Ставнійчук Анна Миколаївна, аспірантка 3-го року навчання ННЦ Інститут біології та медицини&rdquo; Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Назва дисертації: &laquo;Розвиток фіброзу та запалення нирок у мишей за умов введення нових біфункціональних молекул&raquo;. Шифр та назва спеціальності 03.00.04 біохімія. Спецрада Д26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка

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

ЗМІСТ

СПИСОК ВИКОРИСТАННИХ 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 пербувають на стадії

клінічних випробувань………………………………………………….….. 34

1.3. Персперктивні 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 проведень 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 біологічих зразків для подальших досліджень……… 60

2.7. Біохімічні методи…………...................……………………………. 61

16

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 активністі ферменту NAG (N-Aцетил-β-Dглюкозамінідаза) в сечі колориметричним методом…………………….. 63

2.8. In vitro 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 імунногістологіних даних………….......……………….. 69

2.12. Умови провдня імунноферментного аналізу.......……………….. 70

2.13. In vivo Аналіз на токсичність новосинтизованих сполук……….. 70

2.14. Статистисна обробка результатів……………………………...…. 71

РОЗДІЛ 3. Результати та їх обговорення……………………………… 72

17

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

ЗАКЛЮЧЕННЯ

ХронічнахворобанирокХХНвиникаєврезультатібагатьох

гетерогеннихзахворюваньякінезворотньо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зосердженні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Тубулоінтерстіціальний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канальців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γі

якіреалізуютьплейотропнібіологічніефектиповязанізрегулюванням

аутофагіїзапаленнятафіброзуВідомощоагоністиγтамають

захистнівластивостіпридисфукціїнирокСинтетичніагоністиγтакіяк

тіазолідиндіонипродемонструватизахиснийефектприрізнихпатологіяхнирок

включаючидіабетичнунефропатіюнефректоміютаішеміюЗахиснівластивості

тіазолідіондіонівповязанізїхпротизапальноюантиоксидантноюта

антипроліферативноюдієюПодібноактиваціїγактиваціярецептора

запобігаєпошкодженнюгепатоцитівізнижуєрівеньнакопиченняжирув

печінціаагоністи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епоксідгідролазиФерментценевід’ємний

компоненткаскадуарахідоновоїкислотищопризводитьдорозпаду

епоксиейкозатрієновоїкислотидовідповіднихдіоліввиконуєбагато

важливихбіологічнихфункційірезультатидослідженьрядуавторівпоказали

щоможнавикористовуватидлятерапіїзахворюваньнирокТерапевтичні



ефектиможутьбутиотриманізарахунокзбільшенняїхньоїбіодоступності

ієдварізнішляхизробитицеОдинзнихцевикористанняаналогаа

іншийінгібуваннядеградаціїшляхомпригніченняферменту

Зоглядунавищевказанебулонамирозробленоісинтезованоінгібітор

вякостітрапевтичногоагентатадвіновібіфункціональнімолекулиподвійної

діїякаодночаснодієякагоністγіінгібіторіншамолекула

щодієякагоністіінгібіторВажливоюідеєющолежитьв

основірозробкимолекулієпоєднаннякориснихвластивостей

інгібітораіагоністівγта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агоністівγіїхкомбінації

атакожновосинтизованихмолекулі

Длядослідженняпоказниківзапальноготафібротичногопроцесіву

ниркахмивикористовувалимодельОС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ОСбулопроведенодослідженнящодовизначення

патофізіологічноговікназпочаткурозвиткунирковогофіброзуутканинах

нирокмишейПоказанощочерез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Цпризводитьдопошкодження

тубулярнихіепітеліальнихклітинацезумовлюєпотовщеннябазальної

мембраниканальцівівтратусудинАтрофіяканальців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

добипісляпроведенняОС

Рзультатинашихнещодавніхдослідженьпоказалищоінгібітор

проявляєсильнуантифібрознудіюнарядімоделейзахворюваньнирокатакож

намоделіОСнирковогофіброзуВластивістьагоністаγщоунашому

дослідженніповязаназпершимфхімічнимфрагментомнадаємолекулі

численнітерапевтичніперевагиупрофілактицііуповільненнірозвиткуфіброзу

нирокЩеодієюперевагоющолежитьвосновірозробкибулозниження

вираженихпобічнихефектівагоніста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збільшуєбіодоступністьякий

