

УДК 577.126:57.042

А. Л. ЗАГАЙКО, В. П. ФИЛИМОНЕНКО, І. Ю. КАПУСТЯНСЬКИЙ,
С. М. КОВАЛЕНКО, Л. В. ЄВСЄЄВА

Національний фармацевтичний університет

**ПОШУК ІНГІБІТОРІВ C-JUN N-КІНЦЕВИХ КІНАЗ (JNK)
СЕРЕД 4-N-(3-ЦІАНОФЕНІЛ)АМІНО- ТА
4-N-(4-ЦІАНОФЕНІЛ)АМІНОЗАМІЩЕНИХ ХІНАЗОЛІНІВ**

Проведено дослідження JNK-інгібуючої активності синтезованих речовин – похідних 4-N-ариламінозаміщених хіназолінів на тлі введення активатора JNK ацетамінофену *in vitro*. Встановлено, що речовина 006 (6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназолін) зменшує вміст фосфорильованої JNK, тобто попереджає її активацію. При цьому спостерігається зниження активності АЛТ, викликане ацетамінофеном. Отримані дані свідчать, що захисна дія зазначеної речовини пов'язана не з антиоксидантною активністю, а з інгібуючим впливом на активацію JNK.

Ключові слова: JNK; ацетамінофен (АРАР); інгібітори JNK; гепатоцити; АЛТ; ТБК-реактивні продукти

ВСТУП

Спрямований пошук біологічно активних сполук, що діють на заздалегідь визначену терапевтичну мішень – сучасний напрямок створення новітніх лікарських засобів.

C-jun N-кінцеві кінази (JNK) – ферменти, що беруть участь у передачі сигналів від клітинної мембрани до ядра та апарату генної транскрипції та відіграють ключову роль у розвитку багатьох захворювань людини, зокрема, різних видів пухлин, серцево-судинних розладів, діабету, шизофренії, порушень імунітету [9, 10]. Як головні учасники внутрішньоклітинної мережі трансдукції поза- і внутрішньоклітинних сигналів JNK є регуляторами багатьох клітинних процесів, у тому числі процесу регулювання чутливості клітин до інсуліну.

Отримані експериментальні докази підтверджують наявність тісного зв'язку між активацією JNK та розвитком патологічних станів, пов'язаних з інсулінорезистентністю клітин, таких як ожиріння, атеросклероз, цукровий діабет [10].

Пошук нових молекул та розробка фармацевтичних засобів, здатних діяти як інгібітори JNK, є надзвичайно актуальною проблемою, оскільки в сучасному суспільстві спостерігається значне зростання таких глобальних захворювань людини, як цукровий діабет 2-го типу і атеросклероз.

Одним із перспективних класів хімічних сполук, здатних інгібувати каталітичну активність кіназ, є похідні 4-N-ариламінозаміщених хіназолінів. Метою

цього дослідження було вивчення потенційної активності ряду синтезованих речовин цієї групи щодо JNK.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В якості об'єктів біологічних досліджень були обрані 4-N-(3-ціанофеніл)аміно- та 4-N-(4-ціанофеніл)амінозаміщені хіназоліни (табл. 1), які показали високу вірогідність бажаної активності при проведенні комп'ютерного прогнозування (сполуки 001-006).

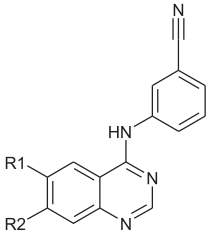
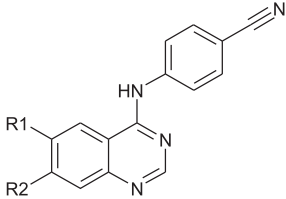
Досліди проводили *in vitro* в інкубаційному середовищі гепатоцитів щурів. Щурів лінії Wistar масою 180-220 г утримували на стандартному раціоні віварію НФаУ. При виконанні експериментів дотримувались «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), гармонізованих із «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Виділення гепатоцитів проводили за модифікованим методом Seglen [8] із печінки самців щурів лінії Wistar. Печінку подрібнювали, суспензію з фрагментами печінки інкубували впродовж 1-2 хв, клітини фільтрували крізь нейлоновий сітчастий фільтр із діаметром пор 100 мкм. Гепатоцити витримували над льодом впродовж всього процесу. Кінцевий осад клітин переважно містив 90 % гепатоцитів. Далі клітини інкубували в середовищі Кребса-Хенселейта впродовж 20 год при 37 °С в атмосфері O₂/CO₂ (95:5).

