

УДК 577.126:57.042

А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, М. А. Мусмарі, І. Ю. Капустянський,
С. В. Власов

Національний фармацевтичний університет

ВПЛИВ НОВИХ СИНТЕТИЧНИХ ІНГІБІТОРІВ JNK НА РОЗВИТОК ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 2-ГО ТИПУ

Проведено дослідження впливу нових синтетичних інгібіторів JNK на показники цукрового діабету 2-го типу, спричиненого дексаметазоном. Встановлено, що вивчені речовини 006 та G0007 чинять гіпоглікемічний та гіполіпідемічний вплив за рахунок попередження активації JNK. При цьому ефективність захисного впливу речовини 006 вища за ефективність речовини G0007.

Ключові слова: JNK; інгібітори JNK; інсулінорезистентність; цукровий діабет 2 типу; дексаметазон

ВСТУП

C-Jun N-кінцеві кінази (JNK) – група MAP-кіназ, що активуються при стресі, беруть участь у регуляції росту, диференціюванні, апоптозі, запаленні та інших важливих клітинних процесах [11, 12, 16]. Відомо, що активація JNK відбувається у відповідь на накопичення активних метаболітів кисню, цитокінів, при гіперглікемії тощо та є важливою ланкою патогенезу багатьох захворювань. Зокрема, порушення механізмів внутрішньоклітинної регуляції, до яких відноситься система JNK, залучені в розвиток інсулінорезистентності, метаболічного синдрому, діабету, серцево-судинних захворювань та інших патологій [7, 14].

Показано, що активація JNK може брати участь у прояві дефектів секреції інсуліну при цукровому діабеті 2 типу (ЦД2) через свою участь у роботі β -клітин у підшлунковій залозі, а також впливає на периферійні мішені дії інсуліну, зокрема класичні мішені – клітини м'язової та жирової тканини [7]. Інсулінорезистентність цих тканин JNK викликає шляхом безпосереднього фосфорилування субстрату інсулінового рецептора-1 (IRS-1) [15]. Ряд експериментальних робіт продемонстрували позитивний вплив пригнічення JNK відносно цукрового діабету 2-го типу, ожиріння, атеросклерозу [8-10]. Дослідження мишей, які страждають на ожиріння і ЦД2, показали, що інгібування JNK відновлює активність β -клітин та чутливість до інсуліну і приводить до поліпшення чутливості до глюкози [9]. Оскільки ЦД2 є найбільш поширеною формою діабету та становить одну з найглобальніших медико-соціальних проблем людства, пошук інгібіторів JNK є надзвичайно гострою і актуальною проблемою. Раніше ми дослідили інгібуючу

активність відносно JNK нових синтетичних сполук (006 і G0007) в умовах *in vitro* [2].

Метою даного дослідження було вивчення впливу синтезованих речовин (006 і G0007), що проявили JNK-інгібуючу активність *in vitro*, на показники цукрового діабету 2-го типу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Робота виконана на щурах лінії Wistar масою 140-200 г, які утримувалися на стандартному раціоні віварію НФаУ. Цукровий діабет моделювали тривалим введенням низьких доз дексаметазону, як описано у роботі [13]. Дослідні тварини були розділені на 6 груп: 1) інтактні тварини, які утримувалися на стандартному раціоні віварію; 2) тварини, яким підшкірно щодня вводили дексаметазон у дозі 2 мг протягом 4-ох тижнів; 3) тварини, яким вводили дексаметазон протягом 4-ох тижнів і ще впродовж 2-ох тижнів на фоні дексаметазону, внутрішньошлунково вводили суспензію синтетичного інгібітора JNK 006 (6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназолін); 4) тварини, яким вводили дексаметазон протягом 4-ох тижнів і ще впродовж 2-ох тижнів на фоні дексаметазону, внутрішньошлунково вводили суспензію синтетичного інгібітора JNK G0007 (етил 3-метил-5-(4-фторобензамідо)-4-ціанотіофен-2-карбоксилат); 5) тварини, які впродовж 4-ох тижнів утримувалися на стандартному раціоні віварію і ще протягом 2-ох тижнів отримували суспензію речовини 006; 6) тварини, які 4 тижні утримувалися на стандартному раціоні віварію і ще впродовж 2-ох тижнів отримували суспензію речовини G0007. Тварини були декапітовані під хлоразоло-уретановим наркозом. Об'єктами дослідження були сироватка крові та гомогенат печінки. При виконанні експериментів дотримувались «Загальних

