

исследования этой гипотезы получены записи потенциалов, связанных с событиями (ПСС), при выполнении испытуемыми этого теста. Испытуемыми были семеро мужчин, правши, в возрасте $20 \pm 1,13$ лет. Наиболее информативным оказалось отведение Cz, для которого получены компоненты N450 и поздний позитивный комплекс (LPC) при стимулировании неконгруэнтными стимулами с правой стороны. Компонент N450 связывают с активностью передней поясной коры и считают надежным маркером конфликта, имеющегося в экспериментальной парадигме данного теста. LPC, вероятно, является компонентом, специфическим для задания Струпа, и соответствует уровню конфликта стимулов. Запись ПСС с центрального отведения не позволяет определить в данном случае источник их происхождения. Однако сопоставление ПСС при неконгруэнтных стимуляциях справа и слева указывает на наличие различий в реакции на стимулы, представленные из разных половин экрана. Появление данных компонентов для неконгруэнтных стимулов, представляемых с правой стороны экрана, вероятно, означает их ассоциацию с функциями левого полушария, и подтверждает выдвинутую ранее гипотезу о метаконтроле левым полушарием при выполнении данного типа когнитивной задачи.

Ключевые слова: комбинированный тест Струпа, потенциалы, связанные с событиями, межполушарное взаимодействие, метаконтроль.

G. Antsukh, stud.,
T. Kutsenko, Ph. D.,
D. Nasiedkin, junior researcher,
A. Pohrebna, Ph. D. stud.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

STUDY OF INTERHEMISPHERIC INTERACTION BY THE INDICES OF EVENT-RELATED POTENTIALS

The study used a combined Stroop test involving a spatial feature. Stimuli (the words "green", "red", "blue" and "yellow", written in relevant or irrelevant color) were presented to the right or left of the center of the screen. In the case of coincidence of the color of the word and its semantic meaning, it was necessary to press the button with the ipsilateral hand (answer "yes", congruent stimulus), discrepancies – with the contralateral hand (answer "no", incongruent stimulus).

According to the results obtained earlier, it was suggested that it is easier to transfer information from the left hemisphere to the right than in the opposite direction, and the dominance of the left hemisphere when performing this type of cognitive task. To study this hypothesis, records of event-related potentials (ERP) were obtained when subjects performed this test. The subjects were 7 men, right-handed, aged $20 \pm 1,13$ years. The most informative was the registration from Cz, for which the components N450 and late positive complex (LPC) were obtained when stimulated by incongruent stimuli from the right side. The N450 component is associated with anterior cingulate cortex activity and is considered a reliable marker of conflict present in the experimental paradigm of this test. LPC is probably a component specific to the Stroop task and corresponds to the level of conflict of stimuli. Recording ERPs from the central lead does not allow to determine in this case the source of their origin. However, a comparison of ERP of incongruent stimuli from the right and left indicates differences in response to stimuli from different halves of the screen. The appearance of these components for incongruent stimuli exposed on the right side of the screen probably means their association with the functions of the left hemisphere, and confirms the previous hypothesis of metacontrol by the left hemisphere in this type of cognitive task.

Keywords: combined Stroop test, event-related potentials, interhemispheric interaction, metacontrol.

УДК 577.122.8
DOI 10.17721/1728_2748.2020.81.25-31

A. Stavnichuk, Ph. D. stud.,
O. Savchuk, Dr. Sc.
Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine,
Abdul Hye Khan, Ph. D.,
Wojciech K. Jankiewicz, stud.,
John D. Imig, Ph. D.
The Medical College of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA

A SORAFENIB INDUCED MODEL OF GLOMERULAR KIDNEY DISEASE

Glomerular damage and proteinuria are important pathophysiological signs of chronic kidney disease. This study provides data obtained using a model developed based on the use of the anti-cancer drug sorafenib. Sorafenib is a tyrosine kinase inhibitor that acts through the signaling pathway associated with vascular endothelial growth factor and is widely used to treat various types of cancer. Sorafenib, on the other hand, causes serious side effects in patients, including the development of chronic kidney disease. This study was aimed at using the nephrotoxic properties of sorafenib to model chronic kidney disease in rats. We showed that rats treated with sorafenib for 8 weeks along with a diet high in salt (8% NaCl) develop hypertension with high systolic blood pressure of 80 mmHg, proteinuria with an increase in protein content of 75% higher, and a 4-fold increase in glomerular damage compared to the control group. In case of damage to the renal glomeruli caused by sorafenib, the level of transcripts that are involved in the synthesis of key glomerular proteins such as nephrine, podocin, synaptopodin and subplanin is significantly reduced. Also, when studying this model, activation of the endothelial-mesenchymal transition is observed. In the group of rats treated with sorafenib, the mRNA level for the WT-1 endothelial cell marker was reduced by 20%, while the concentration of the Col III, FSP-1, α -SMA and vimentin mesenchymal cell markers increased by 2–3 times. Thus, we developed a preclinical model of chronic kidney disease, expressed in damage to the renal glomeruli. We also demonstrated that glomerular damage in this model is associated with decreased expression of key structural glomerular proteins and activation of the endothelial-mesenchymal transition of the kidneys.

Keywords: sorafenib, vascular endothelial growth factor, glomerular injury.

Introduction. Angiogenesis inhibition is a cancer chemotherapeutic approach utilizing either monotherapy or combination chemotherapy and has become a standard treatment for several types of cancers. Anti-angiogenic drugs are particularly effective against solid tumors, such as metastatic renal cell carcinoma (mRCC), non-small cell lung carcinoma, gastrointestinal stromal tumors (GIST), and colorectal carcinoma [20]. One of the main angiogenic growth factors that is targeted to treat cancer is vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors [6]. Several multi-targeted kinase inhibitors (MTKIs) sorafenib, sunitinib, and pazopanib were approved for the treatment of

metastatic renal cell carcinoma (mRCC) and several other cancers [14, 20]. MTKIs are small molecules that target the VEGF receptor VEGFR-2, the platelet-derived growth factor (PDGF) receptor, RAS, and c-KIT [4].

