

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

СТАВНІЙЧУК АННА МИКОЛАЇВНА

УДК 577.151.6:612.115

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЗВИТОК ФІБРОЗУ ТА ЗАПАЛЕННЯ НИРОК У МИШЕЙ ЗА
УМОВ ВВЕДЕННЯ НОВИХ БІФУНКЦІОНАЛЬНИХ МОЛЕКУЛ**

03.00.04-біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



Ставнійчук А.

Науковий керівник **Савчук Олексій Миколайович**, доктор біологічних наук,
професор

Київ – 2021

АНОТАЦІЯ

Ставнійчук А.М.- Розвиток фіброзу та запалення нирок у мишей за умов введення нових біфункціональних молекул. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04-біохімія. – ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2021.

Хронічна хвороба нирок (ХХН) - це комплексна група захворювань, які мають різні причини, але об'єднуються тим, що мають тривалий перебіг та тенденцію до прогресування аж до повної втрати функцій нирок. У всьому світі все більше пацієнтів страждають на ХХН. Прогресуюча природа ХХН зумовлює істотне збільшення витрат в системі охорони здоров'я. Сучасні методи лікування ХХН в основному спрямовані на усунення симптомів, в той час як спостерігається істотна прогалина у можливостях лікування основної причини захворювання. Для розробки ефективних засобів профілактики й терапії ХХН необхідним є проведення досліджень направлених на поглиблене розуміння механізмів формування і розвитку хвороби.

Інтерстиціальний фіброз є загальним гістопатологічною та структурною ознакою ХХН, незалежно від етіології захворювання нирок (гіпертонія, діабет або ін.). Тубулоінтерстиціальний фіброз корелює з функцією нирок і є наслідком складних структурних змін у нирках, які включа розростання інтерстиціальних фіброblastів з трансформацією в міофіброblastи, що в подальшому призводить до надмірного продукування і відкладення позаклітинного матриксу. Також важливо відзначити, що фіброз є реактивним процесом, який розвивається у відповідь на пошкодження епітелію і завжди супроводжуються запаленням, що проявляється в підвищеній експресії прозапальних цитокінів та накопиченні макрофагів у ниркових тканинах. Окрім запалення нирок, пошкодження судинної мережі, а також втрата капілярів в ниркових тканинах посилює пошкодження епітелію на більш пізніх стадіях, обмежуючи доступ поживних

речовин до епітеліальних клітин, що також сприяє фіброзу нирок і розвитку ХХН.

На сьогодні існує нагальна потреба в пошуку та синтезі нетоксичних ефективних препаратів, які становлять важливу складову в процесі розробки новітніх шляхів боротьби з розвитком фіброзу та запалення, як основних чинників патогенезу ХХН.

Використовуючи існуючі знання про внесок ниркового фіброзу та запальних процесів у патофізіологію ХХН, ми провели серію досліджень для розробки нових терапевтичних препаратів, здатних попереджати та/або уповільнювати темпи розвитку ниркового фіброзу.

Метою представленої роботи було дослідити розвиток запалення та фіброзу у нирках мишей на моделі односторонньої обструкції сечоводу (ООС) за умов введення інгібітора розчинної епоксидгідролази (sEH) й агоністів ядерних рецепторів PPAR- γ і FXR. В основі запропонованої нами стратегії розробки нових препаратів для лікування ХХН лежить інгібування sEH, компонента сигнального шляху арахідонової кислоти і активація ядерних рецепторів PPAR- γ і FXR. Для цих сполук характерні антипроліферативні, антифіброзні та протизапальні властивості. На основі них було синтезовано дві біфункціональних молекули RB394 і DM509.

Молекула RB394, є препаратом подвійної дії, тому що одночасно діє як агоніст рецептора PPAR- γ , що активує проліферацію пероксисом і як інгібітор sEH. Інша молекула подвійної дії DM509 діє, як агоніст фарнезоїдного X-рецептора і інгібітора sEH. Де sEH є важливим ферментом, який призводить до деградації епоксиейкозатрієнової кислоти (EET) і зниження її захисного впливу на нирки. Встановлено, що інгібування цього ферменту збільшує біодоступність EET. На основі результатів проведеного дослідження можна стверджувати, що sEH є перспективною мішенню для розробки нових антифіброзних засобів.

Прогресування розвитку ниркового фіброзу досліджували на моделі ООС у мишей з наступним фіксуванням часу появи очевидних ознак розвитку фіброзу. Під час виконання роботи було проаналізовано широкий спектр показників, які

дозволили охарактеризувати стан нирок та їх функціональну активність у мишей з ООС за умов введення досліджуваних речовин.

В результаті проведеного дослідження виявлено суттєві зміни у функціонуванні нирок мишей з ООС, де нирковий фіброз був підтверджений за розростанням інтерстиціального колагену та потовщенням каналцевої базальної мембрани, експресії декількох маркерів фіброзу і продукції прозапальних цитокінів.

За наявності добре охарактеризованої модельної системи були здійсненні відповідні дослідження для визначення профілактичних і терапевтичних можливостей досліджуваних новосинтезованих біфункціональних молекул RB394 та DM509 проти фіброзу нирок.

Продемонстровано помітну дисфункцію нирок за підвищеним рівнем азоту сечовини у сироватці крові мишей з ООС. За умов введення інгібітора sEH, агоніста PPAR- γ , та їх комбінації і біфункціональних молекул RB394 і DM509 було помітно зниження даного показника.

Наявність запалення встановлено за зростанням відносного рівня експресії генів прозапальних цитокінів *Tnfa*, *Il6* та *Il1b* у тканині нирок мишей з ООС. Виявлено основні шляхи, що ведуть до розвитку ниркового інтерстиціального фіброзу в моделі ООС, це інтерстиціальна інфільтрація макрофагами в нирковій тканині, які здатні в свою чергу продукувати цитокіни, відповідальні за апоптоз каналців і проліферацію та активація фібробластів, та загибель епітеліальних клітин каналців внаслідок апоптозу і некрозу. В результаті це призвело до проліферації інтерстиціальних фібробластів, де тубулярні клітини здатні піддаватися епітеліально-мезенхімальному переходу (ЕМП), в результаті якого епітеліальні клітини набувають мезенхімальних характеристик і втручаються в інтерстицій, що в подальшому сприяло відкладенню екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ). Дійсно, продемонстровано, що за введення RB394 і DM509 відбувається зниження інфільтрації запальних клітин, які продукують прозапальні цитокіни у нирках. Виявлено, що антифіброзна активність

біфункціональних молекул пов'язана з їх антиоксидантними та протизапальними реакціями, а також з її здатністю пригнічувати хемотаксис у нирках. В результаті, завдяки зменшенню інфільтрації імунних клітин в ниркових тканинах мишей з ООС, знизився рівень пошкодження нирок.

Дійсно, окрім епітеліальних і ендотеліальних клітин, перицити можуть також диференціюватися в міофібробласти і експресувати α -гладенький актин м'язів (α -SMA), де він є одним із основних учасників формування ЕЦМ. В мишей з ООС ендотеліальні клітини і перицити є основним джерелом продукування аномальної кількості колагену, що являється ще одним учасником ЕЦМ. Накопичення білків позаклітинного матриксу при ООС призводять до фіброзу в нирках при ХХН.

Розвиток фіброзу було підтверджено гістопатологічним аналізом за наявністю компонентів ЕЦМ, підвищенням рівня колагену, а також підвищеним вмістом гідроксипроліну в тканинах нирки мишей з ООС.

Застосування молекулярного методу дослідження дозволило підтвердити висновки про формування ЕЦМ і прогресування ниркового фіброзу, зроблені після проведення гістологічного аналізу.

Було помітно, що у мишей з ООС, яким вводили агоніст PPAR- γ , інгібітор sEH та комбінацію PPAR- γ і інгібітор sEH відбувалося зниження експресії фібротичних генів- *Fnl*, *Coll1a1* і *Col3a1*. Виявлено, що рівень експресії цих генів по-різному залежить від застосування досліджуваних сполук, серед яких, біфункціональна молекула RB394 найбільш ефективно знижувала прогресію експресії колагену в нирках мишей з патологією. Було показано, що за умов введення досліджуваних сполук відбувається зниження накопичення не тільки колагену та α -SMA, зниження рівнів експресії регуляторних генів фіброзу *Tgfbr2*, *Snai1*, *Snai2* і *Twist1*, у ниркових тканинах мишей.

На ряду з формуванням ЕЦМ, пошкодження ниркових каналців та судин є ще одним важливим патофізіологічним процесом ниркового фіброзу. Було виявлено у ході проведених досліджень виражене пошкодження каналців та судинної мережі у ниркових тканинах мишей з ООС. Водночас

експериментально було показано ефект різних комбінацій введення досліджуваних сполук на зниження рівня експресії маркерів ушкодження ниркових каналців- *Lcn2* і *Havcr1* та судин- *Icam1* і *Vcam1* та ендотеліального CD31⁺ маркеру у ниркових тканинах мишей з групи ООС.

Однак, крім вкладу у прогресування фіброгенезу, утворення ЕЦМ, де каналцеві епітеліальні клітини ініціюють його, модулюючи його проліферацію, на ряду з тим, окисний стрес здатний викликати ендотеліальну дисфункцію, запалення, апоптоз, гіпертрофію, фіброз і ангиогенез.

Важливим моментом цього дослідження, є розкриття здатності RB394, комбінації інгібітора sEH і агоністу PPAR- γ призводити до зниження експресії субодиниць НАДФ-оксидази у клітинах нирок при розвитку патологічних процесів. З літературних джерел відомо, що активація PPAR- γ спронуковує появу її антиоксидантної дії, а інгібування sEH знижує показники окислювального стресу у нирках, де в результаті збільшується життєдіяльність EETs і це супроводжується захистою реакцією нирок .

Встановлено нами зниження експресії генів окисного стресу- *Nox1*, *Cybb*, *Ncf1* і *Cyba* у ниркових тканинах мишей групи ООС на фоні введення агоніста PPAR- γ , інгібітора sEH та комбінації агоніста PPAR- γ і інгібітора sEH. Серед досліджених препаратів найбільш активною виявилась молекула подвійної дії RB394, відмічено, що за умов її введення рівень експресії маркерів окисного стресу достовірно знижувався. Важливим аспектом цього дослідження, є розкриття здатності RB394, комбінації інгібітора sEH і агоністу PPAR- γ призводити до зниження експресії субодиниць НАДФ-оксидази у клітинах нирок при розвитку патологічних процесів.

Важливо відзначити, що інша молекула DM509 є новою, біологічні ефекти якої досі досліджувалися тільки на моделях фіброзного захворювання печінки. Наші дані ясно показують, що DM509 потенційно може бути використана, як новий антифіброзний агент для лікування фіброзу нирок. Пряма дія агоніста FXR на нирки неясна, але він володіє сильною антифіброзною дією, що може бути використано для розробки нової антифіброзної терапії ниркового фіброзу.

Отримані результати показали, що за введення біфункціональної молекули DM509, у мишей з ООС, виявлено зниження рівня експресії декількох фіброзних маркерів, а також зниження експресії генів запальних цитокінів.

Підтверджено, що новосинтезовані молекули RB394 і DM509 мають потенціал запобігати прогресуванню ниркового фіброзу і дисфункції нирок на моделі ООС у мишей. Отримані результати описують антифіброзний та протизапальний потенціал біфункціональних молекул DM509 і RB394 при їх застосуванні проти фіброзу та запалення нирок у мишей з ООС. Дійсно, отримані результати є особливо важливими, тому що практично немає доступних антифіброзних засобів, які можуть запобігати розвитку фіброзу та запального процесу у нирках, і існує негайна потреба в нових терапевтичних підходах до лікування фіброзу нирок.

Ключові слова: хронічна хвороба нирок, фіброз та запалення нирок, інгібітор sEH, агоніст PPAR- γ і агоніст FXR, біфункціональні сполуки – RB394 і DM509.

SUMMARY

Stavniichuk A.M. Development of fibrosis and inflammation of the kidneys in mice under the conditions of the introduction of new bifunctional molecules. – Manuscript

The thesis for candidate of biological sciences degree in specialty 03.00.04 – biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2021.

Chronic kidney disease (CKD) is complex diseases that have different etiologies, but the common facts about all forms of CKD is that that all progress to a complete loss of kidney function. There are more and more CKD patients all over the world, and the complex etiopathology, and progressive nature of CKD is causing significant increases in health care costs. Current therapies for CKD are mainly aimed at treating

symptoms, while there is a significant gap in the ability to treat the underlying cause of the disease. For the development of effective means of prevention and treatment of CKD, it is necessary to conduct research aimed at an in-depth understanding of the mechanisms of the formation and development of the disease.

Interstitial fibrosis is a common histopathological and structural feature of CKD, regardless of the etiology of renal disease (hypertension, diabetes, etc.). Tubulointerstitial fibrosis correlates with the loss of renal functions and is a consequence of complex structural changes in the kidney, which include the proliferation of interstitial fibroblasts and their transformation into myofibroblasts. The formation of myofibroblast in the kidney leads to excessive production and deposition of the extracellular matrix proteins. It is important to note that renal fibrosis is a reactive process that develops in response to damage to the epithelium and is always accompanied by inflammation, which manifests itself in increased expression of pro-inflammatory cytokines and the accumulation of macrophages in renal tissues. In addition to inflammation of the kidneys, damage to the vasculature and loss of renal capillaries in the kidney increases the damage to the epithelium in the later stages, limiting the access of nutrients to the epithelial cells, which also contributes to the development of kidney fibrosis and CKD. Unfortunately, the current therapies for CKD have very limited ability to inhibit or reduce renal fibrosis. Hence, there is an urgent need for the search and development of non-toxic effective drugs. Any such new therapies will help to combat the development of renal fibrosis and inflammation, as the main factors in the pathogenesis of CKD.

Using the existing knowledge about the contribution of renal fibrosis and inflammatory processes to the pathophysiology of CKD, we conducted a series of studies to develop new therapeutic drugs that can prevent and/or slow the rate of development of renal fibrosis.

The aim of this work was to investigate the development of inflammation and fibrosis in the kidneys of a mouse model of unilateral ureteral obstruction (UUO). The UUO renal fibrosis model is used to investigate anti-inflammatory and anti-fibrotic actions of a soluble epoxide hydrolase (sEH) inhibitor and activation of two nuclear

receptors. The nuclear receptors that we targeted are peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) and farnesoid X-receptor (FXR). Several biological actions these receptors strongly complement biological actions of sEH inhibitor. It is important to mention that sEH is an important enzyme that leads to the degradation of epoxyicosatrienoic acid (EET) and EET has potent kidney protective actions. Inhibition of sEH increase EET bioavailability. In this thesis work, these molecules were used with a goal to develop new drugs for the treatment of renal fibrosis, a pivotal event in CKD pathophysiology.

We hypothesized that approaches designed to simultaneously target EET signaling pathway and certain nuclear receptors PPAR- γ and FXR will prevent and treat renal inflammation and fibrosis. To test our hypothesis, we used to chemically synthesized and first-in-class bifunctional molecules RB394 and DM509 that simultaneously acts on EET signaling pathway and activate PPAR- γ and FXR, respectively.

As mentioned earlier, in this thesis work we have used a mouse UUO model. We studied the progression of renal fibrosis development in this model and determined a suitable time at which renal inflammation and fibrosis was prominent. The renal fibrosis was confirmed from tubular interstitial collagen formation, renal expression of several fibrosis and inflammatory markers that cause renal fibrosis. We demonstrated elevation in the levels of gene expression of the proinflammatory cytokines *Tnfa*, *Il6*, and *Il1b* in the kidney of mice with UUO. The elevation of these proinflammatory cytokines indicate inflammation in the kidney of the mice with UUO. Indeed, inflammation is considering as the main pathways leading to the development of renal interstitial fibrosis in the UUO model. Renal inflammation is responsible for tubular apoptosis and proliferation and activation of fibroblasts, and death of tubular epithelial cells due to apoptosis and necrosis. These events led to the proliferation of interstitial fibroblasts, where tubular epithelial cells go through epithelial-mesenchymal transition (EMT) acquire mesenchymal characteristics and promote the deposition of extracellular matrix (ECM). Deposition of ECM proteins like collagen in the kidney indicate renal fibrosis. In addition to epithelial cells, pericytes can also differentiate

into myofibroblasts and express α -smooth muscle actin (α -SMA) and participate in the formation of ECM. In UUO mice, the accumulation of extracellular matrix proteins leads to kidney fibrosis and renal dysfunction typical of CKD.

In the present work, the development of fibrosis was confirmed in the mice with UUO by biochemical and histopathological analysis. The kidney of UUO mice had increased in kidney collagen levels, and an elevated level of hydroxyproline. These were important findings on the mouse UUO model of renal fibrosis that helped to design appropriate studies to determine prophylactic and therapeutic potentials of investigational molecules against renal fibrosis. The first investigational molecule that we have studied to determine and characterize as a novel anti-fibrotic agent for renal fibrosis is RB394, a dual acting PPAR- γ agonist/soluble epoxide hydrolase inhibitor (PPAR- γ /sEHi). In the UUO mice kidney, we found elevated expressions of fibrotic genes - *Fn1*, *Colla1* and *Col3a1*. Expression of fibrotic genes were accompanied by deposition of collagen and α -smooth muscle actin (α -SMA) in the kidney mice with UUO. Interestingly, RB394 reduced expression of fibrotic genes and reduced deposition of collagen and α -SMA in the kidney of mice with UUO. Moreover, this ability of RB394 was superior than a PPAR- γ agonist, an inhibitor of sEH and their combination. In the present study, we also demonstrated that RB394 reduced kidney expression of some fibrosis regulator genes *Tgfbr2*, *Snai1*, *Snai2* and *Twist1* in mice with UUO.

Along with the formation of ECM proteins, damage to the renal tubules and blood vessels are other important pathophysiological process of renal fibrosis. In the kidney of mice UUO, we observed marked tubular injury with elevated expression of genes for prominent tubular markers *Lcn2* and *Havcr1*. RB394 reduced expression of these genes in the kidney of UUO mice and its action superior than a PPAR- γ agonist, an inhibitor of sEH and their combination.

We also studied renal vascular injury and vascular loss in the kidney of UUO mice. We studied gene expression of vascular injury markers *Icam1* and *Vcam1* and determined kidney expression level of endothelial CD31 in the kidney of mice with UUO. We found vascular injury and vascular loss with increased *Icam1* and *Vcam1*

and also a decreased level of CD31⁺ cells in the kidney of mice with UUO. Interestingly, RB394 decreased expression levels of *Icam1* and *Vcam1* and increased expression of CD31⁺ cells in the kidney of mice with UUO. Moreover, we found that the ability of RB394 to reduce vascular damage and vascular loss was better than a PPAR- γ agonist, an inhibitor of sEH and their combination.

In the present work, we have also studied antioxidant effects of RB394 in the kidney of mice with UUO as oxidative stress is implicated in the pathophysiology of renal fibrosis. It is also known that both EET and PPAR- γ agonist have antioxidant properties. With this background, we have investigated antioxidant effects of RB394 by studying expression of the genes for several subunits of NADPH oxidase in the kidney of mice with UUO. There was elevated expression of NADPH oxidase subunit genes *Nox1*, *Cybb*, *Ncf1*, and *Cyba* in the kidney of mice with UUO and indicated renal oxidative stress in these mice. The RB394 demonstrated antioxidative effects in the kidney of UUO mice and reduced expressions of *Nox1*, *Cybb*, *Ncf1*, and *Cyba*. It is found that a PPAR- γ agonist, an inhibitor of sEH and their combination also shown antioxidant effects but the antioxidative actions of RB394 was superior than them.

During this dissertation work, we have used another investigational dual acting molecule, DM509 that simultaneously acts as an FXR agonist and as a sEH inhibitor. We demonstrate that DM509 prevents development of renal dysfunction, renal fibrosis, renal mRNA expression of several prominent fibrotic markers as well as fibrosis causing cytokines in UUO renal fibrosis model. The kidney protective actions including anti-fibrotic effect of sEH inhibition is known from several pre-clinical studies of acute and chronic kidney disease models including UUO model. The direct renal actions of FXR agonist is not clear but it has strong anti-fibrotic actions that can be used to develop novel anti-fibrotic therapy for renal fibrosis and CKD. Indeed, anti-fibrotic actions for farnesoid x receptor agonists has also been reported in several disease models including UUO renal fibrosis model. However, novel findings that obtained during the course of this work is that we developed a dual acting FXR agonist/sEH inhibitor DM509 which prevented renal dysfunction and renal fibrosis development.

Overall, in this dissertation work we provided several important information about a mice UUO model to study renal fibrosis. We provided important information on the anti-fibrotic actions of two novel first-in-class molecules, RB394 and DM509 in mouse UUO model of renal fibrosis, which is a critical pathophysiological event of all forms of CKD. We view our findings especially important because there is virtually no anti-fibrotic agent available that can target kidney fibrosis and there is an unmet need for novel therapeutic approaches for renal fibrosis.

Key words: chronic kidney disease, kidney fibrosis and inflammation, sEH inhibitor, PPAR- γ agonist and FXR agonist, bifunctional molecules RB394 and DM509.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях

1. Khan MA Hye, Schmidt J, Stavniichuk A, Imig JD, Merk D. A dual farnesoid X receptor/soluble epoxide hydrolase modulator treats non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Biochem Pharmacol.* 2019; 166: 212-221.
2. Hye Khan MA Hye, Stavniichuk A, Sattar MA, Falck JR, Imig JD. Epoxyeicosatrienoic Acid Analog EET-A Blunts Development of Lupus Nephritis in Mice/ *Front Pharmacol.* 2019; 10: 512.
3. Stavniichuk A, Savchuk O, Khan MA Hye, Jankiewicz WK, Imig JD, Merk D. The effect of compound DM509 on kidney fibrosis in the conditions. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology.* 2020; 1(80): 10-15.
4. Stavniichuk A, Savchuk O, Khan MA Hye, Jankiewicz WK, Imig JD. A Sorafenib induced model of glomerular kidney disease. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology.* 2020; 2(81): 25-31.
5. Stavniichuk A, Khan MA, Yeboah MM, Chesnik MA, Jankiewicz WK, Hartmann M, Blöcher R, Kircher T, Savchuk O, Proschak E, Imig JD. Dual Soluble Epoxide

Hydrolase Inhibitor/PPAR- γ Agonist Attenuates Renal Fibrosis. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2020; 150:106472.

Тези наукових доповідей

6. Khan, MAH, Stavniichuk, A, Yeboah, MM, Chesnik, MA, Hartmann, M, Blocher, R, Proschak, E, Imig, JD. A Dual Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor/ PPAR- γ Agonist Prevents Renal Fibrosis in Mouse Unilateral Ureteral Obstruction Model. Experimental Biology. 2019; 6-9 April, Orlando, Florida, USA, P. 678.12.
7. Khan, MAH, Stavniichuk, A, Schmidt, J, Merk, D, Imig JD. A Dual Farnesoid X Receptor Agonist/Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor Prevents Non-Alcoholic Steatohepatitis in Mice. Experimental Biology. – Orlando, Florida, USA. 2019; 6-9 April, Orlando, Florida, USA, P. 506.3.
8. Stavniichuk, A, Khan, MAH, Jankiewicz, WK, El-Meanawy, A, Yeboah, MM, Savchuk, O, Hwang, SH, Hammock, BD, Imig, JD. Dual acting COX-2 and soluble epoxide hydrolase inhibitor attenuates glomerular injury in focal segmental glomerular sclerosis. Experimental Biology. 2020; 4-7 April, San Diego, California, USA, P. 1.
9. Stavniichuk, A, Khan, MAH, Jankiewicz, WK, El-Meanawy, A, Yeboah, MM, Savchuk, O, Hwang, SH, Hammock, BD, Imig, JD. Reversal of unilateral ureteral obstruction leads to salt-sensitive hypertension. Experimental Biology. 2020; 4-7 April, San Diego, California, USA, P.1.
10. Palygin, O, Khan MAH, Zietara, A, Stavniichuk, A, Staruschenko, A, Imig, JD. Fructose consumption increases blood pressure and induces changes in renal microvascular function. Experimental Biology. 2020; 4-7 April, San Diego, California, USA, P.1.
11. Jankiewicz, WK, Khan, MAH, Stavniichuk, A, Vogel, AN, Savchuk, O, Hwang, SH, Hammock, BD, Imig, JD. A dual COX-2/sEH inhibitor treated kidney injury in a drug-induced glomerular disease model. Experimental Biology. 2020; 4-7 April, San Diego, California, USA, P.1.

12. Khan, MAH, Stavniichuk, A, Jankiewicz, WK, Vogel, AN, Nolan, BJ, Savchuk, O, Merk, D, Imig, JD. Combined farnesoid x receptor agonist and soluble epoxide hydrolase inhibitor treats progressive renal fibrosis. Experimental Biology. 2020; 4-7 April, San Diego, California, USA, P.1.

ЗМІСТ

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ	18
ВСТУП	20
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури	26
1.1. Внесок запалення і ниркового фіброзу в патофізіологію ХХН.....	26
1.2. Сучасні засоби лікування ХХН: антифіброзні та протизапальні препарати.....	31
1.2.1. Нові препарати для лікування ХХН, які перебувають на стадії клінічних випробувань.....	34
1.3. Перспективні препарати і недавні дослідження для нової терапії ниркового фіброзу.....	36
1.4. Використання арахідонової кислоти для розробки ліків проти ХХН.....	41
1.5. Розробка біфункціональних молекул, спрямованих на каскад арахідонової кислоти і ядернихрецепторів.....	45
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи	53
2.1. Реагенти та матеріали.....	53
2.2. Обладнання.....	55
2.3. Експериментальні тварини.....	55
2.4. Умови проведення досліджень.....	56
2.5. Експериментальні протоколи, що були застосовані для дослідження розвитку ниркового фіброзу за умов введення експериментальних сполук.....	57
2.5.1. Експериментальний протокол № 1.....	57
2.5.2. Експериментальний протокол № 2.....	58
2.5.3. Експериментальний протокол № 3.....	59
2.6. Підготовка біологічних зразків для подальших досліджень.....	60
2.7. Біохімічні методи.....	61

2.7.1. Визначення вмісту гідроксипроліну в тканинах нирок дослідних мишей.....	61
2.7.2. Визначення азоту сечовини в крові дослідних мишей.....	62
2.7.3. Визначення концентрації креатиніну у зразках сечі дослідних мишей.....	62
2.7.4. Визначення концентрації білка в сечі.....	63
2.7.5. Визначення концентрації альбуміну в сечі дослідних тварин....	63
2.7.6. Визначення активності ферменту NAG (N-Ацетил-β-D-глюкозамінідаза) в сечі колориметричним методом.....	63
2.8. <i>In vitro</i> аналіз життєздатності клітин (WST1-метод).....	64
2.9. Молекулярно- біологічні методи.....	64
2.9.1. Виділення та очищення РНК з тканин нирок дослідних мишей.....	64
2.9.2. Проведення реакції зворотної транскрипції.....	66
2.9.3. Проведення полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.....	66
2.10. Гістопатологічні методи.....	67
2.10.1. Методологія гістопатологічного фарбування зрізів тканин нирки- Periodic Acid-Schiff (PAS).....	67
2.10.2. Методологія гістопатологічного фарбування зрізів тканин нирки- Picrosirius Red (PSR).....	68
2.10.3. Гістологічний аналіз і оцінка результатів.....	68
2.11. Імуногістохімічні методи дослідження.....	69
2.11.1. Аналіз імунногістологічних даних.....	69
2.12. Умови провдння імунноферментного аналізу.....	70
2.13. <i>In vivo</i> Аналіз на токсичність новосинтезованих сполук.....	70
2.14. Статистисна обробка результатів.....	71
РОЗДІЛ 3. Результати та їх обговорення.....	72

3.1. Показники запалення та фіброзу в тканинах нирок мишей за умов експериментального відтворення фіброзу нирок.....	72
3.2. Показники запалення та фіброзу в тканинах нирок мишей з моделлю ООС та за введення ігібітора sEH, агоніста PPAR γ , їх комбінації та нової біфункціональної молекули RB394.....	79
3.3. Показники запалення та фіброзу в тканинах нирок мишей з моделлю ООС та за введення нової біфункціональної молекули DM509	107
ЗАКЛЮЧЕННЯ	118
ВИСНОВКИ	126
Список використаної літератури.....	128

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ СКОРОЧЕНЬ

- БРА – блокатор ренін-ангіотензин-альдостеронової системи
- ЕЕТ – епоксиейкозатрієнова кислота
- ЕМП – ендотеліально-мезенхімальний перехід
- ЕТ-1 – ендотелін-1
- ЕЦМ – екстрацелюлярний матрикс
- іАПФ – інгібітор ангіотензинперетворювального ферменту
- ООС – одностороння обструкція сечоводу
- РААС – ренін-ангіотензин-альдостеронова система
- НАЖХП – неалкогольна жирова хвороба печінки
- НАСГ – неалкогольний стеатогепатит
- ТСНН – термінальна стадія ниркової недостатності
- ХХН – хронічна хвороба нирок
- AngII – ангіотензин II
- BUN – азот сечовини крові
- СУР – цитохром Р450
- СОХ – циклооксигеназа
- DM509 – комбінація інгібітора sEH і агоніста FXR рецептора
- EDHF – ендотеліальні фактори гіперполяризації
- sEH – розчинна епоксидгідролаза
- sEHі – розчинний епоксидгідролазний інгібітор
- ENaC – епітеліальні натрієві канали
- FXR – ядерний фарнезоїдний X-рецептор
- 20-НЕТЕ – 20-гідроксіетіксатраєнова кислота
- LOX – ліпоксигеназа
- MTKIs – інгібіторів кінази
- NADPH – нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат оксидази
- PPAR-γ – ядерний гамма-рецептор, що активує проліферацію пероксисом
- RB394 – комбінація інгібітора sEH і агоніста PPAR-γ рецептора

Rosі – розиглітазон

TGF – трансформуючий фактор росту

TZD – тiazолідиндіони

ВСТУП

Актуальність теми. **Актуальність теми.** Хронічна хвороба нирок (ХХН) є стійким і незворотнім пошкодженням структури та функції нирок, що є невиліковним і стосується кожної сьомої людини в світі [1, 2]. Проблема ХХН з медичної та соціальної точок зору обумовлена високою летальністю, інвалідизацією та складністю технічного забезпечення сучасних методів лікування цієї патології. Незалежно від етіології ХХН, ключовою патофізіологічною подією цієї хвороби є нирковий фіброз, який, у свою чергу, є останнім етапом на шляху до прогресування ХХН. Наразі серед широкого арсеналу лікарських препаратів практично відсутні ефективні засоби для попередження розвитку та/або уповільнення темпів прогресування ниркового фіброзу. Препарати, які входять до схем лікування ХХН, в основному належать до стероїдного ряду і характеризуються власною вираженою нефротоксичністю [3], що значною мірою обмежує їхнє застосування. А отже, на сьогодні існує нагальна потреба в пошуку нових мішеней впливу в молекулярному каскаді подій розвитку ниркового фіброзу, для розробки нових та оптимізації існуючих стратегій лікування, спрямованих на запобігання або уповільнення прогресування ниркового фіброзу.

З-поміж інших перспективних мішеней нашу увагу привернув сигнальний шлях арахідонової кислоти, а саме шлях за участі Сур450, що продукує епоксіейкозатрієнові кислоти (EETs), які, у свою чергу, виявляють антигіпертензивні, протизапальні та антифіброзні властивості. Варто відзначити, що інші метаболічні шляхи арахідонової кислоти, що реалізуються за участі циклооксигенази та ліпооксигенази, вже активно використовуються як мішені для розробки нових лікарських засобів [4-6]. Однак шлях Сур450 на сьогодні залишається мало вивченим, хоча результати кількох досліджень довели вплив EET на перебіг патологічних процесів у нирках [7]. На нашу думку, терапевтичні ефекти EET можуть бути посилені за рахунок збільшення її біодоступності, і один із шляхів її підвищення є інгібування деградації EET. Ключовим ферментом

шляху деградації ЕЕТ є розчинна епоксидгідролаза (sEH, КФ 3.3.2.10), яка залучена до перетворення ЕЕТ в менш активну дигідроксиейкозатрієнову кислоту [8-9]. Показано, що інгібування sEH призводило до збільшення рівня ЕЕТ в тканинах і плазмі, потенціювало ефекти ЕЕТ, запобігаючи розвитку фіброзу і запалення нирок в експериментальних моделях ХХН на мишах. А отже, пошук та синтез нетоксичних ефективних інгібіторів sEH становлять важливу складову в процесі розробки новітніх шляхів боротьби з розвитком фіброзу та запалення, як основних чинників патогенезу ХХН. Також заслуговує уваги той факт, що інгібітор sEH запобігає розвитку фіброзу та запалення через активацію ядерних рецепторів PPAR- γ і FXR, які трансактивують ряд генів, залучених до процесу фіброгенезу в різних органах, включаючи нирки [10-11]. Встановлено, що активація PPAR- γ чинить антипроліферативну й антифіброзну дію, що пов'язано з протизапальною активністю [12]. Синтетичні агоністи PPAR- γ , такі як тіазолідиндіони, також продемонстрували захисний ефект при діабетичній нефропатії [13]. Цікавим є факт, що одночасна активація PPAR- γ та інгібування sEH підвищує рівень ЕЕТ. Агоністи FXR також проявляють антифіброзну дію, що було показано на експериментальних моделях захворювань печінки і нирок. Одночасна активація FXR та інгібування sEH підвищувало терапевтичну ефективність при неалкогольному стеатогепатиті за рахунок поєднання антистетозної, атифіброзної та протизапальної дії [14]. Багатообіцяючі результати щодо антифіброзної дії інгібіторів sEH та агоністів рецепторів PPAR- γ та FXR, отримані на різних модельних системах, вони можуть в майбутньому використовуватися для створення нових антифіброзних лікарських засобів. Більше того, створення біфункціональних молекул на основі їх поєднання також представляє значний інтерес на шляху оптимізації лікування ХХН.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідних тем: «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.) та «Біохімічні аспекти

функціонування метаболічних та сигнальних шляхів за дії молекул білкової природи в умовах нормального та патологічно зміненого метаболізму» (№ д/р 0119U100168, 2019-2021 рр.).

Мета і задачі дослідження. Метою даної роботи було вивчити показники запалення та фіброзу за введення інгібітора розчинної епоксидгідролази (sEH) й агоністів ядерних рецепторів PPAR- γ і FXR в нирках мишей на моделі ниркової дисфункції.

Для досягнення поставленої мети досліджень вирішували такі завдання:

1. Відтворити модель односторонньої обструкції сечоводу (ООС) на мишах та оцінити показники розвитку запалення та фіброзу в тканинах нирок дослідних тварин.

2. Оцінити зміни у структурі нирок мишей з моделлю ООС та за умов введення інгібітора sEH й агоністів ядерних рецепторів PPAR- γ і FXR.

3. Визначити рівні експресії генів та вміст ключових маркерів фіброзу в тканинах нирок мишей з моделлю ООС та за умов введення інгібітора sEH й агоністів ядерних рецепторів PPAR- γ і FXR.

4. Дослідити рівні експресії генів деяких маркерів запалення та їх вміст у тканинах нирок мишей з моделлю ООС та за умов введення інгібітора sEH й агоністів ядерних рецепторів PPAR- γ і FXR.

5. Визначити деякі показники окисного стресу у тканинах нирок мишей з моделлю ООС та за умов введення інгібітора sEH й агоніста ядерного рецептора PPAR- γ .

Об'єкт дослідження: запальні та фібротичні процеси нирок у мишей моделлю ООС та за умов введення біофункціональних молекул.

Предмет дослідження: основні показники запалення та фіброзу, маркери окисного стресу, рівень інфільтрації імунних клітин, а також ключові компоненти формування екстрацелюлярного матрикса, рівень ушкодження ниркових каналців та судин у мишей за умов експериментального фіброзу та запалення нирок за дії інгібітора sEH й агоністів ядерних рецепторів PPAR - γ і FXR.

Методи дослідження: біохімічні (вміст гідроксипроліну, азот сечовини, концентрація загального білка, креатиніну, альбуміну, активність N-ацетил- β -D-глюкозамінідази), імуноферментний аналіз (рівень цитокінів, маркерів пошкодження ниркових каналців), молекулярні (рівень експресії генів), гістологічні (визначення структурних змін нирок), статистичні методи дослідження.

Наукова новизна одержаних результатів. Проведено комплексне дослідження показників фіброзу та запалення у мишей з моделлю ООС та за умов використання ниркових антифіброзних та протизапальних агентів – sEH і та агоністів ядерних рецепторів FXR і PPAR- γ . Вперше в якості перспективної терапевтичної мішені для уповільнення процесів розвитку ниркового фіброзу і запалення запропоновано фермент sEH. Перевірено і доведено антифіброзні та протизапальні ефекти агоністів ядерних рецепторів FXR і PPAR- γ на моделі ООС.

Показано і доведено, що інгібування sEH і застосування агоністів PPAR- γ та FXR супроводжуються уповільненням прогресування фіброзу. Було розроблено дві експериментальні молекули – RB394 і DM509, що поєднували у собі структури інгібітора sEH та одного з агоністів – PPAR- γ або FXR, відповідно. У роботі експериментально підтверджено антифібротичні та протизапальні властивості біфункціональних молекул DM509 і RB394. Показано, що за умов введення молекул RB394 і DM509 у мишей з ООС спостерігалось зменшення ушкодження ниркових каналців та судин, а також знижувався рівень маркерів ниркової дисфункції – рівня азоту сечовини в крові та вмісту гідроксипроліну в тканинах нирок, також було відмічено зниження рівня експресії генів прозапальних цитокінів та маркерів окисного стресу. Отримані у роботі результати розширюють уявлення щодо розуміння молекулярно-біохімічних аспектів фіброзу та запального процесу нирок. На підставі отриманих даних можна стверджувати, що нові біфункціональні молекули DM509 і RB394 здатні перешкоджати розвитку пошкодження нирок і, що найбільш важливо, попереджувати розвиток ниркового фіброзу і запального

процесу. А отже, в перспективі можливе застосування даних сполук як антифіброзних засобів при ниркових захворюваннях, що супроводжуються фіброгенезом.

Практичне значення одержаних результатів. Практична значимість основних результатів досліджень, отриманих у ході виконання даної дисертації, полягає у розробці фармакологічних препаратів для профілактики та терапії фіброзу нирок. Отримані результати обґрунтовують доцільність використання нових біфункціональних молекул подвійної дії DM509 і RB394, що є перспективними для терапії фіброзу та запального процесу при ХХН в ниркових тканинах і нами були надані переконливі доклінічні докази їхньої ефективності. Встановлено, що за умов введення молекули RB394 відбулося зниження рівня експресії генів декількох маркерів окисного стресу у нирках. Крім того, результати роботи будуть використовуватися в освітніх цілях кафедри біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем особисто у повній мірі опрацьовано наявну наукову літературу згідно даної теми та проаналізовано сучасний стан проблеми, виконано експериментальні дослідження, проведено комп'ютерну та статистичну обробку отриманих результатів. Здобувач брав участь в обговоренні та написанні наукових статей та матеріалів наукових конференцій. Планування напрямку досліджень, узагальнення частини результатів, редагування дисертаційної роботи та формулювання висновків здійснено разом із науковим керівником.

