

Скочко Н.С., Торгалло Є.О., Берегова Т.В. Секреція гідрохлоридної кислоти в шлунку щурів різного віку.

У своїй роботі ми дослідили шлункову секрецію гідрохлоридної кислоти у щурів різних вікових груп. Тварини були народжені самками у один і той же час та після відлучення рандомізовано розподілені на групи. У віці 3, 6, 9, 12, 18, 21, 24 місяці відбирали по 9 тварин для проведення досліджень. Тварини належали до наступних вікових груп: ювенільний вік (51- 120 днів), юнацький (5-10 місяців), зрілий (11-18 місяців), літній (19-23 місяці), старечий (24-30 місяців). Дослідження шлункової секреції гідрохлоридної кислоти у щурів проводилися в гострих дослідах методом перфузії ізольованого шлунка за Гхошем та Шільдом. Встановлено, що базальна шлункова секреція гідрохлоридної кислоти та її динаміка у щурів в процесі у не змінювалась, за виключенням щурів зрілого віку.

Ключеві слова: шлункова секреція гідрохлоридної кислоти, щури, онтогенез.

Резюме

Скочко Н.С., Торгалло Э.А., Берегова Т.В. Секреция гидрохлоридной кислоты в желудке крыс разного возраста.

В своей работе мы исследовали желудочную секрецию гидрохлоридной кислоты у крыс разных возрастных групп. Животные были рождены самками в одно и то же время и после отлучения рандомизированно распределены на группы. В возрасте 3, 6, 9, 12, 18, 21, 24 месяца отбирали по 9 животных для проведения исследований. Животные принадлежали к следующим возрастным группам: ювенильный возраст (51 - 120 дней), юношеский (5-10 месяцев), зрелый (11-18 месяцев), пожилой (19-23 месяца), старческий (24-30 месяцев). Исследование желудочной секреции гидрохлоридной кислоты у крыс проводились в острых опытах методом перфузии изолированного желудка по Гхошу и Шильду. Установлено, что базальная желудочная секреция гидрохлоридной кислоты и ее динамика у крыс в процессе онтогенеза не изменялась, за исключением крыс зрелого возраста.

Ключевые слова: желудочная секреция гидрохлоридной кислоты, крысы, онтогенез.

Summary

Skochko N.S., Torgalo E.A., Beregova T.V. Gastric secretion of hydrochloric acid of rats of different age group.

In our work we investigated the gastric secretion of hydrochloric acid in rats of different age groups. The animals were born in the same day by different females and after wean divided into groups. At the age 3, 6, 9, 12, 18, 21, 24 month gastric secretion was measured in 9 rats. Animals belonged to such age group as: juvenile (51- 120 old days), young (5-10 month), middle age (11-18 month), elderly (19-23 month), senile (24-30 month). Gastric secretion of hydrochloric acid was measured in acute experiments by method of perfusion of isolated stomach by Ghosh and Shild. It was found that basal gastric secretion of hydrochloric acid and its dynamics in rats didn't change during ontogenesis, rats of middle age is the exception.

Key words: gastric secretion of hydrochloric acid, rats, ontogenesis.