MTKI medications have expanded to many different solid tumors, with ongoing clinical trials with newer formulations [8]. Although very effective in treating mRCC, GIST and non-small cell carcinoma, the MTKIs such as sorafenib have several limiting serious side effects. The most common and serious side-effects of VEGF-targeted therapies are hypertension including salt-sensitive

hypertension, kidney dysfunction with proteinuria, glomerular and renal tubular injuries [4].

In the present study, we have investigated the MTKI sorafenib on the kidney and glomerulus. We demonstrate that sorafenib in combination with a high sodium diet (8% NaCl) causes marked glomerular injury that is associated with a decrease in key glomerular proteins essential for glomerular structure and function. Our data also demonstrate a critical contribution for endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) in sorafenib-induced kidney and glomerular injury. We propose that sorafenib can be utilized as a glomerular kidney disease model to study pathophysiology during progressive chronic kidney disease.

Material and methods. All experiments in this study were approved and carried out according to the guidelines of the Institutional Animal Care and Use Committee, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA. Eight-twelve weeks old male Sprague–Dawley rats weighing 200–225 g (Charles River, MA, USA) received an 8% NaCl diet and administered vehicle or sorafenib (20mg/kg/d, p.o.) for 8 weeks. The sorafenib dose was chosen based on a previous rat study [21]. A schematic of the experimental protocol is shown in Figure 1.

Figure 1

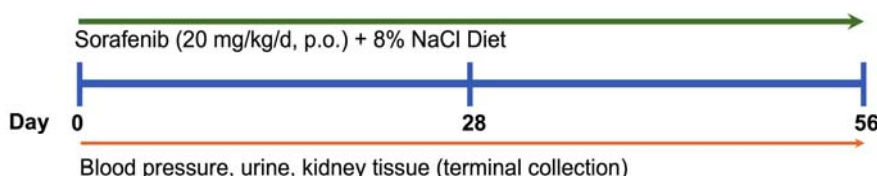


Figure 1. A schematic depicting the experimental protocol used in the study

Blood pressure and urine collection were done at baseline and then on days 28 and 56 of the experimental protocol. Urine samples were used for biochemical analysis to measure protein and creatinine. Blood and kidney tissues were collected at the end of the 56 day protocol. Kidney tissues were processed for histology and gene expression analysis. Systolic blood pressure measurements of vehicle and sorafenib administered rat groups were carried out by tail-cuff plethysmography (IITC Life Science Inc., Woodland Hills, CA, USA). Blood pressure measurement was done at baseline, day 28, and day 56 of the experimental protocol. Urine samples collected at baseline, day 28, and day 56 were used for protein measurement using a commercially available kit (Cayman, Ann Arbor, MI, USA). Creatinine levels in urine were measured using a commercially available kit from Cayman (Ann Arbor, MI, USA). Urinary protein and creatine values were used to calculate their urinary excretion over a 24-hour period. The ratio for urinary protein and creatinine excretion was calculated as a proteinuria index. At the end of the 8-week experimental protocol, rats were killed for kidney tissue collection. The kidney was removed, decapsulated, cut into sections and immersion fixed in 10% neutral buffered formalin for 48 hours. Fixed kidney samples were embedded in paraffin and cut into 4µm sections. Paraffin embedded kidney slices were finally de-paraffinized, rehydrated, and stained with Periodic Acid Schiff (PAS) staining. A semi-quantitative evaluation of glomerular injury was obtained from the PAS stained kidney sections. For each kidney sample, 100 glomeruli were examined to obtain the glomerular injury score as previously described [13]. Each glomerulus was graded from 1 to 4 as follows; grade 1, normal glomerulus identified by light microscopy; grade 2, involvement of sclerosis in up to 1/3 of the glomerulus; grade 3, involvement of sclerosis in 1/3 to 2/3 of the glomerulus; and grade 4, 2/3 involvement or global sclerosis. The extent of glomerular injury is expressed as glomerular injury index [13]. Kidney cortical mRNA expression for several glomerular proteins (nephrin, podocin, synaptopodin, and podoplanin) were carried out using Real Time-PCR (RT-PCR). RT-PCR was also used to determine the gene expression for endothelial cell marker

Wilms Tumor 1 (WT-1) and several mesenchymal markers fibronectin, collagen III (Col III), α -smooth muscle actin (α -SMA), fibroblast specific protein-1 (FSP-1) and vimentin. Messenger RNA (mRNA) was prepared from each kidney cortical sample using RNeasy Mini Kit (QIAGEN, CA, USA). The mRNA samples were quantified spectrophotometrically and cDNA was synthesized from 1µg of total RNA using iScript™ Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Gene expression was quantified by iScript One-Step RT-PCR Kit with SYBR green using the MyiQ™ Single Color RT-PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Dissociation curve analysis was carried out with iQ5 Optical System Software, Version 2.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and each amplified sample analyzed for homogeneity. During RT-PCR, the denaturation of the cDNA was done at 95°C for 2 min followed by 40 cycles used at 95°C for 10s and at 60°C for 30s. All mRNA samples were run in triplicate and fold change in gene expression was compared to controls determined by comparative threshold cycle (C_t) method. Expression levels of the gene of interest were determined by normalizing C_t values to two housekeeping genes. All data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. GraphPad Prism® Version 4.0 software was utilized statistical analysis (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA). Two-tailed unpaired Student's t-test was applied to determine statistical significance between groups. P value of < 0.05 was deemed significant.

Results and discussion Hypertension is the most common cardiovascular event that occurs with VEGF-signaling pathway inhibitors [2]. Sorafenib induces hypertension in around one-quarter of the patients [27]. In agreement with this finding, data in the present study demonstrate that sorafenib treatment along with a high salt diet resulted in a marked hypertension. Systolic blood pressure increased by 80 mmHg in rats administered sorafenib compared to normal control-vehicle rats by the end of the 8-week protocol (Figure 2A).

