

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

СТАВНІЙЧУК АННА МИКОЛАЇВНА



УДК 577.151.6:612.115

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

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2021

Робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Савчук Олексій Миколайович,
Київський національний університет
імені Тараса Шевченка,
завідувач кафедри біохімії
ННЦ «Інститут біології та медицини»

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Король Леся Вікторівна,
Інститут нефрології НАМН України,
завідувач лабораторії біохімії

доктор біологічних наук, професор
Колибо Денис Володимирович,
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
завідувач лабораторії імунобіології
відділу молекулярної імунології

Захист відбудеться «5» травня 2021 року о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58, зала 12

Автореферат розісланий «2» квітня 2021 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
26.001.24



Н.Г. Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 [Піріг ЛА., 2010., Breyer MD. et al., 2016]. 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 [Lee SY. et al., 2015], 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 [Imig JD. et al., 2015., Bellien J. et al., 2013., Hye Khan MA. et al., 2016]. Однак шлях Сур450 на сьогодні залишається мало вивченим, хоча результати кількох досліджень довели вплив EET на перебіг патологічних процесів у нирках [Sudhahar V. et al., 2010]. 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 EET є розчинна епоксидгідролаза (sEH, КФ 3.3.2.10), яка залучена до перетворення EET в менш активну дигідроксіейкозатрієнову кислоту [Kim J. et al., 2014., Kim J. et al., 2015]. Показано, що інгібування sEH призводило до збільшення рівня EET в тканинах і плазмі, потенціювало ефекти EET, 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 [Verbeke L et al., 2016., Gai Z et al., 2017]. Встановлено, що активація PPAR- γ чинить антипроліферативну й антифіброзну дію, що пов'язано з протизапальною активністю [Staels B et al.,

2005]. Синтетичні агоністи PPAR- γ , такі як тiazолідиндіони, також продемонстрували захисний ефект при діабетичній нефропатії [Rohatgi A et al., 2008]. Цікавим є факт, що одночасна активація PPAR- γ та інгібування sEH підвищує рівень EET. 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, антифіброзної та протизапальної дії [Hye Khan MA. et al., 2019]. 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 біфункціональних 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 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Дослідження проводили на моделі експериментального ниркового фіброзу, який індукували хірургічним шляхом ООС у мишей лінії C57Bl6/J (у віці 8-10 тижнів) згідно рекомендацій [Skibba M. et al., 2017]. Тварини контрольної групи піддавалися аналогічній операції, але без наступного перев'язування сечоводу. 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. 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 експериментальні групи (n = 8) у кожній): *контрольна група* – тварини без перев'язування сечоводу, які отримували розчинник; *група ООС* – тварини після перев'язування сечоводу, які також отримували розчинник (контрольна група захворювання); *група sEHi* – тварини групи ООС, які отримували інгібітор розчинної епоксидгідролази (сполука була

синтезована та люб'язно надана нам Dr. John R. Falck (Department of Biochemistry, Southwestern University, Dallas, TX, США); *група Rosi* – тварини групи ООС, які отримували комерційний препарат-агоніст PPAR- γ – Rosiglitazone («Sigma Aldrich», Louis, MO, США); *група sEH+Rosi* – тварини групи ООС, які отримували комбінацію відповідних сполук; *група RB394* – тварини групи ООС, які отримували новосинтезовану сполуку подвійної дії, RB394, що є комбінацією інгібітора sEH та агоніста PPAR- γ ; *група DM509* – тварини групи ООС, які отримували новосинтезовану сполуку подвійної дії, DM509, що є комбінацією інгібітора sEH та агоніста FXR. Сполуки RB394 та DM509 були розроблені і синтезовані групою Ewgenij Proschak (Goethe-University Frankfurt, Institute of Pharmaceutical Chemistry, Німеччина). Усі досліджувані речовини вводили перорально у дозі 10мг/кг/доба протягом 10 днів, після чого тварин виводили з експерименту. Усі процедури з тваринами та їх утримання у віварії здійснювали у відповідності до національних та міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин (Європейська конвенція про захист хребетних тварин), Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження №3447-IV» (Київ, 2006), а також згідно з «Принципами поводження з лабораторними тваринами, 1985», вимогами Національних інститутів здоров'я (США). Збір біологічного матеріалу – сироватку крові та сечу, здійснювали за рекомендаціями [Hue Khan MA. et al., 2019]. Визначення біохімічних показників у сироватці крові проводили за допомогою біохімічного аналізатора Bio-Tek ELx800 з використанням стандартних тест-наборів. Вміст гідроксипроліну в тканинах нирки та вміст азоту сечовини в крові визначали спектрофотометрично згідно [Yeboah MM. et al., 2016]. Активність ферменту N-ацетил- β -D-глюкозамінідази (NAG) в сечі визначали колориметричним методом [Hue Khan MA. et al., 2016]. З метою дослідження експресії генів в ниркових тканинах, виділяли та очищали РНК, отримували кДНК та проводили ПЛР у реальному часі, використовуючи відповідні комерційні набори та слідуючи рекомендаціям [Hue Khan MA. et al., 2016]. Дві методи гістологічного фарбування, PAS та PSR, були використані для встановлення структурних змін у нирках. Імуногістохімічний аналіз проводили згідно [Skibba M. et al., 2017]. Цитокінетичний профіль в тканинах нирки досліджували за допомогою імуноферментного аналізу [Hue Khan MA. et al., 2013]. Статистичну обробку результатів проводили у програмі «GraphPad Prism 8.0.1». Тест Шапіро-Уїлка використовували для перевірки експериментальних даних на нормальне розподілення. Подальший обрахунок здійснювали за допомогою t-критерія Стьюдента [Hue Khan MA. et al., 2019]. Отримані результати наведені у вигляді M (середнє арифметичне) \pm SEM (стандартна похибка середнього). Результати вважали значущими при $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

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

Першочерговим завданням для проведення 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. Ми зупинили свій вибір на моделі ООС на мишах, що супроводжується змінами у структурі та функціонуванні нирок, які є результатом таких патофізіологічних процесів, як апоптоз епітеліальних канальцевих клітин, окислювальний стрес і запалення [Skibba M. et al., 2017., Martínez-Klimova E. et al., 2019]. На початковому етапі 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.

У результаті проведених досліджень показано, що через три доби після повноцінної операції з ООС у дослідних мишей спостерігали ознаки ниркової дисфункції та розвиток фібротичних змін в тканинах нирок. Так, показано, що у сироватці крові мишей групи ООС рівень азоту сечовини, що є ключовим маркером функціонального стану нирок, зростав у 1,6 раза, порівняно з контрольною групою тварин (рис. 1-А).