Рецензент: д.біол.н., проф. С.В. Демідов

ОЦІНКА ПОТЕНЦІЙНОЇ НЕФРОТОКСИЧНОСТІ СПОЛУК З АНТИПРОЛІФЕРАТИВНОЮ АКТИВНІСТЮ ПОХІДНИХ МАЛЕІМІДУ І ДИГІДРОПІРОЛУ

І.В. Харчук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Вступ

Одним з найбільш поширених ускладнень хіміотерапії, що значно обмежують ефективне лікування онкохворих, є викликані цитостатичними препаратами нефропатії. Тому визначальним критерієм у пошуку нових протипухлинних засобів останнім часом є селективність їх дії [9, 16]. АТФ-конкурентні інгібітори тирозинкіназ похідне малеїміду 1-(4-СІ-бензил)-3-СІ-4-(СF₃-феніламіно)-1Н-пірол-2,5-діон (МІ-1) і похідне дигідропіролу 1,4-заміщений 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-он (Д-1) проявляють незначну токсичність у порівнянні з іншими цитостатиками по відношенню до органів щурів, що є хорошим аргументом на користь їх подальшого дослідження з метою терапевтичного застосування [2-4, 6, 8, 11, 15]. Сполуки ефективно зменшують кількість пухлин та загальну площу ураження у щурів при хімічно-індукованому канцерогенезі товстого кишечника [11, 12], МІ-1 також попереджає пренеопластичні зміни у нирках за умов дії канцерогену [10]. Однак, у дослідженнях на щурах була виявлена деяка нефротоксичність МІ-1 [5, 7] та Д-1 [1] після застосування 5-7 тижнів, що спонукало до більш детального дослідження цього питання. Виявлені структурні зміни у тубулярному апараті нирок, порушення гемодинаміки органу та незначне запалення в інтерстиції були характерними ознаками початкових етапів медикаментозного тубуло-інтерстиційного нефриту. У тубулярному апараті під впливом як МІ-1, так і Д-1 більшого ушкодження зазнавали дистальні каналні (розширення просвітів, зменшення висоти епітелію, його десквамація та ознаки білкової дистрофії епітеліоцитів) [1, 5]. Після тривалого впливу (20 та 27 тижнів) ці порушення були менш вираженими за рахунок адаптаційних процесів в епітелії [1, 7]. Подальші дослідження нефротоксичності обох сполук є важливим завданням для встановлення її механізмів та усунення ризиків можливих побічних ефектів.

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана спільно з Віденським медичним університетом в рамках програми з наукового співробітництва між Україною і Республікою Австрія на 2011-2012 р.р. та є фрагментом НДР "Молекулярні механізми протипухлинної активності нового похідного малеїміду".

Метою дослідження є виявлення особливостей впливу MI-1 і D-1 на життєздатність та апоптоз-індуковану загибель епітеліоцитів проксимальних та дистальних каналців нирок.

Матеріали і методи дослідження

Виділення і культивування епітеліоцитів проксимальних і дистальних ниркових каналців. Первинні епітеліоцити проксимальних і дистальних каналців нирок виділяли з C57BL/6 мишей відповідно до методики після обробки колагеназою та центрифугування у градієнті щільності та культивували у гормонально визначеному середовищі без сироватки [14]. Чистоту клітин проксимальних каналців було перевірено за допомогою кількісної полімеразно-ланцюгової реакції у реальному часі (qRT-PCR) аналізом кальбіндіну D28k, ванілоїд-5 (TRPV5) і NaPi2a мРНК. *In vitro* експерименти з клітинами проксимальних і дистальних каналців та каналцевими сегментами проводили у середовищі без сироватки при 37°C у 5% CO₂. Епітеліоцити інкубували з 1 і 10 мкмоль/л MI-1 і D-1 протягом 4 та 24 годин.

МТТ-тест. Визначення життєздатності клітин проводили за допомогою колориметричного методу з використанням 3,4,5-диметилтіазол-2-іл-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ)-тесту, в основі якого лежить здатність мітохондрій живих клітин відновлювати тетразолієву сіль МТТ до МТТ-формазану [13]. Клітини були культивовані зі щільністю 2x10⁴ клітин/лунку в 24-лункових планшетах. Епітеліоцити інкубували з 1 і 10 мкмоль/л MI-1 та D-1 протягом 4 та 24 годин (контрольні лунки не містили досліджуваних речовин). Кожна група клітин складалась із 6 окремих проб. Після 4 і 24 годин культивування життєдіяльність клітин оцінювалась за допомогою МТТ-тесту, який проводили згідно інструкції виробника (Sigma, St Louis, MO). Клітини, що не підлягали впливу сполук, були взяті за контроль. Значення оптичної густини (od) при різних концентраціях були нормалізовані з середнім значенням контролю (=1). Дані представлені як M±SD, де M – середнє значення трьох незалежних експериментів, SD-стандартне відхилення. Після підтвердження

нормального розподілу всіх даних за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова, статистично значима різниця між дослідними групами і контролем була проаналізована з використанням t-критерію Ст'юдента. Аналіз даних представлений з використанням статистичної програми SPSS 14.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Різниця між дослідними групами і контролем вважалась статистично значимою при P < 0,05.

