenase in the renoprotective effects of soluble epoxide hydrolase inhibition in diabetic spontaneously hypertensive rats. Clin Sci (Lond). 2013;125(7):349-59.

6. Fried L. F, Emanuele N, Zhang J. H. et al. Combined angiotensin inhibition for the treatment of diabetic nephropathy. N. Engl. J. Med. 2013;369(20):1892–1903.

7. Gai Z., Chu L., Xu Z., Song X., Sun D., Kullak-Ublick G. A. Farnesoid X receptor activation protects the kidney from ischemia-reperfusion damage. Sci Rep. 2017;29;7(1):9815.

8. Hewitson T. D., Smith E. R., Samuel C. S. Qualitative and quantitative analysis of fibrosis in the kidney. Nephrology (Carlton). 2014;19(11):721-6.

9. Hye Khan M. A, Schmidt J., Stavniichuk A., Imig J. D., Merk D. A dual farnesoid X receptor/soluble epoxide hydrolase modulator treats non-alcoholic steatohepatitis in mice. Biochem Pharmacol. 2019;166:212-221.

10. Imig J. D. Prospective for cytochrome P450 epoxide hydrolase cardiovascular and renal therapeutics. Pharmacol Ther. 2018;192:1-19.

11. Imig J. D. Targeting epoxides for organ damage in hypertension. J Cardiovasc Pharmacol. 2010;56(4):329-35.

12. Imig J. D. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. Physiol Rev. 2012;92(1):101-30.

13. Kim J., Imig J. D., Yang J. et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrosis and inflammation. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2014;307(8):F971-80.

14. Kim J., Yoon S. P., Toews M. L. et al. Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrogenesis in obstructive nephropathy. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2015;308(2):F131-9.

15. Li S., Ghoshal S., Sojoodi M., Arora G., Masia R., Erstad D. J., Ferreira D. S., Li Y., Wang G., Lanuti M., Caravan P., Or Y. S., Jiang L. J., Tanabe K. K., Fuchs B. C. The farnesoid X receptor agonist EDP-305 reduces interstitial renal fibrosis in a mouse model of unilateral ureteral obstruction. FASEB J. 2019;33(6):7103-7112.

16. Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. Kidney Int. 2006;69(2):213–217.

17. Mann J. F., Green D., Jamerson K. et al. Avasentan for overt diabetic nephropathy. J. Am. Soc. Nephrol. 2010;21(3):527–535.

18. Sharma A., Hye Khan M. A, Levick S. P., Lee K. S, Hammock B. D., Imig J. D. Novel Omega-3 Fatty Acid Epoxide Hydrolase Inhibitor Reduces Kidney Fibrosis. Int J. Mol. Sci. 2016;17(5): pii: E751.

19. Suh J. M., Yu C. T., Tang K. et al. (2006). The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney. Mol Endocrinol. 2006;20(12):3412–3420.

20. Verbeke L., Mannaerts I., Schierwagen R. et al. FXR agonist obeticholic acid reduces hepatic inflammation and fibrosis in a rat model of toxic cirrhosis. Sci Rep. 2016;6:33453.

21. Wang X. X., Jiang T., Shen Y., Caldas Y., Miyazaki-Anzai S., Santamaria H. et al. Diabetic nephropathy is accelerated by farnesoid X receptor deficiency and inhibited by farnesoid X receptor activation in a type 1 diabetes model. Diabetes. 2010;59(11):2916-27.

22. Watanabe M., Houten S. M., Wang L. et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. J Clin Invest. 2004;113(10):1408–1418.

23. Zhong J., Yang H. C., Fogo A. B. A perspective on chronic kidney disease progression. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 2017;312(3):F375–F384.

Надійшла до редколегії 16.01.2019

Отримано виправлений варіант 17.02.2019

Підписано до друку 17.02.2019

Received in the editorial 16.01.2019

Received a revised version on 17.02.2019

Signed in the press on 17.02.2019

А. Ставнійчук, асп.,
О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Абдул Хе Хан, д-р біол. наук,
В. К. Янкевич, асп.,
Дж. Д. Іміг, д-р біол. наук
кафедра фармакології і токсикології,
Медичний коледж штату Вісконсін, Мілуокі, Вісконсін, США,
Д. Мерк, д-р біол. наук
Інститут фармацевтичної хімії,
Франкфуртський університет ім. Гете, Франкфурт-на-Майні, Німеччина

ВПЛИВ СПОЛУКИ DM509 НА ФІБРОЗ НИРОК В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ

Фіброз нирок є ключовою подією в розвитку хронічного захворювання нирок, що призводить до термінальної стадії ниркової недостатності. На жаль, зараз мало лікарських засобів, здатних запобігати фіброзу в нирках, що супроводжується прогресією хронічного захворювання нирок у термінальній стадії ниркової недостатності. Отримані результати з використанням моделі односторонньої обструкції сечоводу в мишей показують ефективність застосування нового агенту подвійної дії DM509 для запобігання нирковому фіброзу. DM509 є одночасно агоністом фарнезоїдного X-рецептора та розчинного інгібітора епоксидгідролази. У цьому дослідженні було взято 8-12-тижневих самців C57BL/6J, яких піддали хірургічному втручання, що призводило до розвитку односторонньої обструкції сечоводу, та контрольну групу. Миші протягом 10 днів отримували DM509 (10 мг/кг/доба) або розчин, що не містить DM509, разом із питною водою за день до операції. Зразки тканин нирок і крові були зібрані в кінці експерименту. У групі з односторонньою обструкцією сечоводу була виявлена дисфункція нирок, що супроводжувалася підвищенням вмістом азоту сечовини в крові порівняно з контрольною групою (63 ± 7 vs. 34 ± 6 мг/д). Показано зниження вмісту азоту сечовини в крові на 36 % у мишей з односторонньою обструкцією сечоводу, які отримували DM509, порівняно з мишами з даною патологією без лікування, що, у свою чергу, доводило ефективність DM509 для запобігання нирковій дисфункції. У мишей з односторонньою обструкцією сечоводу, що не отримали DM509, було виявлено розвиток фіброзу нирок з підвищенням вмістом гідроксипроліну в нирках і підвищений вміст колагену в гістологічних зрізах нирок. У групі, що отримала DM509, вміст гідроксипроліну в нирках і колагену були на 34-66 % нижче, що вказує на ефективність цього агенту в лікуванні ниркового фіброзу. Таким чином, ми показали, що новий DM509 ефективний для запобігання дисфункції нирок і нирковому фіброзу з використанням мишиної моделі з односторонньою обструкцією сечоводу.

Ключові слова: розчинний інгібітор епоксидгідролази, агоніст фарнезоїдних X-рецепторів, фіброз нирок.

А. Ставнийчук, асп.,
 А. Савчук, д-р биол. наук
 Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, Украина,
 Абдул Хе Хан, д-р биол. наук,
 В. К. Янкевич, асп.,
 Дж. Д. Имиг, д-р биол. наук
 кафедра фармакологии и токсикологии,
 Медицинский колледж штата Висконсин, Милуоки, Висконсин, США,
 Д. Мерк, д-р биол. наук
 Институт фармацевтической химии,
 Франкфуртский университет им. Гёте, Франкфурт-на-Майне, Германия

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ DM509 НА ФИБРОЗ ПОЧЕК В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ

Фиброз почек является ключевым событием в развитии хронического заболевания почек, что приводит к терминальной стадии почечной недостаточности. К сожалению, сейчас мало лекарственных средств, способных предотвращать фиброз в почках, сопровождающийся прогрессией хронического заболевания почек в терминальной стадии почечной недостаточности. Полученные результаты с использованием модели односторонней обструкции мочеточника у мышей показывают эффективность нового агента двойного действия DM509 для предотвращения почечного фиброза. DM509 является одновременно агонистом фарнезоидного X-рецептора и растворимого ингибитора эпиксидгидролазы. В этом исследовании были взяты 8-12-недельные самцы C57BL/6J, которые подверглись хирургическому вмешательству, что приводило к развитию односторонней обструкции мочеточника, и контрольная группа. Мыши в течение 10 дней получали DM509 (10 мг/кг/сутки) или раствор, не содержащий DM509, вместе с питьевой водой за день до операции. Образцы тканей почек и крови были собраны в конце эксперимента. В группе с односторонней обструкцией мочеточника была обнаружена дисфункция почек, сопровождающаяся повышенным содержанием азота мочевины в крови по сравнению с контрольной группой (63 ± 7 vs. 34 ± 6 мг/с). Показано снижение содержания азота мочевины в крови на 36 % у мышей с односторонней обструкцией мочеточника, которые получали DM509, по сравнению с мышами с данной патологией без лечения, что, в свою очередь, доказывало эффективность DM509 в предотвращении почечной дисфункции. У мышей с односторонней обструкцией мочеточника, не получивших DM509, было обнаружено развитие фиброза почек с повышенным содержанием гидроксипролина в почках и повышенное содержание коллагена в гистологических срезах почек. В группе, получившей DM509, содержание гидроксипролина в почках и коллагена было на 34-66 % ниже, что указывает на эффективность этого агента в лечении почечного фиброза. Таким образом, мы показали, что новый DM509 эффективен для предотвращения дисфункции почек и почечного фиброза с использованием мышиной модели односторонней обструкции мочеточника.