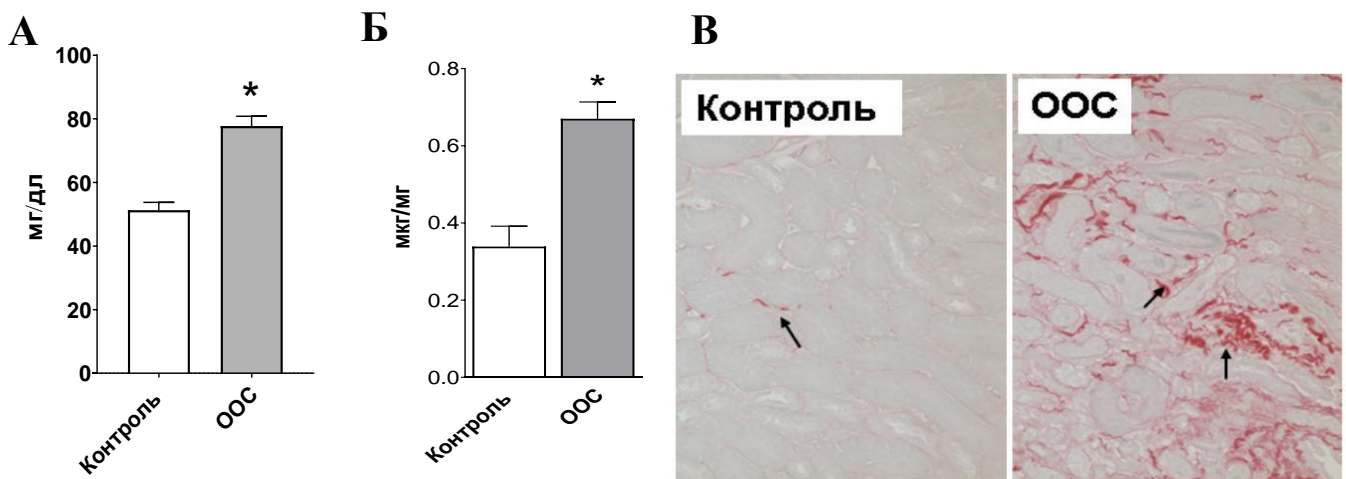
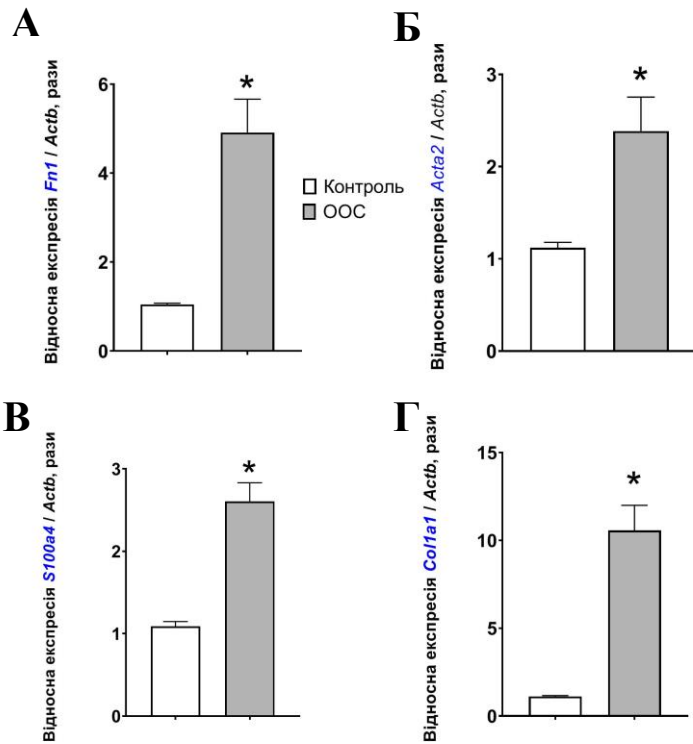


Рис. 1. Концентрація азоту сечовини в сироватці крові (А) і вміст гідроксипроліну в тканинах нирок (Б), а також мікрофотографії тканин нирок з візуалізацією ділянок локалізації колагену (показані стрілками) (В) у дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$);

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Площа просвіту канальців була збільшена у 5 разів мишей з ООС, порівняно з контролем (рис. 1 В). Також було виявлено підвищення рівня одного з білків ЕЦМ – колагену, в 3 рази у тканинах нирки мишей з ООС, порівняно з контролем (рис. 1-В). Вміст гідроксипроліну, який прямопропорційно корелює з рівнем утворення колагену [Skibba M. at al., 2017, Xie Y. at al., 2020, Wakui H. at al., 2020], також був у 2,6 раза вищим в тканинах нирки мишей з ООС, порівняно з показником контрольної групи (рис. 1-В). Беручи до уваги цінність показників рівня експресії генів *Acta2*, *S100a4*, *Colla1* і *Fnl1* як маркерів розвитку фіброзу, ми визначили, що у групі тварин з ООС рівень експресії даних генів, вже на 3 добу

після обструкції сечоводу, був вищим у 2-10 раз, порівняно з рівнем експресії у тканинах тварин контрольної групи (рис. 2 А-Г).



Такі результати є додатковим підтвердженням інтенсифікації фібротичного процесу за умов моделі ООС.

Рис. 2. Відносний рівень експресії генів *Acta2* α -SMA (А), *Fn1* (Б), *S100a4* (В) і *Colla1* (Г) в тканинах нирок дослідних мишей; (M \pm m, n=8); * – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем

Також нами було показано, підвищення рівня експресії генів маркерів запалення *Tnfa*, *Il6* і *Il1b* у 9-10 раз у ниркових тканинах мишей групи ООС, порівняно з контролем (рис. 3 А-В), що доводить активацію запальних реакцій у тканинах ушкодженої нирки.