Апоптоз. Вивчення шляхів клітинної загибелі здійснювали після фарбування клітин специфічними антитілами з флюоресцентною міткою до анексину V, що зв'язується з фосфатидилсерином на клітинній поверхні та після фарбування пропідіум йодидом, який є маркером мертвих клітин. Транслокація фосфатидилсерину з цитоплазматичного моношару плазматичної мембрани на зовнішній є однією з найбільш ранніх подій апоптозу. Клітини розсіювали в 6-лункові планшети в кількості 0,7x10⁶ клітин/лунку в 3 мл середовища без сироватки. Дослідження апоптозу клітин проводили після 24 годин впливу MI-1 і D-1 у раніше встановлених концентраціях, за допомогою проточної цитометрії (FACS Calibur, Becton Dickenson, CA, USA) з використанням CellQuest Software (BD Biosciences), що застосовується для встановлення процентного співвідношення апоптотичних і некротичних клітин. Результати представлені розподілом на чотири популяції (у % від загальної кількості клітин): живі клітини; клітини на ранній стадії апоптозу; загиблі клітини шляхом апоптозу та загиблі клітини шляхом некрозу.

Отримані результати та їх обговорення

Встановлено, що як MI-1, так і D-1 проявляє незначний пригнічуючий ефект на життєздатність епітеліоцитів проксимальних каналців (PT) після 4 годин впливу. Виживання клітин становить 92-95%. Збільшення часу експозиції клітин до досліджуваних речовин до 24 годин викликає зменшення кількості живих клітин, однак вона залишається достатньо високою – 73-80% (рис. 1).

Для епітеліоцитів дистальних каналців (DT) характерна дещо зворотна ситуація. Більшого пригнічення зазнають клітини після короткочасного впливу обох речовин кількість життєздатних клітин становить 72-73% для MI-1 і 80-85% для D-1, після 24 годин впливу сполук життєздатних клітин 85-95% (рис. 2).

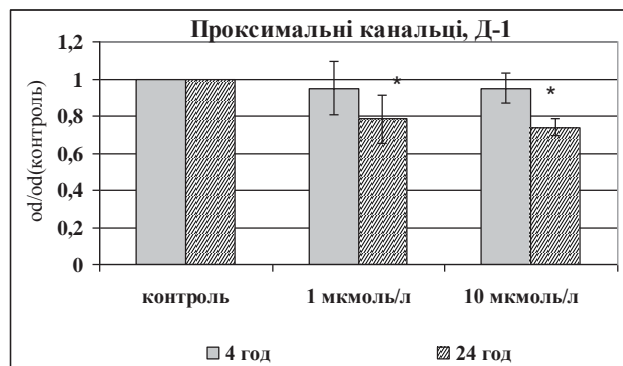
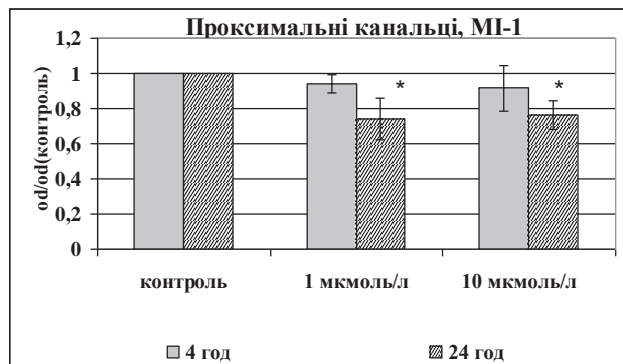


Рис. 1. Ефект MI-1 і D-1 на життєздатність клітин первинної лінії епітеліоцитів проксимальних каналців нирок мишей після 4 та 24 годин впливу. * - $p < 0,05$ по відношенню до контролю.

Виявлений за допомогою МТТ-тесту рівень пригнічення життєздатності клітин для епітеліоцитів обох первинних ліній є досить низький, що вказує на незначну токсичність MI-1 і D-1 по відношенню до тубулярного апарату кіркової зони нирок.