Апробація результатів дисертації. Основні результати досліджень, що включені до дисертаційної роботи були представлені на 2019 Annual Meeting at Experimental Biology (Орландо, США, 2019), Central Society of Clinical and Translational Science Meeting (Чикаго, США, 2020), Cardiovascular Center Research Retreat (Віскосін, США, 2019), International Eicosanoid Conference (Балтімор, США, 2020), Annual Meeting at Experimental Biology (Сан Дієго, США, 2020).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 12 наукових праць, з них – 5 статей у наукових фахових виданнях (3 публікації у наукових виданнях інших держав та 2 у виданнях України, що включені до міжнародних наукометричних баз даних) та 7 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях, з'їздах та форумах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів дослідження та їх обговорення, узагальнення, практичних рекомендацій, висновків та списку використаних джерел, що включає 182 посилань. Робота викладена на 145 сторінках, містить 36 рисунків та 1 таблиця.

РОЗДІЛ 1

Огляд літератури

1.1. Внесок запалення і ниркового фіброзу в патофізіологію ХХН

Серед основних причин розвитку ХХН виділяють наступні: похилий вік, діабетом, гіпертонією, ожирінням і серцево-судинними захворюваннями з діабетичним гломерулосклерозом і гіпертонічним нефросклерозом. Діабетичний гломерулосклероз характеризується альбумінурією, гіпертонією і прогресуючим зниження ШКФ. Гіпертонічний нефросклероз не має чітко виражених ознак ураження нирок, але після початку зниження ШКФ може спостерігатися висока або нормальна концентрація альбуміну в сечі. Багато пацієнтів з діабетом і ХХН не мають типових особливостей діабетичного гломерулосклерозу і патологічні ознаки гіпертонічного нефросклерозу часто більш важкі, зазвичай через рівень артеріального тиску. У країнах, що розвиваються, загальні причини ХХН пов'язують з гломерулярними і тубулоінтерстиціальними захворюваннями, які виникають у результаті інфекцій та впливу ліків і токсинів [15-16].

В Україні пацієнтів із ХХН у 6–7 разів більше, ніж хворих на цукровий діабет. Згідно з даними за 2010 рік, в Україні 490 тисяч людей мають ХХН, 35 тисяч з них поступово, але невпинно наближаються до термінальної стадії ХХН. ХХН займає 12 місце в списку основних причин смертності. Смерть від ХХН склала 12,2 смертей на 100 000 людей. Згідно з прогнозом Глобальної Обсерваторії Здоров'я (ГНО), у найближчі 15 років буде спостерігатись зниження рівня смертності від ВІЛ-інфекції, але рівень смертності від ХХН буде продовжувати рости і до 2030 року досягне 14 на 100 000 населення [2].

ХХН є однією з основних проблем охорони здоров'я в усьому світі, багато в чому обумовленої зростанням поширеності таких важливих факторів ризику, як діабет і гіпертонія, а також зростанням частки громадян похилого віку. Попередження прогресування ранніх стадій ХХН до замісної ниркової терапії є ключовою проблемною та нагальною потребою в дослідженнях направлених на

встановлення механізмів розвитку патологічного процесу [17]. Розуміння патофізіологічних механізмів, які лежать в основі виникнення, трансформації і прогресування патогенетичних змін у процесі розвитку ХХН, дозволять в найближчому майбутньому розробити більш ефективні і ранні методи діагностики захворювання.

Поширеним патологічним проявом багатьох ХХН є фіброз нирок. Фіброз нирок є гістологічним проявом, що характеризується пошкодженням епітеліальних ниркових клітин з наступною їх заміною екстрацелюлярним матриксом (ЕЦМ), а також супроводжується запаленим процесом в результаті пошкодження епітелію. Розростання інтерстиціальних фіброblastів з подальшою трансформацією міофіброblastов призводить до надмірного відкладення ЕЦМ та фіброзу нирок [18]. Фіброзні зміни можуть відбуватися в клубочках (гломерулосклероз), або в каналцях – тубулоінтерстиціальний фіброз [17,19-21]. Слід зазначити, що гломерулосклероз і тубулоінтерстиціальний фіброз пов'язані з аналогічними клітинними змінами, котрі включають втрату епітеліальних клітин і їх судинного капілярного русла і накопичення активованих міофіброblastів, матриксу і запальних клітин [22-24]. В цілому, гломерулосклероз і тубулоінтерстиціальний фіброз є результатом надмірного відкладення матриксу - типова ознака фіброзного процесу, викликана порушенням рівноваги між синтезом білків ЕЦМ і їх деградацією . ЕЦМ накопичується незалежно від першопричини запалення нирок і сприяє руйнуванню структури і функції нирок [17]. ЕЦМ відіграє подвійну роль при розвитку фіброзу: він формує рубець тканини через синтез колагену (в основному колагену типу I) і він вивільняє різні сигнальні молекули в результаті його деградації [25-26]. У цьому сенсі матриксні металпротеїнази і їх тканинні інгібітори є детермінантами накопичення ЕЦМ [22]. Крім того, Hewitson передбачає, що фіброз може також виникнути в результаті колапсу ниркової паренхіми [22]. Кінцева стадія ХХН часто проявляється наявністю гломерулосклерозу, судинного склерозу і тубулоінтерстиціального фіброзу. Дійсно, гломерулосклероз спочатку пов'язаний з непропорційною продукцією

білків мезангіальних клітин, зниженням позаклітинної протеолітичної активності, що генерується цими клітинами [19]. У зв'язку з цим надлишкове продукування в клубочках важливого цитокіна, такого як трансформуючий фактор росту (TGF), грає ключову роль у розвитку гломерулосклерозу і тубулоінтерстиціального фіброзу, стимулює мезангіальні клітини і, ймовірно, є найбільш потужним стимулятором епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП) [20,25-26]. Важливо відзначити, що ЕМП вважається основною подією в патофізіології фіброзу, включаючи фіброз нирок при ХХН.

Активація TGF- β призводить до осадження матриксу за рахунок збільшення синтезу білка і зменшення деградації матричного білка, що призводить до пошкодження тканини [26]. На підтримку критичної профіброзної ролі TGF- β , зниження цієї цитокінової біоактивності, зменшує відкладення ЕСМ і зменшує розвиток фіброзу в експериментальній моделі ХХН [26]. У нирках, під час патогенезу ХХН, збільшення окисного стресу часто пов'язано з підвищеною мезангіальною експресією TGF- β [23], а також стимуляцією Ang II [24]. Передбачається також, що тубулоінтерстиціальний фіброз прискорює дегенерацію пошкоджених нефронів, і вони можуть заважати сусіднім здоровим канальцям, сприяючи прогресуванню фіброзу нирок [25-26]. Важливо відзначити, що нирковий фіброз грає ключову роль при ХХН, викликаній цими патологічними станами. Дійсно, прогресування ХХН підтверджується втратою ниркових клітин і їх заміною ЄСМ [26-27] в клубочках і ниркових канальцях. У той час як активація міофібробластів дає критичні гістологічні характеристики фіброзу, зниження функції нирок викликається втратою диференційованих епітеліальних клітин [28]. При ХХН ці пошкодження майже неможливо виправити, епітеліальні клітини гинуть у результаті апоптозу, некрозу, аутофагії і виводяться з сечею. Втрата капілярів призводить до зменшення доступності поживних речовин, що посилює пошкодження епітелію [28-29]. Безпосередня роль втрати епітеліальних клітин у розвитку фіброзу найбільше виражено в клубочках, оскільки подоцити не можуть проліферувати або швидко оновлюватися. Коли втрата подоцитів перевищує 20%, зміни стають

незворотними, що призводить до утворення рубців в нирках і різкого зниження їхньої функції [22-25].

Фіброз нирок є результатом різних стадій ХХН незалежно від основної етіології. Незважаючи на безліч перспективних експериментальних даних, доступні в даний час стратегії лікування тільки уповільнюють прогресування ХХН, але не усувають фіброз. В теперішній час проводяться дослідження направлені на розкриття процесів і основних чинників, які призводять до ниркового фіброзу, щоб запобігти його розвитку [26-27, 30]. Результати таких досліджень сприятимуть розробці нових препаратів для ефективного лікування ХХН.

Дослідження на тваринних моделях показують, що неконтрольоване ушкодження епітелію і запалення є основними процесами, які викликають фіброз в нирках. ХХН незалежно від першопричини, характеризуються загальним запальним процесом і активацією імунної системи. Запалення і активація імунної системи є важливими причинними факторами в розвитку ХХН [31]. Передбачається, що для профілактики і лікування ХХН також необхідно усунути запалення, пов'язане із фіброгенезом [31-32].

Неконтрольоване запалення призводить до пошкодження клубочків, каналців і інтерстиціального фіброзу. Ці патологічні процеси на нирки можуть викликати або значно сприяти розвитку ХХН. Запалення, що пов'язане з серцево-судинними захворюваннями і цукровим діабетом призводить до серйозних патологій нирок. Без своєчасного лікування ці захворювання призводять до хронічного нефриту, хронічної ниркової недостатності і, нарешті, до уремії [31-32]. Не дивно, що нові терапевтичні підходи до лікування захворювань нирок зосереджені на імунній системі і запаленні.

Запалення і активація імунної системи є важливими причинними факторами в розвитку ХХН. Імунна система часто обговорюється в контексті двох основних засад, адаптивного і вродженого імунітету. Ці дві складові ланки імунної системи мають відмінні функції, опосередковані різними білковими каскадами, різними імунними клітинами і цитокінами. Хоча вони часто

обговорюються як окремі системи, вроджений і набутий імунітет працюють злагоджено, щоб регулювати загальну функцію імунної системи під дією цитокінів. Дійсно, незалежно від того, задіяний чи вроджений або набутий імунітет, ясно, що запальні цитокіни відіграють центральну роль як медіаторів імунної функції, так і ініціаторів пошкодження нирок при ХХН. Проте, цитокіни відіграють імуномодулюючу роль, що може також запобігти розвитку ниркової недостатності. Як правило, коли цитокіни беруть участь в патогенезі ниркової недостатності, вони вносять свій внесок, активуючи молекули адгезії ендотеліальних клітин і хемокіни, які додатково сприяють проникненню імунних клітин в нирки [31-33]. Крім того, сигнальні шляхи, що активуються багатьма цитокінами, підсилюють активацію NF-κB, транскрипційного фактора, який додатково стимулює прозапальний фенотип. Дійсно, експресія та активація NF-κB підвищується в нирках пацієнтів з ХХН, включаючи гломерулонефрит і діабетичну нефропатію [34-35]. Одним з наслідків цього запального циклу є розвиток окисного стресу, який посилює пошкодження нирок і порушує як функцію ниркових каналців, так і ниркову гемодинаміку. Зміни ниркової гемодинаміки часто виникають у результаті активації запальних цитокінів, які можуть в кінцевому підсумку сприяти ушкодженню нирок. Ниркове запалення відбувається з накопиченням макрофагів і інфільтрації запальних клітин. Пошкодження і запалення в нирках опосередковуються вивільненням запальних цитокінів, таких як інтерлейкіни- IL -1, IL-6, IL-23 і утворення активних форм кисню / азоту, кожен з яких бере участь у порушенні функції нирок [31-35].

Таким чином, імунна система відіграє важливу роль у патофізіології ХХН. Хронічне запалення є ключовим чинником фенотипічного перетворення епітеліальних клітин у фібробласти і фіброз. Як тільки цей процес запущений, він стає прогресивним, приводячи до ХХН з подальшими незворотними наслідками. Розуміння складності цього процесу і дослідження впливу ключових медіаторів запалення може допомогти у визначенні цілей терапії.

1.2. Сучасні засоби лікування ХХН: антифіброзні та протизапальні препарати

Лікування ХХН направлене на уповільнення прогресування різних стадій цього захворювання. Прогресуючі симптоми ниркової недостатності розвиваються дуже повільно. На безсимптомних стадіях ХХН ефективність лікування оцінюється лише за лабораторними показниками. Така природа прогресування ХХН часто ускладнює лікування ХХН, оскільки зазвичай являє собою пізню спробу профілактики. Таким чином, лікування ХХН часто є прикладом третинної профілактики в групах населення, які не пройшли перші етапи профілактики, але у яких все ще залишається відносно безсимптомний стан. Особливості патогенезу різних стадій ХХН виявляють складні завдання перед науковцями і лікарями в розробці терапії в клінічній практиці. За останні 20 років були розроблені певні ефективні методи лікування ХХН. Вибір схеми лікування ХХН як окремого патологічного процесу залежить від ефективності терапії ряду первинних захворювань. Це говорить про те, що існують загальні фізіологічні шляхи, які лежать в основі прогресування ХХН, незалежно від ініціювання пошкодження нирок [36-40].

Ефективна профілактична політика залежить від точного розуміння захворюваності та поширеності ХХН. Відомі на даний час варіанти лікування широко поширені серед пацієтів з ХХН, тому що вони є відносно недорогими і безпечними. Сучасні методи лікування ХХН розроблені на основі розуміння деяких загальних аспектів патофізіології ХХН. На даний час, залежно від клінічного випадку, до схем терапії можуть включатись етіотропні препарати для лікування ХХН, препарати для уповільнення прогресування ХХН, препарати для профілактики та лікування ускладнень ХХН, засоби для лікування супутніх захворювань і профілактики захворювань системи кровообігу, засоби замісної терапії. Розроблені різні класи препаратів, які знайшли своє застосування при ХХН: інгібітори ангіотензинперетворювального ферменту (іАПФ); блокатори рецепторів ангіотензину II (БРА); вазодилатуючі блокатори β -

адренорецепторів; селективні блокатори повільних кальцієвих каналів; діуретики [41]. Включення до схеми лікування ХХН нових препаратів стало можливим після попередніх досліджень із використанням лабораторних тварин. Результати серії досліджень навели докази ефективності інгібування АПФ при лікуванні ХХН [42]. Важливо відзначити, що інгібітори АПФ і БРА є стандартними лікарськими засобами для первинної гіпертонії. Однак кожен з них по своєму ефективний в уповільненні прогресування ХХН [41-43]. У дослідженнях, найбільш вивчений вплив цих агентів при лікуванні діабетичної нефропатії. При цукровому діабеті 1 і 2 типів, уповільнення швидкості прогресуючого ураження нирок за допомогою інгібування ренін-ангіотензин-альдостеронової системи (РААС) тісно пов'язане зі стабілізацією або зниженням протеїнурії. Ці результати були продемонстровані у пацієнтів з мікроальбумінурією і макроальбумінурією [41-43]. У наукових публікаціях наведені дані, які свідчать про ефективність пригнічення РААС при недіабетичних захворюваннях нирок у пацієнтів з протеїнурією 41000 мг/день [44-45]. Переваги інгібування РААС у пацієнтів з захворюванням нирок без протеїнурії менш очевидні. При деяких хворобах, таких як аутосомно-домінантна полікістозна хвороба нирок, інгібітори АПФ і БРА можуть бути малоефективні або неефективні, незважаючи на помітне зниження протеїнурії [45-47]. Хоча деякі автори стверджують, що протеїнурія має прямі токсичні ефекти, в даний час немає єдиної думки про те, що наявні докази чітко встановлюють роль причини і наслідків [46-48]. З цієї причини значення протиїнурійних властивостей інгібіторів АПФ і БРА залишається не з'ясованим.

На протипагу наведеному вище, розглядаються два загальноприйнятих механізма, за допомогою яких інгібітори АПФ і БРА вважаються корисними препаратами при ХХН: гемодинамічна/антигіпертензивна дія і протизапальна/антифіброзна дія. Зниження рівня ангіотензину II (AngII) (і подальше зниження рівня альдостерону) є центральним для обох цих шляхів. При моделюванні ХХН на лабораторних тваринах у останніх спостерігається підвищений тиск у клубочкових капілярах. Останні дослідження показали, що

інгібітори АПФ і БРА впливаючи на AngII знижують капілярну гіпертензію, зменшуючи артеріальний перфузій тиск і розслабляючи еферентну артеріолу [49-50]. Полегшення від цього надмірного капілярного тиску, ймовірно, запобігає проліферації мезангіальних клітин і продукції матриксу, а також втраті подоцитів [49]. Після опису позитивних гемодинамічних ефектів, дослідники почали розглядати РААС як прозапальний і профібротичий медіатор. AngII, який у нирках виявляється у високій концентрації, активує NF- κ B, активує молекули адгезії і може безпосередньо стимулювати проліферацію лімфоцитів. AngII може також сприяти розвитку фіброзу за рахунок взаємодій з TGF- β і індукції білків позаклітинного матриксу, таких як проколаген типу I, фібронектин і колаген типу IV [50]. Крім того, припускають, що альдостерон безпосередньо пов'язаний і бере участь у механізмах ендотеліальної дисфункції, запаленні і фіброзу [51]. Використання інгібіторів АПФ і БРА є важливими факторами в уповільненні прогресування ХХН. Оскільки інгібітори АПФ і БРА окремо діють повільно, виникає питання про те, чи буде їхня комбінація більш ефективною. Ця проблема не була остаточно вирішена. В ранньому звіті з дослідження COOPERATE стверджувалося, що комбінація перевершує ефективність окремих препаратів [52]. Однак ці результати і їх аналіз були поставлені під сумнів і відкликані [53-56].

Альдостерон сприяє поряд з AngII несприятливим діям РААС при різних стадіях ХХН. Визнання побічних ефектів альдостерону призвело до спроб вибірково блокувати його за допомогою блокаторів мінералокортикоїдних рецепторів [57]. Велика кількість досліджень на експериментальних тваринах підтвердила ефективність цього підходу. Кілька випробувань у пацієнтів з ХХН показали зниження протеїнурії, коли до інгібітору АПФ або БРА був доданий інгібітор альдостерону [57-58]. Однак поки що немає достатньо великого дослідження, щоб оцінити вплив альдостерону на зниження ШКФ. Більш того, при застосуванні данної схеми, частіше зустрічається гіперкаліємія. Таким чином, немає достатніх даних, щоб рекомендувати додавання блокаторів альдостерону до стандартної схеми терапії при ХХН.

Інгібування реніну є ще одним засобом переривання РААС. Додавання інгібітора реніну до БРА зменшувало протеїнурію при діабетичній нефропатії [57]. Досліджувана комбінація препаратів не проявляла додаткових побічних ефектів. В даний час проводиться більш масштабне і тривале випробування для визначення ефективності додавання інгібітору реніну до інгібіторів АПФ або БРА з дослідженням серцево-судинних і ниркових маркерів захворювання [57-59]. Таким чином, комбінація РААС з інгібіторами АПФ або БРА довела свою ефективність в уповільненні прогресування ХХН. Проте, незважаючи на появу нових препаратів, зокрема таких як інгібітори АПФ і БРА, сучасні схеми лікування ХХН не дозволяють ефективно боротись з цією проблемою у багатьох пацієнтів. ХХН як і раніше асоціюється з високою захворюваністю і смертністю, що чітко вказує на необхідність впровадження нових методів лікування.

1.2.1. Нові препарати для лікування ХХН, які перебувають стадії клінічних випробувань

Пірфенідон - це синтетична молекула з антифіброзним властивостями, яка з'явилася в якості багатообіцяючого перорального лікування ХХН. Хоча точний механізм дії невідомий, ефекти пірфенідона, ймовірно, опосередковані шляхом блокування шляху TGF- β [60]. Культури мезангіальних клітин, оброблені пірфенідоном, показали зниження продукції TGF- β , антагонізм передачі сигналів TGF- β , інгібування TGF- β -індукованої генерації активних форм кисню і зниження TGF- β -опосередкованої продукції матриці. У мишей з діабетичною нефропатією, пірфенідон, значно зменшував розширення мезангіального матриксу незалежно від змін альбумінурії або рівня глюкози в крові. Аналогічні результати були виявлені на моделях постадаптивного фокального сегментарного гломерулосклерозу у щурів [61]. Клінічні випробування показали обнадійливі результати застосування пірфенідона в лікуванні різних ниркових фіброзних захворювань, а також в цирозу печінки, розсіяного склерозу і фіброзу легень [62-64]. У випадку пацієнтів з гломерулярною ХХН пірфенідон також

продемонстрував позитивний ефект у [65]. В цілому, ці результати є багатообіцяючими і вселяють надію щодо появи нового препарату для лікування ХХН.

Бардоксолон-метил є першим представником нового класу антиоксидантів модуляторів запалення. Бардоксолон-метил та інші антиоксидантні модулятори запалення активують NFE2L2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2), який контролює понад 250 цитопротективних білків [66]. Кінцевим результатом є інгібування іммуноопосередованного запалення на рівні тканин, яке може захистити від пошкодження органів. Результати нещодавно завершеної фази ІІв клінічних випробувань показали, що бардоксолон метил здійснює позитивний вплив на прогресування ХХН [66]. Протягом 24 тижнів пацієнти, які отримували 25, 75 або 150 мг бардоксолону метилу, мали статистично значиме збільшення середнього значення ШКФ в порівнянні з пацієнтами, які отримували плацебо. Подальше спостереження показало, що ці переваги зберігалися протягом 52 тижнів. Хоча ця молекула показала деяку користь у пацієнтів з ХХН, але вона має кілька небажаних побічних ефектів. Небажані явища, такі як м'язові спазми, нудота, гіпомагніємія та зниження апетиту, спостерігаються у пацієнтів, які отримують метил бардоксолон. Таким чином, зробили припущення, що цей препарат може дійсно поліпшити ШКФ при ХХН, але для підтвердження його ефектів необхідні більш тривалі дослідження з великими групами пацієнтів.

Антагоністи Ендотеліну-1 представляють собою ще один клас потенційних препаратів для лікування ХХН. Ендотеліни – це група споріднених пептидів з потужними вазоконстрикторними властивостями. ET-1 бере участь в патогенезі гіпертонії, а ще окрім підвищення кров'яного тиску, за рахунок звуження судин, ET-1 також сприяє регуляції рівнів натрію і води в нирках. Щодо судинної мережі нирок, ET-1 викликає ендотеліальну дисфункцію і ремоделювання судин, які часто зустрічаються при гіпертонії [67]. ET-1 сприяє нирковій дисфункції через безліч механізмів, включаючи артеріальну вазоконстрикцію, клубочкову гіпертензію, підвищену протеїнурію і інтерстиціальний фіброз. Отже, інгібування ET-1 вивчається як потенційна

мішень при лікуванні ХХН. Дослідження на тваринах показали підвищення рівня ET-1 в моделі субтотальної нефректомії при ХХН [67]. Лікування антагоністом ET-1 в цих моделях показало не тільки зниження протеїнурії, але і поліпшення CrCl [67-68]. Ці багатообіцяючі результати підтвердили правильність концепції і привели до випробувань на людях. В одному дослідженні антагонізм рецептора ендотеліну типу А (ET-A) покращував нирковий кровообіг і зменшував нирковий судинний опір у пацієнтів з ХХН [67-68]. Ці препарати ще не довели явної ефективності для лікування ХХН, але, з огляду на багатообіцяючі експериментальні дані, в найближчому майбутньому, ймовірно, буде проведено більше клінічних випробувань.

1.3. Перспективні препарати і недавні дослідження для нової терапії ниркового фіброзу

При ХХН дуже важливим чинником збереження ниркової функції є контроль патологій, що лежать в основі ХХН [19]. У людей порушення функції нирок, що викликане фіброзом, зазвичай відбувається через багато років після появи діабету або рецидивуючих інфекцій. Хоча неможливо відтворити цей етап у дослідженнях на тваринах, використання моделей лабораторних тварин з нирковим фіброзом дозволяє оцінити ефективність лікарських засобів, а також вивчити патогенез цього захворювання [69]. Проте, не всі позитивні результати застосування як моно, так і комбінованих схем блокування фіброзного процесу у лабораторних тварин відтворюються на людях. Нирковий фіброз являє собою складний процес, що запускає пошкодження нирок через окислювальний стрес, запалення і різні ефекторні молекули, які, в свою чергу, запускають клітинні реакції, такі як: апоптоз епітеліальних клітин каналців, активація фібробластів і переключення фенотипу фібробластів на міофібробласти з формуванням в подальшому ЕЦМ [69-70]. Лікування, спрямоване на пригнічення системи РААС, що відбувається з використанням двох типів ліків: інгібіторів АПФ і антагоністів рецепторів ангіотензину, є надзвичайно ефективним для зниження протеїнурії, прогресування ХХН і ниркового фіброзу у людей та

експериментальних тварин [17,20-21]. Дійсно, Ang II є основним медіатором у патогенезі захворювань нирок [38]. Використання більш високих доз цих двох препаратів може більш ефективно зменшити фіброз [70], і переваги цього лікування не залежить від зниження артеріального тиску [44-45]. Одним з факторів, що призводять до цих ефектів при блокуванні системи ренін-ангіотензин, дійсно є зниження активності TGF- β [19,25], а також факторів росту тромбоцитів і PAI1 [71]. У дослідженні, проведеному на людях, лозартан, блокатор рецепторів Ang II, зменшував PAI1 у реципієнтів ниркового трансплантата, пролікованих циклоспорином. Блокування Ang II і зменшення PAI1 можуть бути важливою дією в запобіганні ниркового фіброзу [57-58,71].

В даний час інгібування Ang II вважається найбільш ефективною терапевтичною інтервенцією для запобігання або зменшення розвитку більшості захворювань нирок [71]. Хоча пригнічення АПФ має широко визнані клінічні переваги при розвитку ниркового склерозу, воно є не однаково ефективним на різних стадіях ниркового фіброзу. На ранніх стадіях склерозу таке лікування є більш ефективним, ніж на його пізніх стадіях [21]. Лікування екстрактом *Rehmannia glutinosa* ригнічує прогресування гломерулосклероза за рахунок зниження експресії мРНК TGF- β і накопичення колагену типу IV і, ймовірно, запобігає інтерстиціальному фіброзу і інфільтрації мононуклеарних клітин [72]. Пірфенідон, антифібротична молекула, послаблює нирковий фіброз в моделі ООС, знижуючи рівень TGF- β і синтез колагену в нирковій тканині, що дозволяє припустити, що пірфенідон може застосовуватися для уповільнення прогресування ниркового фіброзу [60-61,73]. Проте, не дивлячись на той факт, що анти-TGF- β -терапія пов'язана з уповільненням розвитку ниркового фіброзу [19,74], його слід обережно застосовувати для регресії ниркового фіброзу, оскільки TGF- β бере участь в гломерулярній системі самозахисту, яка обмежує запалення при пошкодженнях нирок [75]. З іншого боку, комбінація антитіл до TGF- β з інгібіторами АПФ забезпечує більш виражені захисні ефекти, ніж монотерапія. Ці ефекти проявляються у нормалізації артеріального тиску, зниження протеїнурії, регресії гломерулосклероза і пошкодження капілярів у

щурів [74-75]. Блокада рецептора кініну V1 є ще однією багатообіцяючою антифіброзною терапією при нирковому фіброзі на тваринних моделях обструктивної нефропатії [19,76]. В іншому дослідженні було підтверджено, що терапевтична комбінація мікофенолату мофетилу (імунодепресанта) і беназапріла (інгібітора АПФ) була більш ефективна при лікуванні фіброзу нирок, ніж мікофенолату мофетилу та беназапріла окремо у щурів з 5/6 нефректомією [72]. Лікування фауділом, специфічним інгібітором Rho-кінази, значно поліпшило ідукований альдостероном фіброз нирок і збільшило експресію колагену, TGF- β і CTGF (connective tissue growth factor), а також активність SMAD2/3 в нирках щурів, які перенесли праву унінефректомію [74-75]. В іншому дослідженні побічні ефекти альдостерону були зменшені попередньою обробкою антагоністом мінералокортикоїдного рецептора і інгібітором Rho-кінази [76-78]. Цей тип дослідження з комбінацією двох або більше препаратів показав більш ефективні результати в декількох моделях фіброзу нирок, і його слід розглядати як потенційне лікування. Проте, необхідні подальші дослідження на тваринах моделях, щоб підтвердити, можливість застосування блокаторів TGF- β і альдостерону або інших препаратів для боротьби з прогресуванням фіброзу нирок.

Yang F і його колеги показали, що здатність блокувати SMAD3, але не SMAD2, і пригнічувати опосередкований Ang II CTGF і фіброзні відповіді, також може бути альтернативною терапією для запобігання прогресування фіброзу нирки [79]. Представляється можливим пригнічувати відкладення матриксу та розвиток ниркового фіброзу шляхом блокування експресії CTGF без впливу на експресію TGF- β . В іншому дослідженні було продемонстровано, що міРНК до CTGF блокує ЕМП у щурів з трансплантацією нирки, які перенесли хронічну нефропатію алотрансплантата [79-80]. Інгібування CTGF можна вважати потенційною терапією для запобігання фіброзу нирок.

Активний вітамін D і його аналоги зменшують нирковий фіброз, уповільнюючи розвиток гломерулосклерозу і інтерстиціального фіброзу. Дослідження проведені на різних лабораторних тваринах і за різних

патологічних станів показали, що активний вітамін D здійснює різні функції: регулювання ренін-ангіотензинової системи та протизапального процесу, захист подоцитів, індукування фактора росту гепатоцитів, збереження каналцевого епітелію шляхом блокування ЕМП. Таким чином, додаткове лікування активним вітаміном D може покращити функціонування нирок у людей з ХХН [81].

Лікування вітаміном E значно знижувало гломерулосклероз та ступінь пошкодження структури нирок у щурів з 5/6 нефректомією [72,82-83]. Можливо це пов'язано з тим, що вітамін E послаблює зростання вмісту клубочкового і мезангіального діацилглицерину, який опосередковує активацію протеїнкінази C (первинного медіатора ниркової дисфункції у діабетичних щурів). Лікування вітаміном E також послаблює клубочкову і мезангіальну активність TGF- β .

Рубоксістаурін, препарат, який пригнічує протеїнкіназу C, був випробуваний на діабетичних щурах, і було виявлено, що він здатний знижувати експресію мРНК TGF- β і в деякій мірі пригнічувати гломерулосклероз [83-84]. В іншому дослідженні Wang з колегами показали, що формула Fuzheng HuaYu, препарат на основі лікарських рослин і вітамін E чинять інгібуючу дію на фіброз нирок шляхом зміни тубулярного ЕМП при нирковому інтерстиціальному фіброзі, індукованим HgCl₂ у щурів. Крім того, формула Fuzheng HuaYu безпосередньо знижувала TGF- β -індукований ЕМП в епітеліальних клітинах проксимальних каналців нирок. Ця дія, ймовірно, посилюється, принаймні частково, за рахунок зниження фосфорилування SMAD2/3 [83]. Дійсно, схоже, що у щурів вітамін E має захисну дію на індукований HgCl₂ нирковий інтерстиціальний фіброз [82-84].

Галофугінон, інгібітор колагену I, показав позитивний результат- зниження прогресування ниркового фіброзу на експериментальній моделі 5/6 видалення ниркової маси. Цей ефект не залежав від змін артеріального тиску [85]. NF κ B може прямо і побічно стимулювати клітинні рекції, що призводять до фіброзу тканин. Механізми протидії регуляції, що викликаються цитокінами, які блокують активацію NF κ B, можливо, можуть запобігти виникненню/прогресуванню захворювання нирок. Інші види лікування можуть

стосуватися інгібування активності NADPH-оксидази, важливого медіатора ниркового фіброзу. Використання агентів з антиоксидантними властивостями, має очевидні переваги в регресії ниркового фіброзу у щурів з нефропатією [34-35,86].

Позаклітинні фактори і внутрішньоклітинні медіатори, які контролюють ЕМП, були визнані в якості можливих альтернатив у боротьбі з прогресуванням ниркового фіброзу. Shin і співавт. припустили, що лікування низькомолекулярними активаторами, специфічними для ядерного фактора E2 (NRF2), може бути альтернативною терапією для профілактики або регресії процесу фіброзу ЕМП [86].

Рецептор колагену: рецептор діскоїдінового домену 1 бере участь в патогенезі синдрому Альпорта, ниркового запалення і фіброзу. Пригнічення цього рецептора, ймовірно, являє собою нову терапевтичну стратегію контролю прогресування фіброзу нирок в майбутньому. Нефропротективний ефект втрати DDR1 може бути пов'язаний із заниженою регуляцією профібротичних цитокінів TGF- β і CTGF [80,86].

Хетомелова кислота А (Chaetomelic acid A), селективний інгібітор фарнезилування HRAS [87], протестований на мишах з ООС, зумовив багатообіцяючу реверсію ниркового фіброзу [87-89]. Крім того, інша дослідницька група продемонструвала, що гальмування активації RAS за допомогою хетомелінової кислоти А може стати майбутньою стратегією в профілактиці ниркового фіброзу [90]. Альтернативним лікуванням ниркового фіброзу може бути використання стовбурових клітин або клітин-попередників для лікування або відновлення функції пошкодженої нирки. Цей тип лікування дозволяє не тільки зупинити прогресування захворювання, але і відновити ниркові функції, однак існує необхідність у підтвердженні механізмів дії стовбурових клітин або клітин-попередників. В даний час вважається, що культивовані клітини з особливостями диференціювання клубочкового епітелію мають неабиякий вплив на розвиток ушкодження нирок внаслідок впливу білків

плазми на функцію подоцитів. Таким чином, білки, крім простого індикатора ниркового пошкодження, можуть бути токсичними для нирок [90].

За допомогою конфокальної мікроскопії останнього покоління і за допомогою комп'ютерних програм можливо виявити відмінності в організації клубочкової мережі, які виникають під час регресії склерозу, що дозволяє ідентифікувати зміни в клітинній і генній експресії. Незважаючи на прогрес, досягнутий в декількох дослідженнях з різними видами лікування і лікарськими засобами, в даний час не існує ліків для ефективного лікування ниркового фіброзу [90-91].

1.4. Використання арахідонової кислоти для розробки ліків проти ХХН

В останні роки пропонуються різні стратегії для розробки препаратів проти ХХН. Однією з них є створення сполук, дія яких направлена на різні ліпіди і жирні кислоти. Арахідонова кислота - це жирна кислота, з утворенням кількох метаболітів, відомих як ейкозаноїди. Арахідонова кислота метаболізується ключовими ферментами до низькомолекулярних медіаторів з різноманітними патофізіологічними ефектами.

Відомо три основні ферментативні шляхи арахідонової кислоти: шлях циклооксигенази (COX), шлях ліпоксигенази (LOX) і шлях P450 (CYP). Загалом розроблено кілька фармакологічних препаратів, мішенню дії яких є ферменти, котрі метаболізують арахідонову кислоту, метаболіти ейкозаноїдів і рецептори ейкозаноїдів [5].

Дотепер успішно застосовуються лікарські засоби, здатні впливати на шляхи COX і LOX при таких патологічних станах як біль, запалення, астма і згортання крові [5-6, 92-94]. Фармакологічні препарати, дія яких спрямована на шлях CYP, були розроблені зовсім недавно. Проте, хоча декілька представників цього класу препаратів пройшли клінічні випробування, жоден з них ще не був

затверджений для використання у медичній практиці [5-6, 92-95]. На рис.1.4.1. показані можливі мішені дії потенційних препаратів на різні шляхи ейкозаноїдів.

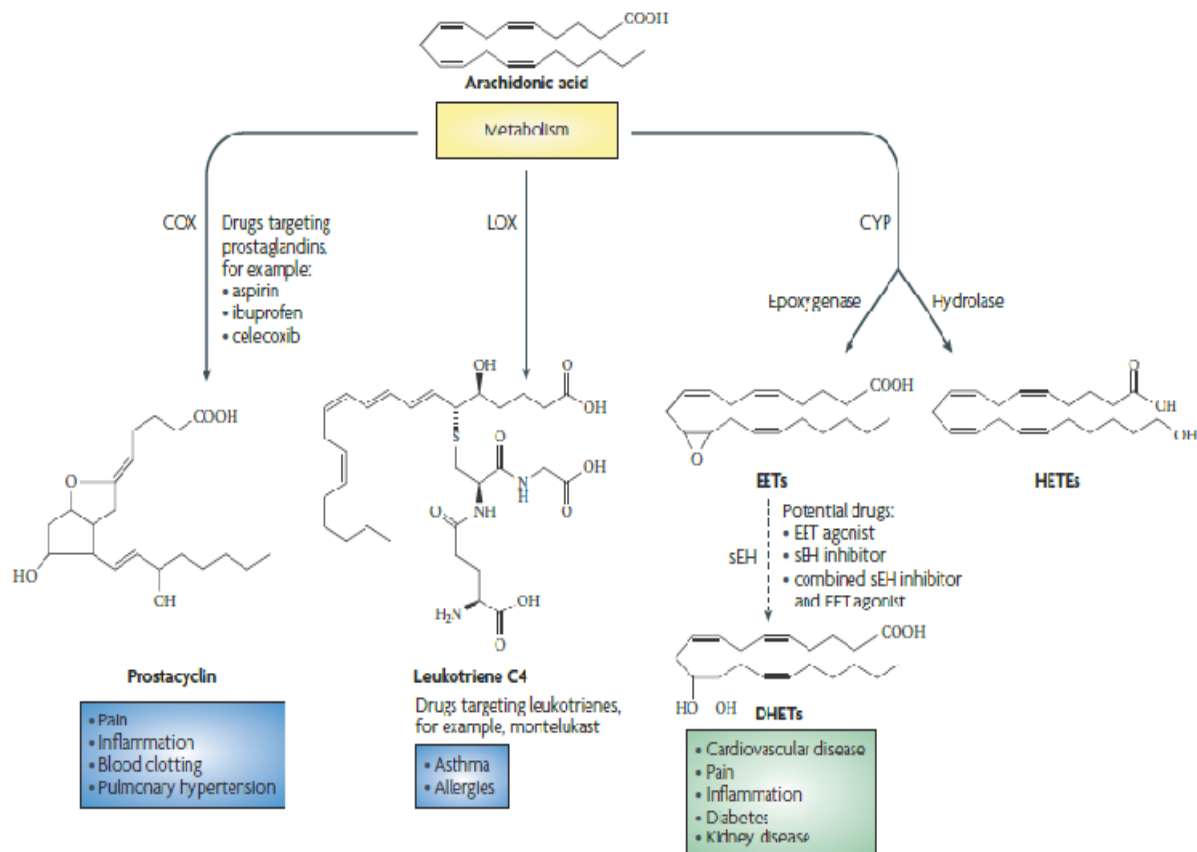


Рис. 1.4.1. Терапевтичні мішені каскаду арахідонової кислоти [93]

Ферменти цитохрому Р (СУР)-450 мають два основних шляхи: епоксигенази (в основному СУР2С і родина ферментів СУР2J) метаболізують арахідонову кислоту до чотирьох біоактивних епоксиейкозатрієнових кислот (ЕЕТs; 5,6-ЕЕТ, 8,9-ЕЕТ, 11,12-ЕЕТ і 14,15-ЕЕТ) і омега-гідроксилаз, що метаболізують арахідонову кислоту в 20-гідроксиейкозатетраєнову кислоту (20-НЕТЕ). Метаболізм арахідонової кислоти ферментами СУР призводить до утворення метаболітів епоксигенази і гідроксилази. Метаболіти епоксигенази виробляються ферментами СУР2С або СУР2J, а гідроксилазаметаболіти - ферментами СУР4А або СУР4F [7,95-97]. Вплив цих ейкозаноїдних метаболітів

СУР на ниркову і серцево-судинну систему був ретельно досліджений. Деякі з цих метаболітів мають позитивний вплив, в той час як інші сприяють розвитку патологічних процесів. EETs мають позитивні функції в підтриманні здоров'я нирок і серцево-судинної системи. Розчинна sEH є ферментом, відповідальним за перетворення EET в діоли, у яких відсутня загальна корисна біологічна активність, притаманна EET [6-7,98-99]. З іншого боку, метаболіт гідроксилази, 20-гідроксиетіксатраєнова кислота (20-НЕТЕ), має побічні дії і може сприяти розвитку захворювань нирок і серцево-судинної системи [100].