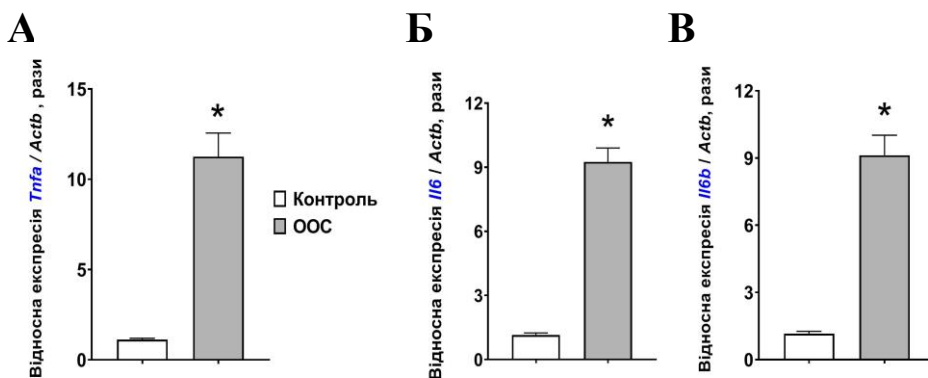


Рис. 3. Відносний рівень експресії генів *Tnfa* (А), *Il6* (Б) і *Il6b* (В) у тканинах нирок дослідних мишей; (M \pm m, n=8); * – $p < 0,05$ порівняно з контролем

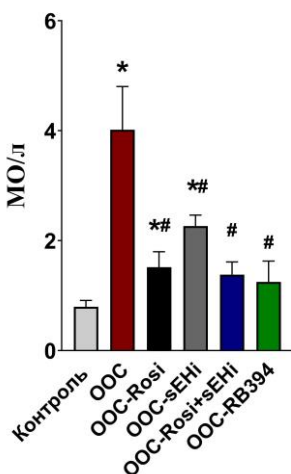
Отримані нами результати узгоджуються з загальною картиною розвитку ниркового фіброзу, за умов якого відбувається посилення відкладення компонентів екстрацелюлярного матриксу, пошкодження каналців і їх атрофія, а також активація запального каскаду з інфільтрацією запальних клітин і вивільненням запальних цитокінів. Отже, ми показали, що експериментальна модель фіброзу, індукована шляхом обструкції сечоводу у мишей є адекватною

для вивчення антифіброзних ефектів різних сполук, та пошуку нових мішеней впливу в молекулярному каскаді реакції фіброгенезу.

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 [Tontonoz P. et al., 2012]. З іншого боку, відомо, що PPAR- γ займає ключове місце в регуляції метаболічного гомеостазу, а тому його ефектори активно використовують у лікуванні різних захворювань людини. У попередніх дослідженнях нами було продемонстровано, що комбінована терапія з використанням синтетичного інгібітора sEH і препарату Розіглітазон (Rosi) – одного з відомих агоністів PPAR- γ класу тіазолідиндіонів, супроводжувалася зниженням кров'яного тиску, рівня глюкози, тригліцеридів і вільних жирних кислот [Imig JD. et al., 2012]. Ми припустили, що фермент sEH може бути потенційною мішенню дії антифіброзних препаратів, а комбінація його інгібітора з агоністом PPAR- γ може посилювати антифіброзний та протизапальний ефект. Тому, у своїх 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 молекули RB394. Оскільки, важливим аспектом фібротичного процесу при ХХН є пошкодження епітелію каналців, ми дослідили активність N-ацетил- β -D-глюкозамінідази (НАГ) в зразках сечі дослідних тварин.

Показано підвищення активності НАГ у мишей з ООС більше ніж у 3 рази, порівняно з контролем (рис. 4). Тоді як за умов введення інгібітора sEH даний показник був зниженим у 1,8 рази, Rosi у 2,4 рази та в комбінації Rosi й інгібітора sEH 2,6 рази, порівняно з показником групи з ООС.



При введенні біфункціональної молекули RB394, цей показник був зниженим у 2,7 рази, порівняно з групою з ООС (рис. 4).

Рис. 4. Активність НАГ в сечі в дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$); * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з групою ООС

Оскільки патологічний фіброз супроводжується посиленням накопиченням компонентів ЕЦМ, що, у свою чергу, призводить до порушення структури тканин

нирок і перешкоджає повноцінному функціонуванню даного органу [Soma M. et al., 2011], ми провели гістологічне дослідження на визначення вмісту колагену, як основного компоненту ЕЦМ. Показано, що у мишей з ООС рівень колагену зростає у 4,8 рази, порівняно з контролем (рис. 5-А, Б).

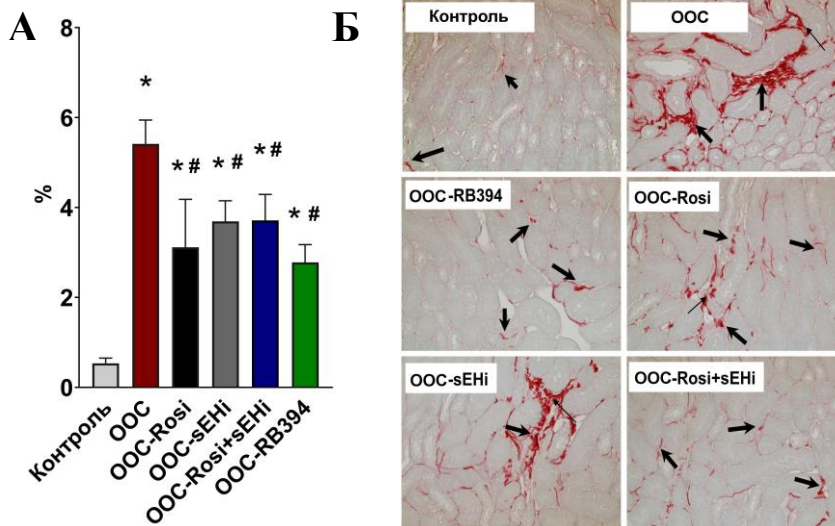


Рис. 5. Відносний вміст колагену (А) та мікрофотографії тканин нирок дослідних тварин з візуалізацією ділянок локалізації колагену (Б); місця локалізації відповідних білків показані стрілками; ($M \pm m$, $n=8$); * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з групою ООС

Ми показали, що рівень α -SMA, який є важливим маркером переходу мезенхімальних клітин у міофібробласти, в тканинах нирок мишей з ООС був у 4,8 рази вище контрольного (рис. 6-А, Б). Тоді як, за умов введення досліджуваних сполук спостерігали часткове зниження накопичення колагену та α -SMA в ниркових тканинах, хоча вміст даних білків в ЕЦМ все ще залишався на достовірно високому рівні порівняно з контролем (рис. 6-А).