Середовище інкубації гепатоцитів містило активатор JNK ацетамінофен (АРАР) у концентрації 2,5 мМ та досліджувані речовини в концентраціях 25, 50 або 100 мкМ, або тільки досліджувані речовини. В інкубаційному середовищі визначали активність аланін-

Таблиця 1

ЗАГАЛЬНІ ФОРМУЛИ СПОЛУК, ДЛЯ ЯКИХ ПРОВЕДЕНІ ДОСЛІДЖЕННЯ JNK-ІНГІБУЮЧОЇ АКТИВНОСТІ

4- <i>N</i> -(3-Ціанофеніл)амінозаміщені хіназоліни		4- <i>N</i> -(4-Ціанофеніл)амінозаміщені хіназоліни	
			
Код речовини	R	Код речовини	R ₁
001	R ₁ =Cl, R ₂ = H	002	R ₁ =Cl, R ₂ = H
003	R ₁ = R ₂ = H -	004	R ₁ = R ₂ = H
005	R ₁ = R ₂ = OCH ₃	006	R ₁ = R ₂ = OCH ₃

аміотрансферази (АЛТ) із використанням стандартних наборів реактивів фірми «Філісіт-Діагностика» (Дніпропетровськ, Україна). Вміст ТБК-реактивних продуктів визначали спектрофотометрично за допомогою реакції з тіобарбітуровою кислотою [2].

Для визначення рівня загальної JNK використовували набір реактивів Total JNK Pan Specific DuoSet IC ELISA (R & D Systems, Inc., USA), для визначення рівня фосфорильованої JNK (p-JNK) – набір реактивів [pThr183/Tyr185] JNK1 / 2 EIA kit (Enzo Life Sciences).

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми STATISTICA (StatSoft

Inc., США, версія 6.0). Значимість міжгрупових відмінностей оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі досліджень визначали вплив досліджуваних речовин на активність АЛТ у культуральному середовищі гепатоцитів, а також їх дію на досліджуваний показник у присутності гепатотоксину АРАР. Отримані результати наведені в табл. 2.

Нами було встановлено, що при інкубації ізольованих гепатоцитів у присутності досліджуваних речовин активність АЛТ достовірно не змінюється.

Таблиця 2

ВПЛИВ ДОСЛІДЖУВАНИХ РЕЧОВИН І АЦЕТАМІНОФЕНУ НА АКТИВНІСТЬ АЛТ В ІНКУБАЦІЙНОМУ СЕРЕДОВИЩІ ГЕПАТОЦИТІВ (M±m, n=6, мкмоль/год*мл У ПЕРЕРАХУНКУ НА 1*10⁶ КЛІТИН)

Речовина		Концентрація	Речовина	АРАР + речовина
Інтакт	0,054±0,002			
Контроль (твін)	0,054±0,003			
АРАР	0,126±0,024*			
001	-	25 мкМ	0,053±0,002	0,066±0,021*
		50 мкМ	0,055±0,001	0,119±0,019
		100 мкМ	0,054±0,001	0,132±0,015
002	-	25 мкМ	0,055±0,001	0,138±0,019
		50 мкМ	0,053±0,001	0,089±0,013*
		100 мкМ	0,055±0,001	0,146±0,024
003	-	25 мкМ	0,054±0,002	0,116±0,016
		50 мкМ	0,054±0,001	0,113±0,009
		100 мкМ	0,053±0,001	0,129±0,019
004	-	25 мкМ	0,053±0,001	0,121±0,021
		50 мкМ	0,054±0,001	0,120±0,018
		100 мкМ	0,053±0,003	0,119±0,019
005	-	25 мкМ	0,053±0,002	0,115±0,013
		50 мкМ	0,053±0,002	0,119±0,021
		100 мкМ	0,053±0,002	0,122±0,014
006	-	25 мкМ	0,054±0,001	0,089±0,011*
		50 мкМ	0,054±0,0015	0,067±0,017*
		100 мкМ	0,054±0,0011	0,059±0,009*

* - Відхилення достовірно щодо інтактних (p ≤ 0,05); # - відхилення достовірно щодо АРАР (p ≤ 0,05).