Ферменти цитохрому Р (СУР)-450 метаболізують арахідонову кислоту до епоксиейкозатрієнових кислот (EET) і 20-гідроксиейкозатетраєнових кислот. Ці ейкозаноїди регулюють артеріальний тиск, тонус судин і транспорт натрію нирковими каналцями при фізіологічних і патофізіологічних станах.

Було розроблено ряд фармакологічних засобів, які пригнічують ферменти СУР епоксигеназу, СУР гідроксилази і sEH. Кілька нових сполук, які діють як антагоністи і міметики метаболітів EET і 20-НЕТЕ, також були синтезовані, і ретельно досліджені [99-103]. Було показано, що міметики EET і інгібітори sEH протидіють захворюванням нирок і захворюванням серцево-судинної системи, і їхній потенціал у якості терапевтичних засобів був досліджений на тваринних моделях [7]. EETs продукується в багатьох тканинах, включаючи нирки, серце, легені та печінку, а також володіють протизапальними і іншими захисними ефектами на нирки. EETs діють як ендотелій-залежні гіперполяризовані фактори регулюючи мікроциркуляцію в нирках, що опосередковують вазодилатація, на додаток до регуляції води в ниркових каналцях і абсорбція натрію. З іншого боку, 20-НЕТЕ звужує аферентні артерії і бере участь в ауторегуляції ниркового кровотоку.

Результати багатьох досліджень свідчать, EETs відіграють важливу фізіологічну роль при розвитку захворювань нирок, таких, як діабетична нефропатія [98]. У нирці рівні EET регулюються ферментами СУР2С, формуються в епітеліальних клітинах каналців. Ферменти СУР2С також виробляються в ендотеліальних клітинах, щоб продукувати EET, які діють як

ендотеліальні фактори гіперполяризації (EDHF). EET метаболізуються за допомогою sEH, який має спорідненість в ранговому порядку для EET з 14,15-EET > 11,12-EET > 8,9-EET > 5,6-EET [97, 101-103] (рис.1.5.2).

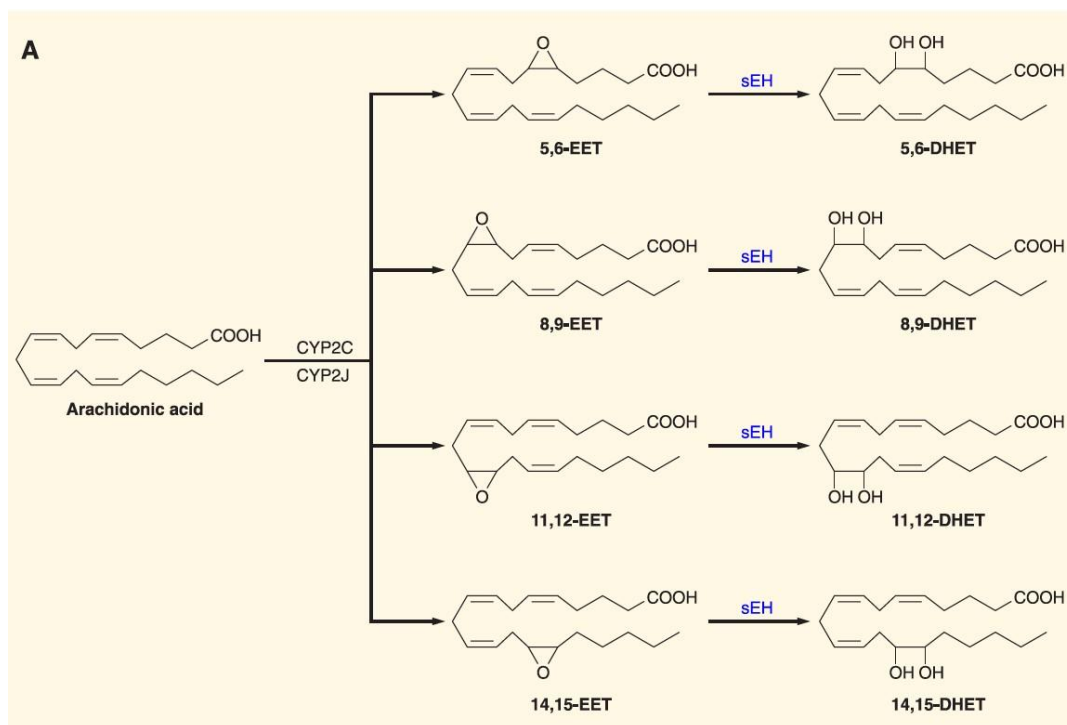


Рис. 1.4.2. Метаболічний шлях епоксигенази цитохрому Р-450 (СУР) [97]

Крім того, 8,9-EET і 5,6-EET можуть метаболізуватися СОХ шляхом, і цей метаболічний шлях був чітко продемонстрований в клубочках нирок [6]. Регуляція ферментативної активності і специфічних метаболітів епоксидних жирних кислот впливає на ниркову і серцево-судинну функцію в нормі та при патології.

Результати досліджень на тваринах із нирковими і серцево-судинними захворюваннями, а також дослідження на людях, свідчать про можливість застосування EETs у якості терапевтичної мішені. Експериментальні дослідження на тваринах дали змогу оцінити ферментативну експресію СУР2С, СУР2J і sEH, рівні метаболітів епоксигенази і роль EET [89-93]. Дані, отримані на тваринах із модельованими захворюваннями нирок, вказують на важливу роль EETs і sEH у пошкодженні ниркових судин і епітеліальних клітин [4,101-105].

Перші докази підвищення активності sEH і зниження EETs в пошкоджених нирках, були виявлені при ангіотензин-залежній гіпертензії у щурів [4,104]. Ці дослідження також виявили, що підвищення рівня EETs за допомогою інгібіторів sEH зменшувало запалення і пошкодження нирок незалежно від зниження кров'яного тиску [104-106]. Також було встановлено, що діабетична нефропатія включає підвищену експресію sEH і знижені рівні EET як фактори, які сприяють прогресуючому пошкодженню нирок. Гостре пошкодження нирок, нефротоксичність, викликана лікарськими засобами, і обструктивне фіброзне захворювання нирок супроводжуються зниження рівнів EETs, за рахунок їх деградації ферментом sEH, що має пряму кореляцію із пошкодження нирок [8-9, 107-109]. Зниження рівня EET при реперфузії ниркової ішемії, гострому пошкодженні нирок сприяють дисфункції ендотелію і апоптозу епітелію [110-113]. Стрес ендоплазматичного ретикулюму є ключовим сигнальним механізмом у клітинах ниркових каналців, який підвищується при більш низьких рівнях EET при нефротоксичності, викликаній лікарськими засобами цисплатину [113-114]. Підвищена активність sEH і знижені рівні EET при ОСС сприяють запаленню і опосередкованому ЕМП і з подальшим розвитком фіброзу нирки [9,111,114]. Отримані на тваринних моделях дані стосовно зниження рівнів EETs на фоні підвищеної активності sEH при розвитку ниркових і серцево-судинних захворювань, свідчать на користь розробки терапевтичних засобів, спрямованих на підвищення рівнів EET. Слід відзначити, що результати наших досліджень узгоджуються з дослідженнями інших авторів і демонструють можливість збільшення біодоступності EET шляхом пригнічення sEH при екзогенному введенні міметика EET. Збільшення біодоступності EET може запобігти розвитку фіброзу нирки.

1.5. Розробка біфункціональних молекул, спрямованих на каскад арахідонової кислоти і ядерних рецепторів

У традиційних схемах розробки нових лікарських препаратів переважає підхід використання мішені з одним білком для лікування одного захворювання за допомогою одного хімічного об'єкта. Такі препарати мають високу селективність і ефективність щодо своїх специфічних мішеней. У сучасному терапевтичному світі цей підхід буде залишатися основною стратегією розробки ліків. Проте, слід зазначити, що цей єдиний цільовий підхід до розробки лікарських засобів має свої недоліки, включаючи нецільові і несприятливі наслідки, і вказує на необхідність альтернативного підходу до розробки лікарських засобів. Альтернативним підходом до розробки ліків може бути розробка молекул, які можуть бути націлені на кілька мішеней.

Багатоцільові препарати [115] також відомі як сконструйовані множинні ліганди [116] або гібридні молекули [117] з'явилися в якості стратегії для подолання вище вказаних проблем. Поліфармакологія особливо корисна для лікування складних захворювань, таких як запалення, рак і метаболічний синдром [118]. Кількість новостворених препаратів на основі малих молекул зменшується через успішну розробку біологічних препаратів, таких, наприклад, як препарати для імунотерапії раку [118-119]. Проте, кількість схвалених FDA ліків, які взаємодіють з багатоцільовими об'єктами, зростає. Однією з причин такого зростання є схвалення інгібіторів панкінази для лікування деяких видів раку, які несприйнятливі до монотерапії через характер захворювання. Багатокомпонентні лікарські засоби спрямовані на підвищення їх ефективності шляхом вирішення більшої кількості завдань, пов'язаних із захворюванням. Адитивні або синергетичні ефекти багатоцільових ліків також дозволяють знизити ефективну дозу, що, в свою чергу, зводить до мінімуму побічні ефекти. Деякі лікарські засоби з однієї мішенню можуть мати побічні ефекти (цільова токсичність), які обмежують їх ефективні дози. Вони можуть потенційно бути пом'якшені за допомогою включення вторинної сполуки, яка послаблює побічний ефект. Розчинна sEH являє собою фермент в каскаді арахідонової кислоти, який бере участь у деградації метаболітів епоксиду, що утворюються при дії цитохрому P450 на арахідонову кислоту (епоксіейкозатрієнова кислота

або EET) та інші ненасичені жирні кислоти, такі як ейкозапентаєва кислота та докозагексанова кислота [4,103-104]. Було показано, що гальмування sEH, а отже, підтримання титрів ендогенних метаболітів епоксидних жирних кислот є корисним при різних патологіях. У цій роботі ми сфокусувалися на нещодавніх відкриттях подвійних інгібіторів/модуляторів, які раціонально призначені для одночасного інгібування sEH як однієї з їхніх численних мішеней, а також ролі цих сполук при різних захворюваннях. Дійсно, було розроблено кілька підходів для одночасного націлювання на sEH поряд з іншими мішенями у каскаді арахідонової кислоти. Кілька каскадів-мішеней арахідонової кислоти, таких як циклооксигенази, ліпооксигенази і білки, що зв'язують жирні кислоти, були використані для конструювання і розробки багатоцільових молекул. Розглядаються також підходи для розробки багатоцільових молекул, які націлені на sEH і ядерні рецептори, такі як рецептори, котрі активують проліферацію пероксисом- PPAR і агоніст фарнезоїдного X рецептора- FXR.

У науковій літературі описується взаємодія між ефектами, опосередкованими EETs, і передачею сигналів рецепторами, що активують PPAR [120]. PPAR належать до родини ядерних рецепторів, які представляють собою групу білків трьох типів (α , β/δ , γ) з диференціальною тканинною експресією. Ці білки діють як фактори транскрипції, регулюють експресію генів і активуються жирними кислотами і ейкозаноїдами. Більш старі агоністи PPAR- α , відомі під загальною назвою фібрати, є сильнодіючими гіперліпідними агентами. Це були перші потужні індуктори, виявлені для sEH [121]. Як агоністи PPAR- α , так і агоністи PPAR- γ підвищують рівні sEH. Таким чином, корисні клінічні ефекти агоністів PPAR- α частково нівелюються завдяки їхній індукції sEH. PPARs грають декілька ролей у гомеостазі ліпідів і глюкози, проте серед цих ефектів особливе значення мають протизапальні і окисні стрес-знижувальні властивості EET, які пов'язані з активацією PPAR- γ [121-123]. Пряма активація PPAR- γ синтетичними агоністами, такими як клінічно схвалені- тіазолідиндіони (TZD), призводить до поліпшення чутливості до інсуліну і зниження рівня глюкози в крові [121]. Проте, основними побічними ефектами препаратів класу

TZD є затримка рідини в організмі і збільшення ваги. Ці побічні ефекти викликані PPAR γ -стимуляцією абсорбції ниркової солі епітеліальними натрієвими каналами (ENaC) [124]. Такі ефекти обмежують користь цих мультимодальних сенсibilізаторів інсуліну[125]. Було показано, що рівні EET, що підвищуються за рахунок інгібування sEH, призводять до зниження ENaC-опосередкованої реабсорбції ниркової солі [124-126]. Отже, інгібування sEH може запобігати основним небажаним побічними ефекти TZD. Крім того, TZD часто пов'язані з гіпертонією, ожирінням, дисліпідемією та хворобами серця в рамках метаболічного синдрому [127]. Як і в попередніх спостереженнях на гризунах, у жировій тканині пацієнтів з ожирінням спостерігається підвищення рівня sEH, що призводить до зниження транскрипційної активності PPAR [128-132]. Таким чином, завдяки здатності агоніста PPAR- α індукувати sEH, TZD протидіють деяким з їхніх власних клінічно корисних ефектів. Ці дані свідчать про те, що одночасне інгібування sEH і активація PPAR- γ є потенційним втручанням для метаболічного синдрому, що призводить до супутнього поліпшення артеріального тиску і рівня глюкози в крові.

У своєму дослідженні Imig та співавт. перевірили цю гіпотезу з одночасним введенням TZD розиглітазону і інгібітору sEH t-AUCB шурам зі спонтанною гіпертонією і ожирінням [132]. Спільне введення обох фармакологічних агентів привело до синергетичного поліпшення судинної функції і зменшення фіброзного пошкодження нирок. Слід зазначити, що деякі ранні інгібітори sEH, такі як AUDA, є не тільки імітаторами EET, але також агоністами PPAR- α . Були отримані кілька подвійних модуляторів PPAR /sEH були розроблені шляхом скріплення двох відомих фармакофор як для PPAR α , γ або δ , так і для sEH і визначили кілька помірних подвійних медіаторів PPAR γ / sEH і PPAR α / sEH [132]. Злиття N-бензилпіперидін-4-карбоксаміду з різними фармакофорами PPAR виявилось менш успішним, що дало подвійні модулятори PPAR/sEH (рис.1.6.1), які проявляли низьку афінність зв'язування в поєднанні з високою молекулярною масою і ліпофільністю [132]. Нарешті, ідентифікація N-

бензилбензамідів як злитого фармакофора PPAR / sEH привела до ідентифікації сполуки свинцю RB394 [131-133].

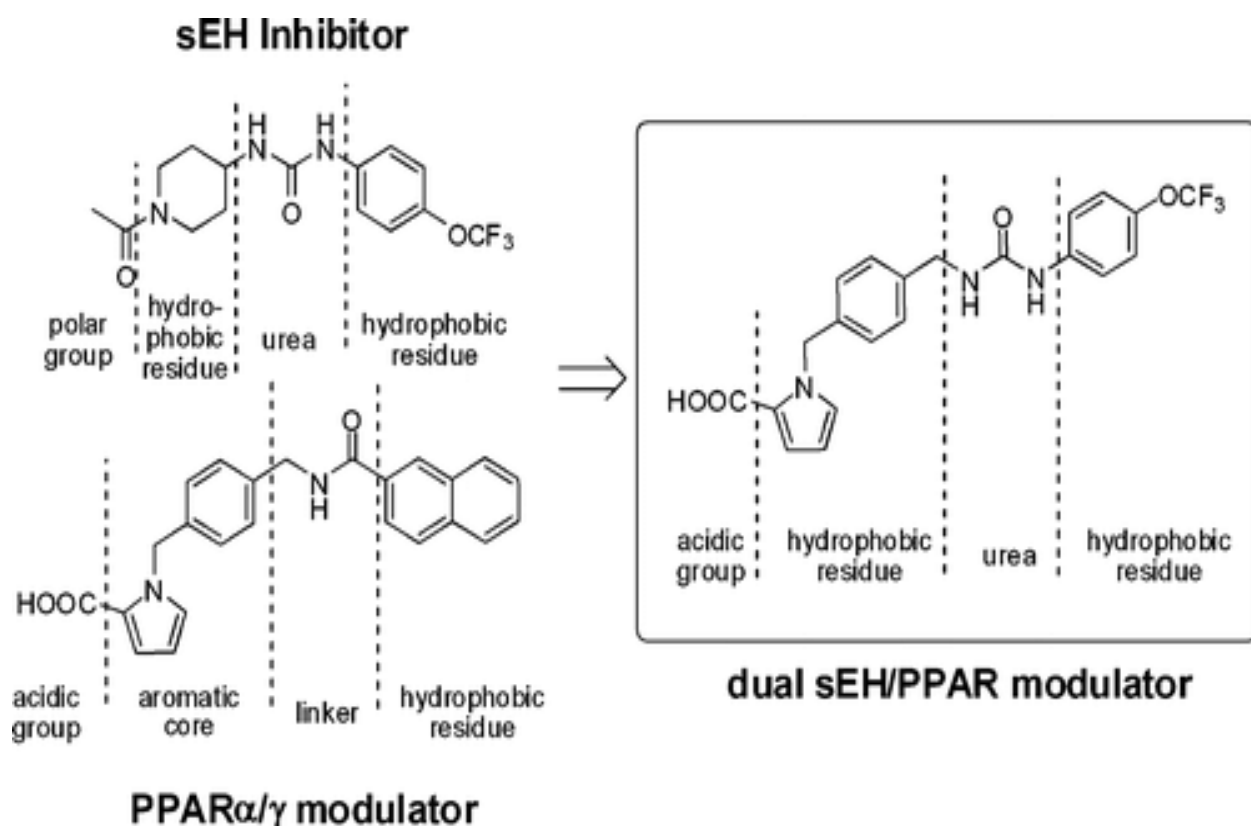


Рис. 1.5.1. Схема дизайну хімічної структури нової синтезованої біфункціональної молекули RB394, яка одночасно діє, як агоніст PPAR- γ і розчинного sEHі [133]

RB394 є еквіпотентним PPAR γ -селективним повним агоністом і інгібітором sEH зі сприятливим фармакокінетичним і фармакодинамічним профілем. Широке профілювання RB394 *in vivo* у спонтанно гіпертонічних щурів (SHROB), ZSF1 (ZSF1-Lep^{rfa}Lep^{crp} / Cr1) здорових та щурів з OOC привело до підтвердження того, що одночасне інгібування sEH і активація PPAR γ є позитивними для метаболічного синдрому. RB394 одночасно і сильно знижував артеріальний тиск, рівень глюкози в крові, підвищений рівень ліпідів і крові, а також фіброз печінки і нирок в профілактичних і лікувальних схемах, при дозі 10 мг / кг / день [132].

Schierle зі співавт. використав протизапальний препарат для визначення інших багатоцільових препаратів, вибравши антиастматичного зафірлукаста, який також мав помірно модулюючу активність щодо PPAR γ і sEH. [134]. Незначні зміни в хімічній структурі зафірлукаста посилили його потенційну протизапальну дію.

Наступним потенційним кандидатом в препарати є агоніст фарнезоїдного X рецептора- FXR. FXR регулює гомеостаз жовчних кислот і є дуже важливим гепатопротектором [135-136]. При активації FXR, високий рівень токсичних жовчних кислот, синтез жовчних кислот блокується, а метаболізм і виведення жовчних кислот прискорюється. FXR захищає клітини печінки від накопичення жовчних кислот і їх токсичного впливу. Крім того, він бере участь в декількох інших системах регуляції метаболізму, включаючи гомеостаз ліпідів і глюкози, має виражену протизапальну активність. Інтенсивні дослідження протягом останнього десятиліття дозволили відкрити кілька синтетичних агоністів і антагоністів FXR. Однак в даний час тільки агонізм FXR має терапевтичний потенціал, в той час як антагонізм FXR викликає різноманітні побічні ефекти. Активація FXR в даний час оцінюється як терапевтична концепція для лікування важких захворювань печінки, таких як неалкогольна жирова хвороба печінки (НАЖХП) і неалкогольний стеатогепатит (НАСГ), первинний біліарний цироз. При цьому на доклінічній стадії розглядається використання ферментно-розчинної епоксидгідролази (sEH) в якості експериментального агоніста FXR.

Генетична делеція або фармакологічне інгібування sEH, як було показано, призводять до протизапальних ефектів на мишачих моделях ожиріння печінки з дієтою з високим вмістом жирів [14,137-138]. sEH є ферментом в СYP-шляху каскаду арахідонової кислоти, що перетворює EET кислоти до відповідних DHET кислот. EETs є протизапальними інгібіторами ліпідів, тобто анти-запальними медіаторами ліпідів. Ця протизапальна дія, була неодноразово продемонстрована в лікуванні НАСГ. А активація FXR при НАСГ в основному ефективна за рахунок метаболічних ефектів та інгібуванням sEH, що мають протизапальну і антифіброзну дію на печінку. Таким чином, комбінація активації

FXR і пригнічення sEH може забезпечити додаткову терапевтичну ефективність при НАСГ. Крім того, в нещодавніх дослідженнях було продемонстровано, що активація FXR пов'язані з індукцією епоксигеназ цитохрому P450. Це, в свою чергу, збільшує концентрацію субстрату sEH, що додатково ілюструє потенційну синергію FXR і sEH (рис.1.5.2) [139-141]. Отриманий в результаті поліфармакологічний профіль їх активності є багатообіцяючим при лікуванні метаболічних захворювань, пов'язаних не тільки з печінкою, а і з нирками.

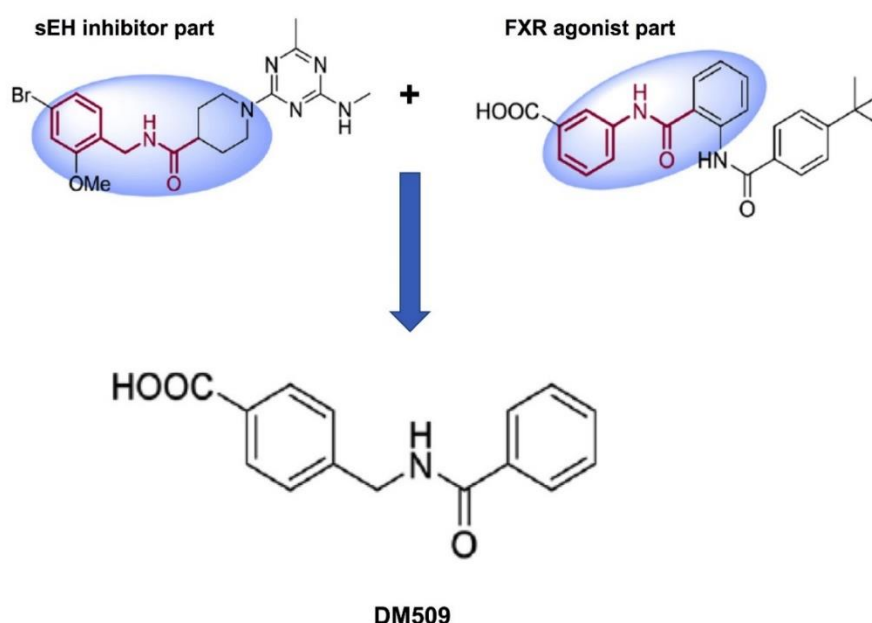


Рис.1.5.2. Схема дизайну хімічної структури нової синтезованої біфункціональної молекули DM509, яка одночасно діє, як агоніст фарнезоїда X рецептора (FXR) і інгібітор розчинної епоксидгідролази (sHEi) [141]

Подальша оптимізація та стратегія хімічної заміни дозволили отримати високоефективний, перорально доступний і ефективний подвійний модулятор sEH/FXR. Декілька недавніх досліджень продемонстрували антифіброзну дію агоністів FXR на моделях захворювань печінки і нирок [141-142]. Сильну протифіброзну дію sEHі на нирки також описано в опублікованих дослідженнях [140,142]. Враховуючи багатообіцяючу дію при захворюваннях печінки і

потенціал лікування фіброза нирок, ми розробили нову біфункціональну молекулу DM509 на основі агоніста FXR і інгібітора sEH.

За останнє десятиліття було розроблено багато різних препаратів для лікування ХХН, які, втім, здатні лише затримувати і, в деяких випадках, можливо запобігти розвитку ТСНН. Ці препарати мають неповну ефективність у запобіганні розвитку фіброзу нирок і прогресування ХХН. Багато клінічних випробувань інших механізмів не увінчалися успіхом і потребують допрацювання. Важливо відзначити, що велика кількість людей з ХХН залишаються без лікування або погано реагують на поточну терапію ХХН, що часто призводить до прогресування ТСНН і летальних випадків. Зважаючи на вище вказане, терапія ХХН є важливим завданням в доклінічній і клінічній практиці. Розробка принципово нових підходів лікування ХХН, особливо підходів направлених на усунення фіброзу та запального процесу як основних патофізіологічних ознак даного захворювання є вкрай важливим завданням на сучасному етапі розвитку медицини.

У дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети, проведено комплексне дослідження показників розвитку запалення та фіброзу у нирках мишей з використанням моделі ООС ниркової дисфункції за умов введення нових синтезованих сполук. Дана робота, не тільки описує розробку новосинтезованих сполук перших у своєму класі DM509 і RB394, а й обґрунтовує доцільність використання цих кандидатів у ліки з переконливими доклінічними доказами їх ефективності.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

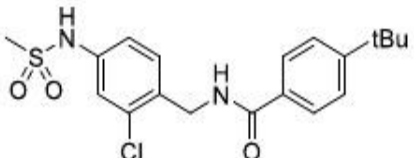
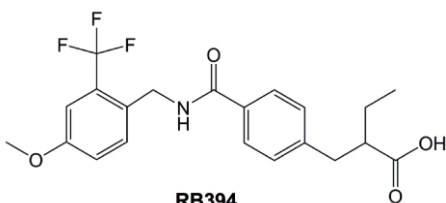
2.1. Реагенти та матеріали

У роботі використовували розчинний sEH інгібітор, що був синтезований і люб'язно наданий нам Dr. John R. Falck (Department of Biochemistry, Southwestern University, Dallas, TX, США), ми також використовували PPAR- γ агоніст- Rosiglitazone («Sigma Aldrich», Louis, MO, США), всі ці хімічні компоненти були розчинні у воді.

У дослідженні було використано кілька досліджуваних біофункціональних агентів DM509 і RB394, обидва розчинні у 0,001% ДМСО та 0,05%, обидва компонента були розроблені і синтезовані групою Ewgenij Proschak (Goethe-University Frankfurt, Institute of Pharmaceutical Chemistry, Німеччина) [14,134,142].

Для гістологічних досліджень використовували anti- α -SMA антитіла (1:100-1:250, «Santa Cruz Biotechnology», Dallas, TX, США), антитіла -CD31, -CD45 (1:50-1:200) були придбані («Cell Signaling Technology», Danvers, MA, США), -CD43 (1:50-1:100, «BD Biosciences», San Jose, CA, США) і Anti F4/80 (1:100-1:150, «Abcam, Cambridge», MA, США).

Експериментальні молекули та комерційний препарат, що були використанні у моделі ООС

Назва препарату	Тип препарату	Характеристика препарату
Rosiglitazone (Rosi)	Комерційний препарат	Розиглітазон є комерційно доступним і входить в клас препаратів тiazолідиндіонів, який спочатку був розроблений для лікування діабету. Росиглітазон діє шляхом зв'язування з рецепторами, що активують проліферацію пероксисом (PPAR γ), і має потужну протизапальну дію при множинних діях, включаючи нирки.
DM509	Нова біофункціональна молекула	DM509 це біфункціональна молекула, яка одночасно діє як інгібітор розчинної епоксидгідролази і агоніст рецептора фарнезоїда x (FXR). Інгібування розчинної епоксидгідролази збільшує біодоступність ЕЕТ, а активація FXR призводить до протизапальної та антифіброзної дії в нирках.
 <p><i>Хімічна структура DM509</i></p>		
t-AUCB (sEHi)	Синтетичний інгібітор розчинної епоксидгідролази	t-AUCB, який хімічно відомий як транс-4- [3-adamantan-1-yl-Ureido)-cyclohexyloxy] бензойна кислота. t-AUCB є інгібітором четвертого покоління розчинної епоксидгідролази, ферменту, який пригнічує деградацію біологічно активного ендogenous ЕЕТ і збільшує біодоступність ЕЕТ.
RB394 (sEHi+PPAR- γ)	Нова біофункціональна молекула	RB394 – унікальна і перша в своєму класі біфункціональна молекула, яка одночасно діє як інгібітор розчинної епоксидгідролази і агоніст рецептора γ , який активує проліферацію пероксисом (PPAR γ). Інгібування розчинної епоксидгідролази збільшує біодоступність ЕЕТ, а активація рецептора PPAR γ спричиняє помітну протизапальну та антифіброзну дію на різні органи, включаючи нирки.
 <p>RB394 <i>Хімічна структура RB394</i></p>		

2.2. Обладнання

В роботі використовували прилади і обладнання наступних виробників: центрифуги MiniSpin, 5418 R, Centrifuge 5910 R («Eppendorf», США) («Universal Bench-to Laboratory Microplate Reader», BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, США), рідера «Infinite M200» (« Tecan Group Ltd.», Crailsheim, Німеччина), гомонізатор («TissueLyser II», «QIAGEN», Valencia, CA, США), термоцикл («C 1000 Thermal Cycler», «Bio-Rad», Hercules, CA, США), алізатор для оптичних систем («CXF384 Touch Real-Time PCR Detection System», «Bio-Rad», Hercules, CA, USA), машина для вимірювання артеріального тиску («ИТС Life Science Inc.», Woodland Hills, CA, США). Камери та інші приладдя для анестезії та евтаназії тварин («Braintree Scientific, Inc.», MA, США).

Пластиковий лабораторний посуд – планшети для імуноферментного аналізу, епендорфи («Thermo Fisher Scientific», MA, США). Стікляні пробірки з гепарином (Vacutainer blood collection tube, «Becton», «Dickinson & Company», Franklin Lakes, NJ, США). Скляний лабораторний посуд – колби, стакани, пробірки, циліндри та інше, виробництва фірми «Simax», Чехія.

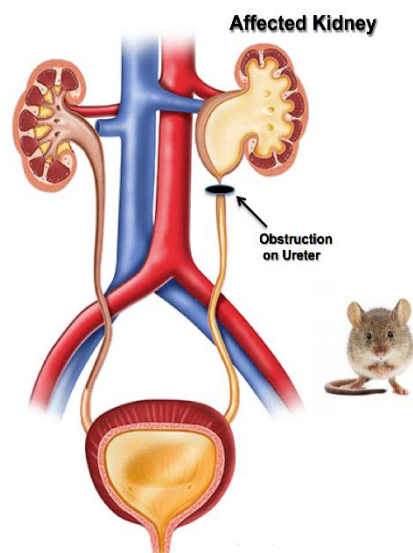
2.3. Експериментальні тварини

Дослідження були проведені на мишах самцях лінії C57BL/6J віком 8-12 тижнів та вагою 18-25г (n = 8). Всі процедури з тваринами та їх утримання у віварії здійснювали у відповідності до «Загальних принципів роботи на тваринах», Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження №3447-IV» (Київ, 2006) та узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), а також згідно з «Принципами поводження з лабораторними тваринами, 1985», вимогами Національних інститутів здоров'я (США). Самці мишей лінії C57BL6/J миші були придбані у Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, США). Біомедичний Ресурсний Центр в Медичному коледжі

штату Вісконсін утримував мишей і забезпечував вільний доступ до води і їжі цілодобово.

2.4. Умови проведення досліджень

Всі досліді проводилися з використанням експериментальної моделі фіброзу нирок – односторонньої обструкції сечоводу на мишах (ООС). Модель ООС є однією із найбільш розповсюджених доклінічних моделей ХХН. ООС стала однією з поширених моделей ХХН, через свою здатність викликати прогресуючий нирковий фіброз, що робить корисним вивчення механізмів тубулоінтерстиціального фіброзу *in vivo*, а також це гарна модель для скринінгу нових методів лікування. Модель ООС має переваги клінічної відтворюваності фіброзу (отже, варіації між тваринами не проблема), короткого тимчасового циклу, легкості виконання і наявності контралатеральної нирки в якості контролю. Ця модель характеризується кількома важливими ознаками ниркового фіброзу, які спостерігаються у пацієнтів з нирковим фіброзом і ХХН. Ці характерні риси включають дилатацію каналців, атрофію каналців, інфільтрацію імунних клітин, втрату проксимальної каналцевої маси, гіпертрофію каналців, загибель клітин каналцевого епітелію. З метою відтворення даної моделі один із сечоводів перекривається (обструкція сечоводу), що у свою чергу призводить до розвитку фіброзу в пошкодженій нирці [114,143]. Деталі хірургічної процедури цього методу описані в нижче.



Анастезію мишам здійснювали шляхом інгаляції – тварин поміщали в бокс і вводили 3,0% ізофлуран. Далі був зроблений серединний розріз біля хребта, щоб оголити ліву нирку і сечовід миші. Лівий сечовід приблизно в 0,5 см від

ниркової протоки, перев'язували подвійною хірургічною ниткою. Потім розріз зашивали (за допомогою накладання 3-6 безперервних швів).

Миші контрольної групи пройшли ту ж процедуру, що і миші з моделлю ООС, за винятком того, що сечовід не був перев'язаний.

2.5. Експериментальні протоколи, що були застосовані для дослідження розвитку ниркового фіброзу за умов введення експериментальних сполук

2.5.1. Експериментальний протокол №1

Дослідження проводили на моделі експериментального ниркового фіброзу, який індукували шляхом ООС у мишей лінії C57Bl6/J (у віці 8-10 тижнів) згідно рекомендацій [114]. На 3 добу після операції частину тварин (n=8), як контрольних, так і з моделлю ООС, виводили з експерименту з метою апробації моделі ниркового фіброзу. Миші були випадково розподілені на групи, миші *1-ї групи* (n =8) – контрольна група, без перев'язування сечоводу, а миші *групи 2* (n = 8) це тварини яким було здійснено повноцінну операцію ООС (розд. 2.4.).

На 3 день після операції у дослідних тварин обох груп відбирали кров і ниркову тканину для подальших досліджень [114]. Методи евтаназії та збору тканин описані в розділі 2.6.

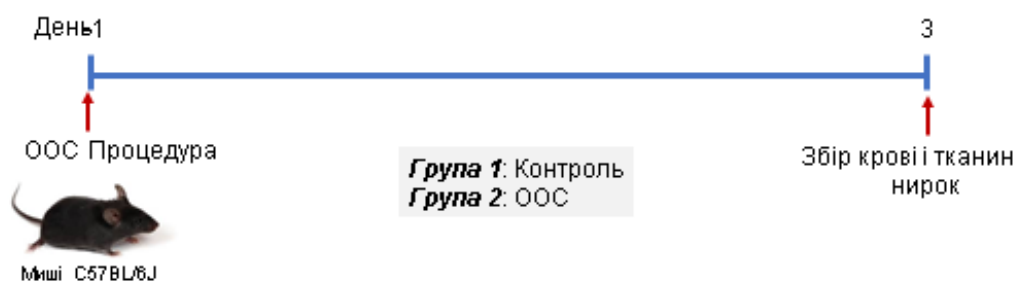


Рис.2.5.1. Схематичний опис експериментального протоколу №1

2.5.2. Експериментальний протокол №2

Решта тварин, починаючи з 3-ї доби експерименту, отримували досліджуванні сполуки або водний розчин 0,001% ДМСО та 0,05% циклодекстрину, який використовували для розчинення антифіброзних агентів. Таким чином у даному дослідженні були сформовані наступні 6 експериментальних груп (n = 8) у кожній:

Група 1- контрольна група – тварини без перев'язування сечоводу, які отримували розчинник;

Група 2- група ООС – тварини після перев'язування сечоводу, які також отримували розчинник (контрольна група захворювання);

Група 3- група sEHi – тварини групи ООС, які отримували інгібітор розчинної епоксидгідролази;

Група 4- група Rosi – тварини групи ООС, які отримували комерційний препарат-агоніст PPAR- γ ;

Група 5- група sEHi+Rosi – тварини групи ООС, які отримували комбінацію відповідних сполук;

Група 6- група RB394 – тварини групи ООС, які отримували новосинтезовану сполуку подвійної дії, RB394, що є комбінацією інгібітора sEH та агоніста PPAR- γ .

В даному протоколі, всі препарати використовувалися перорально у дозі 10 мг/кг/добу. Експериментальні препарати тваринам вводили протягом 7 днів, розпочинаючи на 3-й день після операції ООС.

Група 1- контрольна група – тварини без перев'язування сечоводу, які отримували розчинник;

Група 2- група ООС – тварини після перев'язування сечоводу, які також отримували розчинник (контрольна група захворювання);

Група 3- група DM509 – тварини групи ООС, які отримували новосинтезовану сполуку подвійної дії, DM509, що є комбінацією інгібітора sEH та агоніста FXR.

Після 10 днів експерименту, зразки нирок і крові були зібрані для гістологічних, імуногістологічних, біохімічних аналізів і аналізу експресії генів за протоком, що описано в схемі і показано на рис 2.5.3.

2.6. Підготовка біологічних зразків для подальшого дослідження

Евтаназію мишей здійснювали шляхом передозування ізофлураном, смерть тварини була підтверджена розрізом діафрагми з подальшим пошкодженням серця. Швидко вирізали нирки, розрізали навпіл, одну частину нирки фіксували в 10% формаліні, для гістологічних та імуногістологічних досліджень, зразки зберігали при кімнатній температурі. Іншу частину тканини подрібнювали і поміщали в стабілізуючий розчин «RNAlater™» («Invitrogen™», Carlsbad, CA, USA) та заморожували в рідкому азоті для подальшого аналізу експресії генів. Забір крові здійснювали посмертним шляхом, який полягає в тому, що кров забирають почергово з чотирьох камер серця за допомогою шприца, коли серце ще скорочується. Потім переносять кров до пробірок з гепарином (Vacutainer blood collection tube, «Becton», «Dickinson & Company», Franklin Lakes, NJ, США), щоб уникнути звертання крові. Сироватку відокремлювали центрифугуванням (3000 об/хв) при 4°C протягом 10 хвилин. Сироватка була швидко заморожена для біохімічного аналізу. Збір сечі здійснювали з використанням гідрофобного піску Labsand, який утримує сечу на поверхні («Braintree Scientific», Inc., Braintree, MA, США) [109].

2.7. Біохімічні методи

Рівень гідроксипроліну в нирках вимірювали за допомогою комерційного набору Hydroxyproline Assay Kit («Sigma Aldrich», США). Азот сечовини в крові вимірювали з використанням Blood Urea Nitrogen (BUN) kit («Arbor Assay», США), рівень білка в сечі з використанням комерційного набору («Cayman», Ann Arbor, MI, США), рівень креатиніну в сечі («Cayman», Ann Arbor, MI, США), рівень альбуміну в сечі («Exocell», Philadelphia, PA, США), активність ферменту NAG (N-ацетил- β -D-глюкозамінідаза) в сечі («BioVision», Milpitas, CA, США).