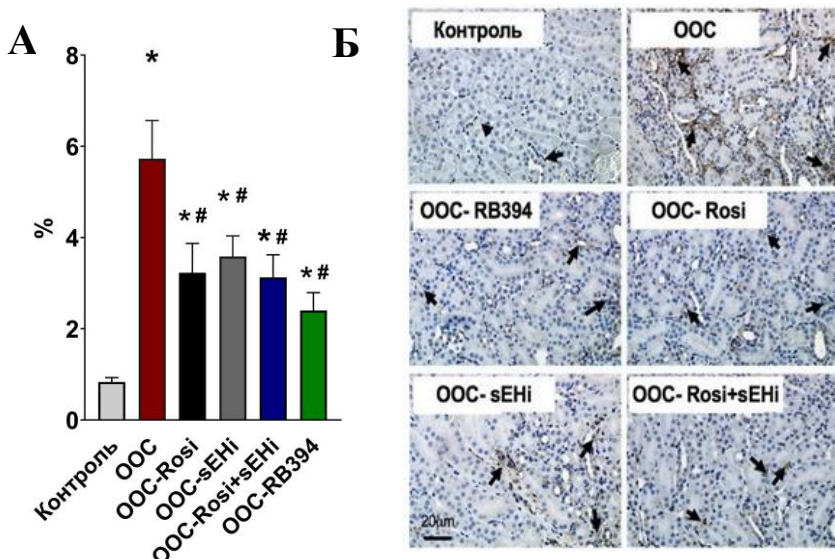
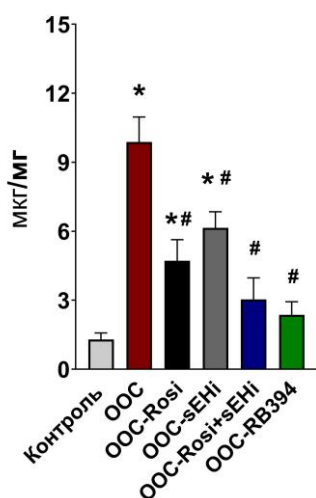


Рис. 6. Відносний вміст α -SMA (А) та мікрофотографії тканин нирок дослідних тварин з візуалізацією ділянок локалізації α -SMA (Б); місця локалізації відповідних білків показані стрілками; ($M \pm m$, $n=8$); * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з групою ООС

Ми також показали збільшення вмісту гідроксипроліну в 10 разів у тканинах нирок мишей з ООС, порівняно з контролем (рис. 7). Ці дані узгоджуються з результатами наших гістологічних досліджень, і слугують додатковим підтвердженням аномально високого рівня формування колагену у мишей з ООС.

За умов введення дослідним тваринам з ООС інгібітора sEH та агоніста PPAR - γ окремо спостерігали зниження показника вмісту гідроксипроліну у 1,6 та 2,1 рази, відповідно, порівняно з групою ООС.



Однак, за введення комбінації даних сполук, а також біфункціональної молекули RB394 відмічали зниження вмісту гідроксипроліну до контрольного рівня (рис. 7).

Рис. 7. Вміст гідроксипроліну в тканинах нирок дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$);
* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;
– $p < 0,05$ порівняно з групою ООС

Ми також оцінили рівні експресії регуляторних генів фіброзу *Tgfb2*, *Snai1*, *Snai2* і *Twist1*, та показали підвищення їхньої рівня експресії у 8-10 рази в тканинах нирки мишей у групі ООС, порівняно з контролем (рис. 8 А-Г).

Відмічено, що за умов введення молекули RB394, порівняно з іншими сполуками, рівень експресії генів *Tgfb2*, *Snai1*, *Snai2* і *Twist1* достовірно знижувалася та наближалася, або, навіть сягав (у випадку *Tgfb2* та *Snai1*) контрольного рівня.

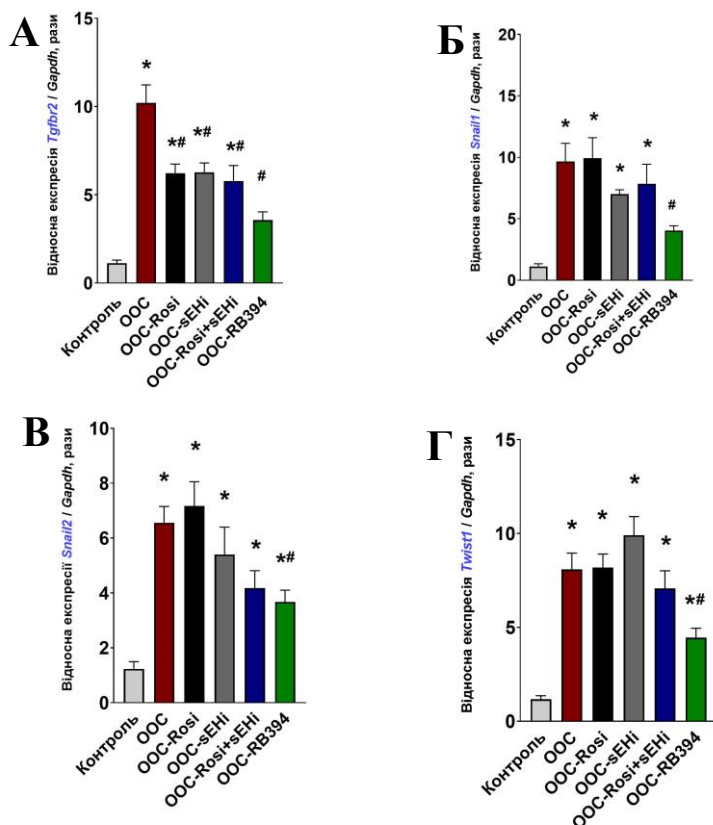


Рис. 8. Відносний рівень експресії генів *Tgfb2* (А), *Snai1* (Б), *Snai2* (В) і *Twist1* (Г) в тканинах нирок дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$);
* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;
– $p < 0,05$ порівняно з ООС групою

Поряд з гіперпродукцією ЕЦМ пошкодження ниркових канальців є ще одним важливим патофізіологічним процесом ниркового фіброзу. Ми визначили експресію генів *Lcn2* і *Havcr1* у тканинах нирок, а також вміст NGAL і KIM-1 у сечі дослідних тварин, оскільки вони вважаються важливими маркерами ушкодження ниркових канальців. Було виявлено підвищення експресії генів *Lcn2* і *Havcr1* у 150 та 200 разів, відповідно в тканинах нирки мишей з групи ООС, порівняно з контролем (рис. 9-А, Б). Також показано достовірне підвищення вмісту NGAL і KIM-1 в мишей ООС, у порівнянні з контролем (рис. 10-А, Б). Дослідивши ефект різних комбінацій введення досліджуваних сполук, ми виявили, що біфункціональна молекула RB394 проявляла максимальний ефект.