Figure 2

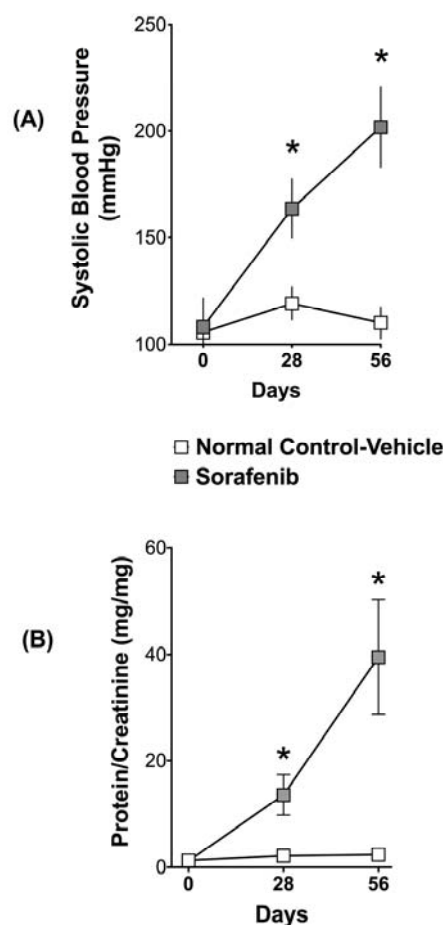


Figure 2. Systolic blood pressure in different experimental groups (A).
Proteinuria expressed as the ratio of urinary protein to creatinine excretion in different experimental groups (B)

*P vs. Normal Control-Vehicle. All data are expressed as mean $\pm$ SEM, N = 6

Evidence indicates that VEGF inhibition causes hypertension as a consequence of decreased nitric oxide production [11]. Another proposed mechanism by which VEGF-signaling pathway inhibition leads to hypertension is that inhibition of the VEGF-signaling pathway increases the production of endothelin-1, a potent vasoconstrictor [2]. It is important to note that sorafenib is known to cause salt-sensitivity [26], hence, it is very likely that the placing the sorafenib treated rats on high salt diet is also played an important pathophysiological role in the development of hypertension and kidney injury assessed from proteinuria. In relation a role of salt sensitivity in VEGF inhibition associated hypertension and kidney injury, in normotensive Sprague-Dawley (SD) rats, the tyrosine kinase inhibitor SU5416 induced salt-sensitive hypertension and kidney injury. In a study performed in normotensive Wistar-Kyoto rats exposed to a low dose of sunitinib, a similar VEGF inhibitor like sorafenib, it is found that a high salt diet augmented the rise in blood pressure and proteinuria [16]. Different mechanisms may account for the salt sensitive hypertension during VEGF inhibition.

As suggested by Gu et al, the VEGF inhibition-induced decrease in NO production by renal proximal tubular cells may impair the pressure-natriuresis response because of impaired vasodilatation in the vasa recta [10]. Additionally, it is suggested that the VEGF inhibition can activate endothelin system and contribute to salt-sensitive hypertension [19].

In the present study, our data demonstrate that the sorafenib treated rats develop marked proteinuria with a 40-fold higher urinary protein excretion compared to normal control-vehicle rats (Figure 2B). Like hypertension, development of proteinuria is another common side effect associated with VEGF inhibitors including sorafenib [5, 12]. Other findings substantiate that VEGF inhibition by drugs like sorafenib causes damage to the glomerular filtration system and leads to proteinuria [12]. In the present study, we demonstrate that rats administered sorafenib in combination to a high sodium diet develop marked 4-fold higher glomerular injury characterized by glomerular sclerosis, mesangiolysis, and glomerular capillary injury (Figure 3A, 3B).

Figure 3

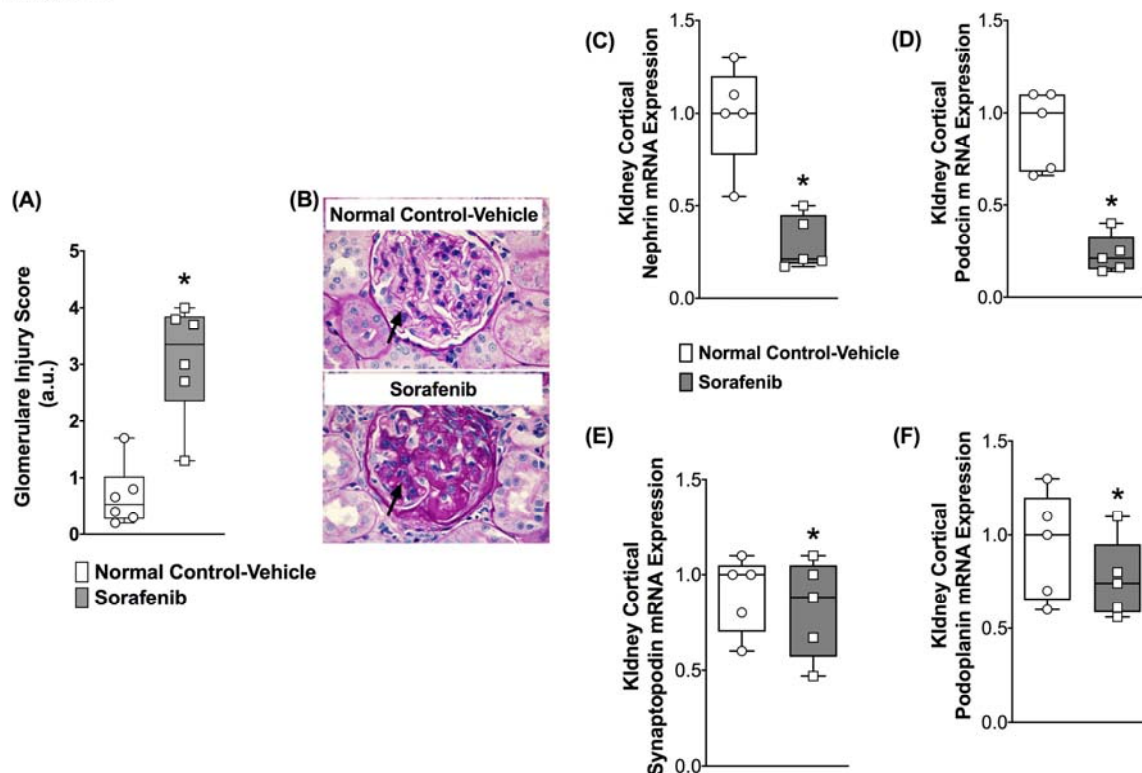


Figure 3. Glomerular injury index in different experimental groups (A).

