

А. Л. Загайко, Т. А. Брюханова, Ю. И. Кочубей,
М. А. Мусмари, С. Н. Коваленко

Экспериментальное исследование фармакологической активности новых ингибиторов JNK

Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

Ключевые слова: JNK, инсулинорезистентность, сахарный диабет 2 типа, апоптоз, митоген-активируемые протеинкиназы, оксидативный стресс

Научные исследования последних лет в области медико-биологических наук направлены на изучение молекулярных механизмов развития повреждений и адаптации клеточных систем при патологических состояниях различного генеза. Основное внимание исследователей сконцентрировано на изучении механизмов регуляции апоптоза и дисбаланса окислительного метаболизма, которые составляют основу целого ряда заболеваний и патологических состояний [6].

Согласно данным литературы, развитие окислительного стресса вследствие интенсификации процессов свободно-радикального окисления приводит к генерации активных форм кислорода (АФК), что при дисфункции антиоксидантной системы обуславливает нарушения функционирования редокс-чувствительных внутриклеточных систем регуляции апоптоза, к которым относятся MAP-киназы: JNK и p38 [7–8].

JNK или c-Jun N-терминальные киназы – это группа серин-треониновых, стресс-активируемых протеинкиназ, которые участвуют в регуляции роста, дифференцировки, апоптоза, воспаления и других важных клеточных процессов. Активация JNK провоцируется накоплением АФК, цитокинов и т. д. и принимает непосредственное участие в патогенезе инсулинорезистентности (ИР), сахарного диабета 2 типа, метаболического синдрома, ате-

росклероза, сердечно-сосудистых заболеваний и других патологий, коррелирующих с этими состояниями [3, 5].

В развитии ИР выделяют четыре основных механизма: избыточное нерациональное питание и гиподинамия, ожирение, воспаление и стресс. Однако все перечисленные компоненты в конечном итоге реализуются в клетках по единому механизму: фосфорилированием непосредственного субстрата инсулинового рецептора – белка IRS (insulin receptor substrate), что обеспечивается разными протеинкиназами (AMPK, JNK1, IKK, S6K1, mTorC1, PKC). Нарушения в системе инсулиновой сигнализации на уровне белка IRS – основная причина резистентности к инсулину на клеточном уровне [2, 4]. Поскольку механизмы развития ИР связаны с активностью MAP-зависимой JNK, фосфорилирующей IRS, эффективным методом коррекции ИР может быть применение ингибиторов c-Jun N-терминальной киназы. В предварительных исследованиях *in vitro* было показано, что новые производные хиназолинов (соединения с шифрами 003, 004, 006), синтезированные в Национальном фармацевтическом университете под руководством профессора С. Н. Коваленко, проявляют JNK-ингибирующую активность.

Цель исследования – изучение активности новых производных хиназолинов при экспериментальной инсулинорезистентности у крыс.

Материалы и методы. В качестве экспериментальных животных использовали крыс-самцов линии Wistar. Инсулинорезистентность моделировали содержанием животных на диете, обогащенной фруктозой (60,3 % фруктозы,

18,3 % белка, 5,2 % жира), что сопровождалось развитием ожирения, нарушениями углеводного и липидного видов обмена [1]. Опытные животные массой 180–220 г были разделены на 8 экспериментальных групп (по 10 животных в каждой): интактный контроль (ИК) (животных содержали на стандартном рационе вивария ЦНИЛ НФаУ); контрольная патология (КП) (6 недель на фруктозной диете); КП+003 (4 недели на фруктозной диете и еще 2 недели на данной диете с ежедневным введением суспензии исследуемого вещества 003); КП+004 (4 недели на фруктозной диете и еще 2 недели на данной диете с ежедневным введением суспензии исследуемого вещества 004); КП+006 (4 недели на фруктозной диете и еще 2 недели на данной диете с ежедневным введением суспензии исследуемого вещества 006); 003 (4 недели на стандартном рационе и 2 недели получали суспензию исследуемого вещества 003); 004 (4 недели на стандартном рационе и 2 недели получали суспензию исследуемого вещества 004); 006 (4 недели на стандартном рационе и 2 недели получали суспензию исследуемого вещества 006). Животных декапитировали под хлоразоло-уретановым наркозом. Объектами исследования были сыворотка крови и гомогенат печени.