При вивченні апоптозу клітин епітеліоцитів каналців нирок під впливом сполук MI-1 та D-1, для клітин епітелію проксимальних каналців встановлено високий ступінь резистентності до дії MI-1, оскільки лише при дії більшої концентрації кількість життєздатних клітин зменшується на 5% за рахунок збільшення клітин на ранній стадії апоптозу.

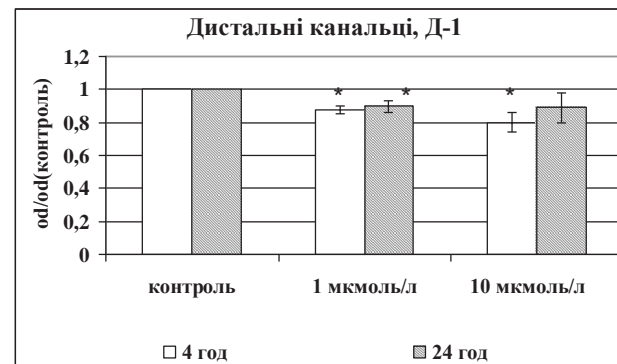
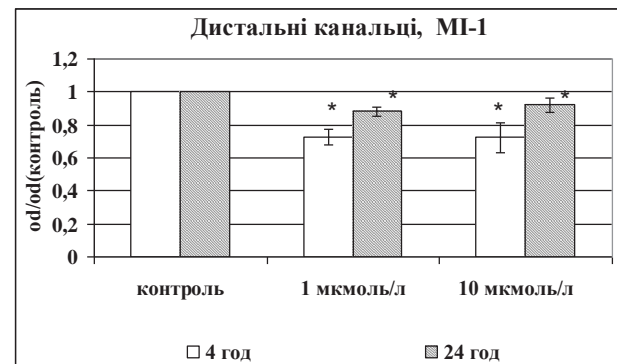


Рис. 2. Ефект MI-1 і D-1 на життєздатність клітин первинної лінії епітеліоцитів дистальних каналців нирок мишей після 4 та 24 годин впливу. * - $p < 0,05$ по відношенню до контролю.

Однак кількість загинувших клітин залишається на рівні контролю. Для D-1 спостерігається подібна ситуація, однак вже при меншій концентрації (рис. 3).

MI-1 викликає зменшення кількості життєздатних епітеліоцитів дистальних каналців з 87% у контролі до 60%, трикратне збільшення клітин в ранній стадії апоптозу, загинувших шляхом некрозу та шляхом апоптозу лише при досягненні концентрації 10 мкмоль/л. Для D-1 вже при концентрації 1 μM характерне зменшення кількості життєздатних клітин до 60% та одночасне збільшення загинувших шляхом апоптозу клітин до 35% (у контролі 10%). За умов впливу 10 мкмоль/л D-1 більше 90% епітеліоцитів гинуть шляхом апоптозу (рис. 4).

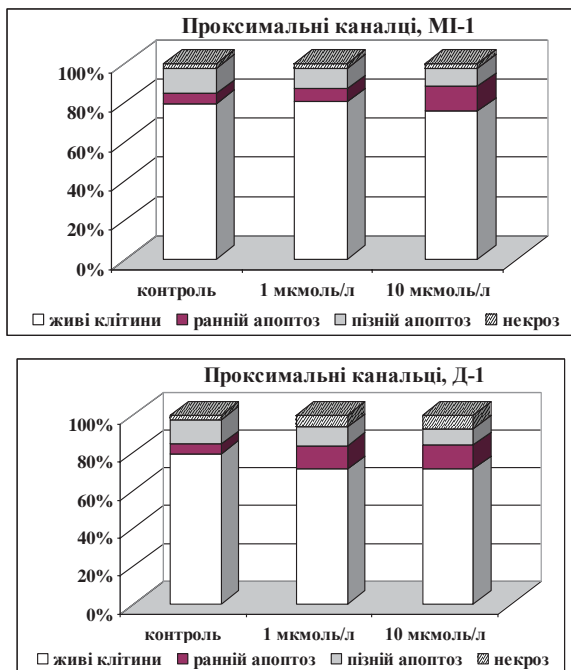


Рис. 3. Співвідношення життєздатних клітин, клітин на ранній стадії апоптозу, загиблих шляхом апоптозу і шляхом некрозу епітеліоцитів проксимальних каналців після впливу MI-1 і D-1 протягом 24 годин.