A representative photomicrograph depicting glomerular injury in normal control-vehicle and rats administered sorafenib (B).

Kidney cortical expression of several glomerular proteins in different experimental groups (C-F)

*P vs. Normal Control-Vehicle. All data are expressed as mean $\pm$ SEM, N = 6

These findings corroborate those of several earlier studies that described glomerular injury during VEGF inhibition [3, 22]. Not only others, in an earlier study, we demonstrated that sorafenib treatment along with high salt diet caused marked glomerular injury in rats [21]. The glomerulus is a highly specialized filtration apparatus with selective permeability that allows free passage of water and solutes, but not protein. The permselectivity of the glomerular filtration barrier restricts protein passage into Bowman's space. Glomerular barrier breakdown and loss of permselectivity leads to proteinuria, which is common in renal diseases. The current study found increased urinary protein and glomerular barrier breakdown in rats administered sorafenib. Although the details of glomerular filtration permselectivity and barrier remain unknown, it is clear that the glomerular epithelial cell and podocyte are important glomerular filtration barrier components. Podocyte injury is frequently involved in the pathogenesis of glomerular diseases [24]. Podocyte damage can be the result of changes in individual podocyte-associated proteins including those that assemble and stabilize the slit diaphragm and those that anchor the foot process to the glomerular basement membrane. In the present study, we evaluated kidney cortical mRNA expression of these proteins including nephrin, podocin, synaptopodin, and podoplanin. Our findings demonstrate that in rats administered sorafenib there is 20-80% lower mRNA expression of glomerular proteins compared to normal control-vehicle rats (Figure 3C-F). It has been proposed that decreased expression of glomerular proteins could be linked to decreased VEGF signaling that occurs with sorafenib administration. Indeed, VEGF is crucial to the maintenance of normal renal function, and both VEGF over- and under-

expression can disrupt normal glomerular function. The interaction between VEGF generated by podocytes and VEGFR-2 on glomerular endothelial cells is necessary to maintain glomerular slit diaphragm barrier integrity [8, 9, 15]. Several studies underscored the importance of VEGF signaling in kidney health. Selective depletion of one VEGF allele in podocytes in mice leads to down regulation of the slit-diaphragm protein nephrin, resulting in proteinuria and structural and functional glomerular damages [7, 25].

Endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) is a subtype of epithelial-mesenchymal transition. EndoMT is a novel source for myofibroblasts and contributes importantly to fibrosis and chronic kidney disease progression. During EndoMT, endothelial cell progressively changes their endothelial phenotype into a mesenchymal phenotype resulting in the loss of specific endothelial markers like WT-1 and gain in mesenchymal markers, such as α -SMA or FSP-1 [1, 23]. Previous findings indicate that EndoMT plays a critical role in glomerular injury and results in albuminuria during diabetic nephropathy. The findings described in this study and several other studies demonstrate a role EndoMT in causing podocyte damage leading to glomerular injury [17, 18, 28]. In the present study, we demonstrate that sorafenib administration caused proteinuria and glomerular injury in rats. Considering a role of EndoMT in glomerular injury we investigated if EndoMT contributes to sorafenib-induced glomerular injury. The current findings reveal that sorafenib administration to rats decreased renal cortical endothelial cell marker WT-1 mRNA expression by 20 % and increased mesenchymal marker Col III, FSP-1, α -SMA and vimentin mRNA expression by 2-3 fold when compared to normal control-vehicle rats (Figure 4 A-F).