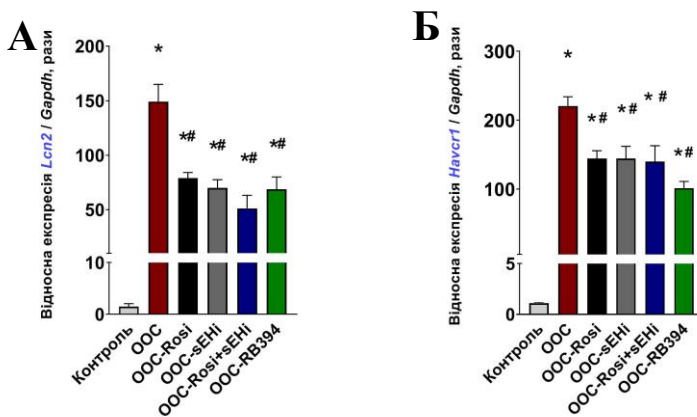
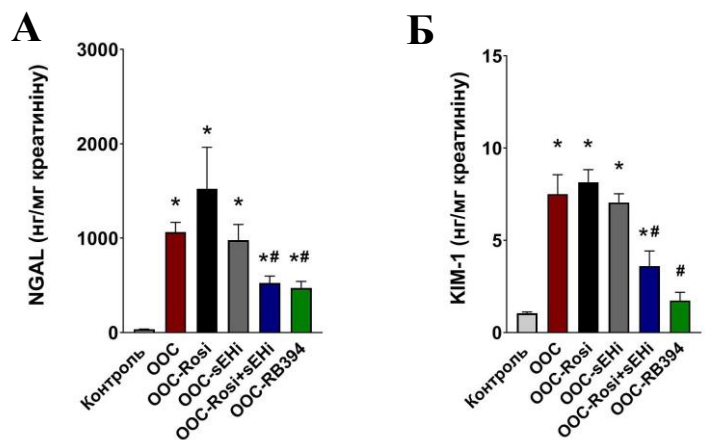


Рис. 9. Відносний рівень експресії генів *Lcn2* (А), *Havcr1* (Б) в тканинах нирок дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$);
* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;
– $p < 0,05$ порівняно з ООС групою

Рис. 10. Вміст маркерів пошкодження ниркових канальців NGAL (А) і KIM-1 (Б) в сечі дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$);
* – $p < 0,05$ порівняно з контролем;
– $p < 0,05$ порівняно з ООС групою



Оскільки, маркер ендотеліальних клітин $CD31^+$ є важливим показником судинної мережі нирок, наші результати доводять її ушкодження, що виражалось у втраті та пошкодженні ниркових судин у мишей з групи ООС (рис. 11-А, Б). Ми також зробили висновок про пошкодження судин нирок, базуючись на 6 та 23-кратному збільшенні рівня експресії генів *Icam1* і *Vcam1* у мишей з ООС у порівнянні з контролем (рис. 10-В, Г). Високий рівень експресії цих молекул адгезії показаний і в інших дослідженнях на експериментальних моделях ниркового фіброзу, включаючи модель ООС [Skibba M. et al., 2017]. Ми також показали, що RB394, як загалом і всі інші сполуки, помітно знижували експресію генів *Icam1* і *Vcam1* у нирках мишей із ООС (рис. 11-В, Г).

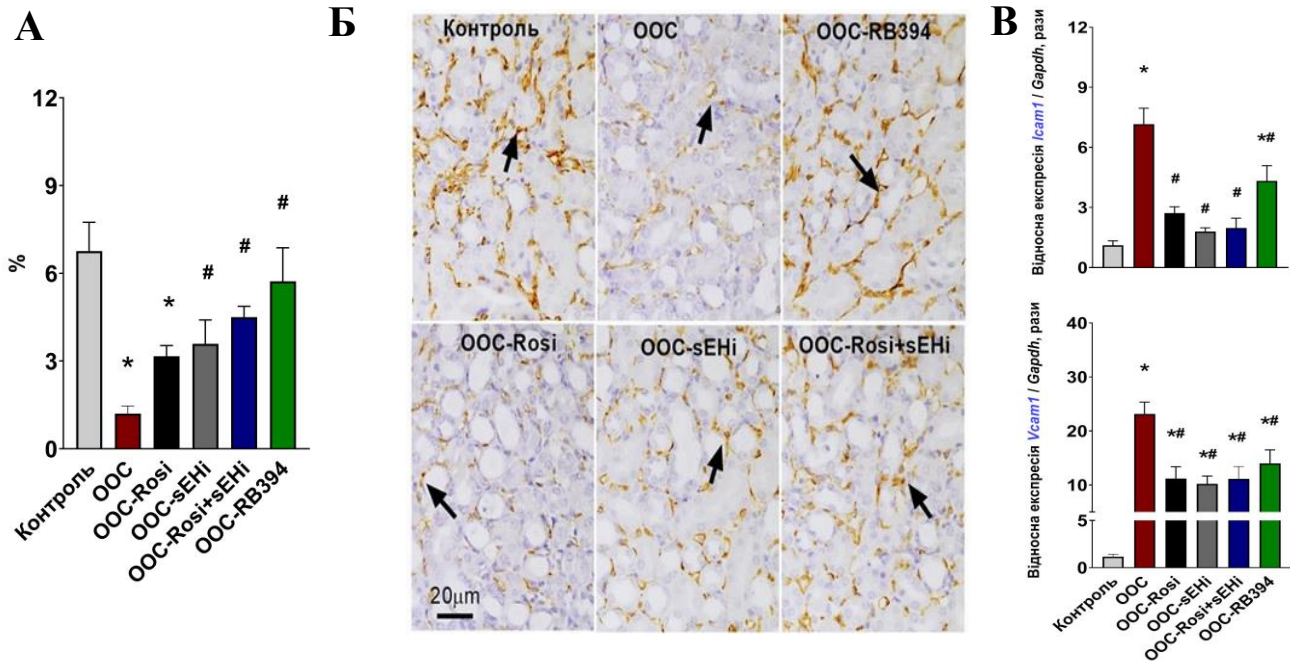


Рис. 11. Відносний вміст CD31⁺ позитивних клітин (А), мікрофотографії тканин нирок дослідних тварин з візуалізацією ділянок локалізації CD31⁺ позитивних клітин (показані стрілками) (Б) та відносний рівень експресії генів *Icam1* (В) і *Vcam1* (Г) в тканинах нирок дослідних тварин; (M±m, n=8);

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з ООС групою

Ми виявили, що у мишей з моделлю ООС розвивалося запалення в нирках, що виражалось вищим рівнем експресії генів запальних цитокінів *Tnfa*, *Il6* та *Il1b*, порівняно з показниками контрольної групи тварин (рис. 12 А-В).

