

І.В. Харчук, О.О. Андрухова, В.К. Рибальченко, О. Андрухов

Механізми нефротоксичності нової протипухлинної сполуки - похідного малеїміду MI-1

Досліджено особливості впливу похідного малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діону (MI-1) на життєздатність і апоптозіндуковану загибель епітеліоцитів проксимальних і дистальних канальців нирок, а також вміст у них загальної та фосфорильованої форми кінази ERK1/2 для встановлення можливих механізмів нефротоксичності MI-1. Дослідження впливу останнього на життєздатність та апоптоз епітеліоцитів канальців нирок проводили за допомогою 3,4,5-диметилтіазол-2-іл-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід (МТТ)-тесту та проточної цитометрії після фарбування специфічними антитілами до анексину V відповідно. Вміст ERK1/2 визначали за допомогою імуноблотингу. Встановлено, що MI-1 є більш токсичним відносно епітеліоцитів дистальних канальців, ніж проксимальних. До механізмів нефротоксичності MI-1 залучений апоптоз, а також підсилення фосфорильовання ERK1/2 у дистальних канальцях. Водночас збільшення вмісту ERK1/2 в проксимальних канальцях під впливом MI-1 може сприяти виживанню епітеліоцитів за умов дії токсичного чинника чи оксидативного стресу.

Ключові слова: похідні малеїміду (піроли), нефротоксичність, апоптоз, ERK1/2-сигнальний каскад.

ВСТУП

Одним з найбільш поширених супутніх ускладнень хіміотерапії є нефропатії, викликані цитостатичними препаратами, що значно обмежує ефективне лікування онкозахворювань. Тому визначальним критерієм у пошуку нових протипухлинних засобів є селективність їхньої дії [6, 17]. АТФ-конкурентний інгібітор тирозинкіназ похідне малеїміду 1-(4-Cl-бензил)-3-Cl-4-(CF₃-феніламіно)-1H-пірол-2,5-діон (MI-1) є потенційною протипухлинною сполукою з подвійним фармакологічним ефектом, оскільки здатний пригнічувати кінази, що задіяні як у ангіогенезі, так і у регуляції процесів проліферації та росту пухлин (EGF-R, FGF-R1, VEGF-R1-3, IGF1-R, INS-R, SRK, YES, ZAP70) [1]. MI-1 ефективно зменшує кількість пухлин і загальну площу ураження у щурів при хімічноіндукованому канцерогенезі товстого кишечника [11], а також попереджає пренеопластичні зміни у нирках за умов дії канцерогену [10].

Крім того, низька токсичність сполуки відносно тканин та органів тварин є хорошим аргументом на користь її подальшого дослідження для терапевтичного застосування [5].

Однак у дослідженнях з використанням тваринних моделей була виявлена деяка нефротоксичність MI-1 після 10- та 30-добового застосування [2, 3], що спонукало до більш детального вивчення цього питання. Виявлені структурні зміни у тубулярному, та меншою мірою, у гломерулярному апараті нирок, порушення гемодинаміки органа та незначне запалення в інтерстиції є характерними для початкових етапів медикаментозно індукованого тубуло-інтерстиційного нефриту [2]. Ураження нирок є більш суттєвим після 10 діб впливу 5 мг/кг MI-1, ніж після 30 діб 2,7 мг/кг сполуки [3]. У тубулярному апараті під дією MI-1 більшого ушкодження зазнають дистальні канальці (розширення, зменшення висоти епітелію, його десквамація). Після тривалого впливу (20 тиж) ці порушення є значно меншими [10]. Дослідження

© І.В. Харчук, О. Андрухова, В.К. Рибальченко, О. Андрухов

механізмів нефротоксичності MI-1 відносно тубулярного апарату нирок, є важливим завданням для встановлення ризиків, усунення можливих побічних ефектів і покращення якості життя пацієнтів.

Метою нашого дослідження було виявлення особливостей впливу MI-1 на життєздатність та апоптозіндуковану загибель епітеліоцитів проксимальних і дистальних канальців нирок для встановлення можливих механізмів його нефротоксичності.