Исследования проводили в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Украина, 2001), с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985) и Этическим Кодексом Всемирной медицинской ассоциации (Хельсинская декларация, 1964).

Содержание глюкозы, свободных жирных кислот (СЖК) и триацилглицеролов (ТАГ) определяли с использованием стандартных наборов фирмы «Фелісит-Діагностика» (Украина) и фирмы «Lachema» (Чехия). Содержание ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) определяли спектрофотометрически с помощью реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [9]. Содержание восстановленного глутатиона определяли

спектрофотометрически по реакции с аллоксаном [9]. Уровень иммунореактивного инсулина (ИРИ) в сыворотке крови определяли с помощью стандартного набора «Рио-ИНС-ПГ-125I» (Беларусь) методом радиоиммунологического анализа «*in vitro*».

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA (StatSoftInc., США, версия 6.0). Значимость межгрупповых различий оценивали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение. Содержание крыс на диете с повышенным содержанием фруктозы в течение 6 недель приводило к почти двукратному увеличению уровня глюкозы в сыворотке крови животных группы КП. Аналогичную тенденцию наблюдали и в содержании ИРИ – его количество в группе КП в 1,4 раза выше, чем у интактных животных (табл. 1). На фоне гипергликемии это свидетельствует о развитии ИР – резком снижении афинности рецепторов клеток к действию инсулина. Введение исследуемых веществ предупреждало патологические изменения показателей гликемии и ИРИ в крови животных, которые получали высокофруктозную диету. При этом субстанция 006 проявила наиболее выраженное положительное влияние на содержание глюкозы и инсулина – это единственное соединение, которое достоверно снижало уровень ИРИ относительно группы КП и максимально нормализовало уровень глюкозы (достоверно не отличался от ИК).

Одновременно с гипергликемией и ИР у исследуемых животных развивались нарушения липидного обмена – наблюдали повышение в 3,5 раза уровня СЖК и в 3,4 раза – ТАГ (табл. 1). Это, вероятно, обусловлено ослаблением ингибирующего действия инсулина на процесс липолиза, что, в свою очередь, приводило к мобилизации жира из жировой ткани и активации синтеза атерогенной фракции – липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП). Повышение уровня СЖК в крови приводило в дальнейшем к усилению

гипергликемии и усугублению ИР, что обуславливало более тяжелое течение сахарного диабета. Развитие атерогенной дислипидемии провоцирует возникновение осложнений в виде прогрессирования атеросклероза и повышенного риска сердечно-сосудистых патологий.

Согласно данным литературы, в патогенезе ряда заболеваний и патологических состояний (в том числе сахарного диабета 2 типа и ИР) одну из ключевых ролей играет интенсификация процессов свободно-радикального окисления, что, в свою очередь, приводит к усилению образования и накоплению АФК, развитию окислительного стресса. Генерация АФК приводит к нарушениям функционирования редокс-чувствительных внутриклеточных систем регуляции апоптоза – митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК): JNK и p38. Одной из мишеней для действия АФК является активация JNK-сигнального пути, что приводит к нарушению про- и антиоксидантного равновесия.

Увеличение содержания в крови СЖК также приводит к генерации АФК и усилению процессов свободно-радикального окисления. Поэтому следующим этапом исследования было изучение влияния исследуемых веществ на содержание маркеров антиоксидант-

но-прооксидантного статуса (ВГ и ТБК-АП) в гомогенате печени животных (табл. 2).

Развитие ИР у подопытных животных приводило к нарушению прооксидантно-антиоксидантного равновесия, что подтверждалось увеличением содержания ТБК-АП продуктов на 75 % и снижением уровня антиоксиданта – восстановленного глутатиона (ВГ) на 23 % по сравнению с показателями группы ИК (табл. 2). Ни одно из исследуемых веществ не вызывало достоверного повышения содержания ВГ в гомогенате печени, что свидетельствовало об отсутствии у них выраженного влияния на этот маркер антиоксидантной защиты. Введение исследуемых соединений приводило к некоторому уменьшению содержания ТБК-АП в гомогенате печени крыс с ИР, однако этот показатель достоверно отличался от аналогичного как у животных группы ИК, так и животных группы КП. Полученные результаты на фоне отсутствия влияния исследуемых веществ на содержание ВГ, по нашему мнению, нельзя рассматривать как проявление эффективной антиоксидантной активности. Это позволяет предположить у изученных веществ механизм действия, базирующийся на ингибировании JNK, а не на непосредственном стабилизирующем действии в отношении мембраны