2.7.1. Визначення вмісту гідроксипроліну в тканинах нирок дослідних мишей

Гідроксипролін (4-гідроксипролін) є нестандартна амінокислота, утворена посттрансляційним гідроксилюванням проліна. Гідроксипролін входить до складу колагену, де він служить для стабілізації спіральної структури. Вимірювання рівня гідроксипроліну ми використовували як індикатор вмісту колагену. Визначали рівень гідроксипроліну в лізаті (гомогенаті) тканини нирки. Зразок нирки 10 мг гомогенізували в 100 мкл 12N HCl, гідролізували протягом 3 годин при 120°C, охолоджували і потім додавали 5 мг активованого вугілля. Все це добре перемішували, центрифугували при 10000 об/хв протягом 5 хвилин. Надосад збирали і проводили реакцію за схемою протоколу. Концентрація гідроксипроліна визначається реакцією окислення гідроксипроліна з 4-диметиламіно бензальдегідом (DMAB), визначали концентрацію спектрофотометричним методом на біохімічному аналізаторі моделі Bio-Tek ELx800 («Universal Bench-top Laboratory Microplate Reader», BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, США) при довжині хвилі 560 нм [144].

2.7.2. Визначення азоту сечовини в крові дослідних мишей

Аналіз азоту сечовини крові являється золотим стандартом, для дігностотики ниркових захворювань. Азотом сечовини крові вважають азот, що міститься в кінцевих продуктах обміну білків, і, зокрема, сечовини. Він становить приблизно половину залишкового азоту сироватки. Крім сечовини, небілковий азот походить також з креатиніну, сечової кислоти і ряду інших нітроген-вмісних сполук. Сечовина - це 90% усіх азотистих метаболітів, які організм виводить.

Концентрація сечовини в крові виражається як кількість азоту сечовини. Цей аналіз називається азот сечовини крові (blood urea nitrogen, BUN), а одиницею виміру є міліграм на децилітр (мг/дл). Реакцію проводили в планшеті на 96 лунок. Зразки та стандарти вносили в дублях по 50 мкл і інкубували протягом 30 хв з ферментом сечовини, який гідролізує сечовину до аміаку і вуглекислого газу. Аміак додатково реагує з розчином хромогену, з утворенням продукту синьо-зеленого кольору. Вимірювання проводили при довжині хвилі між 580 до 630 нм. Концентрацію сечовини в зразку визначали шляхом порівняння з відомим стандартом сечовини. Стандартна крива була лінійною до 50 мг/дл сечовини [144].

2.7.3. Визначення концентрації креатиніну у зразках сечі дослідних мишей

Вимірювання рівня креатиніну необхідно для виявлення захворювань нирок і оцінки ступеня порушення функції нирок. Концентрацію креатиніну визначали спектрофотометричним методом на біохімічному аналізаторі моделі Біо-Тек ELx800 при довжині хвилі 490- 500 нм. Для дослідження концентрації креатиніну використовували стандартні набори виробництва Cayman Chemicals, США. Принцип методу базується на взаємодії в лужному середовищі пікринової кислоти з креатиніном сечі з утворенням комплексу жовто-помаранчево кольору,

концентрація якого вимірюється фотометрично. Концентрацію креатиніну виражали в мг/дл [6].

2.7.4. Визначення концентрації білка в сечі

У роботі використовували набір для визначення білка («Саuman», США), який базується на колориметричному методі Бредфорд, що передбачає взаємодію білка з барвником Кумасі. За умов утворення комплексу барвника з білками в кислому середовищі, відбувається зміна кольору з коричневого на синій. Оптичну щільність проб вимірювали за довжин хвилі 465 та 595 нм. Концентрацію визначали за калібрувальним графіком і виражали у мг/доба [6].

2.7.5. Визначення концентрації альбуміну в сечі дослідних тварин

Альбумін використовується для оцінки функції нирок у мишей *in vitro*. Цей тест оснований на властивості антитіл, що виробляються кроликом у відповідь на імунізацію мишиним альбуміном, щоб впізнавати цей білок як в розчині, так і в іммобілізованому стані. Вторинна реакція з антитілами проти імуноглобулінів кролика конюгованими з пероксидазою хрому веде до утворення комплексу альбумін-антитіло-фермент. Після відмивання тільки іммобілізований альбуміновий комплекс реагує з хромогенним субстратом. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна вмісту альбуміну в зразку. Реакцію зупиняли кислотою і вимірювали поглинання при 450 нм [6].

2.7.6. Визначення активності ферменту NAG (N-Ацетил-β-D-глюкозамінідаза) в сечі колориметрическим методом

NAG вляє собою лізосомальний фермент, що здатний розщеплювати N-ацетил-глюкозамін, моносахаридні похідні глюкози, які утворюють структурні компоненти в багатьох тканинах. При пошкодженні клітин епітелію відбувається

вивільнення NAG, що призводить до збільшення концентрації ферменту в сечі. NAG є одним з використовуваних біомаркерів для виявлення та діагностики пошкодження нирок. Зразок мочі інкубується з розчином субстрату на протязі 20 хв при 37 °С. У цьому аналізі NAG використовує синтетичне похідне пнітрофенола (Р-рNP) в якості субстрату NAG і вивільняє рNP, який можна виміряти при оптичній щільності 400 нм [6].

2.8. *In vitro* аналіз життєздатності клітин (WST-1 метод)

Клітини HepG2 і Hela («DSMZ», Braunschweig, Germany) культивували (0,1-5x10⁴/лунку) в 96-лунковому планшеті в кінцевому обсязі 100 мкл/лунку культурального середовища. Клітини інкубували протягом 24-96 годин досліджуваною сполукою DM509 і боксаротеном (протираковий препарат з сильною цитотоксичною дією), а також іншою синтезованою сполукою RB394. Потім 10 мкл/лунку розчину WST («Abscam», Массачусетс, США) додавали в кожен лунку, не викликаючи утворення бульбашок в лунці. Клітини інкубували від 30 хв до 4 годин на стандартних умовах культивування клітин. Після інкубації клітини ретельно перемішували протягом 1 хв. Всі експерименти проводилися як мінімум в трьох повторах. Життєздатність клітин оцінювали згідно з протоколом виробника з використанням рідера «Infinite M200» («Tecan Group Ltd.», Crailsheim, Німеччина). Поглинання оброблених та необроблених зразків вимірювали при 420-480 нм. Використовувана еталонна довжина хвилі ~ 650 нм [145].

2.9. Молекулярно- біологічні методи

2.9.1. Виділення та очищення РНК з тканин нирок дослідних мишей

Виділення РНК здійснювали з використанням набору («RNeasy Mini Kit», «QIAGEN», Valencia, CA, США). Виділення НК із зразків нирок мишей

проводили таким чином. В пробірки об'ємом 2 мл поміщали тканину не більше 30 мг і додавали лізуючий буферний розчин 350 мкл, що складається з суміші бета-мекаптоетанолу і буферного розчину RLT в пропорції 1:100. Гомонізували тканину на гомонізаторі («TissueLyser II», «QIAGEN», Valencia, CA, США) шляхом високо-швидкісного втрушування з металевими кульками протягом 2 хв. Лізат тканини переносили до RNeasy міні колонок. Центрифугували зразки за 10 тис. об/хв протягом 2 хв, після чого колонку видаляли і до лізату додали рівний об'єм 70% спирту і обережно перемішали. Дану суміш об'ємом 700 мкл перенесли до колонок і центрифугували за 10 тис. об/хв протягом 30 с, осадову рідину видаляли за допомогою вакуумного відсмоктувача. Для очищення нуклеїнових кислот від протеїнів та ліпідів проводили відмивання. На першому етапі відмивання у пробірки із осадженими нуклеїновими кислотами на колонках, додавали по 700 мкл буферний розчин RW1. Знову центрифугували за 10 тис. об/хв протягом 30 с, осадову рідину видаляли. Під час другого та третього етапу відмивання у пробірки додавали по 500 мкл буферний розчин RPE для відмивання з центрифугуванням. Після цього здійснювали елюцію нуклеїнових кислот. Для цього на колонку наносили 50 мкл стерильну воду (RNA-free вода), центрифугували протягом 1 хв за 10 тис. об/хв. Колонку видаляли. РНК знаходилась у пробірці. Зразок поміщали на лід для подальшого використання або зберігали при температурі -20 °C. Очищення РНК від геномної ДНК здійснювати за допомогою набору («DNase I, Amplification Grade», «Invitrogen», Carlsbad, CA, США). До виділеної мРНК 50 мкл додавали суміш з DNase I- 2 мкл, 10X DNase I Reaction Buffer- 6 мкл і очищену воду- 2 мкл, інкубували пробірки 15 хв при кімнатній температурі. Для інактивації DNase I додавали EDTA- 6 мкл і інкубували за температури 65°C протягом 10 хв. Кількість та якість сумарної РНК оцінювали спектрофотометром, при довжинні хвилі 260/280. Зразки зберігали за температури -20 °C, з подальшим використанням для проведення ПЛР [146].

2.9.2. Умови проведення реакції зворотної транскрипції

Для одержання комплементарної ДНК (кДНК) проводили реакцію зворотної транскрипції за допомогою комерційного набору реагентів («iScript™ Select cDNA Synthesis Kit», «Bio-Rad», Hercules, CA, США). До пробірок 0,2 мл вносили 2 мкг тотальної РНК, 8 мкл iScript RT Supermix і доводили водою до об'єму 40 мкл. Зразки інкубували в термоциклі («C 1000 Thermal Cycler», «Bio-Rad», Hercules, CA, США), слідуючи наступному протоколу: початкова інкубація 5 хв при 25°C, процес зворотної транскрипції 20 хв при 46°C, інактивація ЗТ – 1 хв при 95°C [146].

2.9.3. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі

У роботі використовувався комерційний набір для проведення реакції («iScript One-Step RT-PCR Kit з SYBR green», «Bio-Rad Laboratories», Hercules, CA, США). Реакцію проводили за рекомендацією виробника, брали: 2 мкл кДНК (1:10), 5 мкл SYBR green, по 0,4 мкл – прямого і зворотнього праймера, 2,2 мкл води, барвник, додавали всі реагенти в плашку на 384 лунки. Об'єм реакційної суміші 10 мкл.

Аналіз дисоціативної кривої був виконаний за допомогою програмного забезпечення для оптичних систем («CXF384 Touch Real-Time PCR Detection System», «Bio-Rad», Hercules, CA, USA) і кожен ампліфікований зразок був проаналізований на гомогенність. Ампліфікацію проводили в декількох повторювальних циклів при 95 °C протягом 2 хв, після чого проводили 40 циклів при 95 °C протягом 10 с і при 60 °C протягом 30 с. Всі зразки були виконані в триразовій повторності. Цільові рівні експресії генів визначали шляхом

нормалізації значень порогового циклу C_t для двох генів з постійним рівним транскрипції- *Gapdh* and *Actb*.

Статистичний аналіз проводився з використанням 6-10 зразків з кожної експериментальної групи в порівнянні з контрольною групою. Ефективність ампліфікації для всіх пар праймерів була визначена, як $100\% \pm 5\%$, для порівняння рівня експресії цільових генів ми використовували $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метод - порівняльний СТ методом « $\Delta\Delta C_t$ Method» [146].

Визначали експресію ниркових генів, декілька маркерів фіброзу- *FN1*, *Acta2*, *S100a4*, маркери пошкодження ниркових каналців- *Lcn2*, *Havcr1*, маркери запалення- *Tnf*, *Il1b*, *Il6*, маркери пошкодження ниркових судин- *Icam*, *Vcam*, були проаналізовані за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

2.10. Гістопатологічні методи

Дві методики гістологічного фарбування були використані для визначення структурних змін нирок (утворення каналців і їх пошкодження), а також фіброзу нирок. Ці гістологічні методи описані нижче. Для обох методик, нирки фіксували в 10% формаліні, робили зрізи товщиною 5 мкм.

2.10.1. Методологія гістологічного фарбування зрізів тканин нирки – Periodic Acid-Schiff (PAS)

PAS-фарбування зрізів тканини нирок проводили в наступних послідовних етапах. Спочатку депарафінували зрізи, потім занурювали двічі в ксилол на 7 хв та проводили по спиртах спадної концентрації до дистильованої води (100%, 95%, 70% спирт по 5 хв у кожному). Промивали в дистильованій воді та проводили окислення в 0,5% йодній кислоті протягом 5 хв. Промивання слайдів в дистильованій воді проводили після кожного етапу. Поміщали зразки в Schiff's Reagent протягом 15 хв та фарбували гематоксиліном. Потім переносили

слайди в розчин Clarifier на 30 с та на 1 хв в 0.1% аміачна вода. Зневоднювання проводили по спиртах зростаючої концентрації (95%, 100% спирт по 5 хв у кожному). Просвітлювали ксилолом (три зміни по 3-5 хв). На кінцевому етапі, зразки покривали покривними скельцями, уникаючи будь-яких бульбашок [114].

2.10.2. Методологія гістопатологічного фарбування зрізів тканин нирки – Picosirius Red (PSR)

Виготовлені гістологічні зрізи витримували 45 хв за температури + 60 °С для депарєфінізації. Фарбування гістологічних зрізів здійснювали in 0.1% Picosirius Red розчин. Для цього попередньо зрізи послідовно занурювали на 5 хв тричі у розчини ксилолу, на 3 хв двічі в етанол 100 %, 90 %, 70 % та дистильовану воду, а потім поміщали на 8 хв у розчин 0.2% фосфорномолібденову кислоту. Промивали слайди в дистильованій водій протягом 5 хв. Фарбували в 0,1% Picosirius Red протягом 90 хв, після чого занурювали зрізи в 0,01N соляну кислоту на 4 хв. По закінченню процесу фарбування зрізи витримували по 30 с у етанолі різних концентрацій (70 %, 90 % та 100%) та у ксилолі тричі по 5 хв [114].

2.10.3. Гістологічний аналіз і оцінка результатів

Гістологічне дослідження проводили при 200x збільшенні за допомогою програмного забезпечення для зображень («NIS Elements AR версії 3.0», «Nikon Instruments Inc.», Мелвілл, NY, США). PSR- and PAS-фарбування тканин було оцінено на предмет ушкодження каналців нирок, в той час як PSR використовувався для визначення колаген-позитивних рівнів ниркового інтерстиціального фіброзу. Гістопатологічні зміни оцінювали як процентну частку площі щодо загальної площі аналізованої ділянки нирки.

2.11. Імуногістохімічні методи дослідження

Депарафінізацію слайдів проводили при 60°С протягом 1 год. Після цього зрізи послідовно занурювали тричі на 5 хв у розчин ксилолу, по 1 хв в етанол різної концентрації 100 %, 95 % , 70 % та 1х фосфатний буфер на 5 хв. Приготували розчин 198 мл метанолу та 2 мл пероксид водню і занурили зрізи в дану суміш на 30 хв. Перенесли слайди до скляної ємкості з приготованим розчином Rodent Decloaker Mixture, для його приготування змішували 22,5 мл розчину Rodent Decloaker і 202,5 мл дистильованої води, скляну ємність зі слайдами, що занурені в приготований розчин обгорнули алюміневою фольгою і помістили в пароварку на 30 хв при 95°С. Після 30 хв інкубації, дали слайдам охолонути і промили дистильованою водою. Нанесли на кожний зріз по 50 мкл 5% блокуючу козину сироватку на 45 хв. Після, інкубували слайди з первинними антитілами на ніч при 4°С. Наступного дня слайди промивали в суміші 1х фосфатного буферу і 20% Tween Buffer та наносили вторинні антитіла на 45 хв при кімнатній температурі. Робили промивку і наносили по 50 мкл розчин ABC complex («ABC kit», «Vector Laboratories», INC, Burlingame, CA, США) на 30 хв. Знову промивали і інкубували в розчині субстрату пероксидази протягом 1 хв. Фарбували гематоксиліном і швидко промивали проточною водою і занурювали слайди в розчин Scott's Bluing Reagent на 30 с. Після чого промивали і занурювали зрізи у розчини етанолу- 75%, 95% та 100% на 1 хв, потім тричі в розчин ксилолу по 5 хв [6].

2.11.1 Аналіз імуногістологічних даних

Утворення комплексу авідину і біотину конюгованого з пероксидазою хрому вказувало на наявність імунної відповіді («Vectastain ABC Elite kit», «Vector Laboratories», США) з подальшим контрастним фарбуванням гематоксиліном. Пофарбовані гістологічні зрізи візуалізували при 200-400-х збільшенні за допомогою світлового мікроскопа і аналізували з використанням

програмного забезпечення («Nikon NIS Elements», «Nikon Instruments Inc.», Melville, NY, США). Результат був виражений як співвідношення площі всього зрізу до площі іммунопозитивних ділянок для кожного цільового білка [6].

2.12. Умови проведення іммуноферментного аналізу

Для визначення відносного вмісту цитокінів використовували тканину нирки, анти-dsDNA виявляли в сироватці крові, а для визначення рівня пошкодження нирок використовувати сечу з використанням іммуноферментного аналізу.

Досліджувані зразки тканини нирки (до 5 мг тканини додавали 300 мкл фосфатного буферу) гомогенізували за допомогою гомогенізатора. Потім центрифугували протягом 20 хв при 13000 об/хв при 4 ° С, відібраний супернатант використовували для подальшої роботи. Перед внесенням зразків в плашку, приготували розведення супернатанта в фосфатному буферному розчині 1:50, сироватку 1:100 і сечі у воді 1:500.

Розчин антитіл і розведених зразків залишали в лунках на 2 год при кімнатній температурі, щоб молекули антитіл могли сорбційно зв'язатися з поверхнею лунок. Далі незв'язані антитіла тричі відмивали, після чого в ці лунки додавали мічені ферментами антитіла та інкубували 2 год при кімнатній температурі. Знову відмивали і проводили візуалізацію реакції використовуючи ТМБ субстрат за кімнатної температури впродовж 30 хв. Реакцію зупиняли кислотою, а оптичне поглинання проб вимірювали за довжин хвиль 450 нм на мікропланшеточному спектрофотометрі [111] .

2.13. *In vivo* Аналіз на токсичність новоситизованих сполук

Було використано 9 мишей-самців лінії C57BL/6JRj (маса тіла 23-27 г, закуплені у «Jackson Laboratories», США). Тварин утримували в кімнаті з контрольованою температурою (20-24 ° С) і підтримували в режимі 12 годин світла/12 годин темряви. Їжа та вода були доступні без обмежень. Овоситизовау

сполуку RB394 вводили з питною водою в дозі 30 мг/кг протягом 2 тижнів. Протягом всього періоду експерименту за мишами уважно спостерігали на предмет будь-яких ознак фізичних і поведінкових відхилень. В кінці протоколу, тобто після 2-х тижнів, здійснювали евтаназію мишей і збирали кількох органів, включаючи печінку, нирки і підшлункову залозу [145].

2.14. Статистична обробка результатів

Математичну та статистичну обробку результатів досліджень проводили на комп'ютері з використанням програмного пакета «GraphPad Prism 8.0.1» («GraphPad Software Inc.», США). Їх перевіряли на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Уїлка. Подальший обрахунок відбувався за допомогою t-критерія Стюдента [109]. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного \pm S.E.M. (стандартна похибка середнього) для кожної експериментальної групи. Результати вважали значущими, коли $p \leq 0,05$.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Показники запалення та фіброзу в тканинах нирок мишей за умов експериментального відтворення фіброзу нирок

Першочерговим завданням для проведення якісних досліджень нових терапевтичних засобів є розробка й апробація адекватної експериментальної моделі на лабораторних тваринах, що буде максимально відповідати клініко-біохімічній картині ниркового фіброзу та запалення у людей з ХХН. Це дає змогу не лише вивчити біологічні ефекти експериментальних антифіброзних препаратів, а й оцінити їх терапевтичний потенціал та можливі побічні ефекти. Ознайомившись з даними літератури, щодо сучасних підходів відтворення експериментального ниркового фіброзу на лабораторних тваринах, ми зупинили свій вибір на моделі ООС на мишах. За умов даної моделі, у нирках мишей розвивається дилатація канальців, інтерстиціальне розширення, гіпертрофія, гідронефроз, спостерігається втрата проксимальної канальцевої маси, інфільтрація лейкоцитів, загибель клітин канальцевого епітелію і присутність фібробластів. Ці зміни є результатом патофізіологічних процесів, таких як гемодинамічні зміни при механічному розтягуванні, апоптоз епітеліальних канальцевих клітин, окислювальний стрес і запалення, які в цілому призводять до прогресуючого тубулоінтерстиційного ниркового фіброзу [114,147].

З метою відтворення експериментальної моделі ООС, лабораторних тварин (мишей) було поділено на дві групи. Тварини першої групи (контроль) піддавалися хірургічному втручанню, але без подальшої обструкції, а у мишей другої групи відтворювали обструкцію – перев'язували лівий сечовід (група ООС). Через три дні після операції у тварин обох груп відбирали біологічний матеріал – сироватку крові і ниркову тканину для оцінки основних характеристик функціонального стану нирок.

На початковому етапі нашого дослідження нами було визначено ключові маркери розвитку ниркового фіброзу у мишей з моделлю ООС та проаналізовано можливість подальшого використання даної моделі для оцінки антифіброзного ефекту досліджуваних сполук.

При захворюванні нирок виникають проблеми з видаленням сечовини, і вона накопичується в крові після утворення різних ниркових патологій. Рівень накопиченої сечовини може бути виміряна за допомогою азоту сечовини в крові, що є клінічним маркером патології нирок. Тест на визначення рівня азоту сечовини в крові, ми провели, щоб перевірити, наскільки добре працюють нирки. В результаті проведених досліджень було показано, що у дослідних мишей групи ООС розвинулася ниркова дисфункція, що відображається підвищеним рівнем азоту сечовини в сироватці крові в 1,6 раза в порівнянні з контрольною групою (рис. 3.1) наші результати узгоджуються з раніше опублікованими даними [114,148-149], щодо порушення функції нирок за умов моделі ООС.

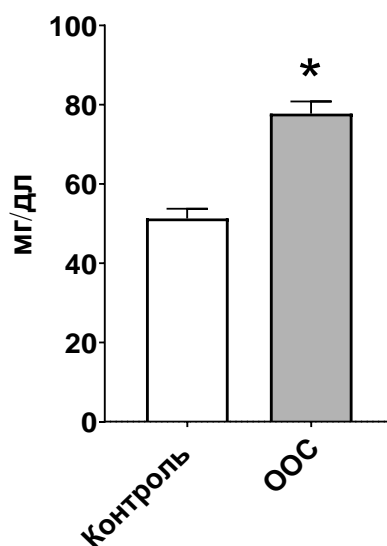


Рис. 3.1.1. Концентрація азоту сечовини в сироватці крові дослідних тварин; (M±m, n=8);

*– $p \leq 0,05$ порівняно з контролем

Для підтвердження розвитку запалення і фіброзу нирок у тварин групи ООС, було проведено визначення маркерів фіброзу і запалення, а також гістологічний аналіз, що є важливим інструментом для встановлення патоморфологічних змін в тканині.

Діагностичними ознаками ниркового фіброзу є: активація запального каскаду з інфільтрацією запальних клітин і вивільнення запальних цитокінів, диференціювання різних типів клітин в міофібробласти, відкладення компонентів позаклітинного матриксу, пошкодження каналців і атрофія [150]. Основна фіброгенна сигнальна молекула – цитокін TGF- β 1 – вивільняється клітинами ушкоджених каналців і інфільтруючими запальними клітинами [151]. Нещодавно було показано, що не тільки передача сигналів TGF- β 1, але також і інші шляхи, такі як передача сигналів NF- κ B, також відіграють вирішальну роль у розвитку фіброзу [152-153].

Інтерстиціальне запалення виявляється вже на 3-й день після проведення процедури ООС [114]. Починаючи з 3-го дня помітні серйозні зміни у структурі нирок і рівні експресії запальних білків, які є значно вищими, порівняно з умовами фізіологічної норми. Запалення можна оцінити шляхом кількісного визначення рівнів запальних цитокінів, таких як TNF- α , IL-1 β і IL-6. Відомо, що рівні ниркових епітеліальних цитокінів прогресивно підвищуються зі збільшенням часу ООС, тобто з прогресуванням захворювання. [20,114].

IL-1 β є важливим профібротичним цитокіном і бере участь в патогенезі ниркового фіброзу. До того ж, IL-1 β також може сприяти продукції інших профібротичних цитокінів, таких як TNF- α . [31-32]. Також повідомляється, що IL-1 β бере участь у розщепленні каспаз-1 і активації інфламасом [31-32,38], що додатково сприяє загибелі епітеліальних клітин.

Відповідно до цього, ми дослідили рівень маркерів запалення *Tnfa*, *Il6* і *Il1b* у ниркових клітинах мишей групи ООС, у порівнянні з контрольною групою. Отримані результати свідчать про значне підвищення рівня експресії (9-10 разів) досліджених маркерів запалення (рис. 3.1.2).

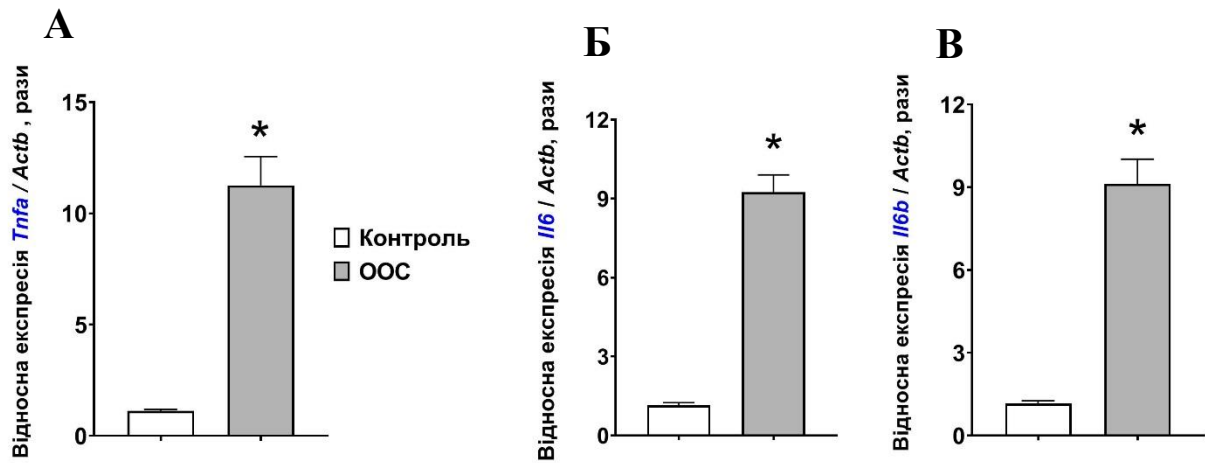


Рис. 3.1.2. Відносний рівень експресії генів *Tnfa* (А), *Il6* (Б) і *Il6b* (В) в тканинах нирок дослідних мишей; ($M \pm m$, $n=8$);

*— $p \leq 0,05$ порівняно з контролем

Проте, первинні сигнальні шляхи, які активують ці патофізіологічні події, що перекриваються між собою, викликаючи запалення і подальший нирковий фіброз – невідомі.

У цьому дослідженні, ми виявили, що у мишей групи ООС, розвинувся нирковий фіброз через 3 дні після операції. Адже предвісником фіброзу є запалення, що і призводить до запуску механізмів фіброзу. Підтвердженням цьому є підвищена експресія маркерів фіброзу таких як: *Acta2*, *S100a4*, *Colla1* і *Fnl*. Усі ці маркери також асоційовані з формуванням ЕЦМ, що є критичним механізмом ниркового фіброзу. Накопичення ЕЦМ призводить до фіброзу і рубцювання тканин. Пошкоджені тубулярні клітини вносять вклад в потовщення базальної мембрани каналців, що складається в основному з колагену I, III і IV типу і фібробластів. Фібробласти, як основні джерела утворення тубулоінтерстиціального ЕЦМ, є ключовими медіаторами фіброзу нирок. Атрофія каналців більш тісно пов'язана з порушенням функції нирок і інтерстиціальним фіброзом, ніж пошкодженням клубочків в моделі ООС.

При даному патологічному стані виявляють підвищену експресію α -SMA, що може бути візуалізовано в мезангіальних клітинах клубочків і

інтерстиціальних міофібробластах. В нормі даний білок експресується у клітинах ендотелію судин. Підвищення експресії α -SMA в мезангіальній тканині призводить до зниження функцій нирок. При нирковій патології у фібробластах спостерігається одночасна експресія двох маркерів як *FSP-1* (фібробласт-специфічний білок 1), так і α -SMA, в той час як зазвичай ці фактори є характерними для різних популяції фібробластів. Більш того, існує пряма кореляція між прогресуючою загибеллю епітеліальних клітин каналців з прогресуванням фіброзу і більш важким нирковим тубулоінтерстиціальним фіброзом в нирках. Результати наших досліджень показали, що у тварин ООС відбувається підвищення рівня експресії експресії *Acta2*, *S100a4*, *Colla1* і *Fn1* в 2-10 разів у порівнянні з контролем (рис. 3.3).

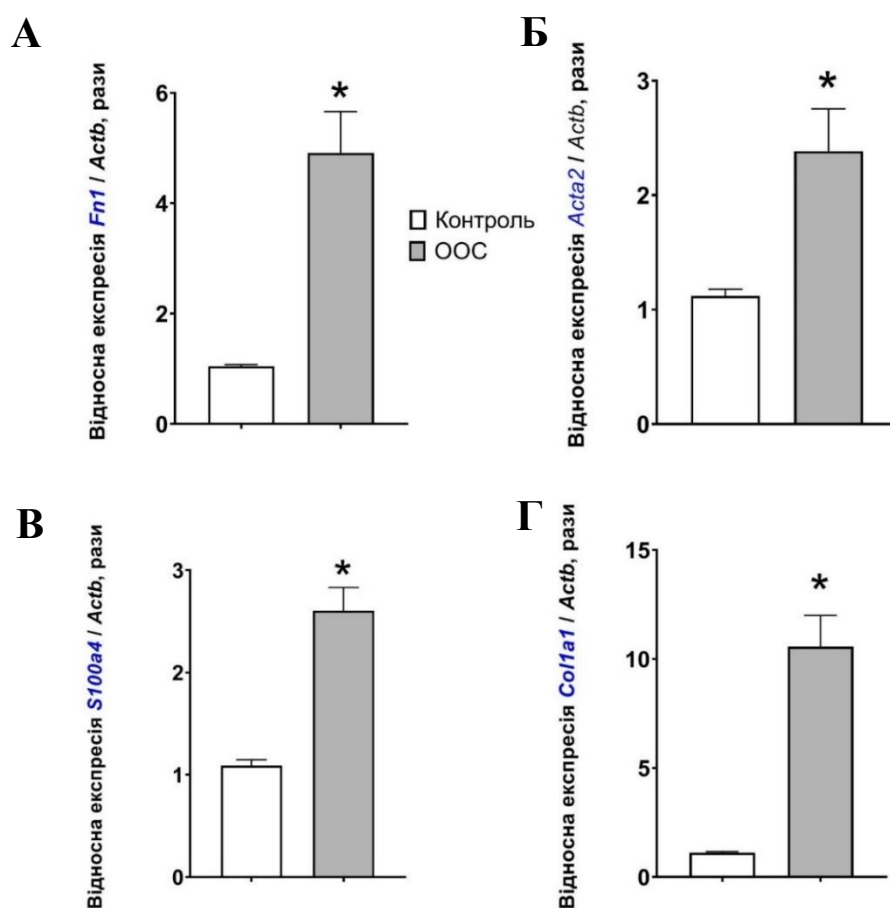


Рис. 3.1.3. Відносний рівень експресії генів *Fn1* (А), *Acta2* (Б), *S100a4* (В) і *Colla1* (Г) в тканинах нирок дослідних мишей; ($M \pm m$, $n=8$);

*– $p \leq 0,05$ порівняно з контролем

Таким чином, зважаючи на інформативність цих маркерів патологічного процесу, ми можемо стверджувати про розвиток фіброзного процесу під час ХХН на моделі ООС, на 3-й день після обструкції сечоводу.

У результаті проведених досліджень було виявлено значні пошкодження структури нирки: зменшення кількості канальців, атрофію канальців, розширення канальців, кістозну дилатацію, апоптоз епітеліальних клітин канальців, тубулоінтерстиціальний фіброз і накопичення ЕСМ. Площа просвіту канальців збільшилася в 5 раз у мишей з ООС, порівняно з контролем (рис. 3.1.4).

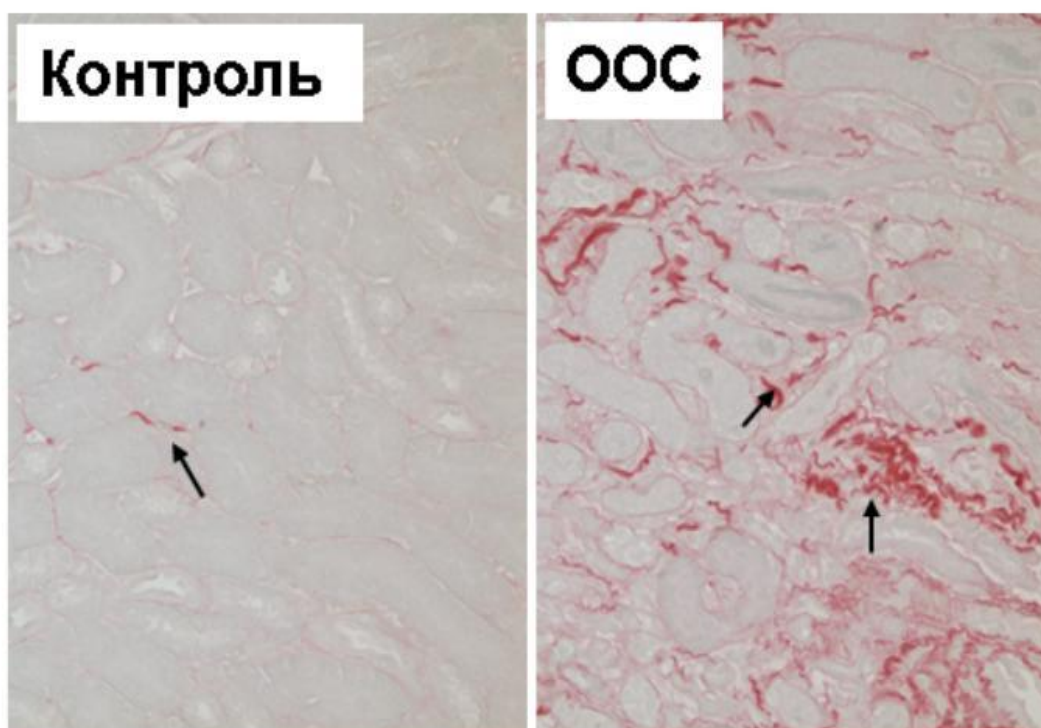


Рис. 3.1.4. Мікрофотографії тканин нирок з візуалізацією ділянок локалізації колагену (показані стрілками) у дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$)

Було виявлено високий рівень накопичення ниркового колагену (білка ЕЦМ) в нирках групи ООС в порівнянні з контролем. В результаті майже в 3 рази вищий рівень колагену в нирці ООС в порівнянні з контрольною ниркою (рис. 3.1.4).

В даній роботі рівень колагену, який використовувався як маркер для підтвердження розвитку ниркового фіброзу у мишей групи ООС, визначався за двома параметрами: безпосередній вміст даного білка і експресія його гену. Цей рівень експресії білка колагену, визначали гістологічним аналізом колагену в нирках, а також встановлення вмісту гідроксипроліну в нирковій тканині. Гідроксипролін - амінокислота, яка є специфічним маркером колагенових білків, оскільки міститься майже виключно у складі молекули колагену. Рівень гідроксипроліну прямо корелює з рівнем колагену, присутнім у зразку, що допомагає діагностувати патологічні стани, пов'язані з надмірним утворенням колагену. Високий вміст гідроксипроліну в нирках є результатом катаболічних процесів в сполучній тканині і може відображати ступінь активності даного процесу [114, 148-149]. При фіброзі високий вміст гідроксипроліну корелює з відповідним високим рівнем формування колагену. Колаген є важливим білком позаклітинного матриксу та вирішальним учасником фіброзного процесу.

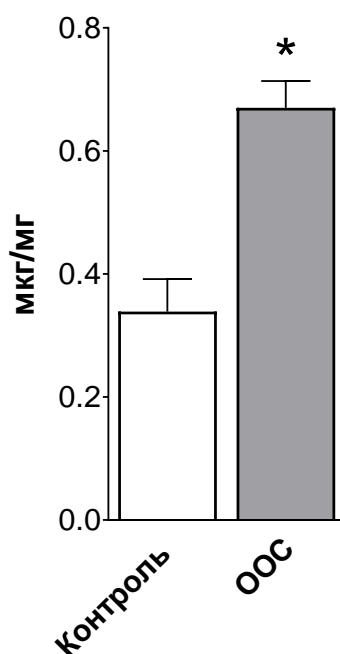


Рис. 3.1.5. Вміст гідроксипроліну в тканинах нирок дослідних мишей; (M±m, n=8);

*– $p \leq 0,05$ порівняно з контролем

У ході проведеного дослідження показано, що миші з ООС мали підвищений рівень гідроксипроліну ($6,4 \pm 0,30$ мкг/10 мг білка) в порівнянні з мишами контрольної групи ($2,5 \pm 0,05$ мкг/10 мг білка) (рис.3.1.5). Аналіз отриманих даних дозволяє встановити, що рівень вільного гідроксипроліну на третій день дослідження в 2,6 раза перевищував показники контрольної групи, ймовірно, у зв'язку з інтенсивністю формування колагену в мишей з патологією нирок. Отже, підвищення у тканинах нирок вмісту гідроксипроліну у декілька раз, порівняно з контрольною групою, свідчить про розвиток фіброзу у мишей з ООС через активацію синтезу колагену.

Отримані результати проведених досліджень підтверджують, що експериментальна модель ООС, відтворена на мишах відповідає клініко-біохімічній картині розвитку запалення та ниркового фіброзу, що дає змогу нам використовувати її для подальших досліджень щодо перевірки терапевтичного потенціалу нових антифіброзних засобів.

3.2. Показники запалення та фіброзу в тканинах нирок мишей з моделлю ООС та за введення інгібітора sEH, агоніста PPAR- γ , їх комбінації та нової біфункціональної молекули RB394

Результати нещодавніх досліджень показали, що інгібітори sEH протидіють захворюванням нирок і серцево-судинної системи, шляхом активації протизапальних і антифіброзних процесів [154]. PPAR- γ є представником родини ядерних рецепторів PPAR і грає ключову роль у метаболічному гомеостазі, а також у протизапальних процесах. З огляду на це PPAR- γ використовують у лікуванні різних захворювань людини [164]. Кілька досліджень показали помітні антифіброзні ефекти агоністів PPAR- γ . PPAR- γ залучений до регуляції профібротичної передачі сигналів і блокує відкладення матриксу та фіброгенез, що було доведено на моделях діабетичного гломерулосклероза [155] і CCl-індукованого фіброзу печінки [156]. Однак

молекулярні сигнальні шляхи, за допомогою яких PPAR послаблює ООС-індукований фіброз, недостатньо добре охарактеризовані. Відомо про роль PPAR у регуляції рівня активних форм кисню (АФК) в гіпоталамусі у мишей, які перебували на дієті з високим вмістом жирів [157], а також за умов розвитку індукованого ЛПС (ліпополісахарид) запалення [158]. Як відомо, PPAR- γ також бере участь у модуляції передачі сигналів TGF- β 1/Smad3. Агоніст PPAR- γ класу тiazолідиндіонів (TZD) послаблює ООС-індукований інтерстиціальний фіброз і розвиток запалення в нирках шляхом пригнічення експресії TGF- β 1 [159-160].

