

УДК 616.155.3-091.818:577.3

М. Мусмари, А. Л. Загайко, Ю. И. Кочубей, Л. В. Галузинская, Э. Л. Торяник

*Национальный фармацевтический университет*

## ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ JNK КИНАЗ

*Активация JNK является важным звеном в патогенезе таких патологий, как ожирение, сахарный диабет, инсулинорезистентность, метаболический синдром. Увеличение активности JNK наблюдается при действии на клетку стрессовых факторов, в том числе при развитии оксидативного стресса. Поэтому поиск новых ингибиторов как синтетического, так и природного происхождения является перспективным в разработке новых стратегий терапии. Была изучена активность синтетических ингибиторов JNK киназы и кверцетина. Полученные результаты показали, что вещество 001 и кверцетин проявили антиоксидантные и мембраностабилизирующие свойства.*

*Ключевые слова:* JNK киназы; ингибиторы JNK киназы; кверцетин; гепатоциты

### ВСТУПЛЕНИЕ

Окислительный стресс является универсальным механизмом повреждения клетки при патологии разного генеза и характеризуется повышением внутриклеточной генерации активных (АФК) форм кислорода АФК вследствие нарушения сбалансированности антиоксидантной и прооксидантной систем [3]. В настоящее время концепция, предполагающая исключительно повреждающее влияние АФК на функционирование клетки, пересматривается. Широко известность приобрел термин «окислительная регуляция», отражающий активную роль окислительно-восстановительной модификации протеинов в регуляции функций клеток [3-5]. Измененные в результате воздействия АФК молекулы можно считать сигналами, несущими биологическую информацию, необходимую для регуляции различных клеточных функций, в частности, реализации апоптоза. АФК могут влиять на различные пути инициации апоптотической программы через внутриклеточные редоксзависимые передающие сигнал системы [3-5]. Оксидативированные фосфолипазы стимулируют множество киназ, включая митогенактивируемые (MAP-киназы) семейства JNK и p38 протеинкиназы MAP киназы. Последние фосфорилируют белки-мишени, связанные с регуляцией запрограммированной клеточной гибели и функционированием соответствующих факторов транскрипции [9]. Установлено, что редоксзависимая JNK киназа может индуцировать апоптоз за счет участия в передаче иницирующего сигнала с TNF-рецептора путем фосфорилирования и активации p53 фактора транскрипции проапоптотических белков

Вах и Bad (после транслокации в митохондрии) и фосфорилирования и инактивации антиапоптотических белков семейства Bcl2 [8-10]. Активация протеинкиназы p38 также вызывает фосфорилирование Bad и повышает уровень экспрессии проапоптотического белка p53 [4]. Однако имеются данные, свидетельствующие об антиапоптотической функции JNK и p38, зависящей от характера стрессовых сигналов, вариантов сочетания путей их передачи и типов клеток [3, 9].

Целью данного исследования было изучение биологической активности синтетических и природного ингибиторов JNK киназ *in vitro* в условиях оксидативного стресса, вызванного пероксидом водорода ( $H_2O_2$ ).

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты были проведены на крысах линии Wistar массой 180-200 г, которые содержались на стандартном рационе вивария Национального фармацевтического университета. Выделение гепатоцитов проводили по методу, предложенному Seglen [7]. В дальнейшем клетки инкубировали в присутствии исследуемых ингибиторов (001, 002, 003) и кверцетина (КВ) в концентрации 50  $\mu$ M. Суспензии исследуемых веществ готовили с добавлением твина-80. Суспензия контрольных клеток содержала твин-80 соответствующей концентрации. Определяли активность аланинаминотрансферазы (АЛТ), гликогенсинтетазы (ГС), содержание в клетках триацилглицеринов (ТГ) с использованием стандартных наборов реактивов фирмы «Фелисит-Диагностика» (г. Днепропетровск, Украина). Антиоксидантную активность оценивали по образованию окрашенных комплексов с тиобарбитуровой кислотой (ТБК).

Таблиця

**ВЛИЯНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ JNK НА НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ НА ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТАХ В УСЛОВИЯХ ПЕРОКСИДНОГО СТРЕССА (M ± s, n = 6)**

	АЛТ, мкмоль\ч*мл	ГС, нмоль/мин/мг белка	ТГ, ммоль\7,8*10 <sup>6</sup> клеток	ТБК-РП, нмоль/мг белка
Интакт	0,0389 ± 0,0017	1,7 ± 0,04	1,547 ± 0,071	0,47 ± 0,07
Контроль	0,0987 ± 0,006	2,4 ± 0,09	1,991 ± 0,025	0,90 ± 0,09
001	0,0456 ± 0,0012*	2,0 ± 0,08*	1,685 ± 0,054*	0,62 ± 0,04*
002	0,0561 ± 0,0003*	2,1 ± 0,06*	1,781 ± 0,149	0,76 ± 0,02
003	0,0566 ± 0,0006*	2,1 ± 0,04*	1,801 ± 0,928	0,79 ± 0,03
КВ	0,0421 ± 0,0011*	1,9 ± 0,04*	1,651 ± 0,157*	0,55 ± 0,01*

Примечания. \* - P ≤ 0,05 по отношению к контролю.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены в таблице и свидетельствуют о том, что при введении пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в группе контроля активность АЛТ возросла в 2,5 раза, активность ГС повысилась в 1,5 раза по сравнению с интактом. Также повысилось содержание ТГ и ТБК-реагирующих продуктов на 28 % и 91 % соответственно по сравнению с интактом.