Таблица 1

Содержание глюкозы, иммунореактивного инсулина, свободных жирных кислот и триацилглицеролов в сыворотке крови при экспериментальной инсулинорезистентности и введении исследуемых веществ (M ± m, n = 10)

ИК	КП	КП+003	КП+004	КП+006	003	004	006
Глюкоза, ммоль/л							
5,4 ± 0,1	9,1 ± 0,2*	7,5 ± 0,3**	7,9 ± 0,2**	6,8 ± 0,2**	5,8 ± 0,3	6,0 ± 0,2	5,6 ± 0,2
Иммунореактивный инсулин, пмоль/л							
115,21 ± 10,75	166,45 ± 14,15	135,45 ± 111,55	142,15 ± 12,35	118,25 ± 10,85**	128,35 ± 10,10	120,10 ± 111,55	116,25 ± 10,15
Свободные жирные кислоты, ммоль/л							
0,39 ± 0,04	1,35 ± 0,12*	0,61 ± 0,02**	0,92 ± 0,04**	0,45 ± 0,03**	0,46 ± 0,03	0,49 ± 0,03	0,40 ± 0,02
Триацилглицеролы, ммоль/л							
0,92 ± 0,05	3,13 ± 0,11*	1,36 ± 0,11**	1,66 ± 0,13**	1,22 ± 0,12**	0,99 ± 0,08	1,11 ± 0,05	0,94 ± 0,07

Примечание. Здесь и в табл. 2: *отклонение достоверно относительно ИК (p ≤ 0,05),

**отклонение достоверно относительно КП (p ≤ 0,05).

Содержание восстановленного глутатиона, ТБК-активных продуктов в гомогенате печени крыс при экспериментальной инсулинорезистентности и/или введении исследуемых веществ (M ± m, n = 10)

ИК	КП	КП+003	КП+004	КП+006	003	004	006
Восстановленный глутатион, мг/г							
0,91 ± 0,07	0,70 ± 0,04*	0,82 ± 0,06	0,85 ± 0,08	0,79 ± 0,05	0,90 ± 0,07	0,89 ± 0,07	0,91 ± 0,08
ТБК-активные продукты, нмоль/г							
2,94 ± 0,28	5,15 ± 0,25*	3,89 ± 0,12*/**	4,15 ± 0,18*/**	3,75 ± 0,12*/**	2,98 ± 0,13	3,01 ± 0,23	2,93 ± 0,14

митохондрий. Такой механизм действия обуславливает спектр фармакологической активности исследуемых соединений: уменьшение степени выраженности ИР и нормализацию показателей липидного обмена на фоне модельной патологии. Подтверждением предполагаемого механизма действия данных веществ также является отсутствие их влияния на изучаемые показатели у интактных животных. Таким образом, свою активность они проявляют только при состояниях, которые сопровождаются активацией JNK.

Выводы

1. Содержание животных на диете, обогащенной фруктозой, приводит к гипергликемии и развитию ИР. Это патологическое состояние сопровождается нарушениями липидного обмена (повышение содержания СЖК и ТАГ в сыворотке крови) и изменением антиоксидантно-прооксидантного статуса (увеличение содержания ТБК-АП и уменьшение уровня ВГ).

2. Введение животным с экспериментальной моделью гипергликемии новых

производных хиназолинов (003, 004, 006), которые в скрининговых исследованиях *in vitro* проявляли JNK-ингибирующую активность, приводило к нормализации показателей гликемии и содержания ИРИ в сыворотке крови, коррекции показателей липидного обмена. Среди всех исследованных соединений максимальную эффективность на фоне высокофруктозной диеты проявило вещество под шифром «006».

3. Новые производные хиназолинов не обладали выраженными антиоксидантными свойствами при введении животным с экспериментальной моделью гипергликемии, что подтверждает предполагаемый механизм их действия – ингибирование JNK.

4. Поскольку все изученные соединения не оказывали влияния ни на один из исследуемых показателей у интактных животных, а реализовали свое действие только на фоне состояния, которое сопровождалось активацией JNK (ИР), можно рекомендовать их использование для коррекции состояний, патогенез которых сопровождается активацией JNK-сигнального пути.