Фізіологічна і патофізіологічна роль PPAR- γ була предметом досліджень протягом декількох десятиліть, і агоністи PPAR- γ зокрема TZD, були розроблені для лікування кардіометаболічних захворювань [12]. Препарати даного ряду «Rosiglitazone» і «Pioglitazone» США, сприятливо впливають на підвищення інсуліну і зниження рівня глюкози в крові. Проте, клінічне використання TZD обмежене через ряд побічних ефектів, зокрема надмірне збільшення ваги, затримка рідини і підвищення ризику остеопорозу. Лікування Розіглітазоном (Rosi), широко використовуваним TZD, призводило до збільшення ризику розвитку серцево-судинних ускладнень, про що свідчать результати проведених клінічних випробувань [161]. Препарат Rosi був вилучений з ринку через гепатотоксичні ефекти, а Піоглітазон викликав рак сечового міхура [161]. Іншим недоліком є слабкий вплив TZD на виникнення макросудинних подій, хоча він урівноважує рівні глюкози в крові і зменшує мікросудинні ускладнення [13]. У цьому контексті важливо згадати, що деякі з побічних ефектів, які спостерігалися з TZD, такі як розвиток раку і гепатотоксичність, ймовірно, є характеристикою поодиноких випадків, а не явищем постійного характеру [162].

У попередніх дослідженнях ми продемонстрували, що комбінована терапія з використанням синтетичного інгібітора sEH і препарату Розіглітазон (Rosi) – одного з відомих агоністів PPAR- γ класу тiazолідиндіонів, супроводжувалася зниженням кров'яного тиску, рівня глюкози, тригліцеридів і вільних жирних кислот [97-98]. Ми припустили, що фермент sEH може бути потенційною мішенню дії антифіброзних препаратів, а комбінація його інгібіторів з

агоністами PPAR- γ може посилювати антифіброзний та протизапальний ефект. Тому, у своїх подальших дослідженнях ми використали мишей з моделлю ООС для перевірки нашої гіпотези щодо антифіброзного потенціалу інгібітора sEH, агоніста PPAR- γ Rosi, їх комбінації, а також новосинтезованої сполуки RB394.

Попередні результати показали, що у мишей з ООС активність PPAR- γ в нирках була значно занижена, в порівнянні з контрольною групою [128]. Дійсно, це дуже важливі результати, що стосуються нашої мети - вивчити терапевтичний ефект біфункціональної молекули, що володіє фармакофором агоніста- PPAR- γ і розчиним sEHі. Ця унікальна сполука здатна одночасно інгібувати sEH і активувати PPAR - γ . Використання сполуки потенційно може забезпечувати надійний захисний вплив на нирки при ХХН.

У більш ранньому дослідженні на щурах зі спонтанно-гіпертонічним ожирінням (SHROB) ми продемонстрували, що комбінована терапія з використанням синтетичного інгібітора sEH (t-AUCB) і комерційного препарату Rosi- агоніста PPAR- γ супроводжувалася зниженням кров'яного тиску, а також зниженням рівня глюкози, тригліцеридів і вільних жирних кислот. В ході експерименту також було продемонстровано позитивну дію комбінованої терапії на нирки, що відображалося у послабленні пошкодження нирок. Ми також показали додатковий позитивний синергетичний ефект комбінацій терапій у порівнянні з монотерапією за використанням sEH або Rosi [128].

Отримані нами дані щодо антифіброзних ефектів EET, його синтетичних міметиків і інгібіторів sEH у різних органах, включаючи нирки співпадають з результатами інших дослідників [173]. Розчинна епоксидгідролаза є критичним ферментом метаболічного шляху EET і регулює біодоступність EET. Справді, з'являється все більше свідчень того, що підвищення рівня EET дійсно має захисну дію на серцево-судинну систему і нирки. Наприклад, підвищення рівнів EET за рахунок пригнічення sEH знижує артеріальний тиск і зменшує пошкодження нирок у модельних тварин.

Недавні дослідження показали покращений ангиогенез ендотеліальних клітин-попередників, отриманих від пацієнтів з гострим інфарктом міокарда,

шляхом інгібування sEH і подальшої активації PPAR- γ за рахунок накопичення EET. Ці дані вказують на значний ступінь перехресної взаємодії між PPAR- γ і sEH [13, 162]. Цікаво, що агоністи PPAR- α і PPAR- γ індукують експресію sEH [163]. Сьогодні існує гостра медична потреба в більш безпечних препаратах, модулюючих PPAR- γ та таких, що володіють додатковими захисними властивостями по відношенню до кардіо- та ниркових систем. Саме тому комбінація агоніста PPAR- γ з інгібітором sEH в одному препараті може бути перспективною для підвищення ефектів лікування ХХН. Основним побічним ефектом відомих активаторів PPAR- γ є затримка води, яка призводить до збільшення ваги і набряків. При цьому, інгібування sEH призводить до збільшення біодоступності EET, що є натрійуретичним фактором і позитивно впливає на гомеостаз води і електролітів [175]. Отже, інгібітор sEH протидіє побічному ефекту активаторів PPAR- γ , якщо ми комбінуємо їх разом або вводимо одночасно. З огляду на ці позитивні ефекти інгібіторів sEH при серцево-судинних і ниркових захворюваннях, ми розробили новий препарат RB394, який поєднує у собі інгібітор розчинної епоксидгідролази- sEH і активатор ядерних рецепторів PPAR- γ [145] (Рис.3.2.1).

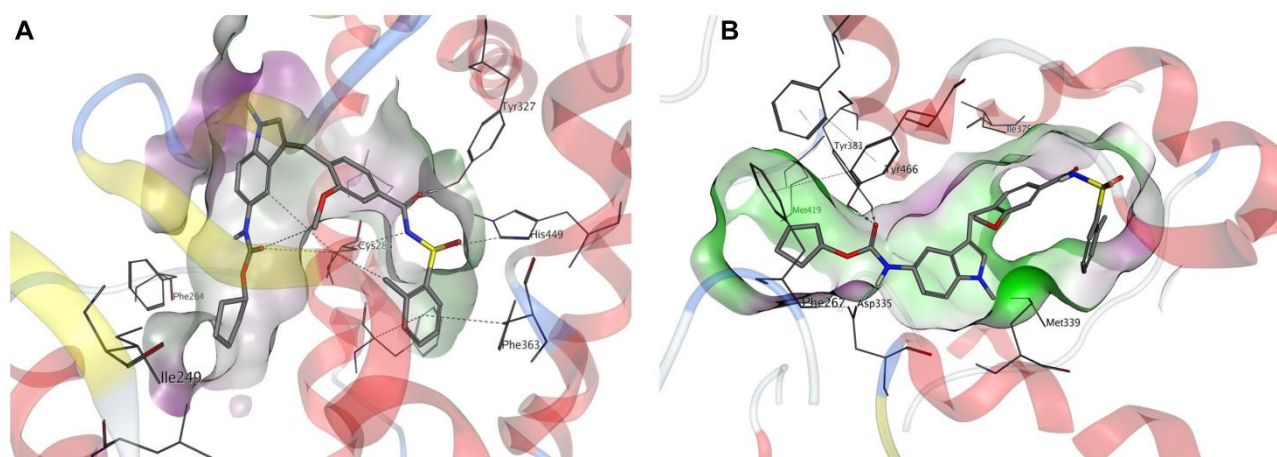


Рис. 3.2.1. Схематичні зображення активації PPAR- γ , де ацил сульфонамідні фрагменти вказують на амінокислотні залишки, що відповідають за рекрутування і активацію рецептора (А) та інгібування sEH, зумовлене взаємодією карбаматного фрагменту з каталітичною тріадою ферменту(В) [145]

У цілому, дані наших недавніх експериментів, а також більш ранніх досліджень, проведених нашою групою на моделі ООС, демонструють, що через 3 доби після операції ООС, у мишей розвивається нирковий фіброз. Більш того, ці дані виправдовують наш підхід до вивчення терапевтичного ефекту досліджуваної молекули шляхом введення її на 3 день захворювання. Отже, ці результати дозволили нам розробити відповідний експериментальний протокол для вивчення терапевтичного потенціалу наступного тестованого препарату RB394.

У цьому дослідженні ми вивчали антифіброзні ефекти RB394 на моделі фіброзу нирок у мишей, з метою визначення потенціалу агоніста PPAR- γ подвійної дії і інгібітору sEH для зниження фіброзу нирок. Дійсно, фіброз органів визнаний однією з основних медичних проблем, який може привести до прогресуючої дисфункції системи багатьох життєво важливих органів, включаючи нирки. Прогресуючий нирковий фіброз, що являє собою складний процес, вважається незалежним попередником довгострокового прогнозу ХХН [164]. На сьогодні ефективне лікування ниркового фіброзу відсутнє, і велика кількість досліджень направлена на розробку ефективних протифіброзних препаратів [164]. Саме тому ми поставили собі за мету дослідити потенціал нової біфункціональної молекули в ослабленні прогресування ниркового фіброзу на моделі ООС у мишей з нирковим фіброзом.

На перших етапах дослідження новосинтезовану сполуку RB394 було перевірено на токсичність. Ми провели цитотоксичне дослідження сполуки RB394 *in vitro* в клітинах Hela і HepG2 з використанням аналізу WST-1[145]. Результати аналізу WST-1 свідчать, що додавання RB394 в концентрації 30 мкм щодним чином не впливає на життєздатність клітин.

В доповнення до цього, ми провели дослідження *in vivo*, де використовували мишей-самців лінії C57BL/6JRj. RB394 вводили з питною водою в дозі 30 мг/кг протягом 2 тижнів. Протягом періоду лікування за мишами уважно спостерігали на предмет будь-яких ознак фізичних і поведінкових відхилень. Не було виявлено ніякого пагубного впливу на фізичні і поведінкові характеристики

мишей протягом 2-тижневого протоколу. Також не було виявлено жодних морфологічних змін у печінці, нирках та інших органах, які ми досліджували у мишей, що отримували RB394. Отже, за даних умов введення новосинтезована сполука RB394 не проявила токсичних ефектів.

Функціональний стан нирок порушується під впливом патологічних факторів різної природи, в тому числі метаболічних, імунологічних, інфекційних та інших. Важливим аспектом ХХН є пошкодження каналців, зокрема, пошкодження епітелію каналців, яке часто зустрічається при фіброзі нирок. Неінвазивним методом діагностики функціональної та структурної аномалії нирок є вивчення активності відповідних маркерних ферментів, серед яких наприклад N-ацетил- β -D-глюкозамінідаза (НАГ). Підвищення активності ферменту НАГ є важливим критерієм діагностики ХХН, оскільки свідчить про пошкодження ниркової паренхіми, зокрема ендотелію проксимальних каналців нефрона [1]. В даній роботі ми дослідили активність НАГ у зразках сечі. У мишей з ООС спостерігалось 3-х кратне підвищення активності НАГ у сечі порівняно з контролем, а лікування препаратом RB394- привело до зниження рівня активності НАГ (рис. 3.2.2).

Тоді як за умов введення інгібітора sEH, даний показник був зниженим у 1,8 раза, а за умов введення Rosi окремо та в комбінації Rosi й інгібітора sEH – у 2,4 та 2,6 раза, порівняно з показником групи ООС. При введенні новосинтезованої біфункціональної сполуки RB394, показник активності НАГ був зниженим у 2,7 раза, порівняно з групою ООС, однак все ще залишався достовірно високим, порівняно з контролем (рис. 3.2.2).

Порівняльний аналіз результатів щодо активності НАГ за умов введення різних схем терапії, свідчить, що нова біфункціональна молекула RB394 сприяє зниженню активності ферменту і, відповідно, уповільнює пошкодження нирок ефективніше, ніж застосування окремо інгібітора sEH та агоністом PPAR- γ , і їх комбінації.

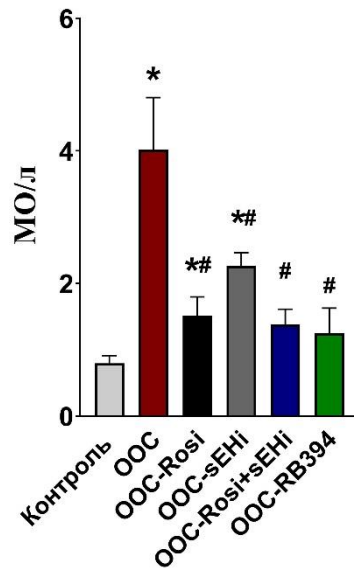


Рис. 3.2.2. Активність НАГ в сечі в дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з OOC групою

В нашій роботі ми використовували комерційний препарат Rosi, в якості контролю- агоніста ядерних рецепторів PPAR- γ . Зважаючи на те, що активація PPAR- γ має антифіброзну дію при діабетичній нефропатії та інших ХХН, даний препарат широко використовують у клінічній практиці. В цьому дослідженні Rosi слугував в якості контрольної молекули агоніста PPAR- γ для порівняння антифіброзних і захисних властивостей RB394 на нирках.

В ході роботи ми провели доклінічні, біохімічні, гістологічні та молекулярно-біологічні експерименти, щоб визначити біологічні ефекти нашої біфункціональної молекули RB394 при фіброзі нирок. Ми досліджували механізм її антифіброзної і захисної дії на нирки щодо трьох основних механізмів фіброзу нирок: формування позаклітинного матриксу, пошкодження судин і каналців.

Патологічний фіброз визначається, як надмірне відкладення ЕЦМ, яке порушує структуру нормальної тканини, тим самим порушуючи функцію нирок. ЕЦМ при інтерстиціальному фіброзі багатий фібрилярним колагеном I, III і IV

типів, фібронектином, α -гладким м'язевим актином (α -SMA), та іншими компонентами. Важливими ознаками патофізіології ниркового фіброзу є утворення інтерстиціальних міофібробластів і ЕЦМ. Наявність міофібробластів у нирках, ідентифікують за рівнем експресії α -SMA в них, що рідко присутні в нормі. Міофібробласти відіграють критичну роль в синтезі і накопиченні основних компонентів ЕЦМ- колагену і фібронектину [176].

Згідно наведених даних, ми провели гістологічне дослідження на визначення вмісту колагену і α -SMA, як основних компонентів ЕЦМ (рис. 3.2.3).

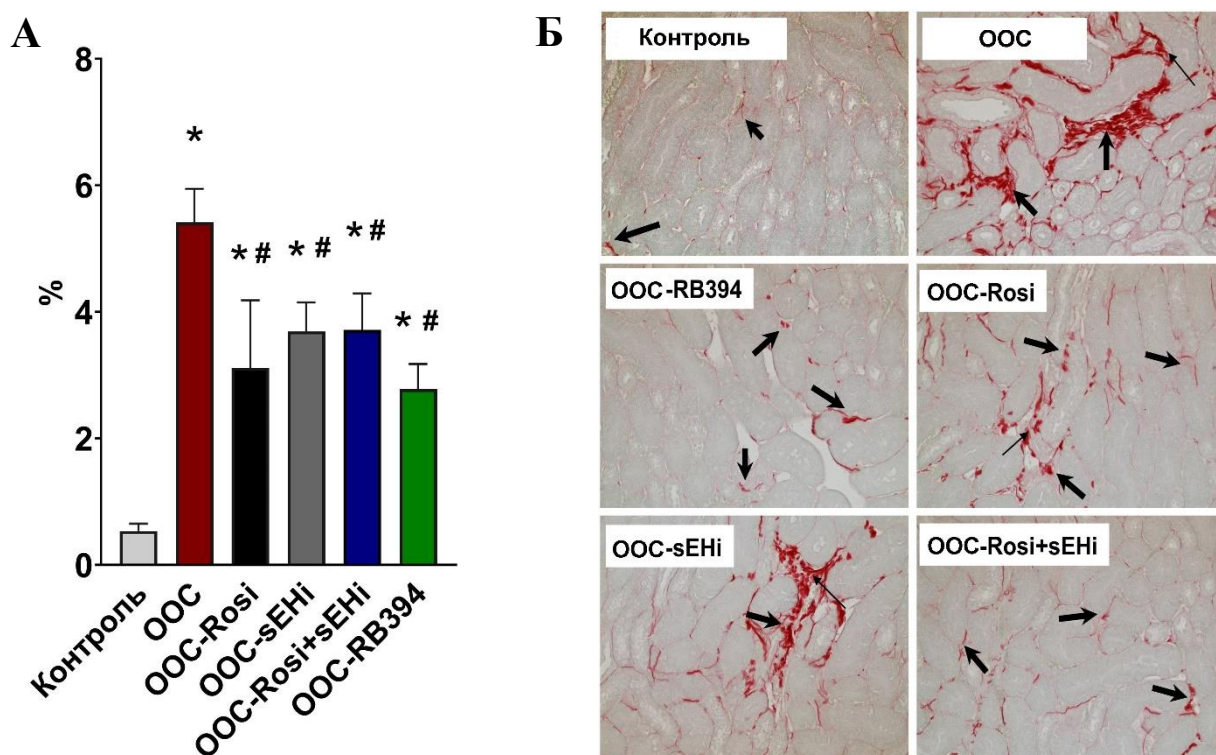


Рис. 3.2.3. Відносний вміст колагену (А) та мікрофотографії тканин нирок дослідних тварин з візуалізацією ділянок локалізації колагену (Б); місця локалізації відповідних білків показані стрілками; ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з OOC групою

Підвищений рівень цих показників у тканині нирок вказує на розвиток фіброзу. Було виявлено, що у мишей з ООС розвинувся виражений нирковий фіброз з підвищеним рівнем колагену у 4,8 раза порівняно з нормою (рис. 3.2.3).

Тоді як, за введення досліджуваних сполук спостерігали зниження накопичення колагену в ниркових тканинах, де за умов застосування агоніста PPAR- γ цей показник знизився у 1,9 раза, sEH у 1,5 і їх комбінацією у 1,4 раза, відповідно, в порівнянні з контролем ООС.

За умов введення різних комбінацій препаратів, ми виявили, що нова біфункціональна молекула RB394 має потужну антифіброзну дію, знижуючи формування колагену у 2 рази в нирках в порівнянні з групою ООС без додавання препаратів. За результатами дослідження, було показано збільшення вмісту гідроксипроліну в 10 раз у тварин з ООС в порівнянні з мишами контрольної групи (рис.3.2.4).

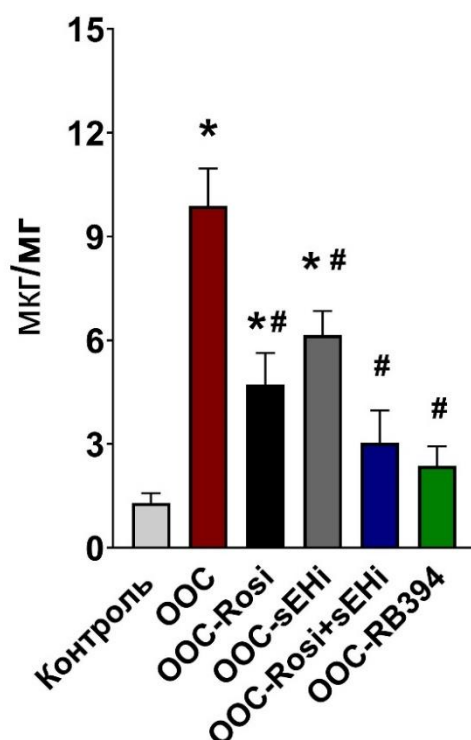


Рис. 3.2.4. Вміст гідроксипроліну в тканинах нирок дослідних тварин; (M \pm m, n=8);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

Результати біохімічного аналізу підтверджують дані гістологічного аналізу, які свідчать про підвищений рівень колагену. Більш того, ці дані чітко вказують на роль аномального утворення колагену при фіброзі нирок у нашому дослідженні. За умов введення дослідним тваринам з ООС агоніста PPAR- γ та інгібітора sEH окремо спостерігали зниження показника вмісту гідроксипроліну у 2,1 та 1,6 раза, відповідно, порівняно з групою ООС. Однак, за введення комбінації даних сполук, а також біфункціональної молекули RB394 відмічали зниження вмісту гідроксипроліну до контрольного рівня (рис. 3.2.4). Крім гістологічного та біохімічного аналізу, ми також досліджували рівень декількох білків ЕЦМ (рис. 3.2.5).

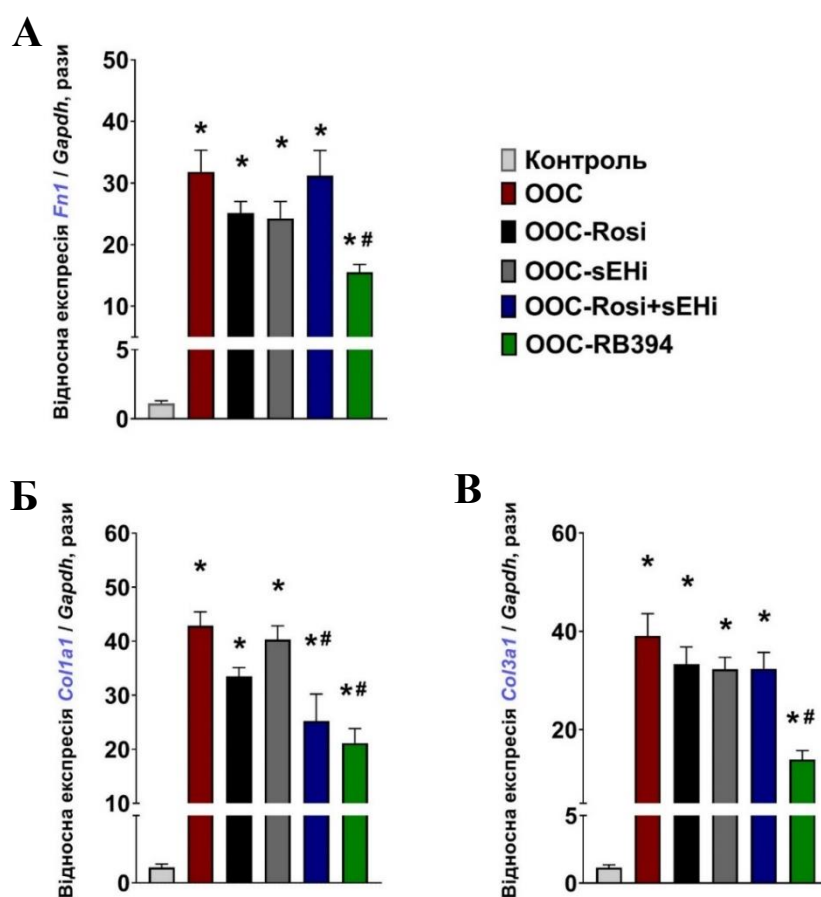


Рис. 3.2.5. Відносний рівень експресії генів *Fnl* (А), *Colla1* (Б) і *Col3a1* (В) в тканинах нирок дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

Застосування цього експериментального дослідження дозволило підтвердити висновки про формування ЕЦМ і прогресування ниркового фіброзу, зроблені після проведення гістологічного аналізу. Так, у тканинах нирки мишей з ООС було виявлено вищу в 40 раз експресію генів профібротичних білків *Fnl*, *Colla1* і *Col3a1* у порівнянні з контрольною групою (рис. 3.2.5)

В мишей з ООС досліджувальних груп, яким вводили агоніст PPAR- γ , або інгібітор sEH, або комбінацію PPAR- γ і інгібітор sEH відбувалося зниження експресії фібротичних генів, у порівнянні з контрольною групою ООС. Рівень експресії цих генів по-різному залежить від препарату, серед усіх досліджуваних препаратів, біфукціональна молекула RB394 найбільш ефективно знижував прогресію експресії *Fnl*, *Colla1* і *Col3a1* у 1,9 раза, у 2 рази і у 2,3 раза, відповідно, в нирках мишей з патологією.

Під час фіброзу більшість фіброblastів експресують α -гладкий м'язевий актин, який вважається маркером переходу мезенхімальних клітин в міофіброblastи. Дійсно, він є важливим маркером зрілих профібротичних міофіброblastів і сприяє утворенню позаклітинного матриксу під час фіброзного процесу ХХН. α -SMA використовується в якості важливого фіброзного маркера, оскільки його відносно легко виявити, а накопичення міофіброblastів, як було показано, пов'язане з розвитком фіброза і прогресуванням ХХН. Результати наших досліджень показали збільшення рівня α -SMA в 4,8 раза в тканинах нирок мишей ООС порівняно з контролем (рис. 3.2.6).

Ми також виявили, що всі види експериментальної терапії знижували експресію α -SMA, так за умов введення sEH даний показник знижувався у 1,5 раза, за агоніста PPAR- γ та комбінації інгібітор sEH та агоніст PPAR- γ і у 1,7 раза, відповідно, в порівнянні з контрольною групою ООС. Водночас, новосинтезована молекула RB394 виявилась найбільш ефективною, знижуючи даний показник у 2,1 раза. Другою за ефективністю виявилась комбінація інгібітора sEH і агоніста PPAR- γ (рис. 3.2.6).

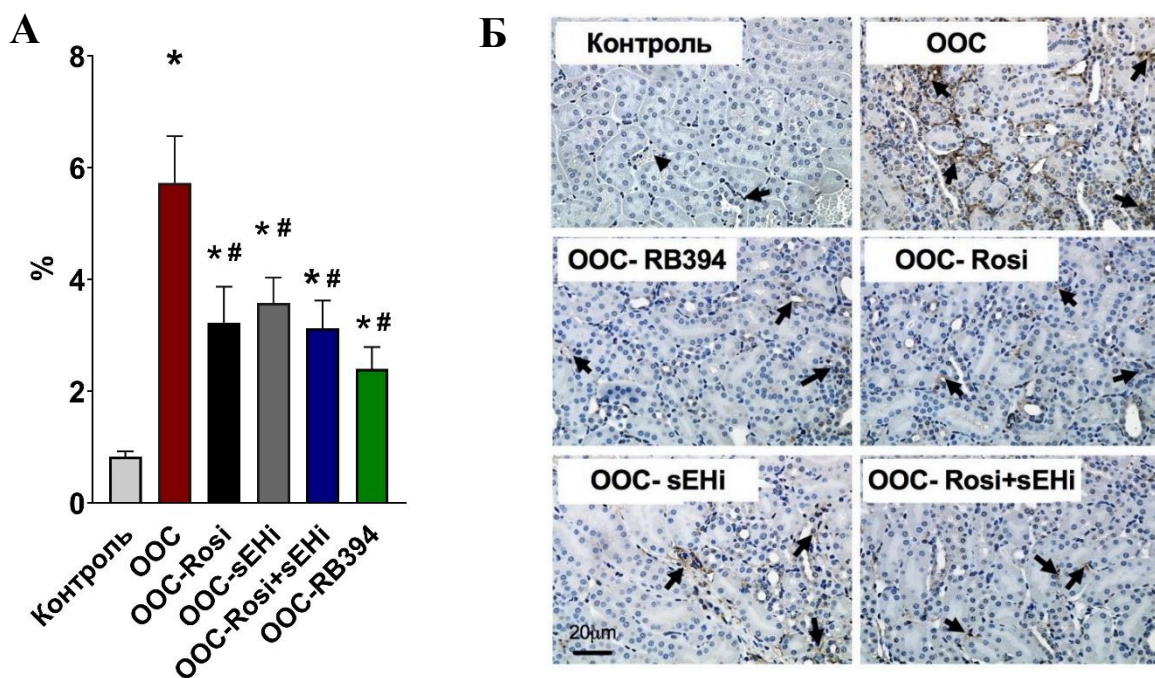


Рис. 3.2.6. Відносний вміст α -SMA (А) та мікрофотографії тканин нирок дослідних тварин з візуалізацією ділянок локалізації α -SMA (Б); місця локалізації відповідних білків показані стрілками; ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

Крім того, ми також оцінили показники регуляторних маркерів фіброзу *Tgfbr2*, *Snail*, *Snai2* і *Twist1* за рівнем експресії цих генів у тканинах нирок. Гени *Snail* і *Twist* регулюють експресію білків ЕЦМ. При фіброзі нирок спостерігається підвищення рівня експресії фіброзу *Tgfbr2*, *Snail*, *Snai2* і *Twist* у 8-10 раз вищу в нирках мишей ООС у порівнянні з контролем (рис. 3.2.7).

За умов використання різних досліджуваних сполук було показано значний вплив на експресію цих генів. Відмічено, що на фоні введення молекули RB394, порівняно з іншими сполуками, експресія генів *Tgfbr2*, *Snail*, *Snai2* і *Twist1* достовірно знижувалася та наближалася, або, навіть сягала (у випадку *Tgfbr2* та *Snail*) контрольного рівня. Водночас, експресія TGF- β у нирках мишей була знижена у всіх групах (рис. 3.2.7).

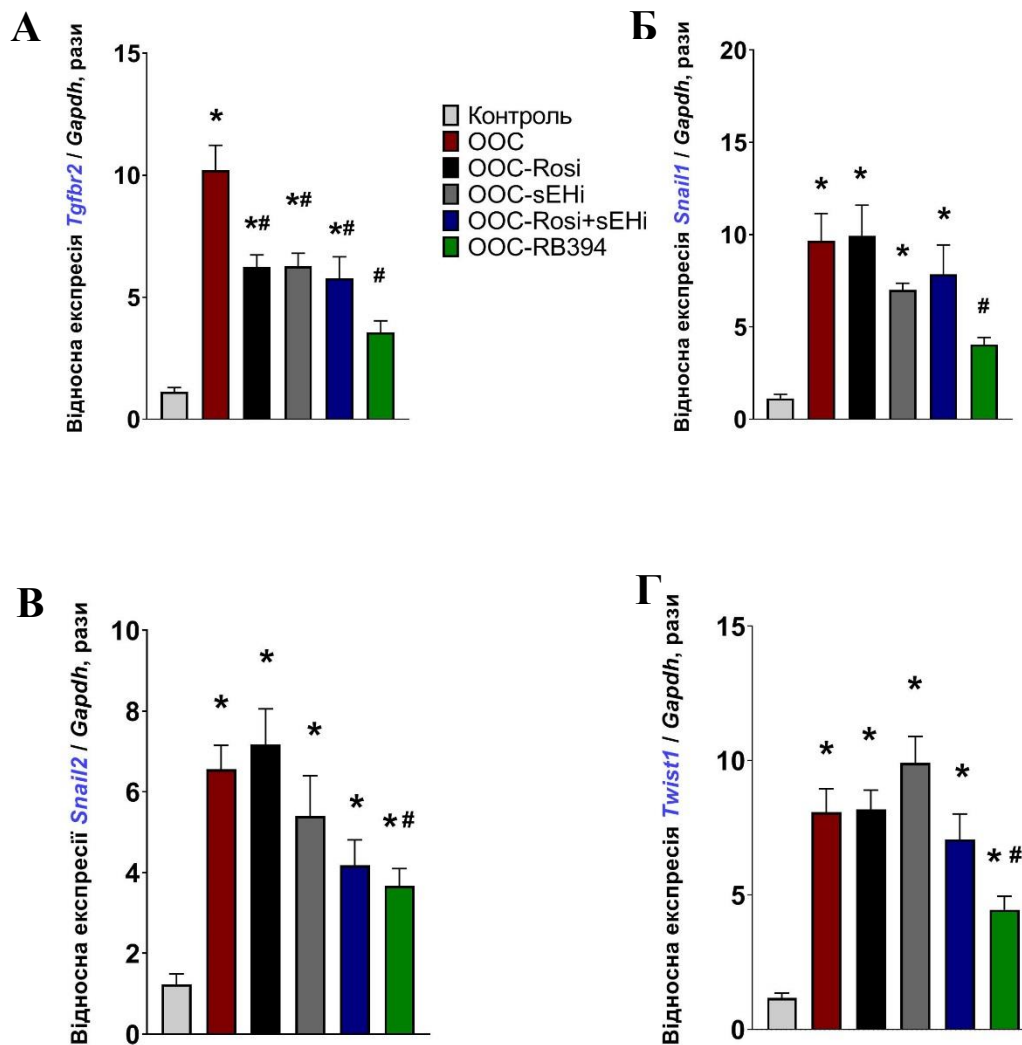


Рис. 3.2.7. Відносний рівень експресії генів *Tgfb2* (А), *Snai1* (Б), *Snai2* (В) і *Twist1* (Г) в тканинах нирок дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

В цілому, наші результати продемонстрували унікальну здатність нової молекули подвійної дії RB394 послаблювати прогресування ниркового фіброзу. Ми також продемонстрували, що молекула RB394 проявляє свою антифібротичну дію, знижуючи експресію регуляторних генів фіброзу в нирках. Наші результати також показали, що RB394 володіє сильнішою антифібротичною дією в порівнянні з інгібітором sEH і агоністом PPAR- γ або, а також їхньою комбінацією.

В попередньому дослідженні, ми продемонстрували подібний вплив новосинтезованої молекули RB394 на нирки, яка запобігала і знижувала вміст інтерстиціального колагену в нирках і знижувала формування міофібробластів на моделях діабетичної нефропатії, мимовільному гіпертонічному ожирінні і жирних ZSF1 щурів [132]. Здатність знижувати утворення інтерстиціального колагену в нирках і формування міофібробластів також відома для інгібітора sEH та агоніста PPAR- γ , включаючи препарат Rosi.

Отже, підсумовуючи вищесказане, можна констатувати, що у мишей з ООС через 3 дні після операції розвивається фіброз, підтвердженням цьому є підвищення рівнів компонентів ЕЦМ при інтерстиціальному фіброзі. Ми порівняли дію RB394 на нирки з інгібітором sEH, агоністом PPAR- γ - Rosi і їх комбінацією. У результаті проведених досліджень було виявлено, що RB394, як комбінований препарат, має кращий лікувальний ефект у боротьбі з фіброзом, в порівнянні з іншими.

Наші результати продемонстрували багатообіцяючі терапевтичні дії RB394, які проявляються у зниженні прогресування ниркового фіброзу, шляхом впливу на множинні патофізіологічні події, які сприяють розвитку цієї патології.

У поточному дослідженні ми вивчали антифібротичну дію препарату RB394, біофункціональної молекули, яка володіє агоністичною активністю PPAR- γ та є інгібітором sEH на моделі ООС фіброзу нирок. Ми також порівняли антифібротичну дію RB394 з комерційно доступним агоністом PPAR- γ та синтетичним інгібітором sEH і їх комбінацією. Ми продемонстрували, що біфункціональна молекула RB394 має помітний антифібротичний ефект, пов'язаний зі зниженням утворення білків ЕЦМ, і її ефект перевершує будь-які інші схеми досліджуваних сполук, використані в цьому дослідженні.

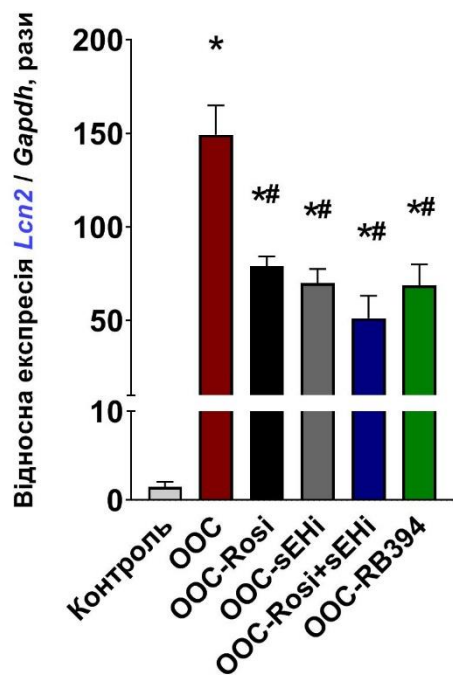
Однак важливо відзначити, що як агоніст PPAR- γ , так і інгібітор sEH, як відомо, мають антифіброзну дію. Відомо, що в епітеліальних клітинах ниркових каналців, під дією глюкози, розвивається виражений тубулярний фіброз з утворенням ЕЦМ, а агоніст PPAR- γ Pioglitazone здатний зменшувати його [165]. Аналогічні антифіброзні ефекти агоністів PPAR- γ також були описані в ряді

моделей ниркового захворювання з фіброзом нирок, включаючи модель ООС, де агоністи PPAR- γ знижують утворення ЕЦМ [165-166]. Антифіброзний ефект інгібітора sEH також був описаний в декількох наших попередніх дослідженнях. Було показано, що генетичне або фармакологічне інгібування sEH, впливаючи на патофізіологію множинного фіброзу нирок, помітно уповільнює розвиток ниркового фіброзу і знижує рівень маркерів ЕЦМ на моделі ООС [8-9].

Поряд з утворенням ЕЦМ, пошкодження ниркових каналців є ще одним важливим патофізіологічним процесом ниркового фіброзу. У цьому дослідженні ми продемонстрували виражене пошкодження ниркових каналців на моделі ООС в порівнянні з контролем. Пошкодження ниркових каналців оцінювали шляхом дослідження кількох клінічно важливих маркерів ушкодження ниркових каналців. Ми виміряли експресію генів окисного стресу *Lcn2*, так *Havcr1* у нирках, а також рівні NGAL і KIM-1 в сечі, оскільки вони вважаються важливими маркерами ушкодження ниркових каналців. Відповідно, захворювання нирок супроводжується збільшення концентрації. KIM-1 має схожі властивості і також є важливим маркером ушкодження ниркових каналців. KIM-1 відсутній у нормальній здоровій нирці і різко збільшується в апікальній мембрані епітелію проксимальних каналців при пошкодженні.

У цьому дослідженні ми продемонстрували значне перевищення у 150-200 разів експресії генів, таких як *Lcn2*, так *Havcr1* у нирках мишей ООС у порівнянні з контролем (рис. 3.2.8 А-Б). Ми виявили, що за умов використання всіх досліджуваних сполук було виявлено зниження експресії генів *Lcn2* і *Havcr1* у нирках в моделі ООС. На відміну від інгібітора sEH і агоніста PPAR- γ , у мишей з ООС комбінація PPAR- γ - sEH і знижували експресію маркерів ушкодження ниркових каналців *Lcn2* і *Havcr1* у 3,1 та 1,5 раза, та молекула RB394 у 2,1 та 2,2 раза, відповідно, порівняно з контролем (рис. 3.2.8 А-Б).

А



Б

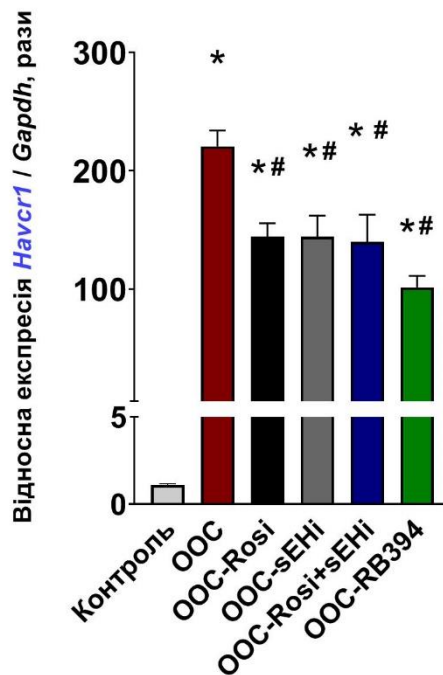


Рис. 3.2.8. Відносний рівень експресії генів *Lcn2* (А), *Havcr1* (Б) в тканинах нирок дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

Методом ІФА було також досліджено вміст NGAL і KIM-1 в сечі. Результати проведеного аналізу показали, що миші ООС мали значно вищий рівень NGAL і KIM-1 у 1000 та 7 раз, відповідно, в порівнянні з контролем (рис. 3.2.9 А-Б). Дослідивши ефект різних комбінацій введення досліджуваних сполук, ми виявили, що біфункціональна сполука RB394 мала максимальний ефект, знижуючи ці показники у 2,5 та 3,5 раза, відповідно, порівняно з контролем.