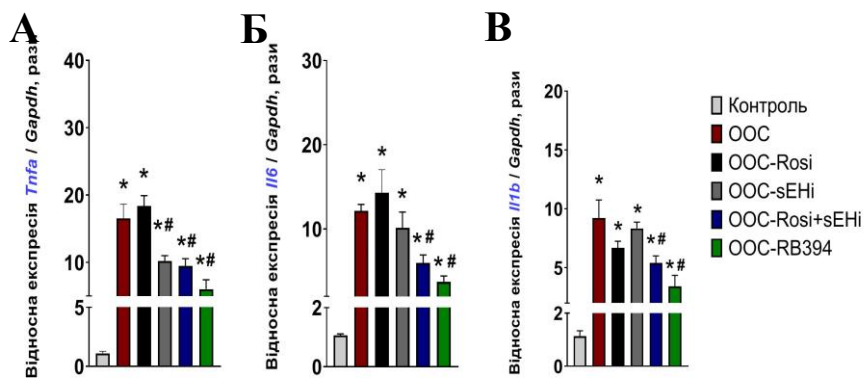
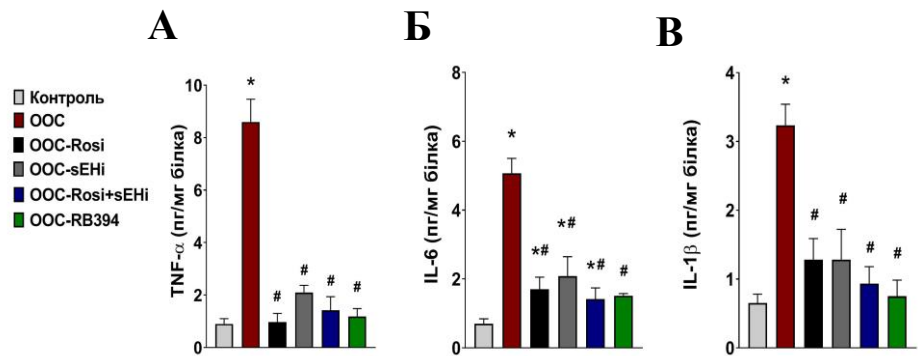


Рис. 12. Відносний рівень експресії генів *Tnfa* (А), *Il6* (Б), *Il1b* (В) в тканинах нирок дослідних тварин; (M±m, n=8);

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з ООС групою

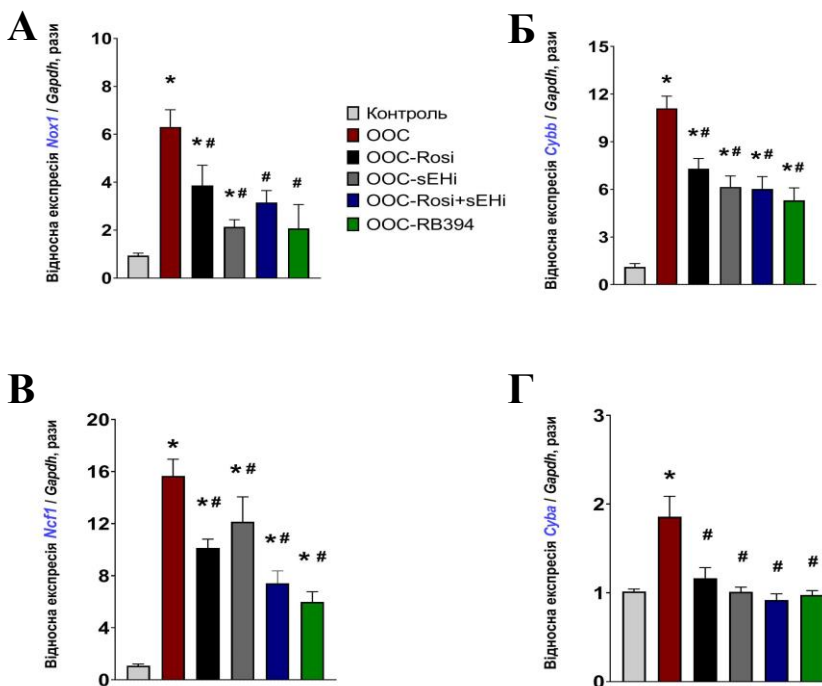
Ми спостерігали схожу тенденцію підвищення рівнів цих протизапальних цитокінів у тканині нирок у мишей з ООС, що загалом може вказувати на розвиток потужного запального процесу (рис. 13 А-В).

Рис. 13. Вміст цитокінів TNF- α (А), IL-6 (Б) і IL-1 β (В) в тканинах нирок дослідних тварин; ($M \pm m$; $n=8$); * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з ООС групою



Інтенсифікація процесу запалення, що відіграє ключову роль в патогенезі фіброзу нирок, виявляється і у пацієнтів з ХХН [Wakui H. et al., 2011]. У цьому дослідженні ми виявили, що всі досліджувані сполуки, за винятком Rosi, демонстрували виражену протизапальну дію, однак RB394 була найбільш ефективна у зниженні експресії генів і зниженні рівня цитокінів у тканинах нирки мишей з моделлю ООС.

Результати нашого дослідження показали, що у мишей з ООС спостерігається не лише активація запального процесу, а й посилення реакцій окислювального стресу в пошкоджених тканинах нирок. Ми дослідили ниркову експресію генів маркерів окисного стресу *Nox1*, *Cybb*, *Ncf1* і *Cyba*, декількох субодиниць НАДФН-оксидази і NOX1. Показано, що експресія генів *Nox1*, *Cybb*, *Ncf1* і *Cyba* була в 2-16 рази вищою у мишей з ООС в порівнянні з контролем (рис. 14-А-Г). Цікаво, що всі досліджувані сполуки, знижували експресію цих маркерів у мишей з ООС у 1,3-2,3 рази, відповідно, порівняно з контрольною групою.



Однак, молекула RB394 продемонструвала максимальний ефект – знижуючи експресію генів-маркерів окисного стресу у 2-3 рази у нирках мишей з ООС.

Рис. 14. Відносний рівень експресії генів *Nox1* (А), *Cybb* (Б), *Ncf1* (В), *Cyba* (Г) в тканинах нирок дослідних тварин; ($M \pm m$, $n=8$); * – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з ООС групою

У цій роботі, ми вивчили терапевтичну ефективність різних мішеней, дія на які призводить до редукції фіброзу нирки. За результатами зменшення запалення та фіброзу нирок під дією інгібітора sEH можна зробити висновок про перспективність даного агенту як терапевтичного препарату при ХХН. На ряду з ним, агоніст PPAR- γ володіє численними біологічними діями, одна із них це антифіброзна дія. Важливою ідеєю, що лежить в основі розробки молекули RB394, є поєднання корисних властивостей інгібіторів sEH і агоністів PPAR- γ на фоні зниження побічних ефектів останніх.

Ми порівняли дію новоситезованої біфункціональної молекули RB394 на нирки з дією інгібітора sEH, агоністом PPAR- γ - Rosi і їхньою комбінацією. 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 ефекти в зниженні прогресування ниркового фіброзу, шляхом впливу на множинні патофізіологічні події, які сприяють розвитку ниркового фіброзу.