1. Endothelial dysfunction in high fructose containing diet fed rats: increased nitric oxide and decreased endothelin-1 levels in liver tissue / M. Altas, A. Var, K. Ozbilgin [et al.] // Dicle University Med School. – 2010. – V. 37, № 3. – P. 193–198.
2. Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism / Belgardt B. F., Mauer J., Wunderlich F. T. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2010. – V. 107. – P. 6028–6033.
3. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges / M. A. Bogoyevitch, K. R. Ngoei, T. T. Zhao [et al.] // BiochimBiophysActa. – 2010. – V. 1804, № 3. – P. 463–475.
4. Cheng Z. Insulin signaling meets mitochondria in metabolism/ Cheng Z., Tseng Y. and White M. F. // Trends Endocrinol. Metab. – 2010. – V. 21. – P. 589–598.
5. Karpac J. Insulin and JNK: optimizing metabolic homeostasis and lifespan / Karpac J. and Jasper H. // Trends Endocrinol. Metab. – 2009. – V. 20. – P. 100–106.
6. Reed J. C. Apoptosis: physiology and pathology / J. C. Reed, D. R. Green. — Cambridge : Cambridge University Press, 2011. – P. 421.

7. Seki E. A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches / E. Seki, D. A. Brenner, M. Karin / Gastroenterology. – 2012. – V. 143, № 2. – P. 307–320.
8. Роль редокс-зависимых сигнальных систем в регуляции апоптоза при окислительном стрессе / Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, Н. Ю. Часовских [и др.] // Цитология. – 2009. – Т. 51, № 4. – С. 329–334.
9. Строев Е. А. Практикум по биологической химии / Строев Е. А., Макарова В. Г. – М. : Высшая школа, 1986. – 231 с.

А. Л. Загайко, Т. А. Брюханова, Ю. И. Кочубей, М. А. Мусмари, С. Н. Коваленко
Экспериментальное исследование фармакологической активности
новых ингибиторов JNK

JNK или c-JunN-терминальные киназы – это группа стресс-активируемых протеинкиназ, которые принимают участие в процессе апоптоза, дифференцировке клеток и регуляции окислительного метаболизма, что играет важную роль в патогенезе ряда заболеваний и патологических состояний. Активация JNK непосредственно сопровождается формированием инсулинорезистентности (ИР), сахарного диабета 2 типа, метаболического синдрома, атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. Основным механизмом развития ИР на клеточном уровне – нарушения в системе инсулиновой сигнализации на уровне белка IRS (insulin receptor substrate). Потому применение ингибиторов JNK, ферментов, которые фосфорилируют IRS, может быть одним из наиболее эффективных методов коррекции этого состояния. В скрининговых исследованиях *in vitro* показано наличие JNK – ингибирующей активности у новых производных хиназолинов.

Цель исследования – изучение фармакологической активности новых производных хиназолинов при экспериментальной инсулинорезистентности у крыс.

Инсулинорезистентность моделировали содержанием крыс на высокофруктозной диете. Изучали влияние исследуемых соединений на содержание глюкозы, иммунореактивного инсулина, показатели липидного обмена в сыворотке крови животных и на маркеры антиоксидантно-прооксидантного статуса в гомогенате печени.

У животных, которые содержались на высокофруктозной диете, наблюдалось значительное увеличение уровня глюкозы и иммунореактивного инсулина в сыворотке крови, увеличение содержания триацилглицеридов и свободных жирных кислот. Введение исследуемых производных хиназолина приводило к нормализации вышеупомянутых показателей, среди которых наибольшую эффективность проявило соединение под номером «006». Изученные вещества не проявляли значимого влияния на антиоксидантную систему, что объясняется их предполагаемым механизмом действия – ингибированием JNK.

Поскольку данные вещества не влияли на исследуемые показатели у интактных животных, а проявляли свою активность только в условиях активации JNK, их можно рассматривать в качестве перспективных корректоров патологических состояний, в патогенез которых включены сигнальные механизмы JNK.