Figure 4

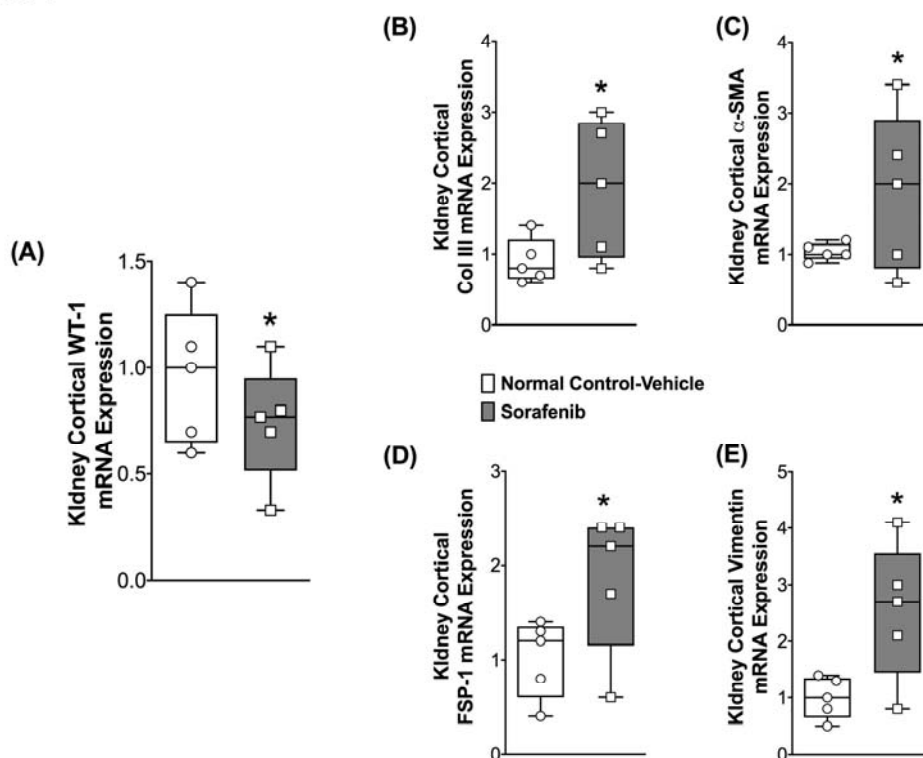


Figure 4. Kidney cortical expression of an endothelial cell marker, WT-1 (A), and several mesenchymal markers (Col III, α -SMA, FSP-1 and vimentin) in different experimental groups (B-E)
*P vs. Normal Control-Vehicle. All data are expressed as mean $\pm$ SEM, N = 6

These results indicate a potential contribution for EndoMT on glomerular endothelial cells to glomerular injury caused by sorafenib.

Conclusion. VEGF signaling inhibition by sorafenib administration resulted in hypertension and kidney injury. Sorafenib administration induced glomerular injury was associated with increased EndoMT and decreased glomerular barrier proteins. Accordingly, our findings establish sorafenib administration as a glomerular disease model in which glomerular injury is associated with decreased key glomerular structural proteins and activated kidney EndoMT.

References:

1. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice / N. Asada, M. Takase, J. Nakamura et al. // *J Clin Invest.* – 2011. – Vol. 121, N 10. – P. 3981–3990.
2. Bair S.M. Cardiovascular complications associated with novel angiogenesis inhibitors: emerging evidence and evolving perspectives / S. M. Bair, T. K. Choueiri, J. Moslehi // *Trends Cardiovasc Med.* – 2013. – Vol. 23, N 4. – P. 104–113.
3. Hypertension and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Receptor Tyrosine Kinase Inhibition: Effects on Renal Function / B. C. Boursiquot, E. C. Zabor, I. G. Glezerman et al. // *Hypertension.* – 2017. pii: HYPERTENSIONAHA.117.09275.
4. Broxterman H. J. Anticancer therapeutics: "Addictive" targets, multitargeted drugs, new drug combinations / H. J. Broxterman, N. H. Georgopapadakou // *Drug Resist Updat.* – 2005. – Vol. 8, N 4. – P. 183–197.
5. Donoviel D. B. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN / D. B. Donoviel, D. D. Freed, H. Vogel et al. // *Mol Cell Biol.* – 2001. – Vol. 21, N 14. – P. 4829–4836.
6. Eremina V. Biology of anti-angiogenic therapy-induced thrombotic microangiopathy / V. Eremina, S. E. Quaglin // *Seminars in nephrology.* – 2010. – Vol. 30, N 6. – P. 582–590.
7. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases / V. Eremina, M. Sood, J. Haigh et al. // *J. Clin Invest.* – 2003. – Vol. 111, N 5. – P. 707–716.
8. Eskens F. A. The clinical toxicity profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) targeting angiogenesis inhibitors a review / F. A. Eskens, J. Verweij // *Eur J. Cancer.* – 2006. – Vol. 42, N 18. – P. 3127–3139.

9. Glomerular expression of nephrin and synaptopodin, but not podocin, is decreased in kidney sections from women with preeclampsia / V. D. Garovic, S. J. Wagner, L. M. Petrovic et al. // *Nephrol Dial Transplant.* – 2007. – Vol. 22, N 4. – P. 1136–1143.
10. Vascular endothelial growth factor receptor inhibitor enhances dietary salt induced hypertension in Sprague-Dawley rats / J. W. Gu, R. D. Jr. Manning, E. Young et al. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2009. – Vol. 297, N 1. – P. 142–148.
11. Clinical risk factors for the development of hypertension in patients treated with inhibitors of the VEGF signaling pathway / O. P. Hamnvik, T. K. Choueiri, A. Turchin et al. // *Cancer.* – 2015. – Vol. 121, N 2. – P. 311–319.
12. VEGF inhibition, hypertension, and renal toxicity / S. R. Hayman, N. Leung, J. P. Grande et al. // *Curr Oncol Rep.* – 2012. – Vol. 14, N 4. – P. 285–294.
13. A novel dual PPAR- γ agonist/sEH inhibitor treats diabetic complications in a rat model of type 2 diabetes / M. A. Hye Khan, L. Kolb, M. Skibba et al. // *Diabetologia.* – 2018. – Vol. 61, N 10. – P. 2235–2246.
14. Jászai J. Trends and Challenges in Tumor Anti-Angiogenic Therapies / J. Jászai, M. H. Schmidt // *Cells.* – 2019. – Vol. 8, N 9. – P. 1102.
15. VEGF is an essential molecule for glomerular structuring / Y. Kitamoto, H. Tokunaga, K. Miyamoto et al. // *Nephrol Dial Transplant.* – 2002. – Vol. Suppl 9, N 17. – P. 25–27.
16. Effect of high salt diet on blood pressure and renal damage during vascular endothelial growth factor inhibition with sunitinib / S. Lankhorst, H. J. Baelde, M. C. Claassen-van Groningen et al. // *Nephrol Dial Transplant.* – 2016. – Vol. 31, N 6. – P. 914–921.
17. Melatonin Attenuates Endothelial-to-Mesenchymal Transition of Glomerular Endothelial Cells via Regulating miR-497/ROCK in Diabetic Nephropathy / F. Liu, S. Zhang, R. Xu et al. // *Kidney Blood Press Res.* – 2018. – Vol. 43, N 5. – P. 1425–1436.
18. Lovastatin Alleviates Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Glomeruli via Suppression of Oxidative Stress and TGF- β 1 Signaling / Z. Ma, L. Zhu, Y. Liu et al. // *Front Pharmacol.* – 2017. – N 8:473.
19. Mononuclear phagocyte system depletion blocks interstitial tonicity-responsive enhancer binding protein/vascular endothelial growth factor C expression and induces salt-sensitive hypertension in rats / A. Machnik, A. Dahlmann, C. Kopp et al. // *Hypertension.* – 2010. – Vol. 55, N 3. – P. 55–61.
20. Mantia C. M. Vascular endothelial growth factor and programmed death-1 pathway inhibitors in renal cell carcinoma / C. M. Mantia, D. F. McDermott // *Cancer.* – 2019. – Vol. 125, N 23. – P. 4148–4157.
21. Captopril attenuates hypertension and renal injury induced by the vascular endothelial growth factor inhibitor sorafenib / T. Nagasawa, M. A. Hye Khan, J. D. Imig // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2012. – Vol. 39, N 5. – P. 454–461.
22. Ollero M. Inhibition of the VEGF signaling pathway and glomerular disorders / M. Ollero, D. Sahali // *Nephrol Dial Transplant.* – 2015. – Vol. 30, N 9. – P. 1449–1455.