МЕТОДИКА

Виділення сегментів ниркових канальців для органної культури. Сегменти ниркових канальців виділяли за методикою Burg і співавт. [7]. Для цього нирки мишей лінії C57BL/6 перфузували стерильним середовищем Ham's F12, GIBCO («Invitrogen», США), яке містило 1 мг/мл колагенази (тип II; «Sigma», США) і 1 мг/кг пронази Е (тип XXV; «Sigma», США) при рН 7,4 і 37°C. Тканину кори нирок подрібнювали (при 4°C) на шматочки 1-2 мм і поміщали при 37°C в середовище Ham's F12, що містило по 0,5 мг/мл колагенази II і пронази Е на 15 хв при інтенсивному струшуванні. Після центрифугування протягом 4 хв при 3000 об/хв ферментвмісний розчин видаляли і канальці ресуспендували в охолоджену середовищі, що містило 1%-й розчин антибіотик/антимікотик і ставили на лід.

Виділення і культивування епітеліоцитів проксимальних і дистальних ниркових канальців. Первинні епітеліоцити проксимальних і дистальних канальців нирок виділяли з мишей відповідно до методики Qi і співавт. [16] після обробки колагеназою та центрифугування у градієнті щільності та культивували у середовищі без сироватки. Експерименти з клітинами проксимальних і дистальних канальців та канальцевими сегментами проводили у середовищі з 5% CO₂ без сироватки при 37°C. Епітеліоцити інкубували з 1 і 10 мкмоль/л MI-1 протягом 4 та 24 год, а канальцеві сегменти органної

культури – у середовищі зі вказаними концентраціями впродовж 2 год. Для імуноблотингу були відібрані зразки сегментів і епітеліоцитів канальців.

Імуноблотинг. Білки були виділені в RIPA-буфері з інгібіторами протеаз. Зразки білків розділяли за допомогою електрофорезу на поліакриламідному гелі за наявності додецилсульфату натрію (50 мкг/лунку) і перенесли на нітроцелюлозні мембрани («Thermo Scientific», США), які інкубували 12 год при +4°C з первинними антитілами до загальної кінази (tERK1/2; «BD Biosciences», США) та фосфорильованої (pERK1/2; «Cell Signaling», США), а також антитілами до β-актину («Sigma», США) в 2 % (маса/об'єм) сироватки альбуміну бика («Sigma», США) в TBS (Tris-buffered saline) [150 ммоль/л NaCl, 10 ммоль/л трис-HCl (рН 7,4), 0,2% Твін-20]. Після промивки мембрани інкубували з вторинними антитілами, кон'югованими з пероксидазою хрому («Amersham Life Sciences», Великобританія). Специфічний сигнал візуалізували за допомогою системи хемілюмінесцентного виявлення для імуноблотингу ECL kit («Amersham Life Sciences», Великобританія). Смуги білків кількісно оцінювали за допомогою програми Total Lab v. 2.01. Рівні експресії були нормалізовані за зворотним забарвленням за допомогою Ponceau S. Рівні експресії pERK1/2 були нормалізовані до tERK1/2.

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 $2 \cdot 10^4$ клітин/лунку в 24-лункових планшетах. Епітеліоцити інкубували з 1 і 10 мкмоль/л MI-1 протягом 4 та 24 год (контрольні лунки не містили досліджуваних речовин). Кожна група клітин складалась із 6 окремих проб. Після культивування життєдіяльність клітин оцінювали за допомогою

МТТ-тесту, який проводили згідно з інструкцією виробника («Sigma», США). Клітини, що не підлягали впливу МІ-1, були взяті за контроль. Значення оптичної густини (D) при різних концентраціях були нормалізовані з середнім значенням контролю, яке приймали за 1. Результати представлені як $M \pm SD$, де M – середнє значення трьох незалежних експериментів, SD-стандартне відхилення. Після підтвердження нормального розподілу всіх результатів за допомогою тесту Колмогорова-Смірнова, статистично значима різниця між дослідними групами і контролем була проаналізована з використанням критерію t Стьюдента. Результати проаналізовані з використанням статистичної програми SPSS 14.0 («SPSS Inc», США). Різниця між дослідними групами і контролем вважалась статистично значимою при $P < 0,05$.