Ключевые слова: JNK, инсулинорезистентность, сахарный диабет 2 типа, апоптоз, митоген-активируемые протеинкиназы, окислительный стресс

А. Л. Загайко, Т. О. Брюханова, Ю. І. Кочубей, М. А. Мусмарі, С. М. Коваленко
Експериментальне дослідження фармакологічної активності
нових інгібіторів JNK

JNK або c-JunN-термінальні кінази – це група серин-треонінових, стрес-активованих протеїніназ, що беруть участь у процесах апоптозу, диференціюванні клітин та регуляції окисного метаболізму, що відіграє важливу роль у патогенезі низки патологічних станів та розвитку ряду захворювань. Активация JNK безпосередньо супроводжує розвиток інсулінорезистентності (ІР), цукрового діабету 2 типу, метаболічного синдрому, атеросклерозу та серцево-судинних захворювань. Основний механізм розвитку ІР на клітинному рівні – порушення в системі інсулінової сигналізації на рівні білка IRS (insulin receptor substrate). Тому застосування інгібіторів JNK, що фосфорилують IRS, може бути одним із найефективніших методів корекції цього стану. У попередніх дослідженнях *in vitro* показано наявність JNK-інгібуючої активності в нових похідних хіназолінів.

Мета дослідження – вивчення фармакологічної активності нових похідних хіназолінів за експериментальної інсулінорезистентності у щурів.

Інсулінорезистентність моделювали утриманням щурів на збагаченій фруктозою дієті. Вивчали вплив досліджуваних похідних хіназоліну на вміст глюкози, імунореактивного інсуліну, показники ліпідного обміну в сироватці крові тварин та на маркери антиоксидантно-прооксидантного статусу в гомогенаті печінки.

У тварин, яких утримували на високофруктозній дієті, спостерігали значне підвищення рівня глюкози та імунореактивного інсуліну в сироватці крові, збільшення вмісту триацилгліцеролів та вільних жирних кислот. Введення досліджуваних речовин призводило до нормалізації вищезазначених

показників, серед яких найбільшу ефективність виявила сполука під номером «006». Вивчені речовини не виявили значущого впливу на антиоксидантну систему, що пояснюється їх передбачуваним механізмом дії – інгібуванням JNK.

Оскільки дані сполуки не чинили впливу на досліджувані показники в інтактних тварин, а виявляли свою дію тільки за умов активації JNK, їх можна розглядати як перспективні коректори патологічних станів, до патогенезу яких залучені сигнальні механізми JNK.

Ключові слова: JNK, інсулінорезистентність, цукровий діабет 2 типу, апоптоз, мітоген-активовані протеїнкінази, оксидативний стрес

A. L. Zagayko, T. A. Briukhanova, Y. I. Kochubey, M. A. Musmari, S. N. Kovalenko
Experimental research of JNK new inhibitors' pharmacological activity

JNK or c-JunN-terminal kinases are the groups of serine-threonine stress-activated protein kinases that take part in apoptosis, cells differentiation and oxydative metabolism regulation, which play an important role in the pathogenesis of several diseases and pathological conditions. JNK activation is also associated with development of insulin resistance (IR), type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome, atherosclerosis and cardiovascular diseases. The main IR pathogenesis at a cellular level is insulin signaling system disorder at the IRS protein level (insulin receptor substrate). So the use of inhibitors of JNK, enzymes that phosphorylate IRS, may be one of the most effective methods of this state correction. *In vitro* scrining studies demonstrated the presence of JNK – inhibitory activity in the new quinazoline derivatives.

The aim of this research was to study pharmacological activity of new synthesized quinazoline derivatives under modelling of insulin resistance on rats.

Insulin resistance was modeled by animal housing on enriched fructose diet. The influence of the test substances on the glucose content, immunoreactive insulin level, lipid metabolism parameters at animals' blood serum and on the markers of antioxidant-prooxidant status in rat liver homogenate was studied.

There were observed a significant increase in glucose, immunoreactive insulin, triacylglycerol and free fatty acids levels in blood serum of rats, receiving high fructose diet. Injections of test substances carried out to the above mentioned parameters normalization. The highest efficiency among all test substances showed the compound with the number of «006». The studied substances didn't show significant influence on antioxidant system that can be explained by the predictable mechanism of action – JNK inhibition.

As these substances didn't have an effect on the studied parameters in the intact animals and exhibit their activity under the conditions of JNK activation only, they can be considered as prospective malconditions correctors that have JNK signaling system in the pathogenesis.

Key words: JNK, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, apoptosis, mitogen-activated protein kinases, oxidative stress

Поступила: 08.12.2014 г.

Контактное лицо: Загайко А. Л., Национальный фармацевтический университет, д. 12, ул. Мельникова, г. Харьков, 61140.