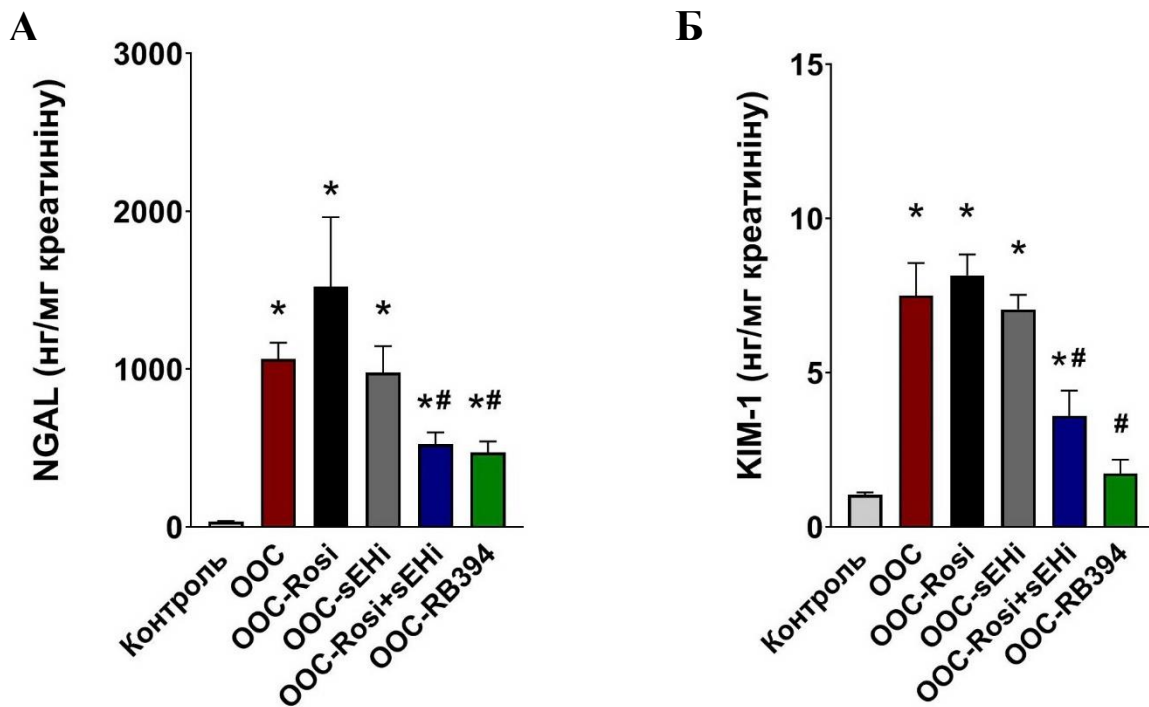


Рис. 3.2.9. Вміст маркерів пошкодження ниркових каналців NGAL (А) і KIM-1 (Б) в сечі дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з OOC групою

В цілому, ми продемонстрували, що антифіброзна дія молекули RB394 пов'язана з її здатністю зменшувати пошкодження каналців. Наші результати показали достовірно високий рівень пошкодження ниркових каналців на моделі фіброзу нирок OOC. В результаті досліджень було виявлено більш високу експресію генів *Lcn2* і *Havcr1* у нирках та їхній підвищений вміст у сечі мишей з OOC в порівнянні з контролем. RB394 знижує експресію генів, а також рівень в сечі цих двох маркерів пошкодження каналців.

Іншим патофізіологічним аспектом фіброзу нирок є пошкодження судин, яке в кінцевому підсумку призводить до втрати судин в нирках. У цьому дослідженні ми досліджували пошкодження судин шляхом визначення експресії генів молекул судинної адгезії *Icam1* і *Vcam1* у тканинах нирок. Відомо, що *Icam1* і *Vcam1* можуть слугувати маркерами пошкодження ендотелію судин і

запального процесу в нирках. Високий рівень експресії цих клітин молекул адгезії спостерігається в нирковому ендотелії під час пошкодження нирок, в тому числі викликаного ООС [114].

Ми також робимо висновок про пошкодження судин нирок, базуючись на 6 та 23-кратному збільшенні експресії генів *Icam1* і *Vcam1* у мишей з ООС в порівнянні з контролем. Ми також виявили, що біфункціональна молекула RB394, а також всі інші схеми терапії помітно знижували експресію генів в нирках *Icam1* і *Vcam1* у мишей із захворюванням (рис. 3.2.10 А-Б).

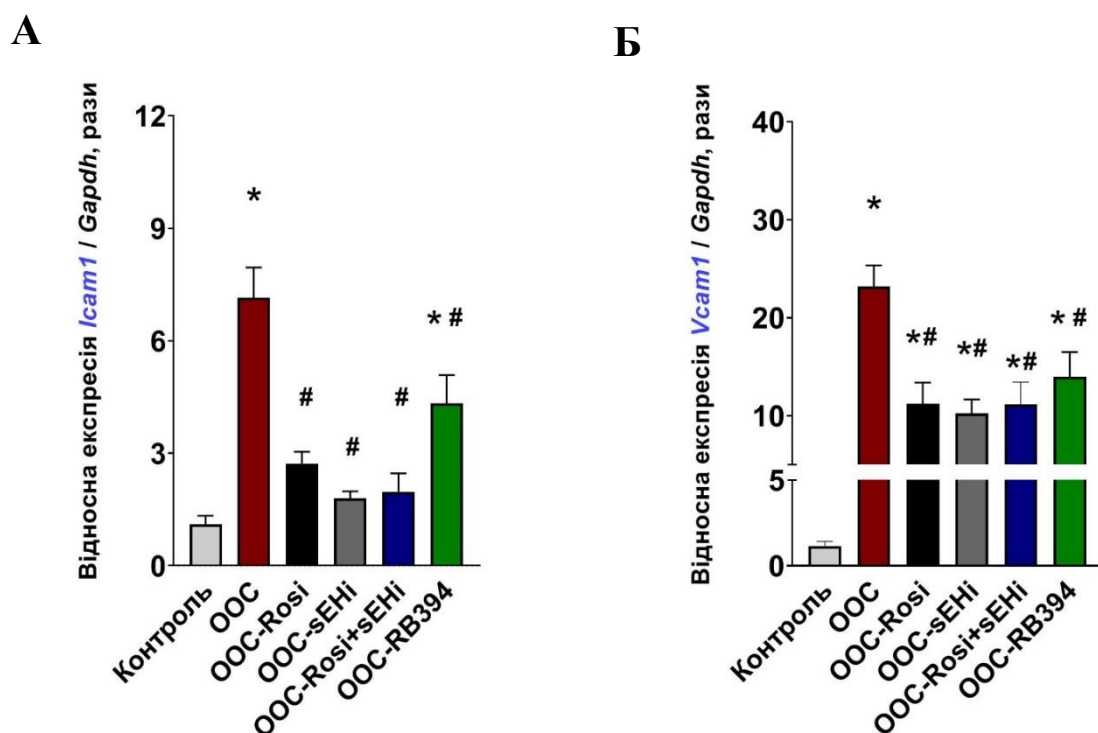


Рис. 3.2.10. Відносний рівень експресії генів *Icam1* (А) і *Vcam1* (Б) в тканинах нирок дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

Кінцевим наслідком запалення і пошкодження ендотелію судин є руйнування або судинної мережі. Важливо відзначити, що втрата судин є важливим механізмом у розвитку фіброзу нирок. Дійсно, пошкодження або руйнація перитубулярної судинної мережі з подальшою хронічною гіпоксією, це є

звичайним явищем при нирковому фіброзі [167]. Саме тому лікарські засоби, які можуть зменшити руйнування і втрату судин, можуть мати значний антифіброзний потенціал. У цьому дослідженні ми вивчали втрату судин під час фіброзу нирок на моделі ООС з використанням ендотеліального CD31⁺ маркера, що є важливим показником судинної мережі нирок [167]. Ми продемонстрували зниження судинної мережі, тобто втрату і пошкодження судин нирок у мишей ООС майже у 5 разів у порівнянні з контролем (рис. 3.2.11 А-Б). Ми також виявили, що всі методи лікування запобігали пошкодженню судин під час розвитку фіброзу нирок, при цьому RB394 був найбільш ефективним, відновлюючи судини майже до нормального стану. На другому місці за ефективністю виявилась комбінація інгібітору sEH і препарату Rosi.

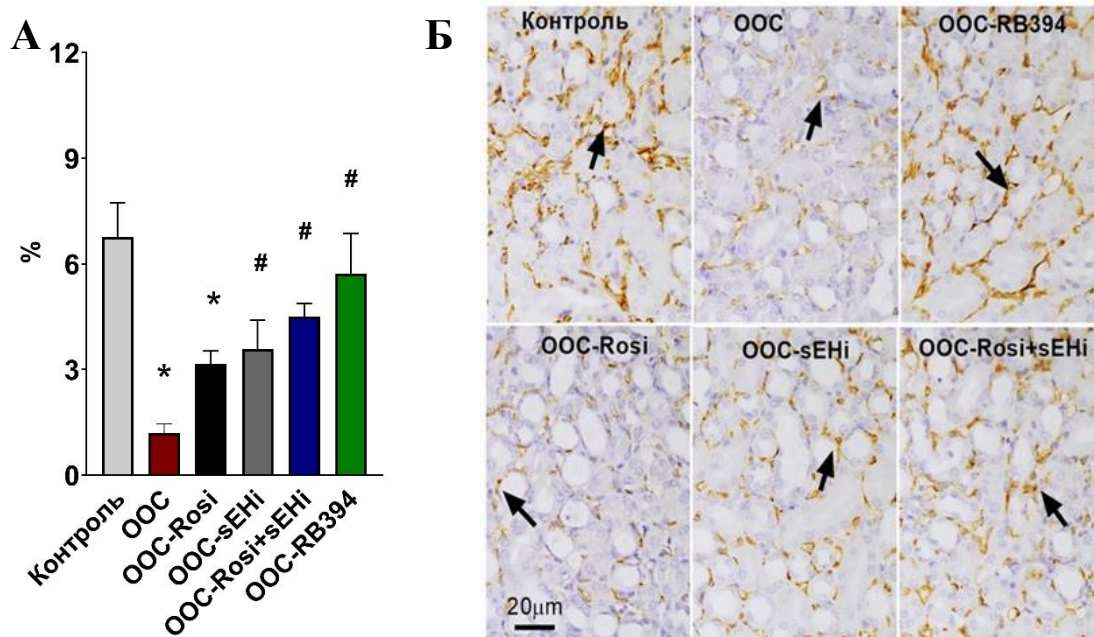


Рис. 3.2.11. Відносний вміст CD31⁺ позитивних клітин (А) та мікрофотографії (Б) тканин нирок дослідних тварин з візуалізацією ділянок локалізації CD31⁺ позитивних клітин (показані стрілками) ($M \pm m$; $n=8$);

*– $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

Захисна дія біфункціональної молекули RB394 на судини, може бути пов'язана з інгібуванням sEH. Пригнічення sEH позитивно позначається на судинній мережі нирок. Захисний ефект інгібітора sEH описується в декількох дослідженнях і може бути пов'язаний з його ангіогенною дією [96]. До того ж, агоніст PPAR- γ – Rosi володіє такими ж позитивними діями на судини. Повідомляється, що агоністи PPAR- γ , такі як Rosiglitazone and Ciglitazone, здатні знижувати експресію фактора, який бере участь в адгезії клітин і пошкодженні ендотелію в моделі ниркової ішемії [166]. Дійсно, Pioglitazone, інший агоніст PPAR- γ , подібний Rosi, продемонстрував захисну дію на ниркові судини при іншій моделі захворювання нирок [165].

В результаті було продемонстровано, що RB394 і комбіноване лікування інгібітором sEH і Rosi чинять виражений захисний ефект на судини при моделюванні фіброзу нирок у мишей ООС. Між інгібуванням sEH і агоністичною активністю PPAR- γ існує синергічний взаємозв'язок. Відомо, що EET може активувати PPAR- γ під час пригнічення sEH інгібітором sEH. [168]. Цей синергізм між агоністом PPAR- γ та пригніченням sEH може бути пов'язаний з захисною дією новосинтезованої молекули подвійної дії RB394, який спостерігаються в цьому дослідженні на моделі ООС.

Таким чином, ми продемонстрували виражену антифіброзну дію RB394, який одночасно діє як інгібітор sEH і агоніст PPAR- γ . Ми також продемонстрували, що антифіброзна дія молекули RB394 може бути пояснена її здатністю знижувати утворення ЕЦМ в нирках, здатністю зменшувати пошкодження ниркових каналців і запобігати втраті ниркових судин під час розвитку ниркового фіброзу.

Важливим патофізіологічним аспектом фіброзу нирок є запалення нирок, і запалення пов'язано з усіма трьома основними явищами фіброзу нирок. У цьому дослідженні, а також у декількох попередніх дослідженнях [8-9] ми показали, що фіброз нирок на моделі ООС супроводжується підвищеною експресією генів профібротичних запальних цитокінів, підвищеним рівнем хемокінів і підвищеною інфільтрацією запальних клітин у нирках.

З огляду на важливу роль запалення в нирковому фіброзі, ми досліджували вплив експериментальних сполук інгібітора sEH і агоніста PPAR- γ , їх комбінації, та молекули RB394 на запальний процес в нирках на моделі ООС. Ми виявили, що у мишей ООС розвинулося запалення в нирках, що виражалось вищим рівнем експресії генів запальних цитокінів *Tnfa*, *Il6* та *Il1b* у 10-ти кратному розмірі в порівнянні з показниками контрольної групи (рис. 3.2.12 А-В). Ми спостерігали дуже схожу тенденцію збільшення рівнів таких же прозапальних цитокінів в тканині нирок у мишей ООС, що є підтвердженням вираженої запальної реакції у мишей ООС (рис.3.2.13 А-В). Важливо відзначити, що підвищення рівня прозапальних цитокінів пов'язано з дисфункцією епітеліальних судин. Підвищене запалення виявляється у пацієнтів з фіброзом нирок при ХХН і передбачається, що запалення відіграє ключову роль у патогенезі ХХН [149].

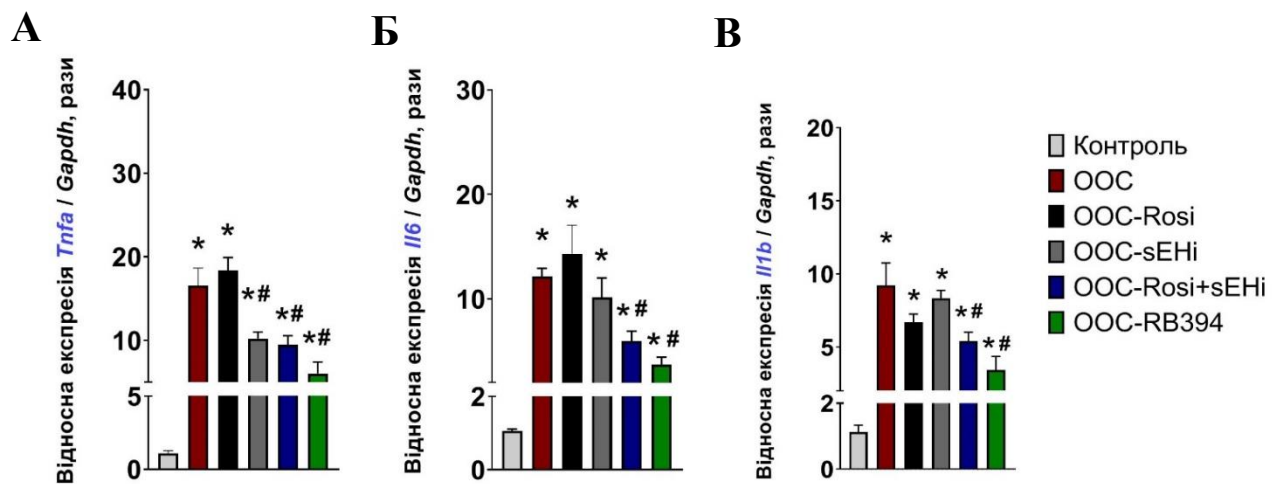


Рис. 3.2.12. Відносний рівень експресії генів *Tnfa* (А), *Il6* (Б) та *Il1b* (В) в тканинах нирок дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

У цьому дослідженні ми виявили, що всі досліджувані сполуки, за винятком Rosi, продемонстрували сильну протизапальну дію і зниження експресії генів *Tnfa*, *Il6* та *Il1b* (рис. 3.2.12 А-В). Ми також виявили, що RB394

був найбільш ефективним у зниженні експресії генів і зниженні рівня цитокінів у тканинах нирки мишей з моделлю ООС.

У результаті проведених досліджень було виявлено аналогічний ефект інгібітора sEH та агоїста PPAR- γ на експресію гена *Tnfa*, і це вказує на те, що як активація PPAR- γ , так і підвищена біодоступність EET мають подібні ефекти на експресію *Tnfa* в нирках мишей ООС. Ми також виявили, що комбінація інгібітор sEH і агоїст PPAR- γ продемонструвала ефект, аналогічний їх монотерапії. Можливо, що ця нездатність агоїста PPAR- γ , інгібітора sEH і їх комбінації знижувати експресію *Tnfa*, пов'язана з сильним запаленим процесом у нирках мишей ООС. Біфункціональна молекула RB394 здатна знижувати експресію гена *Tnfa* і це може вказувати на її позитивну здатність впливати на експресію *Tnfa*, що в свою чергу може бути пов'язано з класовою активністю RB394 і може бути пов'язаною не тільки з його активностями, як агоніста PPAR- γ і інгібітора sEH.

Відомо, що комбінація інгібітора sEH і агоїста PPAR- γ , проявляє протизапальні і захисні властивості у щурів зі спонтанною гіпертензією і ожирінням [169]. Ми припускаємо, що ці потужні протизапальні властивості RB394 є результатом синергетичної дії інгібування sEH і активації PPAR- γ . Відомо, що активація PPAR- γ знижує експресію sEH в кардіоміоцитах [170]. Також було показано, що EET здатна зв'язувати і активувати PPAR- γ для забезпечення протизапального ефекту [168]. Дійсно, роль протизапальних ефектів PPAR- γ та sEH була добре описана при ряді патологій, включаючи фіброз нирок [168, 171].

Ми спостерігали схожу тенденцію підвищення рівнів цих протизапальних цитокінів у тканині нирок у мишей ООС, що загалом може вказувати на розвиток потужного запального процесу (рис.3.2.13 А-В). Подібно з рівнем експресії генів, ми виявили, що у мишей ООС рівні цих цитокінів були завищені в 3-4 рази порівняно з контролем. Ми також виявили, що RB394 і всі інші препарати знижували рівень IL-6, IL-1 β та TNF- α . Ці дані підтверджують наші висновки про здатність всіх розглянутих схем терапії знижувати рівень прозапальних цитокінів як на рівні експресії генів, так і на рівні білка.

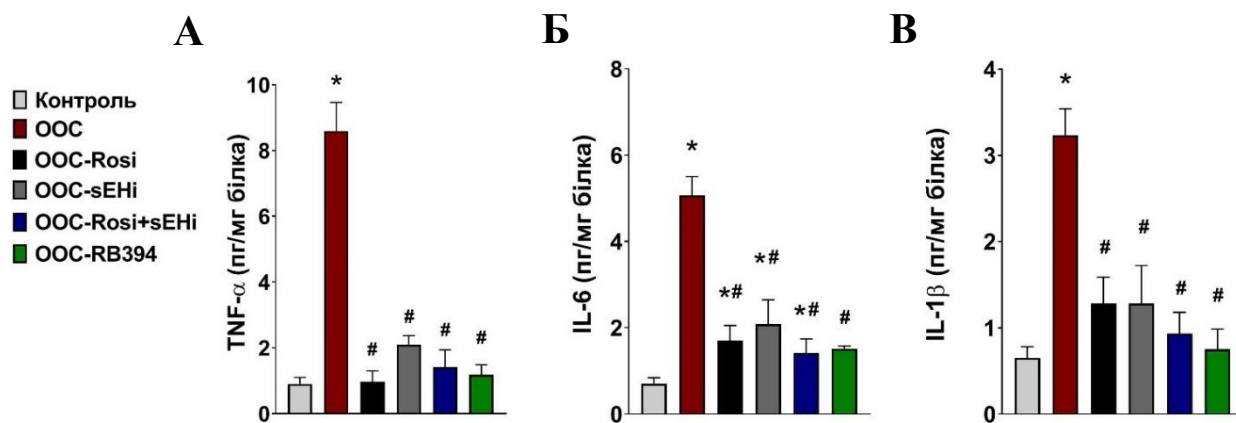


Рис. 3.2.13. Рівень профіброзних запальних цитокінів IL-6 (А), IL-1β (Б) та TNF- α (В) в тканинах нирок дослідних тварин; (M±m, n=8);

*– $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з OOC групою

У цьому дослідженні, крім даних про рівні профібротичних цитокінів, протизапальну дію RB394 та інших препаратів додатково оцінювали за рівням інфільтрації імунних клітин у нирках. Важливо відзначити, що інфільтрація імунних клітин є важливою подією при запаленні нирок і її рівень корелює зі збільшенням рівня цитокінів [93].

Під час прогресування ниркового фіброзу та інших захворювань нирок інфільтрація макрофагів в основному викликає запалення. Дійсно, макрофаги відіграють критичну роль у запаленні нирок при захворюванні, але зменшення кількості макрофагів, як було встановлено, призводить до позитивного впливу на захворювання нирок. У нашому дослідженні ми визначили інфільтрацію макрофагів за допомогою двох маркерів, CD45⁺ і F4/80⁺. Ми продемонстрували високий рівень як Т-лімфоцитів CD45⁺, так і F4/80⁺-позитивних макрофагів у нирках мишей групи OOC. Відносні показники інфільтрації (кількості) цих клітин у хворих мишей були в 10-14 разів вищими контрольних показників (рис. 3.2.14).

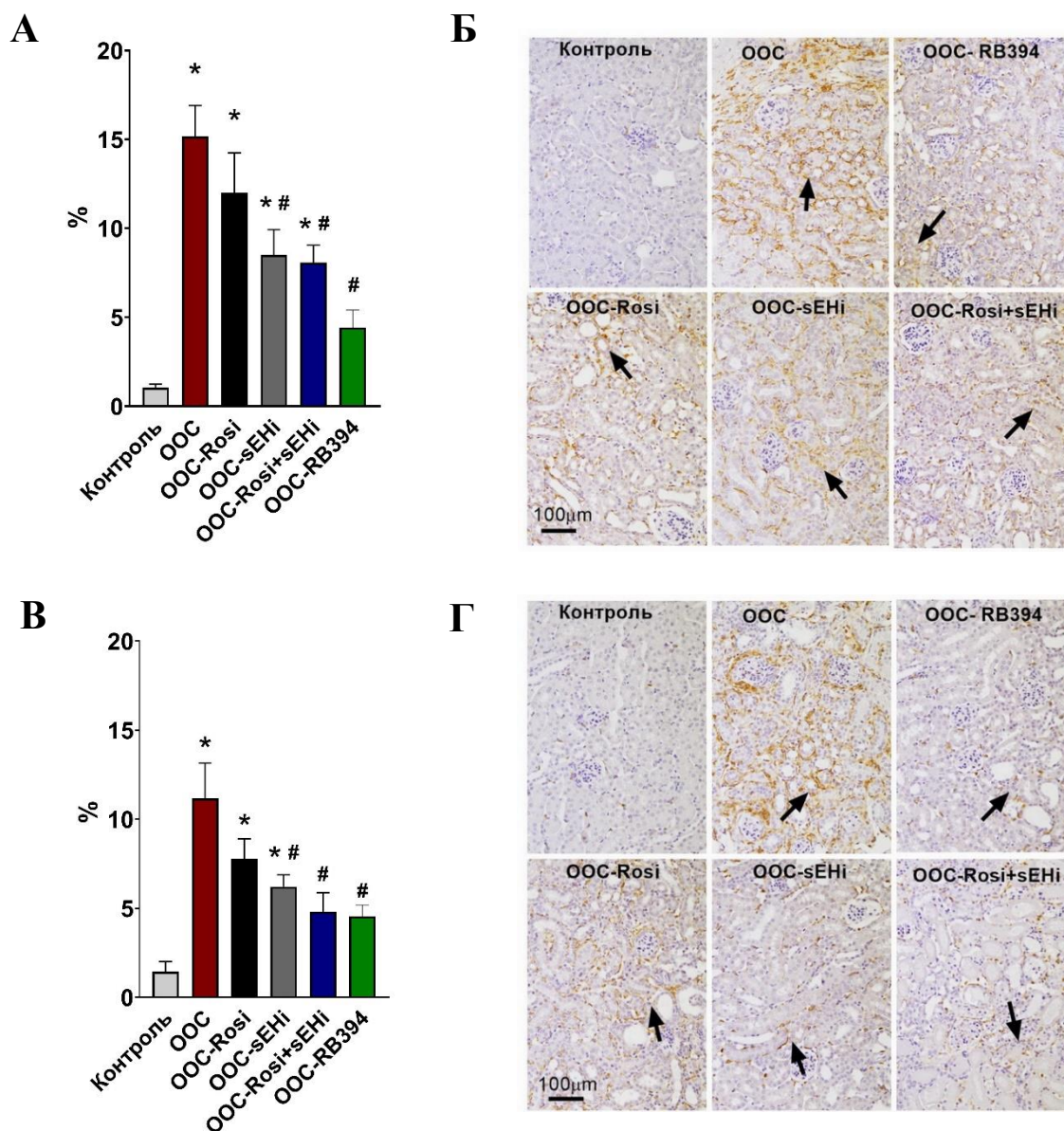


Рис. 3.2.14. Відносний вміст CD45⁺(А) та F4/80⁺ (Б) позитивних клітин та мікрофотографії тканин нирок дослідних тварин з візуалізацією ділянок локалізації CD45⁺(В) та F4/80⁺ (Г) позитивних клітин (показані стрілками) (M±m; n=8);

*– p ≤ 0,05 порівняно з контролем;

– p ≤ 0,05 порівняно з OOC групою

Аналогічні результати були щодо високого рівня ниркових макрофагів також було показано на декількох моделях захворювань нирок, включаючи

нирковий фіброз [93]. Ми виявили, що молекула RB394, а також інші схеми терапії, використані в цьому дослідженні, знижували інфільтрацію макрофагів в моделі фіброзу нирок ООС. Однак досліджуванні сполуки, використані в цьому дослідженні, продемонстрували різний вплив на інфільтрацію запальних клітин. Біфункціональна молекула RB394 виявилася найбільш ефективною у запобіганні інфільтрації у мишей ООС. На фоні введення RB394 спостерігалось зниження кількості CD45⁺ - і F4/80⁺- позитивних макрофагів у нирках мишей ООС в 2,5 раза при порівнянні з контрольною групою (рис. 3.2.14).

Важливо відзначити, що ступінь інфільтрації макрофагів корелює з рівнем експресії відповідних генів і рівнем профібротичних цитокінів у TNF- α , IL-6 і IL-1 β у тканинах нирок мишей ООС (рис. 3.2.12-3.2.13). В цілому, ми виявили, що біфункціональна молекула RB394 продемонструвала найбільш сильну протизапальну дію як в плані своєї здатності знижувати рівень цитокінів, так і інфільтрації імунних клітин в нирках.

Протизапальну дію RB394 можна пояснити гальмуванням sEH і активацією PPAR- γ . Інгібування sEH у мишей з нокаутом sEH і мишей, які отримували інгібітор sEH, продемонструвало значні протизапальні ефекти з більш низьким продукуванням цитокінів в нирках і інфільтрацією імунних клітин в нирках при фіброзі нирок [8-9]. Дійсно, кілька попередніх досліджень продемонстрували позитивний ефект на нирки при інгібування sEH на ряді моделей ХХН, де фіброз нирок є основним патофізіологічним процесом, і такі події викликали протизапальну дію інгібуванням sEH [171].

Відповідно до результатів, Troglitazone, агоніст PPAR- γ , помітно знижував ниркову експресію профібротичного цитокину і інтерстиціальну інфільтрацію F4/80⁺ макрофагів на моделі ООС фіброзу нирок. В цьому дослідженні також було показано протизапальну дію троглітазону, що супроводжується його вираженими антифіброзним ефектам в нирках [173]. Ці результати дозволили нам припустити, що протизапальна дія RB394, який складається з агоніста PPAR- γ , а також інгібітора sEH, є результатом синергетичної дії цих двох фармакофорів.

В ході цього дослідження було виявлено, що у мишей з ООС не тільки був сильний запальний процес, а й окислювальний стрес у пошкоджених нирках. Оксидативний стрес також відіграє важливу роль при розвитку фіброзу нирок, основної патологічної ознаки ХХН. Надлишкова продукція активних форм кисню в умовах активації декількох ферментних систем, включаючи нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ) оксидази, разом з порушенням механізмів антиоксидантного захисту лежить в основі дисбалансу між посиленням прооксидантних процесів і недостатньою антиоксидантною здатністю, що виникає при фіброзі [172-173].

Ці патологічні події під час ниркового фіброзу можуть бути викликані формуванням ЕЦМ, яке викликає значне розширення ниркового каналцевого інтерстиціального простору і приводить до пошкодження каналців, втрати каналців й периканальцевих капілярів [147]. Однак, крім вкладу у формування ЕЦМ, каналцеві епітеліальні клітини ініціюють прогресування фіброгенезу, модулюючи його проліферацію, надаючи тим самим можливість прозапальним хемокінам і цитокінам викликати мононуклеарне запалення і утворення міофібробластів.

Відомо, що формування міофібробластів і ЕЦМ пов'язано з активацією НАДФ-оксидази, і передбачається, що продукція супероксиду цією ферментною системою грає домінуючу роль у фенотиповому переході фібробластів в міофібробласти. [172-174]. НАДФ-оксидаза - це фермент, що складається з двох мембранозв'язаних субодиниць (p22phox і gp91phox), трьох цитозольних субодиниць (p67phox, p47phox і p40phox) і невеликого G-білка Rac (Rac1 і Rac2). На сьогодні відомий цілий ряд ізоформ НАДФ-оксидази, а саме: Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 і Duox2 і тд [174]. НАДФ-оксидази - це трансмембранні білки, які переносять електрони через біологічні мембрани для відновлення кисню до супероксиду. Ферменти родини Nox також можуть бути винуватцями інтенсифікації реакцій окисного стресу, який викликає ендотеліальну дисфункцію, запалення, апоптоз, гіпертрофію, фіброз і ангіогенез.

Результати наших досліджень виявили, що експресія генів маркерів окисного стресу *Nox1*, *Cybb*, *Ncf1* і *Syba*, декількох субодиниць НАДФН-оксидази і NOX1, була в 2-16 рази вищою у ниркових клітина мишей з ООС порівняно з контролем (рис.3.2.15). При застосуванні агоніста PPAR- γ та інгібітора sEH окремо, спостерігали зниження рівня експресії генів окисного стресу *Nox1* у 1,6 та 3,2, *Cybb* у 1,5 та 1,7, *Ncf1* у 1,5 та 1,3 і *Syba* у 1,5 та 1,7 рази, відповідно, порівняно з групою ООС (рис.3.2.15).

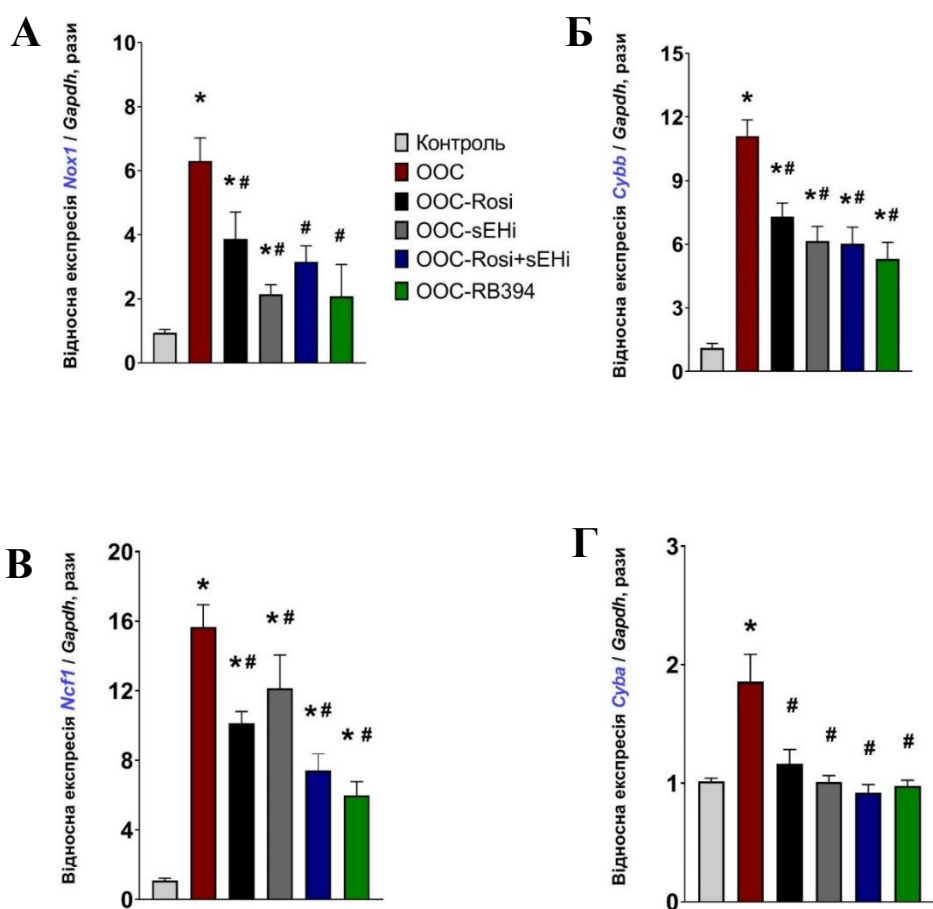


Рис. 3.2.15. Відносний рівень експресії генів *Nox1*(А), *Cybb*(Б), *Ncf1* (В) і *Syba* (Г) в тканинах нирок дослідних тварин; (M \pm m, n=8);

*– $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

Однак комбінація sEH і агоніста PPAR- γ на фоні їхнього введення піддослідним групам тварин показала зниження експресію генів *Nox1* у 1,8, *Cybb*

у 1,7, *Ncf1y* 2,1 і *Syba* у 1,7 рази, відповідно, порівняно з групою ООС. За умов введення вказаних сполук, новосинтезована сполука RB394 продемонструвала максимальний антиоксидантний ефект – знижуючи експресію генів-маркерів окисного стресу *Nox1* у 3,2, *Sybb* у 1,9, *Ncf1y* 2,3 та *Syba* у 1,6 рази у нирках мишей з ООС. Результати наших досліджень вказують на багатообіцяючі терапевтичні ефекти всіх комбінацій, але RB394 демонструє найкращий лікувальний потенціал, впливаючи на основні механізми ХХН.

Відомо, що активація PPAR- γ має антиоксидантну дію. Піоглітазон знижує екскрецію маркерів окисного стресу в сечі, а також екскрецію 8-OHdG, знижує рівень малонового діальдегіду в нирках, підвищує ниркову експресію антиоксидантного ферменту супероксиддисмутази і знижує полі(АДФ-рибозо) полімерази на різних моделях ХХН [172-174]. Також відомо, що інгібування sEH знижує показники окислювального стресу у нирках, а EETs забезпечують захист нирок шляхом зниження окисного стресу в деяких моделях захворювань нирок [4, 8-9].

Важливим моментом цього дослідження, є розкриття здатності RB394, комбінації sEH і агоністу PPAR- γ призводити до зниження експресії субодиниць НАДФ-оксидази у клітинах нирок при розвитку патологічних процесів.

У цій роботі, ми вивчили терапевтичну ефективність різних мішеней, дія на які давала б можливість запобігати або уповільнювати фіброз нирки. Так, здатність інгібітора sEH призводити до зменшення рівня запалення та фіброзу нирок, що дозволяє розглядати його як потенційного терапевтичного агента при ХХН. Водночас, агоніст PPAR- γ володіє численними біологічними ефектами, один з яких - сильна антифіброзна дія. Важливою ідеєю, що лежить в основі розробки молекули RB394, є поєднання корисних властивостей інгібіторів sEH і агоністів PPAR- γ на фоні зниження сильних побічних ефектів останніх. Новостворений експериментальний агент демонструє покращені антифіброзні та протизапальні властивості і може розглядатись як потенційний препарат для майбутнього застосування у клінічній практиці в терапевтичних схемах ХХН.

Ми порівняли дію новосинтезованої біфункціональної сполуки RB394 з дією інгібітора sEH, агоністом PPAR- γ і їх комбінацією при модельованому пошкодженні нирок. У результаті проведених досліджень було виявлено, що RB394, як комбінований препарат, має кращий лікувальний ефект в боротьбі з фіброзом та запаленням, у порівнянні з іншими. Отже, підсумовуючи вищесказане, введення RB394 демонструє багатообіцяючі терапевтичні дії в зниженні прогресування ниркового фіброзу, шляхом впливу на множинні патофізіологічні події, які сприяють розвитку ниркового фіброзу.

В цілому, ми продемонстрували, що нова біфункціональна молекула RB394 демонструє багатообіцяючу антифіброзну дію на нирки. Ми також продемонстрували, що антифіброзна дія RB394 пов'язана з його протизапальною і антиоксидантною дією. Завдяки цьому, RB394 запобігав розвитку ниркового фіброзу в моделі ООС мишей, що супроводжувалось зниженням утворення ЕСМ, пошкодження каналців і пошкодження судин.

3.3. Показники запалення та фіброзу в тканинах нирок мишей з моделлю ООС та за введення нової біфункціональної молекули DM509

В цьому розділі дослідження ми використовували модель ООС, в якій проявляються майже всі основні клінічні ознаки фіброзу нирок, що є гарним підґрунтям для розробки нових антифіброзних агентів. Застосувавши описану модель ми вивчили антифіброзний потенціал інгібітора sEH та агоніста ядерного рецептора FXR в якості важливих складових в процесі розробки новітніх шляхів боротьби з розвитком фіброзу та запалення нирок, як основних факторів патогенезу ХХН. Результатом проведеного дослідження стала розробка біфункціональної молекули DM509, що поєднує в собі потенціал двох дієвих початків.

Описано багато досліджень захисної і антифіброзної дії агоністів FXR на моделях захворювань печінки і нирок [10-11, 164]. Передбачається, що пригнічення розвитку ниркового фіброзу при активації FXR, опосередковується

скоординованою регуляцією прозапальних цитокінів і профібротичних факторів [1]. FXR є представником суперродини ядерних рецепторів, які експресуються в печінці та нирках і фізіологічно активується жовчними кислотами [175-176]. FXR грає вирішальну роль у метаболізмі вуглеводів і ліпідів, а також регуляції чутливості до інсуліну [140].