23. Piere-Velazquez S. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders / S. Piere-Velazquez, Z. Li, S. A. Jimenez // *Am J. Pathol.* – 2011. – Vol. 179, N 3. – P.1074–1080.
24. Shankland S. J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis / S. J. Shankland // *Kidney Int.* – 2006. – Vol. 69, N 12. – P. 2131–2147.
25. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria / H. Sugimoto, Y. Hamano, D. Charytan et al. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, N 15. – P.12605–12608.
26. Van den Meiracker A. H. Mechanisms of Hypertension and Renal Injury During Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Inhibition / A. H. van den Meiracker, A. H. Danser // *Hypertension.* – 2016. – Vol. 68, N 1. – P. 17–23.
27. Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis / S. Wu, J. J. Chen, A. Kudelka et al. // *Lancet Oncol.* – 2008. – Vol. 9, N 2. – P. 117–123.
28. Serum response factor induces endothelial-mesenchymal transition in glomerular endothelial cells to aggravate proteinuria in diabetic nephropathy / L. Zhao, J. Zhao, X. Wang et al. // *Physiol Genomics.* – 2016. – Vol. 48, N 10. – P. 711–718.

References:

1. Asada N., Takase M., Nakamura J. et al. Dysfunction of fibroblasts of extrarenal origin underlies renal fibrosis and renal anemia in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(10): 3981–90.
2. Bair S. M., Choueiri T. K., Moslehi J. Cardiovascular complications associated with novel angiogenesis inhibitors: emerging evidence and evolving perspectives. *Trends Cardiovasc Med.* 2013 May; 23(4): 104–13.
3. Boursiquot B. C., Zabor E. C., Glezerman I. G., Jaimes E. A. Hypertension and VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Receptor Tyrosine Kinase Inhibition: Effects on Renal Function. *Hypertension.* 2017. Jul 24. pii: HYPERTENSIONAHA.117.09275.
4. Broxterman H. J., Georgopadakou N. H. Anticancer therapeutics: "Addictive" targets, multitargeted drugs, new drug combinations. *Drug Resist Updat.* 2005 Aug; 8(4): 183–197.
5. Donoviel D. B., Freed D. D., Vogel H. et al. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. *Mol Cell Biol.* 2001; 21(14): 4829–4836.
6. Eremina V., Quaggin S. E. Biology of anti-angiogenic therapy-induced thrombotic microangiopathy. *Seminars in nephrology.* 2010; 30(6): 582–590.
7. Eremina V., Sood M., Haigh J. et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J. Clin Invest.* 2003; 111(5): 707–716.
8. Eskens F. A., Verweij J. The clinical toxicity profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) targeting angiogenesis inhibitors a review. *Eur J Cancer.* 2006; 42(18): 3127–3139.
9. Garovic V. D., Wagner S. J., Petrovic L. M. et al. Glomerular expression of nephrin and synaptopodin, but not podocin, is decreased in kidney sections from women with preeclampsia. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22(4): 1136–1143.
10. Gu J. W., Manning R. D. Jr., Young E. et al. Vascular endothelial growth factor receptor inhibitor enhances dietary salt induced hypertension in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 297(1): R142–R148.
11. Hamnvik O. P., Choueiri T. K., Turchin A. et al. Clinical risk factors for the development of hypertension in patients treated with inhibitors of the VEGF signaling pathway. *Cancer.* 2015 Jan 15; 121(2): 311–319.