Апоптоз. Вивчення шляхів загибелі клітин здійснювали після їх фарбування специфічними антитілами з флюоресцентною міткою до анексину V, що зв'язується з фосфатидилсерином на клітинній поверхні та після фарбування йодидом пропідіуму, який є маркером мертвих клітин. Транслокація фосфатидилсерину з цитоплазматичного моношару плазматичної мембрани на зовнішній за допомогою ферменту скрамблази є однією з найбільш ранніх подій апоптозу. Клітини розсіювали в 6-лункові планшети в кількості $0,7 \cdot 10^6$ клітин/лунку в 3 мл середовища без сироватки. Дослідження апоптозу клітин

проводили після 24 год впливу речовини у концентраціях 1 і 10 мкмоль/л методом флюорисцентно-активованого розділення клітин (FACS, від англ. fluorescence-activated cell sorting) за допомогою проточної цитометрії («FACS Calibur, Becton Dickenson», США) з використанням програмного забезпечення CellQuest Software («BD Biosciences», США), що застосовується для встановлення відсоткового співвідношення апоптотичних і некротичних клітин. Результати розподіляли на чотири популяції (у відсотках від загальної кількості клітин): живі клітини; клітини на ранній стадії апоптозу; клітини, що загинули через апоптоз, та клітини, що загинули через некроз.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що після 4 год впливу МІ-1 рівень виживання епітеліоцитів проксимальних каналців становить 92–95 %. Збільшення часу експозиції клітин (24 год) до досліджуваних речовин викликає зменшення кількості живих клітин, однак вона залишається достатньо високою – 73–75 % (рис. 1, а).

Для епітеліоцитів дистальних каналців навпаки - більшого пригнічення клітини зазнають після короткочасного впливу МІ-1, кількість життєздатних клітин становить 72–73 %. Після 24 год цей показник збільшується до 90 % (див. рис. 1, б). Тобто виявлене за допомогою МТТ-тесту зменшення кількості життєздатних епітеліоцитів обох

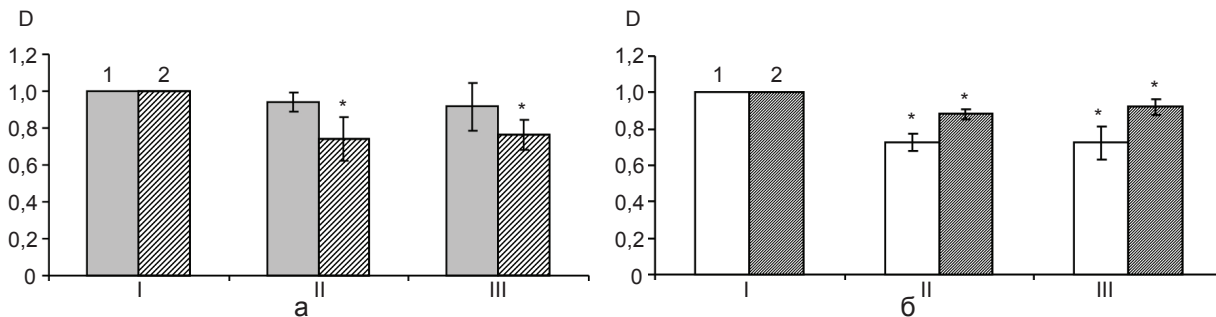


Рис. 1. Вплив похідного малеїміду МІ-1 на життєздатність клітин первинної лінії епітеліоцитів проксимальних (а) та дистальних каналців (б) нирок мишей після 4 (1) та 24 (2) год впливу: I – контроль, II – 1 мкмоль/л, III – 10 мкмоль/л. Клітини, що не підлягали впливу МІ-1, були взяті за контроль. D - значення оптичної густини при різних концентраціях, нормалізовані з середнім значенням контролю. * $P < 0,05$ відносно контролю

первинних ліній є таким, що вказує на низьку токсичність MI-1 відносно клітин тубулярного апарату нирок.

При вивченні апоптозу епітеліоцитів проксимальних каналців встановлено, що лише при більшій концентрації MI-1 кількість життєздатних клітин зменшується на 5 % за рахунок збільшення таких на ранній стадії апоптозу, а число тих, що загинули, залишається на рівні контролю (рис. 2, а). MI-1 викликає зменшення кількості життєздатних епітеліоцитів дистальних каналців з 87 у контролі до 60 %, трикратне збільшення клітин у ранній і віддаленій стадіях апоптозу, а також загиблих через некроз лише при досягненні концентрації 10 мкмоль/л (рис. 2, б).