Нещодавно ми розробили біфункціональну молекулу - DM509, яка одночасно діє як агоніст FXR і розчинний sEH і продемонстрували її виражену антифіброзну дію на моделях НАЖХП та НАСГ захворювань печінки [109]. Перший її компонент FXR приймає участь у захисті від пошкодження нирок, викликаного різними токсичними діями. Активація FXR модулює експресію генів ліпідного метаболізму у нирках, знижує прозапальні цитокіни, що призводить до пригнічення діабетичної нефротоксичності [10, 140]. Агоністи FXR активно використовуються для вивчення фармакологічних ефектів FXR в різних клітинах і на тваринних моделях лише в доклінічних дослідженнях.

Другим важливим компонентом, обраним у цьому дослідженні, є інгібітор розчинної sEH. sEH є ферментом каскаду арахідонової кислоти, по епоксигеназному (цитохром P450- монооксигеназному) шляху, де в мікросомах синтезуються EET. Останні, разом з оксидом азоту, є потужними вазодилататорами. Вони регулюють транспорт іонів в епітелій, склад ендобронхіальної рідини, ступінь запалення, активують ноцицептори [8, 120, 128]. sEH в достатку експресується в жировій тканині, причому рівень експресії зростає з розвитком ожиріння [114]. sEH сприяє гідролізу EET, до їхніх менш біоактивних відповідних діолів, дігідроксиепоксиетокосатрієнових кислот [93]. Завдяки інгібуванню sEH, рівні EETs збільшуються. Ендотеліальні клітини продукують EETs, які у свою чергу активують кальцій-залежні калієві канали в клітинах гладеньких м'язів, що призводить до гіперполяризації і судинного розслаблення [177]. Численні дослідження показують вплив EET на патогенез захворювань нирок різної етіології і різного характеру перебігу (гострих і хронічних).

Потужною антифіброзною дією на рівні ниркових тканин володіє новий інгібітор sEH- t-AUCB, що був синтезований нашою групою, що описано в декількох опублікованих дослідженнях [97, 8-9, 178]. Важливим регулятором biodоступності EET у нашому організмі є розчинна sEH. Цей фермент перетворює біологічно активний і корисний EET в його менш біологічно активну або неактивну дигідрокси-форму. Оскільки підвищення активності sEH супроводжується зниженням рівня EET у нашому організмі, то часто зниження EET асоційовано з розвитком ряду патологічних станів людини, включаючи хворобу нирок [4, 6, 102]. Наприклад, було показано, що у людей з підвищеною активністю sEH спостерігається гостре порушення ниркової функції [6, 8-9, 98]. Такі дані нашою думкою на думку щодо перспективності використання інгібіторів sEH як можливих агентів з антифіброзною дією при ниркових патологіях. У цьому дослідженні, ми вивчали терапевтичний потенціал нової синтезованої біфункціональної молекули DM509, яка поєднує в собі функцію агоніста FXR та інгібітора sEH [4, 179] (рис.3.3.1). Важливо відзначити, що DM509 являє собою нову молекулу і її біологічні ефекти досі досліджувалися тільки на моделях фіброзного захворювання печінки.

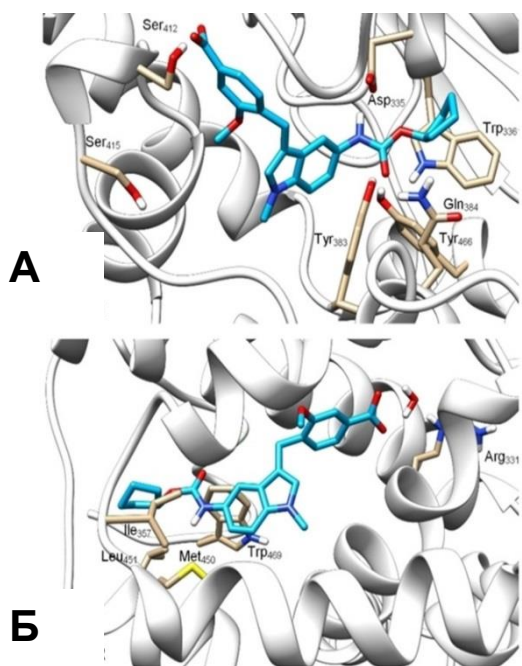


Рис. 3.2.1. Схематичне зображення зв'язування активного сайту sEH (А) з лігандом FXR (Б) [179]

Слід відмітити, що наші попередні дослідження ефектів даної молекули на експериментальній моделі захворювань печінки показали зниження стеатозу

печінки і потужний антифіброзний ефект до рівнів показників контрольної групи. Також, за умов введення DM509 у мишей було виявлено зменшення запального процесу у печінці [14]. Зважаючи на потужний антифіброзний потенціал новосинтезованої молекули ми припустили можливість позитивного терапевтичного ефекту на моделі ниркового фіброзу.

Перед початком дослідження новосинтезовану сполуку було перевірено на токсичність. За умов введення молекули DM509 не було виявлено жодних побічних ефектів *in vitro* і *in vivo* на нормальних клітинах і здорових тваринах.

У нашому дослідженні з вивчення терапевтичної ефективності новосинтезованої молекули подвійної дії DM509 на моделі ООС мишей ми не спостерігали будь-яких побічних ефектів з точки зору зміни ваги тіла (контрольна група тварин - 27,8 +/- 4г і миші з ООС з введенням DM509 - 30,2 +/- 3г), поведінки, зовнішнього вигляду, рухливості і спритності мишей. Подібно дослідженню у модельній системі з ООС, недавнє дослідження на моделі захворювання печінки, викликаного ожирінням у мишей також продемонструвало, що 12-тижневе введення DM509 не викликає будь-яких змін маси тіла і побічних ефектів у мишей контрольної групи [14].

Для виключення несприятливих цитотоксичних ефектів, крім даних на мишах, ми також перевіряли вплив DM509 на клітини *in vitro*. Цитотоксичну дію біфункціональної молекули DM509 перевіряли на клітинах HepG2 (гепатоцелюлярні клітини печінки) з використанням набору для аналізу життєздатності клітин WST-1 [145]. Досліджена сполука в діапазоні концентрації до 100 мкМ не проявила цитотоксичної активності у даній модельній системі. Цитотоксичні ефекти DM509 на життєздатність клітин HepG2 порівнювали з дією протиракового препарату і цитотоксичного препарату бексаротен. Було виявлено, що бексаротен викликає помітну загибель клітин у порівнянні з DM509, і що біфункціональна молекула не викликає загибелі клітин навіть при концентрації 100 мкМ (рис.3.3.2).

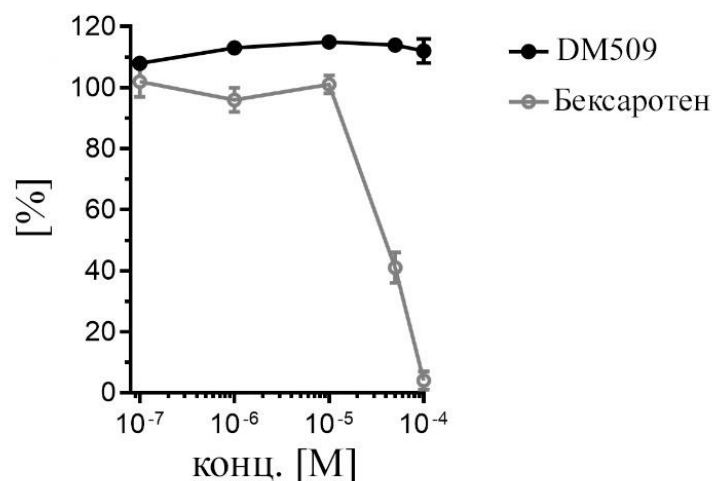


Рис. 3.3.2. Вплив різних концентрацій новосинтезованої сполуки DM509 і протиракового препарату Бексаротен на життєздатність клітин HepG2

Важливо відзначити, що інгібітор sEH і агоніст FXR, як відомо, здійснюють позитивний вплив на функцію нирок. Захисні ефекти інгібітора sEH були описані при фіброзі нирок [8-9], гіпертонічному ураженні нирок і діабетичному пошкодженні нирок [180-181]. Аналогічними захисними ефектами, володіють агоністи фарнезоїдних рецепторів при фіброзі нирок [164], діабетичної нефропатії [182] і ішемічно-реперфузійному пошкодженні нирок [11].

З огляду на багатообіцяючу антифіброзну дію при захворюванні печінки, агоніста FXR і інгібітора sEH, ми перевірили терапевтичну дію новосинтезованої молекули DM509, на моделі фіброзу нирок ООС у мишей. Миші були випадково розподілені на 3 групи, контрольна група мишей, без перев'язування сечоводу, інші дві групи з обструкцією сечоводу, з подальшим розвитком захворювання-ООС. Миші 3-ї групи, на протязі 7 діб отримували DM509 (10мг/кг/день) разом з питною водою на 3-тю добу після операції.

У цьому дослідженні, ми визначили здатність нашої нової молекули подвійної дії, DM509, запобігати дисфункції нирок на моделі фіброзу нирок у мишей. Ми оцінили патологію нирок шляхом вимірювання азоту сечовини в

крові. Згідно отриманих результатів, у мишей з ООС спостерігається дисфункція нирок з підвищеним в 2 рази рівнем азоту сечовини в крові у порівнянні з контролем (рис. 3.3.3).

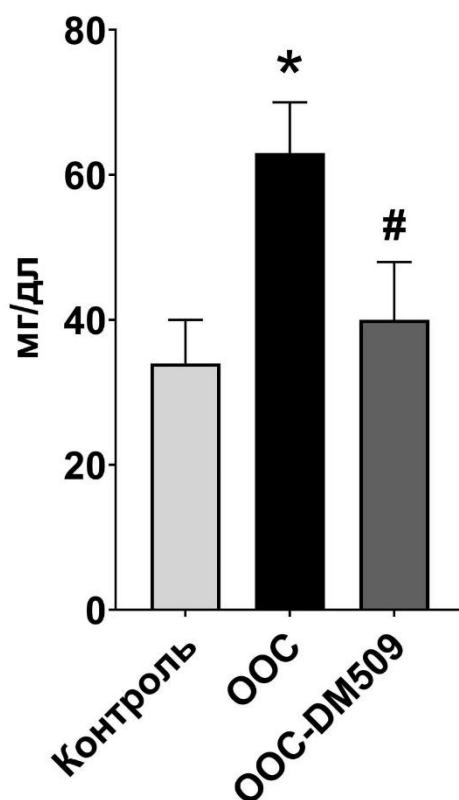


Рис. 3.3.3. Концентрація азоту сечовини в сироватці крові дослідних тварин; (M±m, n=8);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

Було виявлено зниження в 1,6 рази рівня азоту сечовини в крові мишей за умов введення експериментальної молекули DM509 порівняно з показниками тварин групи ООС без терапії.

Ці дані можуть бути доказом того, що молекула DM509 запобігає розвитку дисфункції нирок за умов ниркового фіброзу. Це дослідження демонструє, що молекула DM509, яка одночасно діє як інгібітор sEH і агоніст FXR, має потенціал

запобігати прогресуванню ниркового фіброзу і дисфункції нирок на моделі ООС у мишей.

Фіброз нирок є клінічною ознакою ХХН і вважається найбільш важливим попередником при довгостроковому прогнозі ХХН [167]. Спектрофотометричний аналіз на основі гідроксипроліна є одним з небагатьох, який дозволяє проводити фактичне кількісне визначення вмісту колагену(рис. 3.3.4).

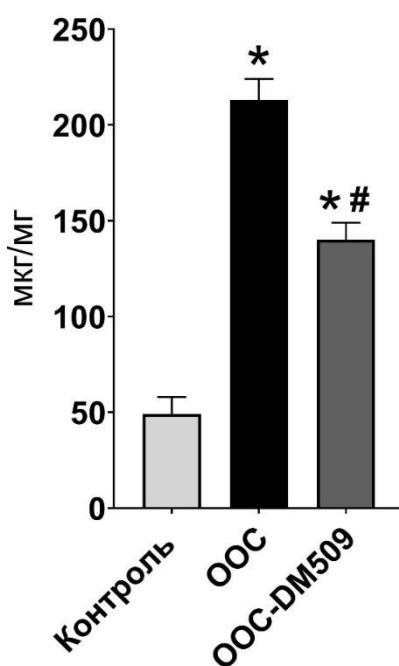


Рис. 3.3.4. Вміст гідроксипроліну в тканинах нирок дослідних тварин ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

В результаті було виявлено, що у мишей з ООС розвинувся виражений фіброз нирок з підвищеним вмістом гідроксипроліну в нирках. Однак на тлі введення DM509 мишам з ООС, даний показник знижувався 1,6 раза в порівнянні з контрольною групою (рис. 3.3.4).

Вплив терапії за DM509 на розвиток фіброзу нирок було додатково оцінено з використанням гістолопатологічного методу (фарбування зрізів тканин нирки-PSR розчином) для визначення рівня колагену в нирках. Отримані результати свідчать, що лікування DM509 запобігає фіброзу нирки шляхом зменшення вмісту колагену у нирках мишей з ООС в 1,8 раза, у порівнянні з контрольною групою (рис. 3.3.5А-Б).

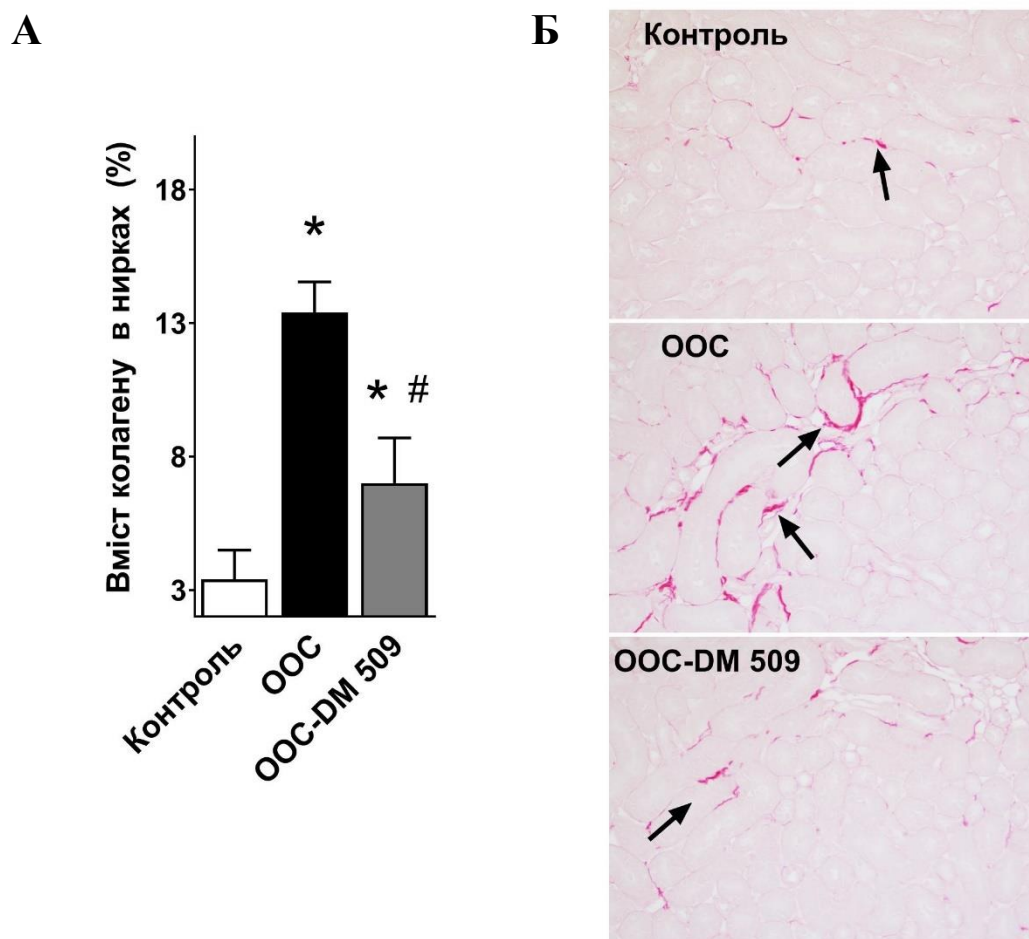


Рис. 3.3.5. Відносний вмісту колагену у ниркових тканинах мишей в тканинах нирок, а також мікрофотографії тканин нирок дослідних тварин з візуалізацією ділянок локалізації колагену (показані стрілками) (В); ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

Експресія генів деяких фіброзних маркерів є критичною для утворення позаклітинного матриксу в нирках. Важливо відзначити, що утворення

позаклітинного матриксу є важливим механізмом, залученим у формування фіброзного процесу в нирках [167]. В результаті миші з ООС мали 2-3-х кратне перевищення експресії генів *FN* і *Acta2* в ниркових тканинах у порівнянні з контролем, а при введенні препарату DM509 відбувалося зниження експресії цих показників у ниркових тканинах мишей з ООС у 4,3 та 1,7 раза, відповідно, порівняно з контрольною групою (рис.3.3.6 А-Б).

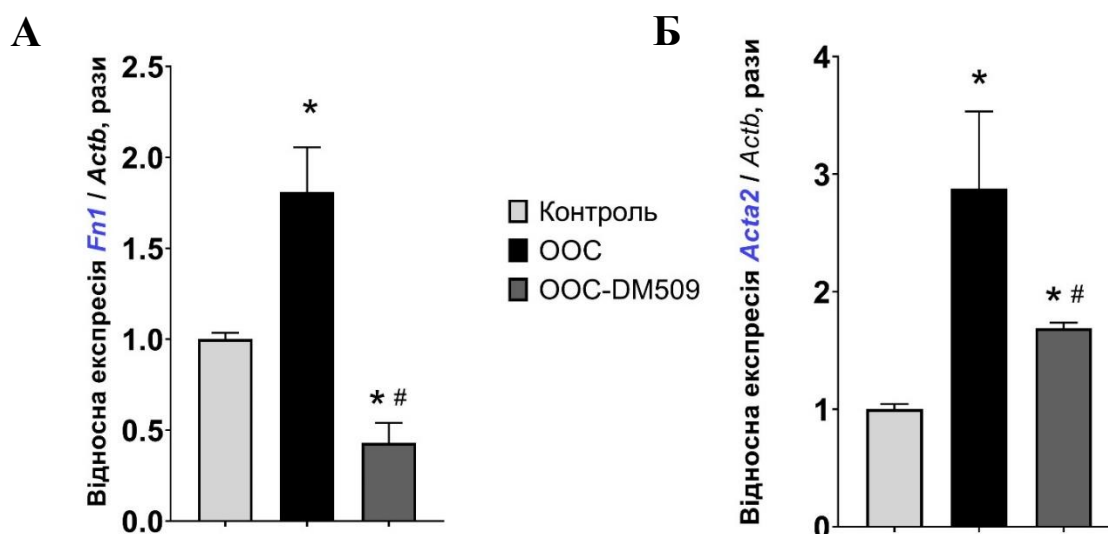


Рис. 3.3.6. Відносний рівень експресії генів *Fnl* (А) і *Acta2* (Б) в тканинах нирок дослідних мишей; ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

Ми оцінили рівень фіброзу і запалення в нирках у мишей з ООС, які отримували молекулу DM509. Варто відзначити, що у мишей з ООС спостерігався вищий рівень експресії кількох профібротичних запальних маркерів (*TNF- α* , *IL-1 β* , *IL6*) у порівнянні з контрольною групою. Було продемонстровано помітні протизапальні ефекти, які виражались у зниженні експресії генів запальних цитокінів *Tnfa* у 3,8, *Il1b* у 1,8 та *Il6* у 7,5 раза у ниркових тканинах мишей з ООС на фоні введення молекули DM509, порівняно з контрольною групою (рис. 3.3.7). З літературного огляду відомо, що комбінація

FXR і інгібітору sEH має протизапальну дію в клітинах HepG2 за рахунок зниження експресії NF-κB, а також зменшення вивільнення запальних цитокінів [26].

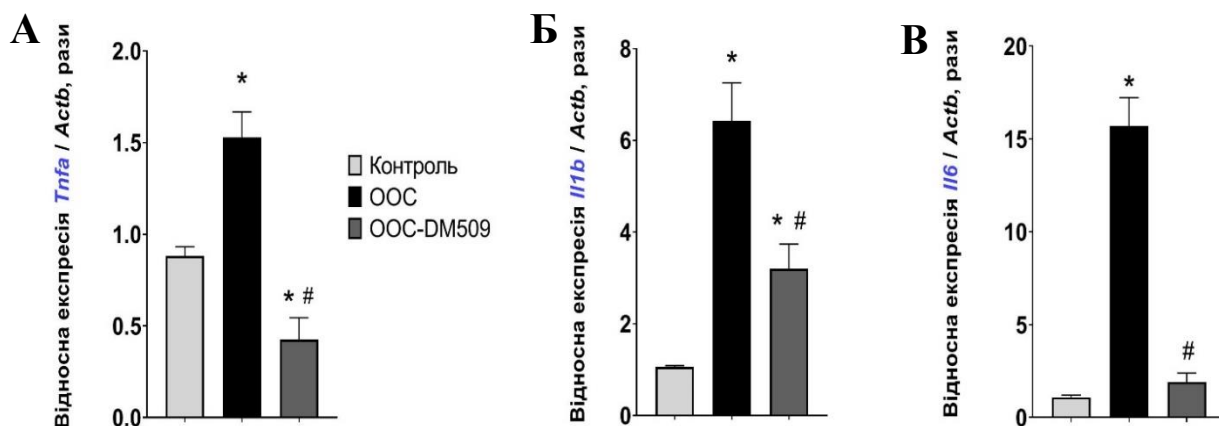


Рис. 3.3.7. Відносний рівень експресії генів *Tnfa* (А), *Il1b* (Б), *Il6* (В) в тканинах нирок дослідних тварин; (M±m, n=8);

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем;

– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

Отримані результати важливі для розуміння механізмів розвитку та перебігу фіброзу у мишей з використанням моделі ООС. Ці результати узгоджуються з попередніми дослідженнями, які демонструють, що інгібітори sEH [104-105] і агоністи FXR [11, 164, 182] запобігають підвищенню експресії фіброзних маркерів у декількох моделях захворювань нирок та печінки. Комбінація агоніста FXR/sEH виявилася високо селективною і нетоксичною. Згідно цього, було синтезовано нову біофункціональну молекулу DM509, яка поєднує в собі функцію обох активних речовин. У результаті проведених досліджень було виявлено, що нова біофункціональна молекула DM509 має протизапальну та антифіброзну дію.

Отже, у ході проведеного дослідження ми продемонстрували, що інгібітор sEH та агоністи PPAR-γ і FXR здатні запобігати прогресуванню пошкодження ниркових каналців, втраті перитубулярних капілярів, інгібувати запалення та

фібротичні процеси в нирках мишей з моделлю ниркової дисфункції, викликані обструкцією сечоводу. На основі результатів проведеного дослідження можна стверджувати, що розчинна епоксидгідролаза є перспективною мішенню для розробки нових антифіброзних засобів. Доведено, що новосинтезовані біфункціональні сполуки DM509 і RB394 мають виражений антифіброзний та протизапальний потенціал і можуть бути розглянуті на роль нових кандидатів у засоби лікування ХХН.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Хронічна хвороба нирок (ХХН) виникає в результаті багатьох гетерогенних захворювань, які незворотно змінюють функцію і структуру нирок протягом місяців або років. У всьому світі все більше число пацієнтів страждають на ХХН.

Прогресуючий характер ХХН у значної частини пацієнтів призводить до інвалідизації, необхідності подальшої трансплантації органу і проведення діалізу, що не тільки впливає на якість життя пацієнта, а й накладає значний тягар на глобальні ресурси системи охорони здоров'я. Важливою причиною ситуації, яка склалась навколо ХХН є відсутність ліків від більшості її форм. Інгібування системи ренін-ангіотензин, яка бере участь в регуляції кров'яного тиску і балансу рідини, з використанням інгібіторів ангіотензин-конвертази або блокаторів рецепторів ангіотензину, зменшує клубочкову гіперфільтрацію, альбумінурію і знижує функції нирок. Дані агенти стали основою терапії ХХН. Однак такий підхід лише уповільнює зниження функції нирок і не лікує ХХН. Крім того, ці препарати характеризуються вираженою нефротоксичністю, що пов'язано зі значними побічними ефектами, зокрема підвищення рівня калію в сироватці крові. Саме побічні ефекти цих препаратів можуть обмежити їхнє терапевтичне застосування. Недостатня ефективність сучасних схем лікування також пов'язана з тим фактом, що ці терапевтичні підходи зосереджені не на важливих патофізіологічних аспектах ХХН, а лише на симптомах, які є наслідком цієї патології. Фіброз нирок є критичним патофізіологічним аспектом ХХН. Дійсно, інтерстиціальний фіброз наряду із запаленням є загальними гістопатологічними ознаками всіх типів ХХН. Тубулоінтерстиціальний і гломерулярний фіброз корелюють з функцією нирок і являють собою загальний складний комплекс структурних змін в нирках, який включає ниркове запалення, продукування матриксу і колагену, пошкодження каналців і ниркових судин. Тубулоінтерстиціальний фіброз є поширеним гістологічним проявом ХХН, практично незалежно від етіології захворювання. Ступінь фіброзу нирок є

важливим попередником майбутнього зниження функції нирок з наступною стадією ниркової недостатності. За механізмами розвитку, тубулоінтерстиціальний фіброз має схожість з іншими фіброзними станами, включаючи фіброз легенів і фіброз печінки. Загальні механізми, ідентифіковані при фіброзі, включають ушкодження епітелію, активацію фібробластів, відкладення матриксу і запалення, кожен з яких становить потенційну терапевтичну мішень. Важливо відзначити, що в даний час немає терапевтичних підходів для лікування фіброзу і особливо фіброзу нирок. Таким чином, на сьогодні існує нагальна потреба в розробці та апробації нових лікарських засобів лікування ниркового фіброзу. Запорукою успішної розробки нових та оптимізації існуючих стратегій лікування, спрямованих на запобігання або уповільнення прогресування ниркового фіброзу є розкриття нових мішеней впливу в молекулярному каскаді подій розвитку цього патологічного процесу.

У якості перспективних мішеней розглядаються рецептори PPAR- γ і FXR, які реалізують плейотропні біологічні ефекти, пов'язані з регулюванням аутофагії, запалення та фіброзу. Відомо, що агоністи PPAR- γ та FXR мають захисні властивості при дисфункції нирок. Синтетичні агоністи PPAR- γ , такі як тіазолідиндіони продемонструвати захисний ефект при різних патологіях нирок, включаючи діабетичну нефропатію, нефректомію та ішемію. Захисні властивості тіазолідондіонів пов'язані з їх протизапальною, антиоксидантною та антипроліферативною дією. Подібно активації PPAR- γ , активація рецептора FXR запобігає пошкодженню гепатоцитів і знижує рівень накопичення жиру в печінці, а агоністи FXR виявляють терапевтичну ефективність в протидії стеатозу, фіброзу та запаленню при патологіях печінки.

Ще однією із терапевтичних мішеней, на яку ми звернули увагу, став фермент розчинної епоксидгідролази (sEH). Фермент sEH це невід'ємний компонент каскаду CYP450 арахідонової кислоти, що призводить до розпаду епоксиейкозатрієнової кислоти (EET) до відповідних діолів. EET виконує багато важливих біологічних функцій і результати досліджень ряду авторів показали, що EETs можна використовувати для терапії захворювань нирок. Терапевтичні

ефекти EET можуть бути отримані за рахунок збільшення їхньої біодоступності, і є два різні шляхи зробити це. Один з них - це використання аналога EET, а інший - інгібування деградації EET шляхом пригнічення ферменту sEH.

З огляду на вищевказане було нами розроблено і синтезовано інгібітор sEH в якості терапевтичного агента та дві нові біфункціональні молекули подвійної дії- RB394, яка одночасно діє як агоніст PPAR- γ і інгібітор sEH, інша молекула DM509, що діє, як агоніст FXR і інгібітор sEH. Важливою ідеєю, що лежить в основі розробки молекул RB394 і DM509, є поєднання корисних властивостей інгібітора sEH і агоністів PPAR- γ та FXR на фоні зниження побічних ефектів останніх.

У даній експериментальній роботі, ми вивчили терапевтичну ефективність різних мішеней, дія на які призводить до затримки та/або уповільнення фіброзу нирок.

Для проведення подальших досліджень активності досліджуваних речовин необхідно було підібрати зручну модельну систему, яка б відповідала клінічним умовам майбутнього застосування сполук. Ми зупинили свій вибір на мишах з односторонньою обструкцією сечоводу (ООС).

Модель ООС слугувала для перевірки нашої гіпотези щодо антифіброзного потенціалу інгібітора sEH, агоністів PPAR- γ і FXR, їх комбінації, а також новосинтезованих молекул RB394 і DM509.

Для дослідження показників запального та фібротичного процесів у нирках, ми використовували модель ООС на мишах, яка демонструє і проявляє клінічні особливості ниркового фіброзу, що звичайно спостерігаються у пацієнтів з ХХН.

З метою апробації моделі, а також розрахунку відповідного часу після проведення операції ООС було проведено дослідження щодо визначення патофізіологічного вікна, з початку розвитку ниркового фіброзу у тканинах нирок мишей. Показано, що через 3 дні після операції ООС, у нирках розвивається фіброз, про що свідчать підвищена експресія фіброзних маркерів та структурні зміни у тканинах нирок мишей. Було проведено також дослідження

фіброзних маркерів, асоційованих з формуванням ЕЦМ, що є критичним в розвитку ниркового фіброзу. Накопичення ЕЦМ призводить до пошкодження тубулярних і епітеліальних клітин, а це зумовлює потовщення базальної мембрани каналців і втрату судин. Атрофія каналців і судин невід'ємно пов'язана з розвитком інтерстиціального фіброзу і загальним порушенням функції нирок.

В ході перевірки моделі ООС, у мишей було виявлено не тільки фібротичні зміни у тканинах нирок, а й сильний запальний процес. Рівні ниркових епітеліальних цитокінів були значно вищими, порівняно з показниками фізіологічної норми. Відомо, що рівень маркерів запалення прогресивно підвищується зі збільшенням часу після ООС, тобто з прогресуванням захворювання.

За результатами досліджень було розроблено схему введення експериментальних сполук, які досліджуються на предмет антифіброзних та прозапальних ефектів. За загальними біохімічними показниками експериментальних тварин, оптимальний час для початку терапії становив 3 доби після проведення ООС.

Результати наших нещодавніх досліджень показали, що інгібітор sEH проявляє сильну антифіброзну дію на ряді моделей захворювань нирок, а також на моделі ООС ниркового фіброзу. Властивість агоніста PPAR- γ , що у нашому дослідженні пов'язана з першим ф хімічним фрагментом RB394, надає молекулі численні терапевтичні переваги у профілактиці і уповільненні розвитку фіброзу нирок. Ще одією перевагою, що лежить в основі розробки RB394, було зниження виражених побічних ефектів агоніста PPAR- γ . Побічні ефекти цього препарату, а саме кардіотоксичність, надмірне збільшення ваги, затримка рідини і підвищення ризику остеопорозу, обмежували і в деяких випадках призупинили його клінічне застосування. Інгібітор sEH збільшує біодоступність EET, який здатний пригнічувати затримку натрію і рідини, а отже, комбінуючи інгібітор sEH з агоністом PPAR- γ , ми змогли знизити побічні ефекти агоніста PPAR- γ і посилити позитивну дію обох препаратів на нирки.

В ході роботи було проведено дослідження цитотоксичності молекули RB394 *in vitro* в клітинах Hela і HepG2 і *in vivo* на мишах. Виявлено, що введення RB394 ніяк не впливає на життєздатність клітин. Не було виявлено жодних побічних впливів на фізичні і поведінкові характеристики мишей, а також жодних морфологічних змін у печінці, нирках та інших органах дослідження. Зважаючи на відсутність цитотоксичного впливу наша біфункціональна молекула була рекомендована до досліджень на наступних стадіях доклінічних випробувань.

На наступній стадії досліджень проводили вичення впливу ООС у мишей, що супроводжувалося підвищеним рівнем експресії генів профібротичних запальних цитокінів, підвищеним рівнем хемокінів і підвищеною інфільтрацією запальних клітин в нирках. Виявили, що у мишей ООС розвинулося запалення в нирках, що виражалось вищим рівнем експресії генів запальних цитокінів в порівнянні з контрольною групою.

За введення інгібітора sEH, агоніста PPAR- γ , та їх комбінації, а також біфункціональної молекули RB394 рівень ушкодження ниркових тканин знижувався завдяки зменшенню інфільтрації імунних клітин у нирках. Виявлено, що ступінь інфільтрації макрофагів корелює з рівнем експресії відповідних генів і рівнем профібротичних цитокінів у TNF- α , IL-6 і IL-1 β у тканинах нирок мишей ООС. За результатами дослідження, біфункціональна молекула RB394 була найбільш ефективною у зниженні рівня експресії генів, зниженні рівня цитокінів та інфільтрації імунних клітин у тканинах нирки мишей з моделлю ООС.

Патологічний фіброз визначається, як надмірне відкладення ЕЦМ, яке змінює структуру нормальної тканини, порушуючи тим самим функцію нирок. При інтерстиціальному фіброзі відбувається накопичення колагену, фібронектину і α -SMA, це слугує пошкодженням каналців і судин. Важливим фактором ХХН є пошкодження каналців, зокрема, пошкодження епітелію каналців, яке часто зустрічається при фіброзі нирок.

Результати наших досліджень показали, що антифіброзний та протизапальний ефекти досліджуваних речовин можуть бути обумовлені

зниженням накопичення колагену та α -SMA, а також пригніченням рівня експресії профібротичних білків *Fn1*, *Coll1a1* і *Col3a1* у ниркових тканинах мишей групи ООС. Крім того, показники рівнів експресії регуляторних генів фіброзу *Tgfbr2*, *Snai1*, *Snai2* і *Twist1*, які регулюють експресію білків ЕЦМ, були підвищені в рази в групі тварин з ООС. Відмічено, що за введення RB394, порівняно з іншими сполуками, рівень експресії цих генів достовірно сягав контрольного рівня.

Експериментально було підтверджено, що рівень експресії маркерів ушкодження ниркових каналців *Lcn2* і *Havcr1* та судин *Icam1* і *Vcam1* у ниркових тканинах мишей групи ООС, знижувався за введення досліджуваних сполук як окремо, так у різній їхній комбінації.

В ході цього дослідження було виявлено, що у мишей з патологією нирок на фоні сильного запального процесу розвивались ознаки окислювального стресу в пошкоджених нирках. При застосуванні інгібітора агоніста PPAR- γ та інгібітора sEH окремо, спостерігали зниження рівня експресії генів окисного стресу *Nox1*, *Cybb*, *Ncf1*, *Cyba* у ниркових тканинах мишей групи ООС. Однак комбінація інгібітора sEH і агоніста PPAR- γ і молекула RB394 при введенні піддослідним тваринам продемонстрували кращий антиоксидантний ефект – знижуючи рівні експресії генів-маркерів окисного стресу майже до контрольного рівня.

Досліджено терапевтичну ефективність інгібітора sEH, агоніста PPAR- γ , їхньої комбінації і RB394 у здатності зменшувати множинні патофізіологічні події, які критично пов'язані з фіброзом ирок. Показано, що біфункціональна молекула RB394 мала максимально виражений антифіброзний потенціал, на що вказує достовірне зниження рівня експресії генів запалення та фіброзу до контрольного рівня. Отримані дані також показують, що антифіброзні дії для RB394 є результатом комплементарних і синергетичних дій між інгібуванням sEH і активацією PPAR- γ .

Комбінація агоніста FXR і інгібітора sEH виявилася дуже селективною і нетоксичною. Важливо відзначити, що і агоніст FXR, і інгібітор sEH проявляють

антифіброзну дію в багатьох органах, включаючи печінку, серце і нирки. Згідно з цим, синтезована на їхній основі нова біофункціональна молекула DM509 була перевірена на її терапевтичний потенціал у боротьбі з фіброзом та запаленням нирок. За умов введення DM509 не було виявлено жодних побічних ефектів *in vitro* і *in vivo* на нормальних клітинах і здорових тваринах. Водночас, при моделюванні патологічного процесу, спостерігали зменшення пошкодження структури нирок на тлі введення молекули DM509. Ефективність сполуки була підтверджена зниженням рівня азоту сечовини в крові та результатами гістологічного аналізу.

Експресія генів деяких фіброзних маркерів є критичною для утворення позаклітинного матриксу в нирках. В ході дослідження, у ниркових тканинах мишей з ООС був підвищений рівень експресії генів фіброзу *FN* і *Acta2*. Введення молекули DM509 призвело до запобігання розвитку ниркової дисфункції, а також до зниження експресії колагену, що продукується міофібробластиками в нирках, і зниження показників формування фібротичного процесу.

Отримані результати важливі для розуміння механізмів розвитку та перебігу фіброзу у мишей з використанням моделі ООС. За умов введення інгібітора sEH і агоніста FXR було виявлено зниження ниркової експресії генів прозапальних цитокінів *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL6*, що призводить до пригнічення діабетичної нефротоксичності.

Використовуючи експериментальну модель фіброзу і запалення у гризунів, ми дослідили профілактичну і терапевтичну ефективність нових досліджуваних молекул при ХХН, які направлені на її первинні патофізіологічні події - фіброз і запалення. Отримані результати доводять антифіброзний та протизапальний потенціал біфункціональних молекул DM509 і RB394 при їх застосуванні за експериментальної моделі ниркової дисфункції у мишей.

На основі результатів проведеної роботи можна стверджувати, що новосинтезовані біфункціональні молекули подвійної дії RB394 і DM509 з їх антифіброзною та протизапальною діями можуть бути перспективними при терапії ниркового фіброзу при ХХН. В даній роботі було продемонстровано їхній

вплив на рівень експресії маркерів фіброзу та запалення при нирковій дисфункції. Доведено, що новосинтезовані біфункціональні молекули DM509 і RB394 мають виражений антифіброзний та протизапальний потенціал і можуть бути розглянуті на роль нових кандидатів у засоби терапії запалення та фіброзу при ХХН.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі відповідно до поставленої мети проведено комплексне дослідження показників розвитку фіброзу та запалення у нирках мишей з моделлю ниркової дисфункції, індукованої обструкцією сечоводу за введення інгібітора sEH і агоністів ядерних рецепторів PPAR- γ і FXR. Отримані результати обґрунтовують доцільність використання розчинної епоксидгідролази як нової терапевтичної мішені для розробки нових антифіброзних засобів та створення на основі її інгібітора та на основі агоністів ядерних рецепторів мультифункціональних молекул для реалізації комплексної дії при терапії фіброзу та запального процесу в ниркових тканинах за умов хронічної хвороби нирок.

1. Доведено розвиток ниркового фіброзу за умов експериментальної ниркової дисфункції на моделі односторонньої обструкції сечоводу. Показано підвищення продукції прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-6, IL-1 β) та гіперпродукцію компонентів позаклітинного матриксу (α -SMA, FSP-1, Coll1a і FN), що виражалось як у посиленні експресії відповідних генів, так і у зростанні вмісту відповідних білків у тканинах нирок мишей на 3 добу після операції.

2. Продемонстровано, що введення як агоніста ядерного рецептора PPAR- γ , так й інгібітора sEH, а також їхньої комбінації призводило до зниження активності НАГ відповідно у 2,4, 1,8 та 2,6 раза, порівняно з показником групи ООС. Активність НАГ також знижувалася у 2,7 раза за умов введення новосинтезованої біфункціональної сполуки RB394. У разі введення молекули – DM509, що є структурним аналогом інгібітора sEH та агоніста FXR, виявлено зниження азоту сечовини у сироватці крові у 1,6 раза, а також відмічено нижчий рівень ушкодження ниркових каналців при одночасному зниженні рівня мРНК і білків NGAL і KIM-1 у мишей ООС. Показано, що усі комбінації запобігали пошкодженню судин, що було виражено зниженням експресії генів і білків ICAM, VCAM за одночасного підвищення CD31⁺. Однак, максимально

виражений позитивний ефект, зазвичай, спостерігали за введення молекул RB394 і DM509.