12. Hayman S. R., Leung N., Grande J. P., Garovic V. D. VEGF inhibition, hypertension, and renal toxicity. *Curr Oncol Rep.* 2012 Aug; 14(4): 285–294.
13. Hye Khan M. A., Kolb L., Skibba M. et al. A novel dual PPAR- γ agonist/SEH inhibitor treats diabetic complications in a rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2018 Oct; 61(10): 2235–2246.
14. Jászai J., Schmidt M. H. H. Trends and Challenges in Tumor Anti-Angiogenic Therapies. *Cells.* 2019; 8(9): 1102.
15. Kitamoto Y., Tokunaga H., Miyamoto K., Tomita K. VEGF is an essential molecule for glomerular structuring. *Nephrol Dial Transplant.* 2002; 17(Suppl 9): 25–27.
16. Lankhorst S., Baelde H. J., Claessen-van Groningen M. C. et al. Effect of high salt diet on blood pressure and renal damage during vascular endothelial growth factor inhibition with sunitinib. *Nephrol Dial Transplant.* 2016; 31(6): 914–921.
17. Liu F., Zhang S., Xu R. et al. Melatonin Attenuates Endothelial-to-Mesenchymal Transition of Glomerular Endothelial Cells via Regulating miR-497/ROCK in Diabetic Nephropathy. *Kidney Blood Press Res.* 2018; 43(5): 1425–1436.
18. Ma Z., Zhu L., Liu Y. et al. Lovastatin Alleviates Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Glomeruli via Suppression of Oxidative Stress and TGF- β 1 Signaling. *Front Pharmacol.* 2017 Jul 18; 8: 473.
19. Machnik A., Dahlmann A., Kopp C. et al. Mononuclear phagocyte system depletion blocks interstitial tonicity-responsive enhancer binding protein/vascular endothelial growth factor C expression and induces salt-sensitive hypertension in rats. *Hypertension.* 2010; 55(3): 755–761.
20. Mantia C. M., McDermott D. F. Vascular endothelial growth factor and programmed death-1 pathway inhibitors in renal cell carcinoma. *Cancer.* 2019; 125(23): 4148–4157.
21. Nagasawa T., Hye Khan M. A., Imig J. D. Captopril attenuates hypertension and renal injury induced by the vascular endothelial growth factor inhibitor sorafenib. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2012 May; 39(5): 454–461.
22. Ollerio M., Sahali D. Inhibition of the VEGF signaling pathway and glomerular disorders. *Nephrol Dial Transplant.* 2015 Sep; 30(9): 1449–1455.
23. Piere-Velazquez S., Li Z., Jimenez S. A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol.* 2011; 179: 1074–1080.
24. Shankland S. J. The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2006 Jun; 69(12): 2131–2147.
25. Sugimoto H., Hamano Y., Charytan D., Cosgrove D., Kieran M., Sudhakar A., Kalluri R. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem.* 2003;278(15): 12605–12608.
26. Van den Meiracker A. H., Danser A. H. Mechanisms of Hypertension and Renal Injury During Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Inhibition. *Hypertension.* 2016; 68(1): 17–23.
27. Wu S., Chen J. J., Kudelka A. et al. Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol.* 2008 Feb; 9(2): 117–123.
28. Zhao L., Zhao J., Wang X. et al. Serum response factor induces endothelial-mesenchymal transition in glomerular endothelial cells to aggravate proteinuria in diabetic nephropathy. *Physiol Genomics.* 2016 Oct 1; 48(10): 711–718.

Надійшла до редколегії 22.04.2020
Отримано виправлений варіант 25.05.2020
Підписано до друку 25.05.2020

Received in the editorial 22.04.2020
Received a revised version on 25.05.2020
Signed in the press on 25.05.2020

А. Ставнійчук, асп.,
О. Савчук, д-р біол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна,
Абдул Хе Хан, д-р біол. наук,
Войцех К. Янкевіч, асп.,
Джон Д. Іміг, д-р біол. наук
Медичний коледж штату Вісконсин, Мілуокі, Вісконсин, США

МОДЕЛЬ КЛУБОЧКОВОЇ ХВОРОБИ НИРОК, ІНДУКОВАНА СОРАФЕНІБОМ

Пошкодження клубочків і протеїнурія є важливими патофізіологічними ознаками хронічного захворювання нирок. У статті надано дані, отримані з використанням моделі, розробленої на основі застосування антиракового препарату сорафеніб. Сорафеніб – інгібітор тирозинкінази, що діє через сигнальний шлях, пов'язаний із судинним ендотеліальним фактором росту і широко використовується для лікування різних видів раку. З іншого боку, сорафеніб викликає серйозні побічні ефекти в пацієнтів, серед яких і розвиток хронічного захворювання нирок. Зазначене дослідження було спрямоване на використання нефротоксичних властивостей сорафеніба для моделювання хронічного захворювання нирок у щурів. Показано, що у щурів, які отримували сорафеніб протягом 8 тижнів разом із дієтою з високим вмістом солі (8 % NaCl), розвивається гіпертонія з підвищеним артеріальним тиском систоли на 80 мм рт. ст., протеїнурія зі збільшенням вмісту білка на 75 %, і 4-кратним збільшенням гломерулярного пошкодження порівняно з контрольною групою. При пошкодженні ниркових клубочків, викликаних сорафенібом, значно знижується рівень транскриптів, що беруть участь у синтезі таких ключових гломерулярних білків, як нефрин, подоцин, синатподин і подопланін. Також при дослідженні цієї моделі спостерігається активація ендотеліально-мезенхімального переходу. У групі щурів, що отримували сорафеніб, рівень мРНК для маркера ендотеліальних клітин WT-1 був знижений на 20 % і водночас концентрація маркерів мезенхімальних клітин Col III, FSP-1, α -SMA і віментину збільшувалася у 2–3 рази. Отже, нами розроблено преклінічну модель хронічного захворювання нирок, що виражається в ушкодженні ниркових клубочків. Також продемонстровано, що пошкодження клубочків у цій моделі пов'язано зі зниженням експресії ключових структурних гломерулярних білків і активацією ендотеліально-мезенхімального переходу нирок.

Ключові слова: сорафеніб, фактор росту ендотеліальних судин, ушкодження клубочків.

А. Ставнийчук, асп.,
А. Савчук, д-р биол. наук
Киевский национальный университет имени Тараса Шевченка, Киев, Украина,
Абдул Хе Хан, д-р биол. наук,
Войцех К. Янкевич, асп.,
Джон Д. Имиг, д-р биол. наук,
Медицинский колледж штата Висконсин, Милуоки, Висконсин, США