Отримані дані свідчать, що обидві сполуки проявляють незначний рівень пригнічення життєздатності епітеліоцитів проксимальних каналців нирок і є більш токсичними по відношенню до епітеліоцитів дистальних каналців, що підтверджується виявленою у попередніх гістологічних дослідженнях більшою токсичністю обох сполук по відношенню до дистальних каналців [1, 5, 7]. D-1 чинить більш значний, ніж MI-1, токсичний вплив на епітеліоцити дистальних каналців, на основі чого можна спрогнозувати його більш значну нефротоксичність. До механізмів цитотоксичності обох сполук залучений апоптоз-індукований шлях клітинної загибелі. В цілому низька нефротоксичність сполуки MI-1 свідчить про перспективність подальших її досліджень.

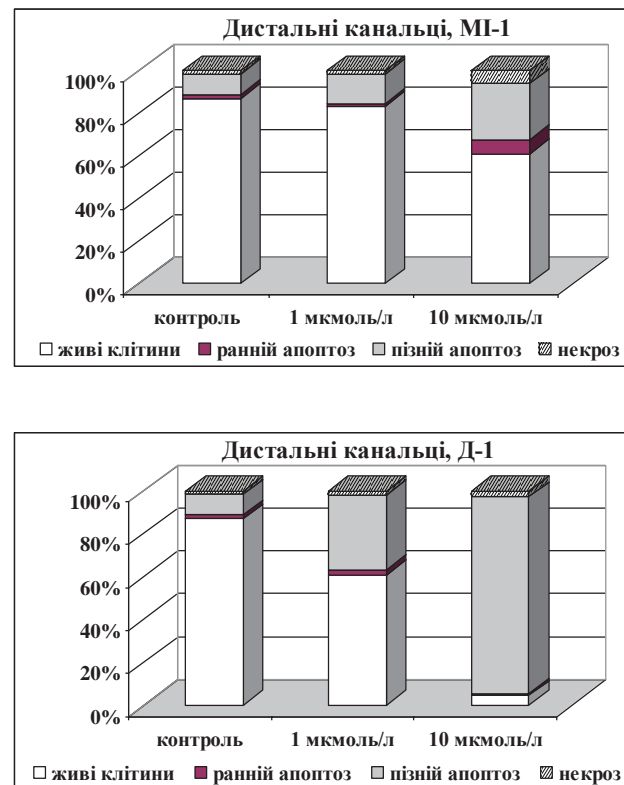


Рис. 4. Співвідношення життєздатних клітин, клітин на ранній стадії апоптозу, загиблих шляхом апоптозу і шляхом некрозу епітеліоцитів дистальних каналців після впливу MI-1 і D-1 протягом 24 годин.

Висновки

1. MI-1 і D-1 є більш токсичними по відношенню до епітеліоцитів дистальних каналців порівняно з епітеліоцитами проксимальних каналців.
2. До механізмів цитотоксичності MI-1 і D-1 залучений апоптоз-індукований шлях клітинної загибелі.
3. Низька нефротоксичність сполуки MI-1 свідчить про перспективність подальших її досліджень з метою застосування у терапії онкозахворювань.