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. Агоніст FXR і розчинна sEH здатні запобігати фіброзу в багатьох органах, включаючи печінку, серце і нирки. Активація FXR модулює ниркову експресію генів ліпідного метаболізму, знижує рівень експресії генів прозапальних цитокінів, що призводить до пригнічення діабетичної нефротоксичності [Hue Khan A. at al., 2019, Stavniiichuk A. at al., 2020]. На цьому тлі ми вивчили антифіброзний потенціал інгібітора sEH та агоніста FXR, як наступної терапевтичної мішені при фіброзі нирок. За результатами дослідження було розроблено біфункціональну молекулу DM509, що поєднує в собі потенціал обох.

Важливо відзначити, що DM509 є новою молекулою, біологічні ефекти якої досі досліджувалися тільки на моделях фіброзного захворювання печінки [Hue Khan A. at al., 2019]. Наші дані ясно показують, що DM509 потенційно може бути використана, як новий антифіброзний агент для лікування фіброзу нирок. Отримані результати показали, що у мишей з ООС ниркова дисфункція супроводжується підвищеним у 1,6 раза рівнем азоту сечовини в сироватці крові, порівняно з контролем. Тоді як, у разі введення експериментальної молекули DM509 було виявлено зниження азоту сечовини в сироватці крові до контрольного рівня (дані не представлені). У мишей з групи ООС за умов введення DM509 спостерігали зниження вмісту гідроксипроліну та колагену в тканинах нирки у 1,6 та 1,8 раза, відповідно, порівняно з групою ООС (рис. 15-А, Б). Результати гістологічного аналізу також довели інгібуючий вплив біфункціональної молекули DM509 на надлишкове накопичення компонентів ЕЦМ (рис. 15-В).

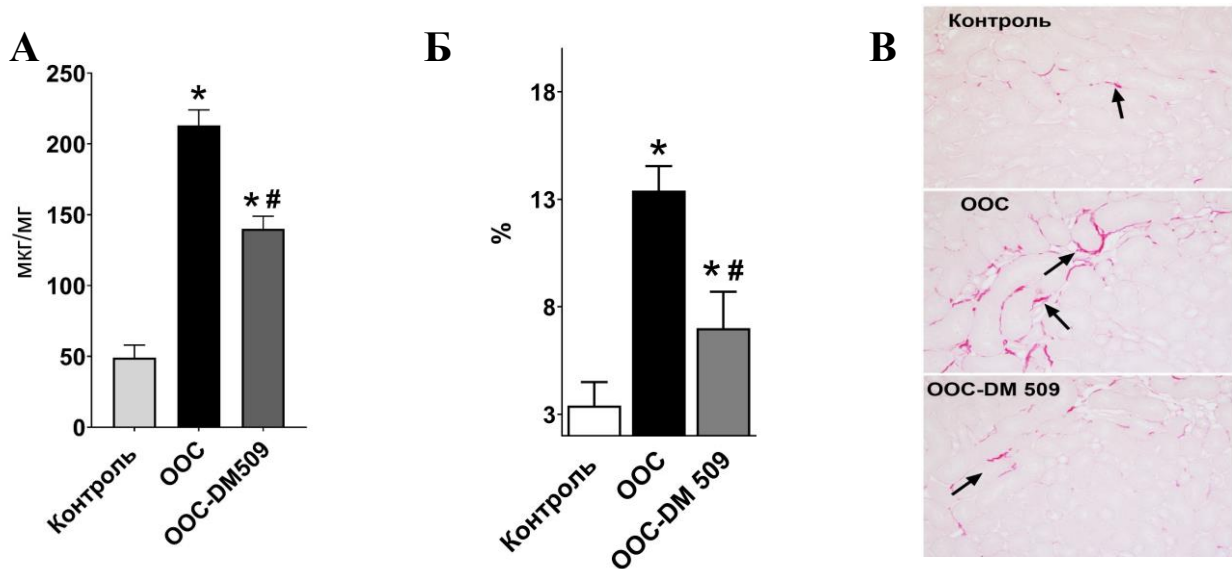


Рис. 15. Вміст гідроксипроліну (А) і колагену (Б) в тканинах нирок, а також мікрофотографії тканин нирок дослідних тварин з візуалізацією ділянок локалізації колагену (показані стрілками) (В); ($M \pm m$, $n=8$);
* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з ООС групою

За умов ведення молекули DM509 спостерігали зниження рівня експресії генів α -SMA і FN, що є важливими маркерами у зміні формування позаклітинного матриксу за умов фіброзного процесу в нирках [Liu Y., 2006]. Так, рівень експресія генів *Acta2* і *Fn1* у мишей з моделлю експериментального фіброзу за введення DM509 був знижений у 4,3 та 1,7 раза, відповідно, порівняно з групою тварин ООС (рис. 16 А, Б).

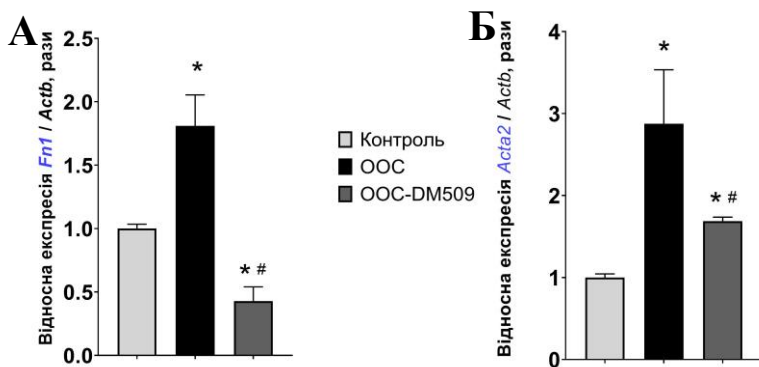


Рис. 16. Відносний рівень експресії генів *Acta2* (А) і *Fn1* (Б) в тканинах нирок дослідних мишей; ($M \pm m$, $n=8$);
* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем,
– $p \leq 0,05$ порівняно з ООС групою

Також було продемонстровано помітні протизапальні ефекти молекули DM509, що виражалося у зниженні експресії генів запальних цитокінів *Tnfa*, *Il1b*, *Il6* у мишей з ООС за умов введення даної сполуки (рис. 17 А-В).