Отримані результати свідчать про більшу резистентність до сполуки MI-1 епітеліоцитів проксимальних каналців порівняно з дистальними. Виявлена у попередніх гістологічних дослідженнях токсичність MI-1 відносно епітеліоцитів дистальних каналців [2, 3] підтвердилась отриманими результатами, що вказують на апоптозіндукований шлях загибелі клітин.

Відомо, що сигнальний шлях ERK1/2 залучений до патогенезу цисплатиніндукованої гострої ниркової недостатності [14, 15]. Фосфорилування ERK1/2 призводить до підсилення апоптозу у культурі клітин проксимальних каналців через активацію 3-каспази, а пригнічення - знижує рівень апоптозу [14]. Саме ураження цих каналців

спочатку вважалось основою для розвитку цисплатиніндукованої нефротоксичності. Однак подальші дослідження *in vivo* виявили переважну локалізацію pERK1/2 у дистальних каналцях [9] і при інших патологіях, наприклад при діабеті [7]. У мишей з гострою нирковою недостатністю цисплатин викликає фосфорилування ERK1/2 переважно в дистальних каналцях і збірних трубочках, а це в свою чергу призводить до опосередковано фактором некрозу пухлин α запалення і апоптозу через активацію 3-каспази. Застосування інгібітора U0126 до мітогенактивованої протеїнкінази кінази зменшувало фосфорилування ERK1/2 і значно покращувало функціональний і морфологічний стан тубулярного апарату [8]. Це можна використати для попередження нефротоксичності ліків, а збільшення вмісту pERK1/2, що відіграє ключову роль у патогенезі гострої ниркової недостатності, може бути індикатором потенційної нефротоксичності певного чинника.

У дослідженнях з використанням органної культури тканини кіркової зони нирок мишей, встановлено, що після 2 год інкубації з MI-1 у концентрації 1 та 10 мкмоль/л вміст tERK1/2 та pERK1/2 суттєво не змінюється порівняно з контролем (рис. 3). Однак після інкубації з MI-1 у більш високій концентрації вміст tERK1/2 в проксимальних каналцях зростає в 2,6 раза, а в дистальних каналцях майже не змінюється. Вміст pERK1/2 в проксимальних каналцях після інкубації з MI-1 зростає на

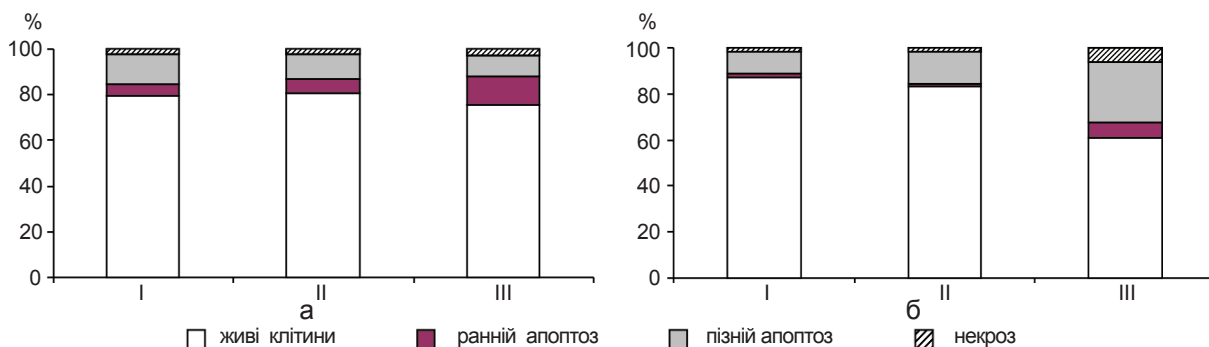


Рис. 2. Співвідношення життєздатних клітин, клітин на ранній стадії апоптозу, загиблих через апоптоз і некроз епітеліоцитів проксимальних (а) та дистальних каналців (б) після впливу похідного малеїміду MI-1 протягом 24 год: I – контроль, II – 1 мкмоль/л, III – 10 мкмоль/л. Клітини, що не підлягали впливу MI-1, були взяті за контроль