1. Данилов М.О. Вплив цитостатика похідного дигідропіролу на морфофункціональний стан нирок щурів / М.О. Данилов, Г.В. Островська // IV Міжнар. наук. конф. «Психофізіологічні і вісцеральні функції в нормі і патології». – Київ, 2012. – С. 75.
2. Кузнєцова Г.М. Порівняння впливу цитостатичних сполук похідного дигідропіролу і 5-фторурацилу на слизову оболонку кишечника щурів / Г.М. Кузнєцова, Г.В. Островская, В.К. Рыбальченко // *Современные проблемы токсикологии*. – 2011. – № 1-2. – С. 47-51.
3. Морфо-функціональний стан органів шлунково-кишкового тракту після впливу похідного малеїміду MI-1 протягом місяця / О.В. Линчак, І.В. Харчук, Н.О. Карпезо [та ін.] // *Соврем. пробл. токсикол.* – 2011. – № 1-2 (52). – С. 52-55.
4. Морфо-функціональні зміни в сім'яниках щурів під впливом нового антинеопластичного препарату, похідного малеїміду / І.В. Харчук, Н.О. Карпезо, Г.В. Островська [та ін.] // *Совр. пробл. токсикол.* – 2008. – № 1. – С. 61-64.
5. Особливості морфо-функціонального стану нирок під впливом різних доз та тривалості дії потенційного цитостатика похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону / І.В. Харчук, Н.О. Карпезо, Г.В. Островська [та ін.] // *Доп. НАН України*. – 2009. – № 10. – С. 185-188.
6. Морфологічні зміни у підшлунковій залозі щурів під впливом 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону / І.В. Харчук, О.В. Линчак, Н.О. Карпезо [та ін.] // *Совр. пробл. токсикол.* – 2008. – № 4. – С. 16-19.
7. Дослідження структурно-функціонального стану нирок та підшлункової залози щурів після тривалої дії новітньої таргетної сполуки – похідного малеїміду / І.В. Харчук, О.М. Філінська, С.В. Яблонська, Т.В. Рыбальченко // *Доп. НАН України*. – 2010. – № 7. – С. 150-154.
8. Оцінка гепатотоксичності нового похідного малеїміду з цитостатичною активністю і його вплив на перекисне окислення та антиоксидантну систему печінки / С.В. Яблонська, О.М. Філінська, Г.В. Островська, В.К. Рыбальченко // *Укр. біохім. журн.* – 2009. – Т. 81, № 3. – С. 83-92.
9. Arias J.L. Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview / J.L. Arias // *Mini Rev. Med. Chem.* – 2011. – Vol. 11 (1). – P. 1-17.
10. Preventive action of maleimide derivative 1-(4-Cl-benzil)-3-Cl-4-(CF₃-fenilamino)-1H-pyrrol-2,5-dion on rat's renal system in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis / I. Kharchuk, O. Filinska, S. Yablonska, V. Rybalchenko // *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. - Lublin - Polonia. - Sectio DDD. Pharmacia.* – 2010. – Vol. 23, № 2. – P. 191-195.
11. Kuznetsova G. M. Influence of cytostatic compound dihydropyrrol derivative on colon mucosa under colon cancer in rats / G. M. Kuznetsova, A.P. Burlaka,

V.K. Rybalchenko // *The 1-st Multidisciplinary Symposium "Molecular Oncology: From Laboratory Bench to Medicine"*. – Kyiv, Ukraine, 2012. – P. 78.

12. Lynchak O. Effects of new maleimide derivate on the 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats / O. Lynchak, G. Ostrovska, V. Rybalchenko // *Gut "GASTRO 2009 UEGW/WCOG, London"*. – 2009. – Vol. 58 (Suppl. II). – P. A334.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mosmann // *J. Immunol. Meth.* – 1983. – Vol. 65. – P. 55-63.
14. Isolation, propagation and characterization of primary tubule cell culture from human kidney / W. Qi, D.W. Johnson, D.A. Vesey [e.a.] // *Nephrology (Carlton)*. – 2007. – Vol. 12. – P. 155-159.
15. Effect of the maleimide derivative MI-1, a novel antitumor agent, on the rat myocardium and cardiomyocytes / V. Rybalchenko, I. Kharchuk, V. Kyrychenko, O. Lynchak // *Exp. Clin. Cardiol.* – 2011. – Vol. 16, Suppl A. – P. 25A.
16. Zhang J. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors / J. Zhang, P.L. Yang, N.S. Gray // *Nature Review Cancer.* – 2009. – Vol. 9, № 11. – P. 28-39.

Резюме

Харчук І.В. Оцінка потенційної нефротоксичності сполук з антипроліферативною активністю похідних малеїміду і дигідропіролу.

Досліджено особливості впливу похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону (MI-1) і похідного дигідропіролу 1,4-заміщеного 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-ону (Д-1) на життєздатність і апоптоз-індуковану загибель епітеліоцитів проксимальних та дистальних канальців нирок. Встановлено, що MI-1 і Д-1 є більш токсичними по відношенню до епітеліоцитів дистальних канальців порівняно з епітеліоцитами проксимальних канальців. До механізмів цитотоксичності сполук залучений апоптоз-індукований шлях клітинної загибелі.