здатнийпригнічуватизатримкунатріюірідиниаотжекомбінуючиінгібітор

загоністомγмизмоглизнизитипобічніефектиагоністаγі

посилитипозитивнудіюобохпрепаратівнанирки



Входіроботибулопроведенодослідженняцитотоксичностімолекули

вклітинахіінамишахВиявленощовведення

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біфукціональнамолекула

буларекомендованадодослідженьнанаступнихстадіяхдоклінічних

випробувань

НанаступнійстадіїдослідженьпроводиливиченнявпливуОСумишей

щосупроводжувалосяпідвищенимрівнемекспресієїгенівпрофібротичних

запальнихцитокінівпідвищенимрівнемхемокіновіпідвищеноюінфільтрацією

запальнихклітинвниркахВиявилищоумишейОСрозвинулосязапаленняв

ниркахщовиражалосявищимрівнемекспресіїгенівзапальнихцитокінівв

порівняннізконтрольноюгрупою

Завведенняінгібітораагоністатаїхкомбінаціїатакож

біфукціональноїмолекулирівеньушкодженнянирковихтканин

знижувавсязавдякизменшеннюінфільтраціїімуннихклітинуниркахВиявлено

щоступіньінфільтраціїмакрофагівкорелювзрівнемекспресіївідповіднихгенів

ірівнемпрофібротичнихцитокінівуαіβутканинахнирокмишей

ОСЗарезультатамидослідженнябіфункціональнамолекулабула

найбільшефективноюузниженнірівняекспресіїгенівзниженнірівняцитокінів

таінфільтраціїімуннихклітинутканинахниркимишейзмоделлюОС

ПатологічнийфіброзвизначаєтьсяякнадмірневідкладенняЦяке

змінюєструктурунормальноїтканинипорушуючитимсамимфункціюнирок

Приінтерстиціальномуфіброзівідбуваєтьсянакопиченняколагену

фібронектинуіαцеслугуєпошкодженнямканальцівісудинВажливим

факторомХХНєпошкодженняканальцівзокремапошкодженняепітелію

канальців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атакожпригніченнямрівня

експресіїпрофібротичнихбілківунирковихтканинах

мишейгрупиООСКрімтогопоказникирівнівекспресіїрегуляторнихгенів

фіброзуіякірегулюютьекспресіюбілківЕЦМбути

підвищенівразивгрупітваринзООСВідміченощозавведення

порівнянозіншимисполукамирівеньекспресіїцихгенівдостовірносягав

контрольногорівня

Експериментальнобулопідтвердженощорівеньекспресіїмаркерів

ушкодженнянирковихканальцівітасудині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γта

інгібітораокремоспостерігализниженнярівняекспресіїгенівокисного

стресуунирковихтканинахмишейгрупиООСОднак

комбінаціяінгібітораіагоністаγімолекулапривведенні

піддосліднимтваринампродемонструваликращийантиоксидантнийефект–

знижуючирівніекспресіїгенівмаркерівокисногостресумайжедоконтольного

рівня

Дослідженотерапевтичнуефективністьінгібітораагоністаγ

їхньоїкомбінаціїіуздатностізменшуватимножинніпатофізіологічні

подіїякікритичнопов’язанізфіброзомирокПоказанощобіфункціональна

молекула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

єрезультатомкомплементарнихісинергетичнихдійміжінгібуванням

іактивацієюγ

Комбінаціяагоністаіінгібіторавиявиласядужеселективноюі

нетоксичноюВажливовідзначитищоіагоністіінгібіторпроявляють



антифібрознудіювбагатьохорганахвключаючипечінкусерцеіниркиЗгідно

зцимсинтезовананаїхнійосновіновабіофункціональнамолекулабула

перевіренанаїїтерапевтичнийпотенціалуборотьбізфіброзомтазапаленням

нирокЗаумоввведеннянебуловиявленожоднихпобічнихефектів

інанормальнихклітинахіздоровихтваринахВодночаспри

моделюванніпатологічногопроцесуспостерігализменшенняпошкодження

структуринирокнатлівведеннямолекулиЕфективністьсполукибула

підтвердженазниженнямрівняазотусечовинивкровітарезультатами

гістологічогоаналізу

Експресіягенівдеякихфібрознихмаркерівєкритичноюдляутворення

позаклітинногоматриксувниркахВходідослідженняунирковихтканинах

мишейзОСбувпідвищенийрівеньекспресіїгенівфіброзуіВведеня

молекулипризвелодозапобіганнярозвиткунирковоїдисфункціїа

такождозниженняекспресіїколагенущопродукуєтьсяміофібробластами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іагоністабуловиявленозниженнянирковоїекспресіїгенів

прозапальнихцитокінів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іприїх

застосуваннізаекспериментальноїмоделінирковоїдисфункціїумишей

Наосновірезультатівпроведеноїроботиможнастверджуватищо

новосинтезованібіфункціональнімолекулиподвійноїдіїі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новосинтизованібіфункціональнімолекулиі

маютьвираженийантифібрознийтапротизапальнийпотенціаліможуть

бутирозглянутінарольновихкандидатівузасобитерапіїзапаленнятафіброзу

приХХН