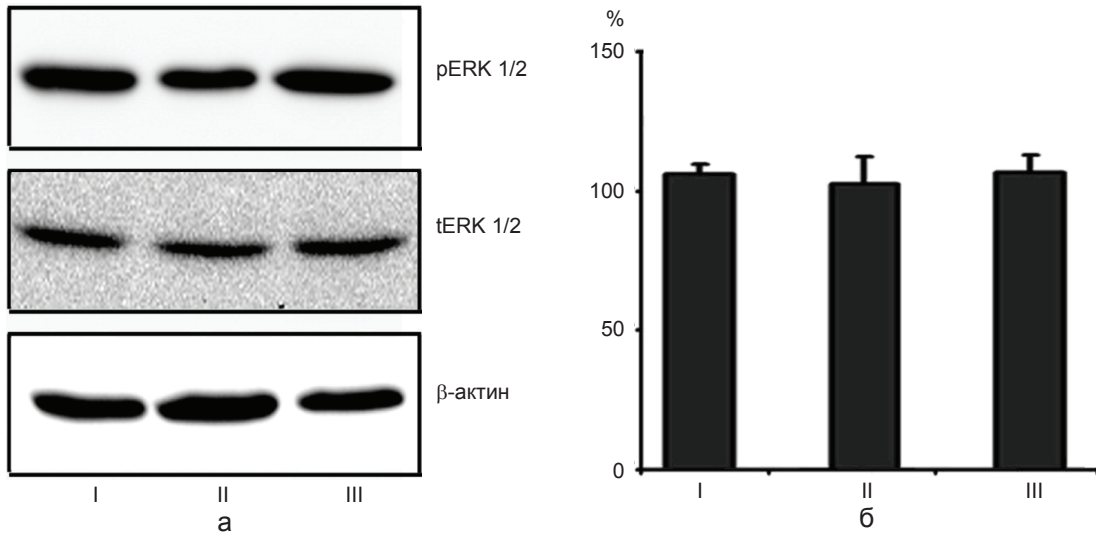


Рис. 3. Імуноблотинг фосфорильованої кінази (pERK1/2) і загальної (tERK1/2) (а) та співвідношення їх експресії (pERK1/2/tERK1/2) (б) у зразках білків з органної культури кори нирок мишей після 2 год впливу розчинника (I - контроль) або похідного малеїміду MI-1 (II - 1 мкмоль/л, III - 10 мкмоль/л)

25 %, в дистальних – на 50 % порівняно з контрольним рівнем. Подальша нормалізація вмісту pERK до tERK дала змогу встановити зниження цього показника в проксимальних каналцях ($pERK1/2/tERK1/2=48\pm 10\%$) та його збільшення в дистальних ($pERK1/2/tERK1/2=166,7\pm 12\%$; рис. 4).

Збільшення вмісту pERK1/2 у дистальних каналцях під впливом MI-1 (рис. 5) вказує на можливу токсичність сполуки відносно

тубулярного апарату нирок. Оскільки це збільшення в дистальних каналцях було в 2 рази вище, ніж у проксимальних, можна припустити, що MI-1 *in vivo* буде більше пошкоджувати перші, перешкоджаючи функціональній здатності цієї частини нефрону реабсорбувати фізіологічно необхідні для мінерального обміну організму такі електrolіти, як кальцій, калій та натрій. Як вже зазначалося, при дослідженні впливу MI-1