Таблиця 3

ВПЛИВ ДОСЛІДЖУВАНИХ РЕЧОВИН ТА АЦЕТАМІНОФЕНУ НА КІЛЬКІСТЬ ІЗОЛЬОВАНИХ ГЕПАТОЦИТІВ, ЗАБАРВЛЕНИХ ТРИПАНОВИМ СИНІМ ($M \pm m$, $n=6$, % ВІД ЗАГАЛЬНОЇ КІЛЬКОСТІ КЛІТИН)

Речовина		Концентрація	Речовина	АРАР + речовина
Інтакт	97±3	-	-	-
Контроль (твін)	96±2	-	-	-
АРАР	74±8*	-	-	-
001	-	25 мкМ	98±2	92±6#
		50 мкМ	96±4	81±8*
		100 мкМ	93±7	75±4*
002	-	25 мкМ	95±4	73±1*
		50 мкМ	98±3	93±5*#
		100 мкМ	92±9	77±8*
003	-	25 мкМ	95±6	73±6*
		50 мкМ	95±8	75±7*
		100 мкМ	93±7	75±5*
004	-	25 мкМ	98±4	71±5*
		50 мкМ	96±3	77±7*
		100 мкМ	97±4	81±3*
005	-	25 мкМ	92±8	73±11*
		50 мкМ	95±7	79±7*
		100 мкМ	94±8	75±6*
006	-	25 мкМ	94±7	83±7*
		50 мкМ	95±8	88±6*
		100 мкМ	98±2	91±8*

* – Відхилення достовірне щодо інтактних тварин ($p \leq 0,05$); # – відхилення достовірне щодо АРАР ($p \leq 0,05$)

Відомо, що АЛТ є важливим гепатоспецифічним маркером цитолізу. Збільшення активності цього ферменту при інкубації клітин печінки може свідчити про порушення цілісності мембран ізольованих гепатоцитів [1]. Отримані нами дані щодо стабільного рівня активності АЛТ для досліджуваних речовин можуть свідчити про те, що дані речовини не чинять негативного впливу на мембрани гепатоцитів. Отримані дані також можуть бути підтверджені даними щодо забарвлення ізольованих гепатоцитів. Результати наведені в табл. 3.

Ацетамінофен (парацетамол, АРАР) широко застосовується як анальгетичний і піралгетичний засіб, що спричиняє істотне ураження центральнонобулярних областей печінки при передозуванні [3].

Одночасно АРАР широко застосовується як модельний токсин для з'ясування механізмів гепатотоксичності та пошуку нових гепатопротекторів. Тому механізми гепатотоксичності АРАР у достатній мірі вивчені. Так, було встановлено, що фосфорилування і транслокація JNK є невід'ємною частиною виявлення токсичної дії АРАР [4]. Активація JNK-кіназ під дією АРАР на ізольовані гепатоцити відбувається через 2 год експерименту [10]. Збільшення активності АЛТ корелює з токсичною дією АРАР і проявами цитотоксичності [5].

Отримані результати свідчать про те, що речовини 001, 002 і 006 достовірно знижують активність АЛТ у середовищі гепатоцитів, які інкубували в присут-

Таблиця 4

ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ СИНТЕТИЧНИХ ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ JNK ЩОДО УТВОРЕННЯ ТБК-РЕАКТИВНИХ ПРОДУКТІВ ($M \pm m$, $n=6$, нмоль/мг БІЛКА)

Умови експерименту		Значення
речовина	концентрація	
Інтакт		0,371±0,012
001	25 мкМ	0,333±0,011*
	50 мкМ	0,415±0,024
	100 мкМ	0,394±0,019
002	25 мкМ	0,350±0,014
	50 мкМ	0,340±0,009*
	100 мкМ	0,462±0,024
003	25 мкМ	0,569±0,028
	50 мкМ	0,470±0,019
	100 мкМ	0,400±0,023
004	25 мкМ	0,445±0,021
	50 мкМ	0,525±0,025
	100 мкМ	0,484±0,014
005	25 мкМ	0,427±0,009
	50 мкМ	0,520±0,019
	100 мкМ	0,330±0,023*
006	25 мкМ	0,393±0,024
	50 мкМ	0,410±0,018
	100 мкМ	0,393±0,017

* – Відхилення достовірне щодо інтактних тварин ($p \leq 0,05$).