Таблиця 1

ВМІСТ ГЛЮКОЗИ, ІНСУЛІНУ, ТАГ, ВЖК, АпоВ-ЛП, ЛПВЩ ТА ТБК-РАП В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ ДЕКСАМЕТАЗОНУ І СИНТЕТИЧНИХ ІНГІБІТОРІВ JNK ($M \pm m$, $n = 6$)

Інтакт	Дексаметазон	Дексаметазон + 006	Дексаметазон + G0007	006	G0007
Глюкоза, ммоль/л					
4,9 ± 0,1	9,2 ± 0,2*	7,3 ± 0,3**	8,0 ± 0,2**	4,7 ± 0,2	4,9 ± 0,3
Інсулін, пг/мл					
1290 ± 45	2073 ± 32*	1585 ± 38**	1836 ± 25**	1354 ± 27	1267 ± 37
ВЖК, ммоль/л					
0,40 ± 0,07	0,86 ± 0,05*	0,57 ± 0,02**	0,63 ± 0,06**	0,44 ± 0,05	0,39 ± 0,04
ТАГ, ммоль/л					
0,83 ± 0,07	2,07 ± 0,09*	1,51 ± 0,11**	1,76 ± 0,13**	0,89 ± 0,082	0,91 ± 0,07
АпоВ-ЛП, мг/мл					
4,86 ± 0,25	6,78 ± 0,15*	5,46 ± 0,21**	6,17 ± 0,18**	4,78 ± 0,19	4,73 ± 0,25
ЛПВЩ, мг/мл					
1,12 ± 0,06	0,97 ± 0,07 [†]	1,15 ± 0,05	1,14 ± 0,04	1,11 ± 0,06	1,13 ± 0,07
ТБК-РАП, мкмоль/л					
2,67 ± 0,16	3,47 ± 0,27*	2,93 ± 0,2**	3,14 ± 0,15**	2,68 ± 0,12	2,55 ± 0,14

Примітка: * – відхилення достовірне щодо інтакту ($p \leq 0,05$); ** – відхилення достовірне щодо дексаметазону ($p \leq 0,05$); [†] – тенденція щодо інтакту ($0,05 \leq p \leq 1$).

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).

Вміст глюкози, інсуліну, вільних жирних кислот (ВЖК) і триацилгліцеролів (ТАГ) визначали з використанням стандартних наборів фірми «Фелісіт-Діагностика» (Україна) та фірми «Lachema» (Чехія). Сумарну концентрацію β - і пре- β -ліпопротеїнів (АпоВ-ЛП) і ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) у сироватці крові визначали турбідиметричним методом. Вміст ТБК-реактивних продуктів (ТБК-РАП) визначали спектрофотометрично за допомогою реакції з тіобарбітуровою кислотою [3]. 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/Тур185] 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

Тривале введення низьких доз дексаметазону викликає майже дворазове підвищення вмісту глюкози в сироватці крові (табл. 1). Це, ймовірно, пов'язане зі зниженням утилізації глюкози периферичними тканинами внаслідок пригнічення дексаметазоном експресії транспортерів глюкози GLUT1 та GLUT4 [6]. В цей же час спостерігається гіперінсулінемія як компенсаторна реакція на гіперглікемію (табл. 1), що свід-

чить про нечутливість клітин до інсуліну, тобто про розвиток інсулінорезистентності. Зростання концентрації ВЖК і ТАГ (табл. 1), що спостерігається через 4 тижні експерименту, є наслідком мобілізації жиру з жирової тканини і посилення синтезу ліпопротеїнів дуже низької щільності печінкою через ослаблення інгібуючої дії інсуліну на ліполіз. Накопичення атерогенних АпоВ-ЛП у даної групи щурів (табл. 1) – компенсаторна відповідь, спрямована на зменшення вмісту ВЖК, обумовлена підвищеним синтезом ендогенних ліпопротеїнів і їх зниженою утилізацією [1]. При цьому спостерігається тенденція до зменшення рівня антиатерогенних ЛПВЩ (табл. 1), що, очевидно, пов'язано з порушенням ремоделювання АпоВ-ЛП і посиленням катаболізму ЛПВЩ.