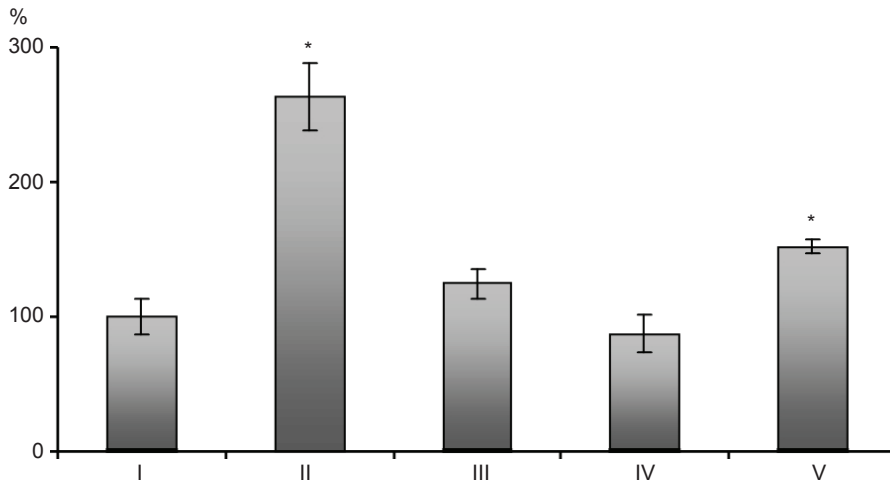


Рис. 4. Рівень експресії загальної кінази (tERK1/2) (II, IV) та фосфорильованої (pERK1/2) ERK1/2 (III, V) в органній культурі проксимальних (II, III) та дистальних каналців (IV, V) нирок мишей після 2 год впливу похідного малеїміду MI-1 в концентрації 10 мкмоль/л, нормалізований до контролю (I) – рівня експресії обох форм білка у органних культурах каналців, що не підлягали впливу MI-1. *P<0,05 відносно контролю

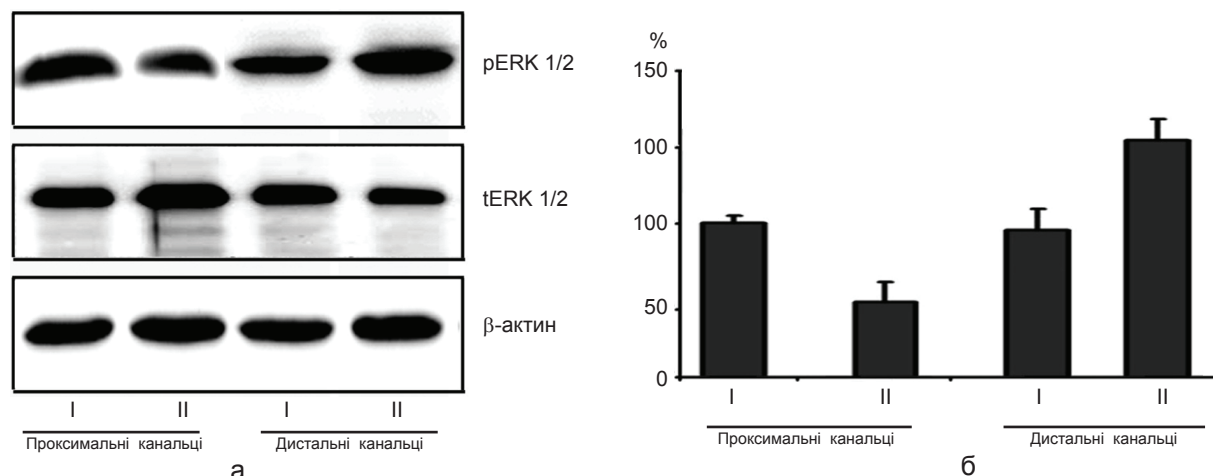


Рис. 5. Імуноблотинг фосфорильованої кінрази (pERK1/2) і загальної (tERK1/2) (а) та співвідношення їх експресії (pERK1/2/tERK1/2) (б) у зразках білків з органної культури проксимальних і дистальних каналців нирок мишей після 2 год впливу розчинника (I - контроль) або похідного малеїмиду MI-1 (II - 10 мкмоль/л). * P<0,05 відносно контролю

на морфологію нирок щурів дійсно була виявлена його більша токсичність відносно дистальних каналців [2].

З іншого боку відомо, що цисплатиніндукована активація ERK1/2 сигнального шляху захищає клітини від цисплатинової токсичності і залежить від *de novo* синтезу білка [15]. Крім того є дані, що ERK1/2 відіграє провідну роль у виживанні епітеліоцитів тубулярного апарату в умовах оксидативного стресу [12]. Збільшення загальної кількості ERK1/2 в проксимальних каналцях під впливом MI-1 може бути позитивним у разі канцерогенезу, коли тканини знаходяться в умовах порушення оксидантно-антиоксидантної рівноваги. Це збігається з даними морфологічних досліджень нирок за умов CoCl_2 -індукованого оксидативного стресу, в яких встановлена протективна дія MI-1 щодо тубулярного апарату нирок [4].