**ВПЛИВ АРАР І РЕЧОВИНИ 006 НА РІВЕНЬ ЗАГАЛЬНОЇ ТА p-JNK В ІЗОЛЬОВАНИХ
ГЕПАТОЦИТАХ ЩУРІВ (M±m, n=6, нг / мг БІЛКА)**

Показник	Інтакт	Контроль	АРАР	АРАР + 006 (50 мкМ)	АРАР + 006 (100 мкМ)	006 (50 мкМ)	006 (100 мкМ)
JNK	286±12	283±8	294±11	290±13	284±14	291±11	286±8
p-JNK	93±7	89±8	154±14*	129±9*#	119±7*#	88±6	89±7

* – Відхилення достовірне щодо інтактних тварин ($p \leq 0,05$); # – відхилення достовірне щодо АРАР ($p \leq 0,05$)

ності АРАР. При цьому речовина 001 найбільш ефективно виявила себе в концентрації 25 мкМ, а речовина 002 – в концентрації 50 мкМ (табл. 3), тоді як при вивченні речовини 006 спостерігалась концентраційна залежність: чим більша концентрація досліджуваної речовини в середовищі інкубації, тим нижча активність ферменту АЛТ.

Зниження активності АЛТ у культуральному середовищі може свідчити про те, що досліджувана речовина гальмує токсичну дію АРАР, можливо, завдяки інгібуванню сигнального шляху, пов'язаного з JNK. Це припущення підтверджується даними про те, що застосування специфічного інгібітора JNK антрапіразолону SP600125 зменшує активність АЛТ у середовищі інкубації гепатоцитів з АРАР [6].

У той же час зменшення активності АЛТ може бути пов'язане з безпосередньою дією досліджуваних речовин на плазматичну мембрану свіжовиділених клітин, а саме, з її стабілізацією.

Відомо, що активація JNK (котра відбувається при інкубації з АРАР) супроводжується розвитком оксидативного стресу і у подальшому активацією перекисного окиснення.

Тому наступним етапом наших досліджень було вивчення антиоксидантної активності досліджуваних речовин. Отримані результати наведені в табл. 4.

Отримані дані свідчать про те, що деякі з досліджуваних речовин (001, 002 і 005) виявляють антиоксидантні властивості, тоді як речовини 003, 004 і 006 таку активність не виявляють. Слід також зазначити, що максимальну антиоксидантну активність речовини 001 і 002 виявляють у концентрації 25 мкМ, а при збільшенні концентрації досліджуваної речовини в пробі дана активність зменшується. Таким чином, досліджувані речовини 001 і 002 за дослідженою ознакою виявляють антиоксидантну активність при низьких концентраціях, а в більших – відіграють роль прооксидантів (табл. 4).

Враховуючи той факт, що речовини 001 і 002 виявляють антиоксидантну активність, зменшення активності АЛТ у культуральному середовищі гепатоцитів при інкубації клітин з даними речовинами (табл. 3) можна пояснити їх безпосередньою стабілізуючою дією на плазматичну мембрану.

Таким чином, отримані результати дозволяють зробити припущення, що саме речовина 006 може

впливати на активність JNK у клітинах. Тому метою наступного етапу експерименту була перевірка висунутого припущення.

Так, нами було встановлено, що АРАР не змінює загального рівня JNK в клітинах печінки, проте спричиняє її активацію, про що свідчить підвищення рівня p-JNK (табл. 5). Внесення речовини 006 до середовища інкубації гепатоцитів зменшує вміст p-JNK (табл. 5), що свідчить про інгібування JNK.

ВИСНОВКИ

Таким чином, проведені дослідження показали:

- Сполуки 001, 002 і 005 виявляють антиоксидантні властивості, сполуки 003, 004 і 006 не виявляють антиоксидантної активності.
- Сполука 006 зменшує активність АЛТ в інкубаційному середовищі гепатоцитів на тлі дії АРАР та зменшує вміст p-JNK на тлі введення АРАР.