3. Показано, що введення інгібітора sEH й агоністів PPAR- γ чи FXR мишам з моделлю ООС призводить до зниження формування колагену та ЕЦМ у 2 рази, порівняно з показниками групи ООС, що відмічали поряд з нормалізацією показників вмісту гідроксипроліну та на тлі зниження маркерів фіброзу таких, як α -SMA, FN, TGF- β в нирках (на рівні білка) та інших - *Tgfbr2*, *Snai1*, *Snai2* і *Twist 1* (на рівні мРНК). Результати наших досліджень вказують на багатообіцяючі антифіброзні ефекти RB394 та DM509, які нормалізували рівень ряду ключових показників, залучених до прогресування ниркового фіброзу.

4. Доведено, що застосування молекул RB394 і DM509 сприяло двократному зниженню рівнів експресії генів *Tnfa*, *Il1b*, *Il6*. Застосування RB394 сприяло 3-кратному зниженню кількості CD45⁺- і F4/80⁺- Т-лімфоцитів та макрофагів у нирках мишей з моделлю ООС, що підтвердило протизапальні властивості даних сполук.

5. За умов застосуванням агоніста PPAR- γ та інгібітора sEH окремо, у групі мишей з ООС спостерігали зниження експресії генів окисного стресу *Nox1* у 1,6 та 2,3, *Cybb* у 1,5 та 1,7, *Ncf1* у 1,5 та 1,3 і *Cyba* у 1,5 та 1,7 рази, відповідно. Однак введення комбінації sEH і агоніста PPAR- γ тваринам з ООС показала зниження експресії генів *Nox1* у 1,8, *Cybb* у 1,7, *Ncf1* у 2,1 і *Cyba* у 1,7 рази, відповідно, порівняно з групою ООС. За введення молекули RB394 відмічено максимальний антиоксидантний ефект, що виражений у зниженні рівня експресії генів-маркерів окисного стресу у 1,6-3,2 рази у нирках мишей з ООС. Результати наших досліджень вказують на багатообіцяючий терапевтичний потенціал усіх комбінацій, однак молекула RB394 проявила найкращий лікувальний ефект.

Список використаної літератури

1. Breyer MD, Susztak K. The next generation of therapeutics for chronic kidney disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2016; 8: 568–88.
2. Пиріг ЛА, Статистична номенклатура патології нирок в Україні: динаміка і сучасність. Газета *Новости медицины и фармации, нефрология.* 2010; 297: 5-30.
3. Lee SY, Kim SI, Choi ME. Therapeutic targets for treating fibrotic kidney diseases. *Transl Res.* 2015; 165(4): 512–30.
4. Imig JD. Epoxyeicosatrienoic acids, hypertension, and kidney injury. *Hypertension.* 2015; 65: 476–482.
5. Bellien J, Joannides R. Epoxyeicosatrienoic acid pathway in human health and diseases. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2013; 61: 188–196.
6. Hye Khan MA, Hwang SH, Sharma A, Corbett JA, Hammock BD, Imig JD. A dual COX-2/sEH inhibitor improves the metabolic profile and reduces kidney injury in Zucker diabetic fatty rat. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2016; 125: 40–47
7. Sudhakar V, Shaw S, Imig JD. Epoxyeicosatrienoic acid analogs and vascular function. *Curr. Med. Chem.* 2010; 17: 1181–1190.
8. Kim J, Imig JD, Yang J, Hammock BD, Padanilam BJ. (2014). Inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrosis and inflammation. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 2014; 307: F971–F980.
9. Kim J, Yoon SP, Toews ML, Imig JD, Hwang SH, Hammock BD, et al. Pharmacological inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrogenesis in obstructive nephropathy. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 2015; 308: F131–F139.
10. 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.
11. Gai Z, Chu L, Xu Z, Song X, Sun D, Kullak-Ublick GA. Farnesoid X receptor activation protects the kidney from ischemia-reperfusion damage. *Sci Rep.* 2017;7(1): 9815.

12. Staels, B.; Fruchart, J.-C. Therapeutic Roles of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Agonists. *Diabetes*. 2005; 54: 2460.
13. Rohatgi A, McGuire DK. Effects of the Thiazolidinedione Medications on Micro- and Macrovascular Complications in Patients with Diabetes - Update 2008. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2008; 22: 233–240.
14. Hye Khan MA, Schmidt J, Stavniichuk A, Imig JD, Merk D. A dual farnesoid X receptor/soluble epoxide hydrolase modulator treats non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Biochem Pharmacol.* 2019; 166:212–221
15. Levey AS, Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet*. 2012; 379(9811): 165-80.
16. Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet*. 2017; 389(10075): 1238–1252.
17. Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C, Rodriguez-Pena AB and Lopez-Hernandez FJ: Common pathophysiological mechanisms of chronic kidney disease: Therapeutic perspectives. *Pharmacol Ther.* 2010; 128(1): 61–81.
18. Edeling M, Ragi G, Huang S, Pavenstädt H, Susztak K. Developmental signalling pathways in renal fibrosis: the roles of Notch, Wnt and Hedgehog. *Nat Rev Nephrol.* 2016 Jul;12(7):42–6-39.
19. McCarty MF: Adjuvant strategies for prevention of glomerulosclerosis. *Med Hypotheses.* 2006; 67(6): 1277–1296.
20. Zhao J, Wang H, Cao AL, Jiang MQ, Chen X and Peng W: Renal tubulointerstitial fibrosis: A review in animal models. *J Integr Nephrol Androl.* 2015; 2(3): 75–80.
21. Fogo AB: Progression and potential regression of glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2001; 59(2): 804–819.
22. Stavniichuk A, Savchuk O, Khan HA, Jankiewicz KW, Imig DJ. A Sorafenib induced model of glomerular kidney disease. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Biology,* 2(81) 2020, P25–31.
23. Markowitz GS, Bomback AS, Perazella MA. Drug-induced glomerular disease: direct cellular injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2015; 10(7): 1291–9.

24. Liu WH, Tang NN and Zhang QD: Could mycophenolate mofetil combined with benazapril delay tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats? *Chin Med J*. 2009; 122(2): 199–204.
25. Gupta S, Clarkson MR, Duggan J and Brady HR: Connective tissue growth factor: Potential role in glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis. *Kidney Int*. 2000; 58(4): 1389–1399.
26. Liu Y: New insights into epithelial–mesenchymal transition in kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21(2): 212–222.
27. Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *J Clin Invest*. 2014; 124: 2333–2340.
28. Hakrrouch S, et al. Extensive podocyte loss triggers a rapid parietal epithelial cell response. *J Am Soc Nephrol*. 2014; 25: 927–938.
29. Eng DG, et al. Glomerular parietal epithelial cells contribute to adult podocyte regeneration in experimental focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2015; 88: 999–1012.
30. Kaissling B, Lehir M and Kriz W: Renal epithelial injury and fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1832(7): 931–939.
31. Imig JD, Ryan MJ. Immune and inflammatory role in renal disease. *Compr Physiol*. 2013; 3(2): 957–76.
32. Schwarting A, Tesch G, Kinoshita K, Maron R, Weiner HL, Kelley VR. IL-12 drives IFN- γ -dependent autoimmune kidney disease in MRL-Fas(lpr) mice. *J Immunol*. 1999; 163: 6884–6891.
33. Burne MJ, Daniels F, El GA, Mauiyyedi S, Colvin RB, O'Donnell MP, Rabb H. Identification of the CD4(+) T cell as a major pathogenic factor in ischemic acute renal failure. *J Clin Invest*. 2001; 108: 1283–1290.
34. Sanz AB, Justo P, Sanchez-Nino MD, Blanco-Colio LM, Winkles JA, Kretzler M, Jakubowski A, Blanco J, Egido J, Ruiz-Ortega M, Ortiz A. The cytokine TWEAK modulates renal tubulointerstitial inflammation. *J Am Soc Nephrol*. 2008; 19: 695–703.

35. Sanz AB, Sanchez-Nino MD, Ramos AM, Moreno JA, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. NF-kappaB in renal inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21: 1254–1262.
36. Hostetter TH. Hyperfiltration and glomerulosclerosis. *Semin Nephrol.* 2003; 23: 194–199.
37. Zandi-Nejad K, Brenner BM. Strategies to retard the progression of chronic kidney disease. *Med Clin North Am.* 2005; 89: 489–509.
38. Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest.* 2006; 116: 288–296.
39. Go AS, Chertow GM, Fan D et al. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med.* 2004; 351: 1296–1305.
40. van der Velde M, Matsushita K, Coresh J et al. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney Int.* 2011; 79: 1341–1352.
41. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP et al. The effect of angiotensin converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med.* 1993; 329: 1456–1462.
42. Jafar TH, Schmid CH, Landa M et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and progression of nondiabetic renal disease. A meta-analysis of patient-level data. *Ann Intern Med.* 2001; 135: 73–87.
43. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2001; 345: 851–860.
44. Jafar TH, Stark PC, Schmid CH et al. Progression of chronic kidney disease: the role of blood pressure control, proteinuria, and angiotensin converting enzyme inhibition: a patient-level meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2003; 139: 244–252.
45. Appel LJ, Wright Jr JT, Greene T et al. Intensive blood-pressure control in hypertensive chronic kidney disease. *N Engl J Med.* 2010; 363: 918–929.

46. Jafar TH, Stark PC, Schmid CH et al. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on progression of advanced polycystic kidney disease. *Kidney Int.* 2005; 67: 265–271.
47. Glassock RJ. Debate: CON position. Should microalbuminuria ever be considered as a renal endpoint in any clinical trial? *Am J Nephrol.* 2010; 31: 462–467.
48. Abbate M, Zoja C, Remuzzi G. How does proteinuria cause progressive renal damage? *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 2974–2984.
49. Ruster C, Wolf G. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 2985–2991.
50. Sowers JR, Whaley-Connell A, Epstein M. Narrative review: the emerging clinical implications of the role of aldosterone in the metabolic syndrome and resistant hypertension. *Ann Intern Med.* 2009; 150:776–783.
51. Nishiyama A, Abe Y. Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: renoprotective effects of aldosterone blockade. *J Pharmacol Sci.* 2006; 100: 9–16.
52. Nakao N, Yoshimura A, Morita H et al. Combination treatment of angiotensin-II receptor blocker and angiotensin-converting-enzyme inhibitor in non-diabetic renal disease (COOPERATE): a randomized controlled trial. *Lancet.* 2003; 361: 117–124.
53. Kunz R, Wolbers M, Glass T et al. The COOPERATE trial: a letter of concern. *Lancet.* 2008; 371: 1575–1576.
54. Bidani A. Controversy about COOPERATE ABPM trial data. *Am J Nephrol* 2006; 26: 629, 632; author reply 629–632.
55. Mann JF, Schmieder RE, McQueen M et al. Renal outcomes with telmisartan, ramipril, or both, in people at high vascular risk (the ONTARGET study): a multicentre, randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet.* 2008; 372: 547–553.
56. Fried LF, Duckworth W, Zhang JH et al. Design of combination angiotensin receptor blocker and angiotensin-converting enzyme inhibitor for treatment of diabetic nephropathy (VA NEPHRON-D). *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4: 361–368.
57. Bomback AS, Kshirsagar AV, Amamoo MA et al. Change in proteinuria after adding aldosterone blockers to ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers in

CKD: a systematic review. *Am J Kidney Dis.* 2008; 51: 199–211.

58. Navaneethan SD, Nigwekar SU, Sehgal AR et al. Aldosterone antagonists for preventing the progression of chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst.* 2009; 8 (3): CD007004.

59. Mehdi UF, Adams-Huet B, Raskin P et al. Addition of angiotensin receptor blockade or mineralocorticoid antagonism to maximal angiotensin-converting enzyme inhibition in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20: 2641–2650.

60. RamachandraRao SP, Zhu Y, Ravasi T et al. Pirfenidone is renoprotective in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2009; 20: 1765–1775.

61. Shimizu T, Fukagawa M, Kuroda T et al. Pirfenidone prevents collagen accumulation in the remnant kidney in rats with partial nephrectomy. *Kidney International Supplement.* 1997; 63: S239–S243.

62. Walker JE, Giri SN, Margolin SB. A double-blind, randomized, controlled study of oral pirfenidone for treatment of secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2005; 11: 149–158.

63. Armendariz-Borunda J, Islas-Carbajal MC, Meza-Garcia E et al. A pilot study in patients with established advanced liver fibrosis using pirfenidone. 2006; 55: 1663–1665.

64. Azuma A, Nukiwa T, Tsuboi E et al. Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; 171: 1040–1047.

65. Sharma K, Ix JH, Mathew AV et al. Pirfenidone for diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2011; 22: 1144–1151.

66. Pergola PE, Raskin P, Toto RD et al. Bardoxolone methyl and kidney function in CKD with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2011; 365:327–336.

67. Dhaun N, Goddard J, Webb DJ. The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17:943–955.

68. Goddard J, Johnston NR, Hand MF et al. Endothelin-A receptor antagonism reduces blood pressure and increases renal blood flow in hypertensive patients with chronic renal failure: a comparison of selective and combined endothelin receptor

blockade. *Circulation*. 2004; 109: 1186–1193.

69. Al-Bayati MA, Xie Y, Mohr FC, Margolin SB and Giri SN: Effect of pirfenidone against vanadate-induced kidney fibrosis in rats. *Biochem Pharmacol*. 2002; 64(3): 517–525.

70. Boor P, Sebekova K, Ostendorf T and Floege J: Treatment targets in renal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2007; 22(12): 3391–3407.

71. Ishikawa A, Tanaka M, Ohta N, Ozono S and Kitamura T: Prevention of interstitial fibrosis of renal allograft by angiotensin II blockade. *Transplant Proc*. 2006; 38(10): 3498–3501.

72. Lee BC, Choi JB, Cho HJ and Kim YS: *Rehmannia glutinosa* ameliorates the progressive renal failure induced by 5/6 nephrectomy. *J Ethnopharmacol*. 2009; 122(1): 131–135.

73. Shimizu T, Kuroda T, Hata S, Fukagawa M, Margolin SB and Kurokawa K: Pirfenidone improves renal function and fibrosis in the post-obstructed kidney. *Kidney Int*. 1998; 54(1): 99–109.

74. Rodriguez-Pena A, Prieto M, Duwel A, Rivas JV, Eleno N, Perez-Barriocanal F, Arevalo M, Smith JD, Vary CP, Bernabeu C and Lopez-Novoa JM: Up-regulation of endoglin, a TGF- β -binding protein, in rats with experimental renal fibrosis induced by renal mass reduction. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16(Suppl 1): 34–39.

75. Gagliardini E and Benigni A: Role of anti-TGF- β antibodies in the treatment of renal injury. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17(1-2): 89–96.

76. Klein J, Gonzalez J, Duchene J, Esposito L, Pradere JP, Neau E, Delage C, Calise D, Ahluwalia A, Carayon P, Pesquero JB, Bader M, Schanstra JP and Bascands JL: Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *FASEB J*. 2009; 23(1): 134–142.

77. Sun GP, Kohno M, Guo P, Nagai Y, Miyata K, Fan YY, Kimura S, Kiyomoto H, Ohmori K, Li DT, Abe Y and Nishiyama A: Involvements of rho-kinase and TGF- β pathways in aldosterone-induced renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17(8): 2193–2201.

78. Diah S, Zhang GX, Nagai Y, Zhang W, Gang L, Kimura S, Hamid MR, Tamiya

- T, Nishiyama A and Hitomi H: Aldosterone induces myofibroblastic transdifferentiation and collagen gene expression through the rho-kinase dependent signaling pathway in rat mesangial cells. *Exp Cell Res.* 2008; 314(20): 3654–3662.
79. Yang F, Chung AC, Huang XR and Lan HY: Angiotensin II induces connective tissue growth factor and collagen I expression via transforming growth factor-beta-dependent and -independent smad pathways: The role of SMAD3. *Hypertension.* 2009; 54(4): 877–884.
80. Phanish MK, Winn SK and Dockrell ME: Connective tissue growth factor-(cTGF, CCN2)—a marker, mediator and therapeutic target for renal fibrosis. *Nephron Exp Nephrol.* 2010; 114(3): e83–92.
81. Tan X, Li Y and Liu Y: Therapeutic role and potential mechanisms of active vitamin D in renal interstitial fibrosis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 103(3-5): 491–496.
82. Tain YL, Freshour G, Dikalova A, Griendling K and Baylis C: Vitamin E reduces glomerulosclerosis, restores renal neuronal NOS, and suppresses oxidative stress in the 5/6 nephrectomized rat. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007; 292(5): F1404–1410.
83. Wang QL, Yuan JL, Tao YY, Zhang Y, Liu P and Liu CH: Fuzheng huayu recipe and vitamin E reverse renal interstitial fibrosis through counteracting TGF-beta 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition. *J Ethnopharmacol.* 2010; 127(3): 631–640.
84. Tao YY, Wang QL, Yuan JL, Shen L and Liu CH: Effects of vitamin E on mercuric chloride-induced renal interstitial fibrosis in rats and the antioxidative mechanism. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* 2011; 9(2): 201–208.
85. Benchetrit S, Yarkoni S, Rathaus M, Pines M, Rashid G and Bernheim J: Halofuginone reduces the occurrence of renal fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Isr Med Assoc J.* 2007; 9(1): 30–34.
86. Shin DH, Park HM, Jung KA, Choi HG, Kim JA, Kim DD, Kim SG, Kang KW, Ku SK, Kensler TW and Kwak MK: The NRF2- heme oxygenase-1 system modulates cyclosporin A-induced epithelial–mesenchymal transition and renal fibrosis. *Free*

Radic Biol Med. 2010; 48(8): 1051–1063.

87. Nogueira A, Vala H, Vasconcelos-Nóbrega C, Faustino-Rocha AI, Pires CA, Colaço A, Oliveira PA, Pires MJ. Long-term treatment with chaethomellic acid A reduces glomerulosclerosis and arteriolosclerosis in a rat model of chronic kidney disease. *Biomed Pharmacother.* 2017; 96:489–496.

88. Nogueira A, Peixoto F, Oliveira MM, Pires CA, Colaço B, Oliveira PA, Pires MJ. The Effects of Long-Term Chaetomelic Acid A Administration on Renal Function and Oxidative Stress in a Rat Model of Renal Mass Reduction. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:5125980.

89. Nogueira A, Vala H, Nobrega C, Pires CA, Colaço B, Oliveira PA and Pires MJ: Effect of chronic therapy with chaethomellic acid A on renal fibrosis in 5/6 nephrectomized rats: A preliminary study. *Virchows Archiv.* 2015; 467: S2–S32.

90. Rodriguez-Pena AB, Fuentes-Calvo I, Docherty NG, Arevalo M, Grande MT, Eleno N, Perez-Barriocanal F and Lopez-Novoa JM: Effect of angiotensin II and small GTPase RAS signaling pathway inhibition on early renal changes in a murine model of obstructive nephropathy. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 124902.

91. Schachinger V and Zeiher AM: Stem cells and cardiovascular and renal disease: Today and tomorrow. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16(Suppl 1): S2–6.

92. Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J. Clin. Invest.* 2006; 116: 4–15.

93. Imig JD, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase as a therapeutic target for cardiovascular diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009; 8: 794–805.

94. Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. *Physiol. Rev.* 2002; 82: 131–185.

95. Zeldin DC. Epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism. *J. Biol. Chem.* 2011; 276: 36059–36062.

96. Imig JD, Elmarakby A, Nithipatikom K, Wei S, Capdevila JH, Tuniki VR, et al. Development of epoxyeicosatrienoic acid analogs with in vivo anti-hypertensive actions. *Front. Vasc. Physiol.* 2010; 1: 157.

97. Imig JD. Epoxides and soluble epoxide hydrolase in cardiovascular physiology. *Physiol. Rev.* 2012; 92: 101–130.
98. Hye Khan MA, Pavlov TS, Christain SV, Neckář J, Staruschenko A, Gauthier KM, et al. Epoxyeicosatrienoic acid analogue lowers blood pressure through vasodilation and sodium channel inhibition. *Clin. Sci. (Lond.)* 2014; 127: 463–474.
99. Miyata N, Taniguchi K, Seki T, et al. HET0016, a potent and selective inhibitor of 20-HETE synthesizing enzyme. *Br J Pharmacol.* 2001; 133(3): 325–329.
100. Campbell WB, Imig JD, Schmitz JM, Falck JR. (2017). Orally active epoxyeicosatrienoic acid analogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2017; 70: 211–224.
101. Campbell WB, Fleming I. Epoxyeicosatrienoic acids and endothelium-dependent responses. *Pflugers Arch.* 2010; 459: 881–895.
102. Morisseau C, Hammock BD. Impact of soluble epoxide hydrolase and epoxyeicosanoids on human health. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2013; 53: 37–58.
103. Tacconelli S, Patrignani P. Inside epoxyeicosatrienoic acids and cardiovascular disease. *Front. Pharmacol.* 2014; 5: 23.
104. Zhao X, Pollock DM, Inscho EW, Zeldin DC, Imig JD. Decreased renal cytochrome P450 2C enzymes and impaired vasodilation are associated with salt-sensitive hypertension. *Hypertension.* 2003; 41: 709–714.
105. Imig JD, Zhao X, Capdevila JH, Morisseau C, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase inhibition lowers arterial blood pressure in angiotensin II hypertension. *Hypertension.* 2002; 39: 690–694.
106. Chen G, Xu R, Wang Y, Wang P, Zhao G, Xu X, et al. Genetic disruption of soluble epoxide hydrolase is protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2012; 303: E563–E575.
107. Elmarakby AA, Faulkner J, Al-Shabrawey M, Wang MH, Maddipati KR, Imig JD. Deletion of soluble epoxide hydrolase gene improves renal endothelial function and reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced type 1 diabetes. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 2011; 301: R1307–R1317.

108. Hashimoto T, Fang YI, Ohata H, Honda K. Change in soluble epoxide hydrolase (sEH) during cisplatin-induced acute renal failure in mice. *J. Toxicol. Sci.* 2015; 40: 451–457.
109. Hye Khan MA, Stavniichuk A, Sattar MA, Falck JR, Imig JD. Epoxyeicosatrienoic Acid Analog EET-A Blunts Development of Lupus Nephritis in Mice. *Front Pharmacol.* 2019; 10:512.
110. He J, Wang C, Zhu Y, Ai D. Soluble Epoxide Hydrolase: A Potential Target for Metabolic Diseases. *J Diabetes.* 2016; 8(3):305-.13
111. Khan MAH, Liu J, Kumar G, Skapek SX, Falck JR, Imig JD. Novel orally active epoxyeicosatrienoic acid (EET) analogs attenuate cisplatin nephrotoxicity. *FASEB J.* 2013a; 27: 2946–2956.
112. Khan MAH, Manthati V, Errabelli R, Pavlov TS, Staruschenko A, Falck JR, et al. An orally active epoxyeicosatrienoic acid analog attenuates kidney injury in hypertensive Dahl salt sensitive rat. *Hypertension.* 2013; 62: 905–913.
113. Liu Y, Webb HK, Fukushima H, Micheli J, Markova S, Olson JL, et al. Attenuation of cisplatin-induced renal injury by inhibition of soluble epoxide hydrolase involves nuclear factor κ B signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012; 341: 725–734.
114. Skibba M, Hye Khan MA, Kolb LL, Yeboah MM, Falck JR, Amaradhi R, et al. Epoxyeicosatrienoic acid analog decreases renal fibrosis by reducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Front. Pharmacol.* 2017; 8: 406.
115. Ramsay RR, Popovic-Nikolic MR, Nikolic K, Uliassi E, Bolognesi ML. A perspective on multi-target drug discovery and design for complex diseases. *Clin Transl Med.* 2018; 17: 7(1):3.
116. Morphy R, Rankovic Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm, *J. Med. Chem.* 2005; 48 (21): 6523–6543.
117. Meunier B. Hybrid molecules with a dual mode of action: dream or reality? *Acc Chem Res.* 2008; 41(1): 69-77.
118. Rask Larsen J, Dima L, Correll CU, Manu P. The pharmacological management of metabolic syndrome. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2018; 11(4): 397–410.

119. Li W, Pang IH, Pacheco MTF, Tian H. Ligandomics: a paradigm shifts in biological drug discovery. *Drug Discov Today*. 2018; 23(3): 636–643.
120. Spector AA, Norris AW. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292(3): C996–1012.
121. Idris-Khodja N, et al., Vascular smooth muscle cell peroxisome proliferator-activated receptor gamma protects against endothelin-1-induced oxidative stress and inflammation, *J. Hypertens*. 35 (7) (2017) 1390–1401.
122. Samokhvalov V, Vriend J, Jamieson KL, Akhnokh MK, Manne R, Falck JR, Seubert JM. PPAR γ signaling is required for mediating EETs protective effects in neonatal cardiomyocytes exposed to LPS. *Front Pharmacol*. 2014; 5:242.
123. Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes*. 2005; 54(8): 2460–70.
124. Guan Y, Hao C, Cha DR, Rao R, Lu W, Kohan DE, Magnuson MA, Redha R, Zhang Y, Breyer MD. Thiazolidinediones expand body fluid volume through PPAR γ stimulation of ENaC-mediated renal salt absorption. *Nat Med*. 2005;11(8): 861–6.
125. Eldor R, DeFronzo RA, Abdul-Ghani M. In vivo actions of peroxisome proliferator-activated receptors: glycemic control, insulin sensitivity, and insulin secretion. *Diabetes Care*. 2013; 36 Suppl 2: S162–74.
126. Capdevila JH, Pidkovka N, Mei S, Gong Y, Falck JR, Imig JD, Harris RC, Wang W. The Cyp2c44 epoxygenase regulates epithelial sodium channel activity and the blood pressure responses to increased dietary salt. *J Biol Chem*. 2014; 289(7): 4377–86.
127. Grundy SM. Drug therapy of the metabolic syndrome: minimizing the emerging crisis in polypharmacy. *Nat Rev Drug Discov*. 2006; 5(4): 295–309.
128. Imig JD, Walsh KA, Hye Khan MA, Nagasawa T, Cherian-Shaw M, Shaw SM, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase inhibition and peroxisome proliferator activated receptor γ agonist improve vascular function and decrease renal injury in hypertensive obese rats. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012; 237(12): 1402–12.

129. la Buscató E, Blöcher R, Lamers C, Klingler FM, Hahn S, Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, Proschak E. Design and synthesis of dual modulators of soluble epoxide hydrolase and peroxisome proliferator-activated receptors. *J Med Chem*. 2012; 55(23): 10771–5.
130. R. Blöcher, et al., Design and synthesis of fused soluble epoxide hydrolase/peroxisome proliferator-activated receptor modulators, *Med. Chem. Comm.* 7 (6) (2016) 1209–1216.
131. Blöcher R, Lamers C, Wittmann SK, Merk D and Proschak E. N-Benzylbenzamides: A Novel Merged Scaffold for Orally Available Dual Soluble Epoxide Hydrolase/Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Modulators. *J Med Chem*. 2016; 59(1): 61–81.
132. Hye Khan MA, Kolb L, Skibba M, Hartmann M, Blöcher R, Proschak E, Imig JD. A novel dual PPAR- γ agonist/sEH inhibitor treats diabetic complications in a rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2018; 61(10): 2235–2246.
133. la Buscató E, Blöcher R, Lamers C, Klingler FM, Hahn S, Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M, Proschak E. Design and synthesis of dual modulators of soluble epoxide hydrolase and peroxisome proliferator-activated receptors. *J Med Chem*. 2012 Dec 13;55(23):10771–5
134. Stavniichuk A, Abdul Hye Khan, Yeboah MM et al. Dual Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor/PPAR- γ Agonist Attenuates Renal Fibrosis. *PLOM*. 2020
135. Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, Lavine JE, Van Natta ML, Abdelmalek MF, Chalasani N, Dasarathy S, Diehl AM, Hameed B, Kowdley KV, McCullough A, Terrault N, Clark JM, Tonascia J, Brunt EM, Kleiner DE, Doo E; NASH Clinical Research Network. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2015; 385(9972): 956–65.
136. Mudaliar S, Henry RR, Sanyal AJ, Morrow L, Marschall HU, Kipnes M, Adorini L, Sciacca CI, Clopton P, Castelloe E, Dillon P, Pruzanski M, Shapiro D. Efficacy and safety of the farnesoid X receptor agonist obeticholic acid in patients with type 2 diabetes and nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2013;145(3): 574–82.

137. Mangels N, Awwad K, Wettenmann A, Dos Santos LR, Frömel T, Fleming I. The soluble epoxide hydrolase determines cholesterol homeostasis by regulating AMPK and SREBP activity. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2016; 125: 30–9.
138. Liu Y, Dang H, Li D, Pang W, Hammock BD, Zhu Y. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates high-fat-diet-induced hepatic steatosis by reduced systemic inflammatory status in mice. *PLoS One.* 2012; 7(6): e39165.
139. Merk D, Lamers C, Ahmad K, Carrasco Gomez R, Schneider G, Steinhilber D, Schubert-Zsilavecz M. Extending the structure-activity relationship of anthranilic acid derivatives as farnesoid X receptor modulators: development of a highly potent partial farnesoid X receptor agonist. *J Med Chem.* 2014; 57(19): 8035–55.
140. Kompa AR, Wang BH, Xu G, Zhang Y, Ho PY, Eisennagel S, Thalji RK, Marino JP Jr, Kelly DJ, Behm DJ, Krum H. Soluble epoxide hydrolase inhibition exerts beneficial anti-remodeling actions post-myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013; 167(1): 210–9.
141. Schmidt J, Rotter M, Weiser T, Wittmann S, Weizel L, Kaiser A, Heering J, Goebel T, Angioni C, Wurglics M, Paulke A, Geisslinger G, Kahnt A, Steinhilber D, Proschak E, Merk D. A Dual Modulator of Farnesoid X Receptor and Soluble Epoxide Hydrolase To Counter Nonalcoholic Steatohepatitis. *J Med Chem.* 2017; 60(18): 7703–7724.
142. Stavniichuk A, Savchuk O, Abdul Hye Khan, Wojciech K Jankiewicz, John D Imig, Daniel Merk. The effect of compound DM509 on kidney fibrosis in the conditions of the experimental model. *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, серія Біологія.* 2020; 12 (80): 10–15.
143. Martínez-Klimova E, Aparicio-Trejo OE, Tapia E, Pedraza-Chaverri J. Unilateral Ureteral Obstruction as a Model to Investigate Fibrosis-Attenuating Treatments. *Biomolecules.* 2019; 8: 9(4).
144. Yeboah MM, Hye Khan MA, Chesnik MA, Sharma A, Paudyal MP, Falck JR, et al. The epoxyeicosatrienoic acid analog PVPA ameliorates cyclosporine-induced hypertension and renal injury in rats. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 2016; 311: F576–F585.

145. Göbel T, Diehl O, Heering J, Merk D, Angioni C, Wittmann SK, Buscato E, Kottke R, Weizel L, Schader T, Maier TJ, Geisslinger G, Schubert-Zsilavecz M, Steinhilber D, Proschak E, Kahnt AS. Zafirlukast Is a Dual Modulator of Human Soluble Epoxide Hydrolase and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ . *Front Pharmacol.* 2019 Mar 20;10: 263
146. Hye Khan MA, Fish B, Wahl G, Sharma A, Falck JR, Paudyal MP, et al. Epoxyeicosatrienoic acid analogue mitigates kidney injury in a rat model of radiation nephropathy. *Clin. Sci. (Lond.)* 2016; 130: 587–599.
147. Boor P, Ostendorf T, Floege J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol.* 2010; 6(11) :643–56.
148. Xie Y, Lan F, Zhao J, Shi W. Hirudin improves renal interstitial fibrosis by reducing renal tubule injury and inflammation in unilateral ureteral obstruction (UUO) mice. *Int Immunopharmacol.* 2020; 81: 106249.
149. Wakui H, Yamaji T, Azushima K, Uneda K, Haruhara K, Nakamura A, Ohki K, Kinguchi S, Kobayashi R, Urate S, Suzuki T, Kamimura D, Minegishi S, Ishigami T, Kanaoka T, Matsuo K, Miyazaki T, Fujikawa T, Yamashita A, Tamura K. Effects of Rikkunshito treatment on renal fibrosis/inflammation and body weight reduction in a unilateral ureteral obstruction model in mice. *Sci Rep.* 2020; 10(1): 1782.
150. Hogaboam CM, Steinhauser ML, Chensue SW, Kunkel SL. Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis. *Kidney Int.* 1998; 54: 2152–2159.
151. Borges FT, Melo SA, Ozdemir BC, Kato N, Revuelta I, Miller CA, Gattone VH, 2nd LeBleu VS, Kalluri R. TGF- β 1-containing exosomes from injured epithelial cells activate fibroblasts to initiate tissue regenerative responses and fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2013; 24: 385–392.
152. Inoue T, Takenaka T, Hayashi M, Monkawa T, Yoshino J, Shimoda K, Neilson EG, Suzuki H, Okada H. Fibroblast expression of an I κ B dominant-negative transgene attenuates renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 2010; 21: 2047–2052.
153. Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Esteban V, Ruperez M, Egido J, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells

by a transforming growth factor- β -independent mechanism. *Circulation*. 2005; 111: 2509–2517.

154. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: The Diverse Biology of PPAR Gamma. *Annu. Rev. Biochem.* 2008; 77: 289–312.

155. McCarthy KJ, Routh RE, Shaw W, Walsh K, Welbourne TC, Johnson JH. Troglitazone halts diabetic glomerulosclerosis by blockade of mesangial expansion. *Kidney Int.* 2000; 58: 2341–2350.

156. Kon K, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Enomoto N, Kitamura T, Takei Y, Sato N. Pioglitazone prevents early-phase hepatic fibrogenesis caused by carbon tetrachloride. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 291: 55–61.

157. Kim JC, Lee YH, Yu MK, Lee NH, Park JD, Bhattarai G, Yi HK. Anti-inflammatory mechanism of PPAR- γ on LPS-induced pulp cells: role of the ROS removal activity. *Arch Oral Biol.* 2012; 57: 392–400.

158. Zuo Y, Yang CH, Potthoff, SA. Protective effects of PPAR γ agonist in acute nephrotic syndrome. 2012; 27(1): 174–181.

159. Kawai T, Masaki T, Doi S, Arakawa T, Yokoyama Y, Doi T, Kohno N, Yorioka N. PPAR-agonist attenuates renal interstitial fibrosis and inflammation through reduction of TGF- β . *Lab Invest.* 2008; 89: 47–58.

160. Ghosh AK, Bhattacharyya S, Wei J, Kim S, Barak Y, Mori Y, Varga J. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ abrogates Smad-dependent collagen stimulation by targeting the p300 transcriptional coactivator. *FASEB J.* 2009; 23: 2968–2977.

161. Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM. PPAR γ Signaling and Metabolism: The Good, the Bad and the Future. *Nat. Med.* 2013; 99: 557–566.

162. Cariou, B.; Charbonnel, B.; Staels, B. Thiazolidinediones and PPAR γ Agonists: Time for a Reassessment. *Trends Endocrinol. Metab.* 2012; 23: 205–215.

163. Xu, D. Y.; Davis, B. B.; Wang, Z. H.; Zhao, S. P.; Wasti, B.; Liu, Z. L.; Li, N.; Morisseau, C.; Chiamvimonvat, N.; Hammock, B. D. A Potent Soluble Epoxide Hydrolase Inhibitor, T-AUCB, Acts through PPAR γ to Modulate the Function of

- Endothelial Progenitor Cells from Patients with Acute Myocardial Infarction. *Int. J. Cardiol.* 2013, 167, 1298–1304.
164. Liu F, Zhuang S. New Therapies for the Treatment of Renal Fibrosis. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1165:625–659.
165. Panchapakesan U, Chen XM, Pollock CA. Drug Insight: Thiazolidinediones and Diabetic Nephropathy--Relevance to Renoprotection. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2005; 1(1):33-43.
166. Sivarajah et al., 2003 Agonists of Peroxisome-Proliferator Activated Receptor-Gamma Reduce Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *Am J Nephrol.* 2003; 23(4):267–76.
167. Liu, Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int.* 2006; 69:213–217.
168. Liu Y, Zhang Y, Schmelzer K, Lee TS, Fang X, Zhu Y, Spector AA, Gill S, Morisseau C, Hammock BD, Shyy JY. The antiinflammatory effect of laminar flow: the role of PPARgamma, epoxyeicosatrienoic acids, and soluble epoxide hydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:16747–16752.
169. Imig JD, Walsh KA, Hye Khan MA, Nagasawa T, Cherian-Shaw M, Shaw SM, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase inhibition and peroxisome proliferator activated receptor γ agonist improve vascular function and decrease renal injury in hypertensive obese rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 2012; 237(12): 1402–12.
170. Pang W, Li N, Ai D, Niu XL, Guan YF, Zhu Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma downregulates soluble epoxide hydrolase in cardiomyocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38:358–364.
171. Imig JD. Epoxide hydrolase and epoxygenase metabolites as therapeutic targets for renal diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Sep;289(3):F496–503
172. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int.* 2002; 62: 1524–1538.
173. Vaziri ND. Oxidative stress in uremia: nature, mechanisms, and potential consequences. *Semin Nephrol.* 2004; 24: 469–473.

174. Bondi CD, Manickam N, Lee DY, Block K, Gorin Y, Abboud HE, Barnes JL. NAD(P)H oxidase mediates TGF-beta1 induced activation of kidney myofibroblasts. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2010; 21: 93–102.
175. Suh JM, Yu CT, Tang K, et al. The expression profiles of nuclear receptors in the developing and adult kidney. *Mol Endocrinol.* 2006; 20: 3412–3420.
176. Watanabe M, Houten SM, Wang L, et al. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. *J Clin Invest.* 2004; 113: 1408–1418.
177. Huang A, Sun D, Jacobson A, Carroll M, Falck JR, Kaley G. Epoxyeicosatrienoic Acids Are Released to Mediate Shear Stress-Dependent Hyperpolarization of Arteriolar Smooth Muscle. *Circ. Res.* 2005; 96: 376–383.
178. Chiang CW, Lee HT, Tarng DC. et al. Kuo KL, Cheng LC, Lee TS. Genetic deletion of soluble epoxide hydrolase attenuates inflammation and fibrosis in experimental obstructive nephropathy. *Mediators Inflamm.* 2015; 693260.
179. Schierle S, Helmstädter M, Schmidt J, Hartmann M, Horz M, Kaiser A, Weizel L, Heitel P, Proschak A, Hernandez-Olmos V, Proschak E, Merk D. Dual Farnesoid X Receptor/Soluble Epoxide Hydrolase Modulators Derived from Zafirlukast. *ChemMedChem.* 2020 Jan 7;15(1):50–67.
180. Imig JD. Prospective for cytochrome P450 epoxygenase cardiovascular and renal therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2018;192: 1–19.
181. Elmarakby AA, Faulkner J, Pye C, Rouch K, Alhashim A, Maddipati KR, 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.
182. Wang XX, Jiang T, Shen Y, Caldas Y, Miyazaki-Anzai S, 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.