Таким чином, сполука MI-1 має низьку цитотоксичність відносно епітеліоцитів проксимальних і дистальних каналців нирок, до механізмів якої залучений апоптоз. Збільшення вмісту pERK1/2, особливо у дистальних каналцях, під впливом MI-1 вказує на те, що одним з можливих механізмів нефротоксичності MI-1 є підсилення

фосфорилування ERK1/2, що може призводити до апоптозу епітеліоцитів через активацію 3-каспази. Водночас збільшення вмісту tERK1/2 в проксимальних каналцях під впливом MI-1 може сприяти виживанню їх клітин за умов, наприклад, дії токсичного чинника чи оксидативного стресу. В цілому низька нефротоксичність сполуки MI-1 свідчить про перспективність подальших її досліджень.

И.В. Харчук, О. Андрухова, В.К. Рыбальченко, О. Андрухов

МЕХАНІЗМИ НЕФРОТОКСИЧНОСТІ НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО СОЄДИНЕННЯ - ПРОИЗВОДНОГО МАЛЕИМИДУ МИ-1

Исследованы особенности влияния производного малеи-мида 1-(4-Cl-бензил)-3-хлор-4-(CF₃-фениламино)-1Н-пиррол-2,5-дион (МИ-1) на жизнеспособность и апопто-зиндуцированную гибель эпителиоцитов проксимальных и дистальных канальцев почек, а также содержание общей и фосфорилированной форм киназы ERK1/2 в них для установления возможных механизмов нефротоксичности МИ-1. Исследование влияния последнего на жизнеспособность и апоптоз эпителиоцитов канальцев почек проводили с помощью 3,4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенил-тетразо-лиум бромид (МТТ)-теста и проточной цитометрии после окрашивания специфическими антителами к анексину V соответственно. Содержание ERK1/2 определяли с помощью иммуноблотинга. Установлено, что МИ-1 яв-

ляется более токсичным по отношению к эпителиоцитам дистальных канальцев, чем проксимальных. В механизмы цитотоксичности МИ-1 вовлечен апоптоз. Одним из возможных механизмов нефротоксичности соединения МИ-1 является усиление фосфорилирования ERK1/2 в дистальных канальцах. Одновременное увеличение общего количества ERK1/2 в проксимальных канальцах под влиянием МИ-1 может способствовать выживанию эпителиоцитов в условиях действия токсического фактора или оксидативного стресса.

Ключевые слова: производные малеимида (пиролы) нефротоксичность, апоптоз, ERK1/2 сигнальный каскад.

I.V. Kharchuk, O. Andrukhova, V.K. Rybalchenko, O. Andrukhov

MECHANISMS OF NEPHROTOXICITY OF NOVEL ANTICANCER COMPOUND MALEIMIDE DERIVATIVE MI-1

The features of the impact of the maleimide derivative 1-(4-Cl-benzyl)-3-chloro-4-(CF₃-fenilamino)-1H-pyrrole-2,5-dione (MI-1) on the viability and apoptosis-induced cell death of renal proximal and distal tubular epithelial cells and the amount of total and phosphorylated ERK1/2 were studied in order to establish possible mechanisms of nephrotoxicity induced by of MI-1. The viability and apoptosis of renal epithelial tubular cells after incubation with MI-1 were performed by 3,4,5-dymethyliazol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)-test and by flow cytometry after staining with specific antibodies to annexin V, respectively. The amount of ERK1/2 was determined by Western blotting. The data indicate that MI-1 was 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 MI-1 cytotoxicity. One of the possible mechanisms of MI-1 nephrotoxicity is increase in phosphorylation of ERK1/2 in the distal tubules. At the same time the increase amount of total ERK1/2 in proximal tubules under the influence of MI-1 may contribute to the survival of proximal tubular epithelial cells under the impact of a toxic factor or oxidative stress.

Key words: maleimide derivatives, nephrotoxicity, apoptosis, ERK1/2 signalling pathway.

Taras Shevchenko National University, Kyiv;

Vienna University of Animal Medicine, Austria

Vienna Medical University, Austria

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дубініна Г.Г., Головач С.М., Козловський В.О. Толмачов А.О., Воловенко Ю.М. Антипроліферативна дія нових похідних 1-(4-*R*-бензил)-3-*R*1-4-(*R*2-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діону // Журн. органіч. та фармацевт. хімії. – 2007. – Вип. 5, № 1. – С. 39–49.