У печінці тварин контрольної патології також відбувається накопичення ВЖК і ТАГ (табл. 2). Підвищення ВЖК у крові і посилене їх надходження в клітини різних тканин провокує подальші порушення метаболізму, посилюючи гіперглікемію і гіперінсулінемію. Встановлено, що одним з механізмів токсичності ВЖК є посилене утворення активних форм кисню і активація вільнорадикального окиснення [1]. Наші результати також свідчать про порушення антиоксидантно-прооксидантної рівноваги – накопичення продуктів вільнорадикального окиснення (ТБК-РАП) спостерігається як у сироватці крові, так і в печінці щурів (табл. 1, 2). Відомо, що істотний внесок у розвиток інсулінорезистентності вносить посилене утворення активних форм кисню, а одним з механізмів дії АФК є активація JNK-сигнального шляху [5]. Як видно з табл. 2, введення дексаметазону не впливає у досліджений термін на рівень загальної JNK, проте викликає її активацію, про що свідчить під-

Таблиця 2

ВМІСТ ТАГ, ВЖК ТА ТБК-РАП І РІВНІ ЗАГАЛЬНОЇ ТА ФОСФОРИЛЬОВАНОЇ JNK В ГОМОГЕНАТІ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ ДЕКСАМЕТАЗОНУ І СИНТЕТИЧНИХ ІНГІБІТОРІВ JNK (M ± m, n = 6)

Інтакт	Дексаметазон	Дексаметазон + 006	Дексаметазон + G0007	006	G0007
ВЖК, ммоль/мг білка					
1,18 ± 0,04	1,63 ± 0,05*	1,31 ± 0,07**	1,48 ± 0,05**	1,20 ± 0,06	1,23 ± 0,06
ТАГ, ммоль/мг білка					
1,43 ± 0,03	2,28 ± 0,04*	1,70 ± 0,13**	2,00 ± 0,06**	1,49 ± 0,05	1,54 ± 0,04
ТБК-РАП, нмоль /мг білка					
0,74 ± 0,12	2,03 ± 0,14*	1,19 ± 0,13**	1,79 ± 0,08**	0,82 ± 0,09	0,76 ± 0,12
Загальна JNK, нг/мг білка					
315 ± 33	324 ± 23	320 ± 27	319 ± 23	311 ± 31	319 ± 28
p-JNK, нг/мг білка					
98 ± 7	171 ± 13*	125 ± 15**	142 ± 11**	93 ± 10 [†]	92 ± 12 [†]

Примітка: * – відхилення достовірне щодо інтакту (p ≤ 0,05); # – відхилення достовірне щодо дексаметазону (p ≤ 0,05); † – тенденція щодо інтакту (0,05 ≤ p ≤ 1).

вищення вмісту p-JNK на 74 % порівняно з інтактом. Останнє, ймовірно, обумовлене здатністю дексаметазону викликати оксидативний стрес [4].

Введення досліджуваних речовин 006 і G0007 істотно знижує концентрації глюкози та інсуліну в сироватці крові (табл. 1), а також зменшує рівні ВЖК і ТАГ у сироватці крові та гомогенаті печінки (табл. 1, 2). Як наслідок, спостерігається падіння вмісту АпоВ-ЛП в сироватці крові тварин з експериментальною інсулінорезистентністю (табл. 1). Слід зазначити, що речовина 006 виявила більш виражену протекторну дію. Вивчені сполуки чинять також значний нормалізуючий вплив на накопичення ТБК-РАП в обох досліджуваних тканинах (табл. 1, 2). Рівень p-JNK в печінці при введенні синтезованих речовин на тлі введення дексаметазону теж змінюється в бік нормалізації (табл. 2). І знову ефективність речовини 006 виявилася більш високою. При цьому найдослідженіші сполуки не вплинули на жоден з вивчених показників.

Оскільки речовини 006 і G0007 не проявляють гіпоглікемічних, гіполіпідемічних і антиоксидантних властивостей при окремому введенні, а чинять такий вплив на тлі активації JNK, а також знижують її активацію, можна розглядати можливість їх застосування в комплексному захисті при станах, що супроводжуються активацією JNK, зокрема при цукровому діабеті 2-го типу.

ВИСНОВКИ

- Таким чином, проведені дослідження показали, що:
1. Вивчені синтетичні речовини 006 і G0007 чинять антидіабетичний вплив: знижують рівень глюкози та інсуліну в сироватці крові, ймовірно, в результаті зниження проявів інсулінорезистентності при введенні дексаметазону.
 2. Речовини 006 і G0007 виявляють нормалізуючий вплив на досліджені показники ліпідного

обміну в сироватці і печінці щурів, що може знижувати ризик атерогенезу при цукровому діабеті 2-го типу.