У результаті біологічних досліджень *in vitro* встановлено, що речовина 006 (6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназолін) здатна суттєво впливати на активність JNK-кіназ та є перспективною сполукою для подальших досліджень *in vivo*.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Кост Е. А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования / Е. А. Кост. – М.: Медицина, 1975. – 360 с.
2. Строев Е. А. Практикум по биологической химии / Е. А. Строев, В. Г. Макарова. – М.: Высш. шк., 1986. – 231 с.
3. Bessems J. G. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches / J. G. Bessems, N. P. Vermeulen // Crit. Rev. Toxicol. – 2001. – № 31. – P. 55-138.
4. Du K. The gap junction inhibitor 2-aminoethoxy-diphenyl-borate protects against acetaminophen hepatotoxicity by inhibiting cytochrome P450 enzymes and c-jun N-terminal kinase activation / [K. Du, C. D. Williams, M. R. McGill et al.] // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2013. – Vol. 273, № 3. – P. 484-491.
5. Gum S. I. Korean red ginseng extract prevents APAP-induced hepatotoxicity through metabolic enzyme regulation: the role of ginsenoside Rg3, a proto-

- panaxadiol / S. I. Gum, M. K. Cho // *Liver Int.* – 2013. – Vol. 33, № 7. – P. 1071-1084.
6. Saito C. c-Jun N-terminal kinase modulates oxidant stress and peroxynitrite formation independent of inducible nitric oxide synthase in acetaminophen hepatotoxicity / C. Saito, J. J. Lemasters, H. Jaeschke // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 246, № 1-2. – P. 8-17.
 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 // *Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 143, № 2. – P. 307-320.
 8. Solheim A. E. Subcellular distribution of proteolytically generated valine in isolated rat hepatocytes / A. E. Solheim, P. O. Seglen / *Eur. J. Biochem.* – 1980. – Vol. 107, № 2. – P. 587-596.
 9. Vlahopoulos S. JNK: a key modulator of intracellular signaling / S. Vlahopoulos, V. C. Zoumpourlis // *Biochemistry Mosc.* – 2004. – Vol. 69, № 8. – P. 844-854.
 10. Williams C. D. Protection against acetaminophen-induced liver injury by allopurinol is dependent on aldehyde oxidase-mediated liver preconditioning / [C. D. Williams, M. R. McGill, M. Lebofsky et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 274, № 3. – P. 417-424.

УДК 577.126:57.042

А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, И. Ю. Капустянский, С. Н. Коваленко, Л. В. Евсеева

ПОИСК ИНГИБИТОРОВ С-JUN N-КОНЕЧНЫХ КИНАЗ (JNK) СРЕДИ 4-N-(3-ЦИАНОФЕНИЛ)АМИНО- И 4-N-(4-ЦИАНОФЕНИЛ)АМИНО-ЗАМЕЩЕННЫХ ХИНАЗОЛИНОВ

Проведено исследование JNK-ингибирующей активности синтезированных веществ – производных 4-N-ариламинозамещенных хиनाзолинов на фоне введения активатора JNK ацетаминофена *in vitro*. Установлено, что вещество 006 (6,7-диметокси-4-N-(4-цианофенил)аминохиназолин) снижает содержание фосфорилированной JNK, т.е. предупреждает её активацию. При этом наблюдается снижение активности АЛТ, вызванное ацетаминофеном. Полученные данные свидетельствуют, что защитное действие указанного вещества связано не с антиоксидантной активностью, а с ингибирующим влиянием на активацию JNK.

Ключевые слова: JNK; ацетаминофен (АПАП); ингибиторы JNK; гепатоциты; АЛТ; ТБК-реактивные продукты

UDC 577.126:57.042

A. L. Zagayko, V. P. Fylymonenko, I. Yu. Kapustyanskiy, S. M. Kovalenko, L. V. Yevseyeva

SEARCH FOR C-JUN N-TERMINAL KINASE (JNK) INHIBITORS AMONG 4-N-(3-CYANOPHENYL) AMINO- AND 4-N-(4-CYANOPHENYL) AMINO-SUBSTITUTED QUINAZOLINES

The investigation of JNK-inhibitory activity of the synthesized compounds – derivatives of 4-N-aryl-amino-substituted quinazolines with administration of acetaminophen (JNK activator) *in vitro* was carried out. It was established that the substance 006 (6,7-Dimethoxy-4-N-(4-cyanophenyl)-aminoquinazolin) reduces the content of phosphorylated JNK, i.e. prevents its activation. The decrease of ALT activity is induced by acetaminophen. The data obtained indicate that the protective effect of the substance is associated not with antioxidant activity, but with inhibitory effect on the activation of JNK.

Key words: JNK; acetaminophen (APAP); inhibitors JNK; hepatocytes; ALT; TBA-reactive products

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.
Тел. (057) 706-30-99.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 12.05.2014 р.