Ключевые слова: растворимый ингибитор эпиксидгидролазы, агонист фарнезоидных x-рецепторов, фиброз почек.

УДК: 616.62-006.6-073

DOI: https://doi.org/10.17721/1728_2748.2020.80.15-19

В. Дмитрик, асп.,
 О. Савчук, д-р биол. наук
 Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
 П. Яковлев, канд. мед. науд.
 Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

ПОКАЗНИКИ ДЕЯКИХ КОМПОНЕНТІВ СИСТЕМИ АКТИВАЦІЇ ПЛАЗМІНОГЕНУ ПРИ РАКУ СЕЧОВОГО МІХУРА

Рак сечового міхура (PCM) продовжує бути захворюванням з високим показником смертності. Рак сечового міхура є шостим для чоловіків та сімнадцятим для жінок за частотою злоякісним утворенням у всьому світі. Інвазія та метастазування злоякісних пухлин зумовлені послідовністю процесів, серед яких – втрата клітинно-клітинної та/або клітинно-матричної адгезії, протеоліз та індукція ангиогенезу. Різні системи протеаз задіяні в цих процесах, особливо в процесі інвазії та розвитку метастазів. Однією з таких систем протеаз є система активації плазміногену (АП) або фібринолізу. Зміни в балансі системи активації плазміногену досліджені при багатьох типах злоякісних новоутворень і можуть не тільки свідчити про функціонування цієї системи, але й мати прогностичне значення. При злоякісних новоутвореннях компоненти цієї системи беруть участь у рості, інвазії та метастазуванні пухлин, впливаючи на процеси клітинної міграції та ангиогенезу. Основним і вже добре дослідженим компонентом системи активації плазміногену є серинова протеїназа – активатор плазміногену урокіназного типу (urokinase-type PA), скорочено uPA. На відміну від uPA, активатор плазміногену тканинного типу (tPA) характеризується високою афінністю до фібрину і бере участь в тромболізі. У тканинах пухлин синтезуються обидва типи активаторів плазміногену: tPA та uPA. Найбільше значення серед інгібіторів фібринолізу має інгібітор активатора плазміногену першого типу (PAI-1), залучений до патогенезу багатьох серцево-судинних захворювань, а також до злоякісних онкологічних новоутворень. Метою даного дослідження було виявити зміни вмісту активатора плазміногену тканинного типу tPA та PAI-1 у плазмі крові хворих на PCM при різних стадіях захворювання. У дослідженні брали участь 40 чоловіків, у яких був верифікований діагноз – PCM. Вміст tPA та PAI-1 у передопераційній плазмі крові визначали імуноферментним методом у модифікації ELISA. У ході дослідження було встановлено зміни вмісту tPA та PAI-1 у плазмі крові на різних стадіях, що може характеризувати ріст та інвазію пухлин і поповнити існуючі відомості щодо захворювання.

Ключові слова: рак сечового міхура, tPA, PAI-1, система активації плазміногену.

Вступ. Рак сечового міхура (PCM) є шостим для чоловіків та сімнадцятим для жінок за частотою злоякісним утворенням у всьому світі [21]. Серед злоякісних новоутворень сечостатевої системи він є найчастішим після раку простати. Патологічна гістологія свідчить про те, що більше 90 % PCM є карциномою перехідного епітелію. Більш того, частота виникнення PCM у 3-4 рази вища в чоловіків, аніж у жінок [11, 21].

Інвазія та метастазування злоякісних пухлин зумовлені послідовністю процесів, серед яких – втрата клітинно-клітинної та/або клітинно-матричної адгезії, про-

теоліз та індукція ангиогенезу [3, 8]. Різні системи протеаз задіяні в цих процесах, особливо в процесі інвазії та розвитку метастазів. Однією з таких систем протеаз є система активації плазміногену (АП) або фібринолізу. АП контролює не тільки вміст фібрину в судинах, але бере участь у багатьох фізіологічних і патологічних процесах. При злоякісних новоутвореннях компоненти цієї системи беруть участь у рості, інвазії та метастазуванні пухлин, впливаючи на процеси клітинної міграції та ангиогенезу. Зміни в балансі системи активації плазміногену досліджені при багатьох типах злоякісних но-