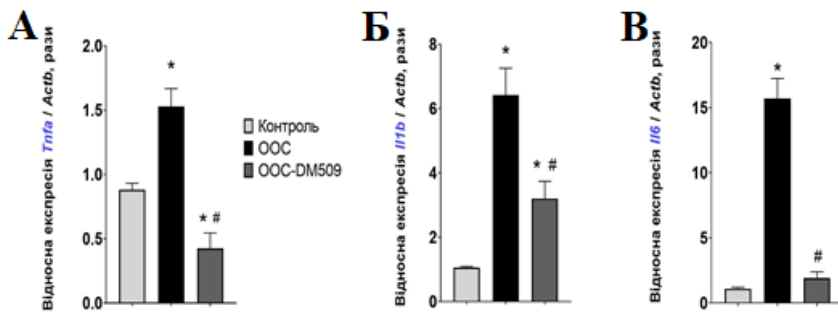


Рис. 17. Відносний рівень експресії генів *Tnfa* (А), *Il6b* (Б), *Il6* (В) в тканинах нирок дослідних тварин; (M±m, n=8);

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем; # – $p < 0,05$ порівняно з OOC групою

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, викликаній обструкцією сечоводу. Доведено, що новосинтезовані біфункціональні молекули DM509 і RB394 мають виражений антифіброзний та протизапальний потенціал і можуть бути розглянуті на роль нових кандидатів у засоби лікування 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 виражалося 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 OOC. 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 OOC. 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 - *Tgfb2*, *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 ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у 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. (*Особистий внесок здобувача – постановка експериментальної частини, оформлення та інтерпретація експериментальних даних, математична обробка, участь у написанні статті*).
2. Hye Khan MA Hye, **Stavniichuk A**, Sattar MA, Falck JR, Imig JD. Epxyeicosatrienoic Acid Analog EET-A Blunts Development of Lupus Nephritis in Mice/ *Front Pharmacol.* 2019; 10: 512. (*Особистий внесок здобувача – дослідження рівня експресії СХС хемокінових рецепторів, інтерпретація та математична обробка експериментальних даних*).
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. (*Особистий внесок здобувача – постановка експериментальної частини, оформлення та інтерпретація експериментальних даних, математична обробка, участь у написанні статті*).

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. (*Особистий внесок здобувача – робота з науковою літературою, оформлення та інтерпретація даних, написання статті*).
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. (*Особистий внесок здобувача – постановка експериментальної частини, оформлення та інтерпретація експериментальних даних, математична обробка, участь у написанні статті*).

Тези основних 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.

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. Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2021.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню показників запалення та фіброзу у тканинах нирок мишей з моделлю ООС та за умов введення інгібітора sEH і агоністів ядерних рецепторів PPAR- γ і FXR та новосинтезованих біфункціональних молекул RB394 і DM509. Для досягнення сформульованих у роботі задач було відтворено експериментальну модель ООС на мишах та визначено ряд показників, що характеризують розвиток ниркового запалення та фіброзу. 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 в нирках, також відмічалось зниження накопичення колагену та α -SMA, а також пригнічення рівня експресії регуляторних генів фіброзу у ниркових тканинах мишей з ООС. Експериментально було підтверджено, що рівень експресії маркерів ушкодження ниркових каналців та судин, а також рівень експресії маркерів окисного стресу у ниркових тканинах мишей групи ООС, знижувався за введення досліджуваних сполук, при цьому молекула RB394 мала максимально виражений ефект. За умов введення молекули DM509 спостерігали зменшення пошкодження структури нирок, що було підтверджено результатами гістологічного аналізу. Також було показано зниження рівня експресії генів прозапальних цитокінів та білків ЕЦМ – α -SMA і FN у мишей з моделлю ООС за введення DM509. Отримані результати доводять антифіброзний та протизапальний потенціал біфункціональних молекул DM509 і RB394 при їх застосуванні за експериментальної моделі ниркової дисфункції у мишей.

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

АННОТАЦИЯ

Ставнийчук А.Н. Развитие фиброза и воспаления почек у мышей в условиях введения новых бифункциональных молекул. - Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. – Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2021.

Диссертационная работа посвящена исследованию показателей воспаления и фиброза в тканях почек мышей с моделью ООМ и в условиях введения ингибитора sEH и агонистов ядерных рецепторов PPAR- γ и FXR и новосинтезированных бифункциональных молекул RB394 и DM509. Для достижения сформулированных в работе задач было воссоздано

экспериментальную модель ООМ на мышах и определен ряд показателей, характеризующих развитие почечного воспаления и фиброза. За введение ингибитора sEH, агониста PPAR- γ и их комбинации, а также бифункциональной молекулы RB394 уровень повреждения почечных тканей снижался благодаря уменьшению инфильтрации иммунных клеток в почках, также отмечалось снижение накопления коллагена и α -SMA, а также угнетение уровня экспрессии регуляторных генов фиброза в почечных тканях мышей с ООС. Экспериментально было подтверждено, что уровень экспрессии маркеров повреждения почечных канальцев и сосудов, а также уровень экспрессии маркеров окислительного стресса в почечных тканях мышей группы ООМ, снижался после введения исследуемых соединений, при этом молекула RB394 имела максимально выраженный эффект. В условиях введения молекулы DM509 наблюдали уменьшение повреждения структуры почек, что было подтверждено результатами гистологического анализа. Также было показано снижение уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов и белков ЭЦМ - α -SMA и FN у мышей с моделью ООМ после введения DM509. Полученные результаты доказывают антифиброзный и провоспалительный потенциал бифункциональных молекул DM509 и RB394 при их применении на экспериментальной модели почечной дисфункции у мышей.

Ключевые слова: хроническая болезнь почек, фиброз и воспаление почек, ингибитор sEH, агонист PPAR- γ , агонист FXR, бифункциональные молекулы - RB394 и 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. – Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

The thesis for candidate of biological sciences degree in specialty 03.00.04 – Biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, 2021.

The thesis is devoted to study the development of inflammation and fibrosis in the kidney using a mouse UUO model of renal fibrosis. In this thesis, studies are also carried out to investigate the anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of sEH inhibitor, agonists of nuclear receptors (PPAR- γ and FXR), and the novel bifunctional molecules RB394 and DM509. Biochemical, histological and immunohistochemical data confirmed renal fibrosis from renal ECM protein accumulation and elevated renal hydroxyproline content. Renal fibrosis was accompanied by increased renal inflammation, tubular and vascular injuries and oxidative stress in the UUO mice. When we investigated RB394, our data revealed that among all the substances (sEH inhibitor, PPAR- γ agonist, and their combination) the novel bifunctional molecule RB394 was the most effective in reducing fibrosis, inflammation, oxidative stress, and injury in the kidney of UUO mice. We also investigated anti-inflammatory, anti-fibrotic and kidney protective effects of another bifunctional molecule DM509 in the mice with UUO. DM509 demonstrated anti-inflammatory, anti-fibrotic and kidney protective effects in UUO mice. Our findings demonstrated the development of renal inflammation and fibrosis in a UUO mice model. Most importantly, we demonstrated robust anti-fibrotic

and anti-inflammatory potentials of two novel bifunctional molecules RB394 and DM509 in a mouse UUO model of renal fibrosis.

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