Эти результаты могут свидетельствовать о развитии окислительного стресса, важным звеном которого является активация JNK.

Добавление исследуемых веществ и кверцетина приводило к достоверному снижению активности АЛТ, что говорит о мембраностабилизирующих свойствах исследуемых соединений. При этом в присутствии кверцетина активность АЛТ снижалась на 57 %, вещества 001 – на 54 %, веществ 002 и 003 – на 43 % по сравнению с контролем.

Исследование активности ГС показало, что все исследуемые объекты незначительно, но достоверно снижали данный показатель. Наиболее заметно снижалась активность при введении вещества 001 и кверцетина (17 % и 21 % соответственно по сравнению с контролем).

Содержание ТГ при добавлении вещества 001 и кверцетина достоверно снижалось, тогда как вещества 002 и 003 не снижали данный показатель по сравнению с контролем.

Изучение влияния исследуемых веществ на содержание ТБК-РП показало, что только вещество 001 и кверцетин достоверно снижали данный показатель в 1,4 раза и в 1,6 раза соответственно по сравнению с контролем.

Также следует отметить, что вещество 001 и КВ наиболее активно влияли на нормализацию исследуемых показателей и достоверно снижали все исследуемые показатели. Подобное действие является их преимуществом по сравнению с другими веществами, поскольку они тормозят развитие окислительного стресса, который, в свою очередь, активизирует JNK киназы.

### ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые вещества в разной степени проявляли антиоксидантные и мембранопротекторные свойства. Наиболее эффективными показали себя вещества 001 и КВ. Это говорит о необходимости продолжения изучения активности данных соединений в условиях *in vivo* с целью установления прямого влияния на JNK.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

1. Аббасова С. Г. Система Fas-FasL в норме и при патологии / С. Г. Аббасова, В. М. Липкин, Н. Н. Трапезников, Н. Е. Кушлинский // *Вопр. биол., мед., фарм., химии.* – 2003. – № 3. – С. 3-17.
2. Белецкий И. П. Цитотоксический сигнал рецепторов семейства TNF-Rs / И. П. Белецкий, А. Б. Мошников, О. В. Прусакова // *Биохимия.* – 2002. – Т. 67, вып. 9. – С. 377-395.
3. Дубинина Е. Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса / Е. Е. Дубинина // *Вопр. мед. химии.* – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561-581.
4. Меньшикова Е. Б. Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньшикова, В. З. Ланкин, Н. К. Зенков // *Слово.* – 2006. – № 7. – С. 600-650.
5. Рязанцева Н. В. Роль нарушения регуляции апоптотической гибели в механизмах развития вирусиндуцированной цитогенетической нестабильности лимфоцитов крови / Н. В. Рязанцева, В. В. Новицкий, О. Б. Жукова // *Бюл. эксперим. биол. и медицины.* – 2006. – Т. 141, № 5. – С. 544-549.
6. Bredesen D. E. Apoptosis overview and signal transduction pathways / D. E. Bredesen // *J. Neurotrauma.* – 2000. – Т. 17, № 2. – P. 801-810.
7. Bredesen D. E. Stress signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis Baines / D. E. Bredesen, C. P. Molkentin // *J. of Molecular and Cell. Cardiol.* – 2005. – Vol. 38, № 37. – P. 47-62.

8. Czaja M. J. JNK regulation of hepatic manifestations of the metabolic syndrome / M. J. Czaja // Trends Endocrinol Metab. – 2010. – Vol. 21, № 12. – P. 707-713.
9. Seglen P. O. Preparation of isolated rat liver cells: The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver / P. O. Seglen // Methods Cell Biol. – 1976. – №. 13. – P. 29-83.
10. Wang Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases / Y. Wang // Circulation. – 2007. – Vol. 116, № 12. – P. 1413-1423.

**УДК 616.155.3-091.818:577.3****М. Мусмарі, А. Л. Загайко, Ю. І. Кочубей, Л. В. Галузинська, Е. Л. Торяник****ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ ІНГІБІТОРІВ JNK КІНАЗИ**

Активация JNK є важливою ланкою в патогенезі великої кількості захворювань і станів, таких як ожиріння, діабет, інсулінорезистентність, метаболічний синдром. Ми вивчали активність синтетичних інгібіторів JNK кінази та кверцетину. Речовина 001 і кверцетин показали антиоксидантні властивості, в той час як речовина 003 викликала накопичення тригліцеридів в ізольованих гепатоцитах. Ми вважаємо подальше вивчення цих сполук в експериментах на тваринах доцільним у природних умовах.

**Ключові слова:** JNK; інгібітори JNK; кверцетин; гепатоцити

**UDC 616.155.3-091.818:577.3****M. Musmari, A. L. Zagayko, Yu. I. Kochubey, L. V. Galuzinska, E. L. Toryanik****THE STUDY OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF NEW INHIBITORS JNK KINASE**

The activation of JNK is an important link in the pathogenesis of a lot of diseases and conditions like obesity, diabetes, insulin resistance, metabolic syndrome. We studied the activity of synthetic inhibitors of JNK kinase and antioxidant quercetin. Substance 001 and quercetin showed antioxidant properties, while the substance 0003 caused accumulation of triacylglycerols in isolated hepatocytes. We recommend further study of these compounds in vivo.

**Key words:** JNK; inhibitors of JNK; quercetin; hepatocytes

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

Надійшла до редакції  
23.06.2014 р.