2. Харчук І.В. Вивчення нефротоксичності похідного малеїміду 1-(4-*Cl*-бензил)-3-хлор-4-(*CF*₃-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діону // Соврем. пробл. токсикологии. – 2009. – № 2. – С. 46–49.
3. Харчук І.В., Карпезо Н.О., Островська Г.В., Рибальченко Т.В., Рибальченко В.К. Особливості морфо-функціонального стану нирок під впливом різних доз та тривалості дії потенційного цитостатика похідного малеїміду 1-(4-*Cl*-бензил)-3-*Cl*-4-(*CF*₃-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діону // Доп. НАН України. – 2009, № 10. – С. 185–188.
4. Харчук І.В., Карпезо Н.О., Філінська О.М., Яблонська С.В., Линчак О.В., Рибальченко В.К. Зниження нефротоксичного впливу оксидативного стресу похідним малеїміду 1-(4-*Cl*-бензил)-3-*Cl*-4-(*CF*₃-феніламіно)-1*H*-пірол-2,5-діоном // Урологія. – 2009. - № 1. – С. 27–31.
5. Яблонська С.В., Філінська О.М., Островська Г.В., Рибальченко В.К. Оцінка гепатотоксичності нового похідного малеїміду з цитостатичною активністю і його вплив на перекисне окислення та антиоксидантну систему печінки // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 3. – С. 83–92.
6. Arias J.L. Drug targeting strategies in cancer treatment: an overview // Mini Rev. Med. Chem. – 2011. – **11**, №1. – P. 1–17.
7. Burg M.B., Grantham J., Abramow M., Orloff J., Schafer J.A. Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons // J. Amer. Soc. Nephrol. – 1997. – **8**, №4 – P. 675–683.
8. Fujita H., Omori S., Ishikura K., Hida M., Awazu M. ERK and p38 mediate highglucose-induced hypertrophy and TGF-beta expression in renal tubular cells // Amer. J. Physiol. Renal Physiol. - 2004. – **286**, №1. – P. F120–F126.
9. Jo S.K.; Cho W.Y.; Sung S.A.; Kim H.K, Won N.H. MEK inhibitor, U0126, attenuates cisplatin-induced renal injury by decreasing inflammation and apoptosis // Kid. Int. – 2005. – **67**, № 2. – P. 458–466.
10. Kharchuk I., Filinska O., Yablonska S., Rybalchenko V. Preventive action of maleimide derivative 1-(4-*Cl*-benzil)-3-*Cl*-4-(*CF*₃-fenilamino)-1*H*-pyrrol-2,5-dion on rat's renal system in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis // Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Lublin – Polonia. – Sectio DDD. Pharmacia. – 2010. - **23**, № 2. – P. 191–195.
11. Lynchak O., Ostrovska G., Rybalchenko V. Effects of new maleimide derivate on the 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats // Gut «GASTRO 2009 UEGW/WCOG, London». – 2009. – 58 (Suppl. II). – P. A334.
12. di Mari J.F., Davis R., Safirstein R.L. MAPK activation determines renal epithelial cell survival during oxidative injury // Amer. J. Physiol. – 1999. – 277. – P. F195–F203.
13. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Meth. – 1983. – **65**, № 1-2. – P. 55–63.

14. Nowak G. Protein kinase C-alpha and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells // J. Biol. Chem. – 2002. – **277**, №45. – P. 43377–43388.
15. Persons D.L., Yazlovitskaya E.M., Cui W., Pelling J.C. Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin // Clin. Cancer Research. – 1999. – **5**. – P. 1007–1014.
16. Qi W., Johnson D.W., Vesey D.A., Pollock C.A., Chen X. Isolation, propagation and characterization of primary tubule cell culture from human kidney // Nephrology (Carlton). - 2007. – **12**. – P. 155–159.
17. Zhang J., Yang P.L., Gray N.S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors // Nature Rev. Cancer. – 2009. – **9**, № 11. – P. 28–39.

*Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка;
Віден. ун-т ветеринар. медицини, Австрія;
Віден. мед. ун-т, Австрія
E-mail: kharchukirina@ukr.net*

*Матеріал надійшов
до редакції 31.11.12*