Ключові слова: культура клітин, похідні малеїміду і дигідропіролу, нефротоксичність, апоптоз.

Резюме

Харчук И.В. Оценка потенциальной нефротоксичности соединений с антипролиферативной активностью производных малеимида и дигидропиirroла.

Исследованы особенности влияния производных малеимида 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-фениламино)-1H-пиррол-2,5-диона

(МИ-1) и 1,4-замещенного 5-амино-1,2-дигидропиррол-3-она (Д-1) на жизнеспособность и апоптоз-индуцированную гибель эпителиоцитов проксимальных и дистальных канальцев почек. Установлено, что МИ-1 и Д-1 являются более токсичными по отношению к эпителиоцитам дистальных канальцев сравнительно с эпителиоцитами проксимальных канальцев. В механизмы цитотоксичности соединений вовлечен апоптоз-индуцированный путь клеточной гибели.

Ключевые слова: культура клеток, производные малеимида и дигидропиррола, нефротоксичность, апоптоз

Summary

Kharchuk I.V. *Evaluation of potential nephrotoxicity of compounds with anti-proliferative activity derivatives maleimide and dihydropyrrole.*

The features of the influence of a maleimide derivative 1-(4-Chlorobenzyl)-3-chloro-4-(CF₃-phenylamino)-1H-pyrrole-2,5-dione (MI-1) and 1,4-substituted 5-amino-1,2-dihydropyrrolo-3-one (D-1) on the viability and apoptosis-induced death of renal proximal and distal tubular epithelial cells. It was found that MI-1 and D-1 were more toxic with respect to the epithelial cells of distal than proximal tubule cells. The apoptosis-induced cell death pathway is involved in the mechanisms of both compounds cytotoxicity.

Key words: cell culture, maleimide and dihydropyrrole derivatives, nephrotoxicity, apoptosis.

Рецензент: д.біол.н., проф. В.К. Рибальченко

УДК 577.112.7:616

ЕНДОТЕЛІАЛЬНИЙ ФАКТОР РОСТУ СУДИН: БІОЛОГІЯ ТА ТЕРАПЕВТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ

Є.В. Хоменко, Л.Б. Орябінська, О.Г. Мінченко

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

Вступ

Досягнення останніх років в області молекулярної та клітинної біології, молекулярної генетики та імунології визначили основні напрямки досліджень по створенню нових протипухлинних препаратів. Проблема ангіогенезу є досить актуальною з точки зору розробки нових засобів діагностики та терапії пухлинних і серцево-судинних захворювань. Ангіогенез – це важливий фізіологічний процес утворення нових кровоносних судин з уже існуючої судинної системи. Ангіогенез відіграє важливу роль в процесі розвитку, контролює ріст тканин, загоювання ран та репродуктивний цикл у жінок [17]. Відомо, що прогресія пухлини супроводжується новоутворенням судин, які забезпечують доступ до неї поживних речовин [14]. Судини проростають у пухлину завдяки тому, що вона виділяє цілий ряд ангіогенних факторів, провідними з яких є родина ендотеліальних факторів росту судин (vascular endothelial growth factor - VEGF) [15], причому швидкістю росту пухлини та прогноз захворювання корелюють із рівнем експресії VEGF клітинами пухлини. Відомо, що застосування антитіл до VEGF та його рецепторів, а також генної терапії антисенсових послідовностей VEGF суттєво сповільнює розвиток пухлини [19]. Таким чином, детальне дослідження гена VEGF виступає важливою науково-практичною задачею, що відкриває нові можливості для встановлення ролі ангіогенезу в розвитку пухлинних захворювань.

Метою роботи є аналіз літературних даних стосовно біології та терапевтичного значення VEGF.

Ендотеліальний фактор росту судин (VEGF)

У 1983 році Senger із співавторами виділили з клітинної лінії пухлини хом'яка білок, що був названий фактором проникності судин

Екологічні аспекти сучасної біології та медичної генетики