СОРАФЕНИБ-ИНДУЦИРОВАННАЯ МОДЕЛЬ КЛУБОЧКОВОЙ БОЛЕЗНИ ПОЧЕК

Повреждение клубочков и протеинурия являются важными патофизиологическими признаками хронического заболевания почек. В статье представлены данные, полученные с использованием модели, разработанной на основе применения антиракового препарата сорафениб. Сорафениб – ингибитор тирозинкиназы, который действует через сигнальный путь, связанный с сосудистым эндотелиальным фактором роста и широко используется для лечения различных видов рака. С другой стороны, сорафениб вызывает серьезные побочные эффекты у пациентов, включая развитие хронического заболевания почек. Данное исследование было направлено на использование нефротоксических свойств сорафениба для моделирования хронического заболевания почек у крыс. Показано, что у крыс, получавших сорафениб в течение 8 недель вместе с диетой с высоким содержанием соли (8 % NaCl), развивается гипертония с повышенным систолическим артериальным давлением на 80 мм рт. ст., протеинурия с увеличением содержания белка на 75 %, и 4-кратным увеличением гломерулярного повреждения по сравнению с контрольной группой. При повреждении почечных клубочков, вызванных сорафенибом, значительно понижается уровень транскриптов, участвующих в синтезе таких ключевых гломерулярных белков, как нефрин, подоцин, синаптоподин и подоплазин. Также при исследовании этой модели наблюдается активация эндотелиально-мезенхимального перехода. В группе крыс, получивших сорафениб, уровень мРНК для маркера эндотелиальных клеток WT-1 был снижен на 20 % и одновременно содержание маркеров мезенхимальных клеток Col III, FSP-1, α -SMA и виментина увеличивалась в 2–3 раза. Таким образом, мы разработали преคลินิกую модель хронического заболевания почек, проявляющуюся в повреждении почечных клубочков. Мы также продемонстрировали, что повреждение клубочков в этой модели связано со снижением экспрессии ключевых структурных гломерулярных белков и активацией эндотелиально-мезенхимального перехода почек.

Ключевые слова: сорафениб, фактор роста эндотелия сосудов, повреждения клубочков.

УДК 579.64:633.11
DOI 10.17721/1728_2748.2020.81.31-36

С. Гудзь, асп.,
Л. Сквіва, д-р биол. наук
Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

ОСОБЛИВОСТИ ФОРМУВАННЯ ЕУБАКТЕРІАЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ РИЗОСФЕРИ ПШЕНИЦІ ОЗИМОЇ (*TRITICUM DURUM*) ЗА РІЗНИХ СИСТЕМ УДОБРЕННЯ

Досліджено кількісний, якісний склад і таксономічну структуру еубактеріального комплексу у ризосфері пшениці озимої при застосуванні різних систем удобрення. Мікробіологічними методами визначали вміст у ризосфері пшениці озимої мікроорганізмів, а молекулярними – таксономічну структуру та метабіотичний комплекс мікроорганізмів. Встановлено, що на варіантах біологічної системи удобрення пшениці озимої зростала частка мікроорганізмів родини *Proteobacteria* до 80,3 %, а чисельність представників *Actinobacteria* зменшувалась до 12,4 %, аналогічні показники зростання були помічені і на варіанті екологічної системи удобрення. Аналіз родин ґрунтової мікробіоти показав, що на посівах пшениці озимої за застосування різних варіантів удобрення домінуючими є представники *Alcaligenaceae* та *Pseudomonadaceae*. За промислової системи удобрення частка представників родини *Alcaligenaceae* була найвищою, за застосування біологічної та екологічної систем – знижувалась одночасно зі зростанням частки представників родини *Pseudomonadaceae*. Застосування органічних добрив, порівняно з мінеральними, сприяло формуванню різноманіття бактерій. Найбільше значення індексу Шеннона було за біологічної системи удобрення – 4,82.

Встановлено, що застосування біологічної системи удобрення супроводжувалося збільшенням видового різноманіття ґрунтової мікробіоти за рахунок філ *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, використання екологічної системи удобрення – за рахунок представників *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*. Абсолютними домінантами в дослідженій ґрунтовій мікробіоті, незалежно від застосованої системи удобрення, були представники бактеріальних філ *Proteobacteria* – 79,1 % та *Actinobacteria* – 14,0 %.

Ключові слова: ґрунтова мікробіота, системи удобрення, метабіот, піросеквенування, ризосфера.

Вступ. Мікроорганізми ґрунту є головними факторами впливу на мінералізацію, синтез і накопичення органічної речовини в агроценозах усіх без винятку сільськогосподарських культур [1]. Збалансованість мікробіоти ґрунту визначає, передусім, підтримання екологічної рівноваги та збереження ґрунтових агроєкосистем [2]. Дослідження вітчизняних учених доводять: різноманіття мікроорганізмів ґрунту, їхня структурна організація та чисельність є головними факторами, що визначають особливості формування ґрунту, його структурних елементів і родючості [3]. Як наслідок – різні ґрунти характеризуються відмінностями у видовому різноманітті мікроорганізмів. Кількість функціонуючих у ґрунті мікробних популяцій, що мають приналежність до різних видів, може свідчити про різноманіття ґрунтової біоти та спрямованість перебігу мікробіологічних процесів у ньому [4, 5].

Важливим питанням вивчення ґрунтової мікробіоти залишається ідентифікація видів які є домінантними, адже переважання певних мікроорганізмів – визначальний показник для характеристики типу агроєкосистеми [6]. Варто окремо зауважити, що різноманіття ґрунтових

мікроорганізмів визначає гомеостаз агроценозу та певною мірою нівелює вплив антропогенного навантаження. Система, що перебуває під тиском антропогенного навантаження, зі свого боку, реагує за рахунок перерозподілу домінантних видів мікроорганізмів, що може бути індикативним показником екологічного стану ґрунту [7].

Класичні методи вивчення мікробіоти ґрунту мають свої обмеження та дозволяють ідентифікувати лише мікроорганізми, здатні рости на відповідних селективних середовищах. За різними підрахунками такі мікроорганізми становлять від 0,1 до 10 % загального різноманіття мікроорганізмів ґрунту [8, 9].

Застосування молекулярно-біологічних методів для вивчення комплексу мікроорганізмів ґрунту дозволяє визначити закономірності перебігу мікробіологічних процесів у багатокомпонентних екосистемах, незалежно від можливості культивування окремих видів мікроорганізмів [10]. Такий аналіз дозволяє доволі точно ідентифікувати, окрім головних, і міnorні філи мікробіоти, зокрема: *OD1*, *TM7*, *Thermi*, *WS3*, *WYO* та визначити кількісні показники поширеності певних таксонів [11].