3. Речовини 006 і G0007 знижують вміст p-JNK, тобто пригнічують активацію JNK, спровоковану дексаметазоном.
4. Ефективність захисного впливу речовини 006 вища, ніж речовини G0007.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Загайко А. Л. Метаболічний синдром: механізми розвитку та перспективи антиоксидантної терапії: [монографія] / А. Л. Загайко, Л. М. Вороніна, К. В. Стрельченко. – Х.: Вид-во НФаУ; Золоті сторінки, 2007. – 216 с.
2. Загайко А. Л. Пошук інгібіторів c-jun N-кінцевих кіназ (JNK) серед 4-N-(3-ціанофеніл)аміно- та 4-N-(4-ціанофеніл)амінозаміщених хіназолінів / [А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, І. Ю. Капустянський та ін.] / Укр. біофармац. журн. – 2014. – № 3 (32). – С. 55-59.
3. Строев Е. А. Практикум по биологической химии / Е. А. Строев, В. Г. Макарова – М.: Высш. шк., 1986. – 231 с.
4. Almeida M. Glucocorticoids and tumor necrosis factor increase oxidative stress and suppress wnt protein signaling in osteoblasts / [M. Almeida, L. Han, E. Ambrogini et al.] // J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286, № 52. – P. 44326-44335.
5. Bogoyevitch M. A. C-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges / [M. A. Bogoyevitch, K. R. Ngoei, T. T. Zhao et al.] // Biochem. Biophys. Acta. – 2010. – Vol. 1804, № 3. – P. 463-475.
6. Buren J. Dexamethasone decreases GLUT 1 and GLUT 4 content in primary cultured rat adipocytes / J. Buren, J. Erekssohn // Diabetol. – 1999. – Vol. 42, № 1. – P. 170.

7. Hirosumi J. A central role for JNK in obesity and insulin resistance / [J. Hirosumi, G. Tuncman, L. Chang et al.] // *Nature*. – 2002. – Vol. 420. – P. 333.
8. Lim A. K. Evaluation of JNK blockade as an early intervention treatment for type 1 diabetic nephropathy in hypertensive rats / [A. K. Lim, F. Y. Ma, D. J. Nikolic-Paterson et al.] // *Am. J. Nephrol.* – 2011. – Vol. 34, № 4. – P. 337-346.
9. Nakatani Y. Modulation of JNK pathway in liver affects insulin resistance status / Y. Nakatani, H. Kaneto, D. Kawamoti // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 44. – P. 45803-45809.
10. Osto E. C-Jun N-terminal kinase 2 deficiency protects against hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress / [E. Osto, C. M. Matter, A. Kouroedov et al.] // *Circulation*. – 2008. – Vol. 118, № 20. – P. 2073-2080.
11. Sehgal V. Network Motifs in JNK Signaling / V. Sehgal, P. T. Ram // *Genes. Cancer*. – 2013. – Vol. 4, № 9-10. – P. 409-413.
12. 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.
13. Severino C. Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance / [C. Severino, P. Brizzi, A. Solinas et al.] // *Am. J. of Physiol.* – 2012. – Vol. 283, № 2. – P. 367-373.
14. Tarantino G. JNKs, insulin resistance and inflammation: A possible link between NAFLD and coronary artery disease / G. Tarantino, A. Caputi // *World J. Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 17, № 33. – P. 3785-3794.
15. Vinayagamoorthi R. Antioxidants preserve redox balance and inhibit c-Jun N-terminal kinase pathway while improving insulin signaling in fat-fed rats: evidence for the role of oxidative stress on IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance / R. Vinayagamoorthi, B. Zachariah, M. G. Sridhar // *J. Endocrinol.* – 2008. – Vol. 197. – P. 287-296.
16. Vlahopoulos S. JNK: a key modulator of intracellular signaling / S. Vlahopoulos, V. C. Zoumpourlis // *Biochemistry Mosc.* – 2004. – Vol. 69, № 8. – P. 844-854.

УДК 577.126:57.042

А. Л. Загайко, В. П. Филимоненко, М. А. Мусмари, И. Ю. Капустянский, С. В. Власов

ВЛИЯНИЕ НОВЫХ СИНТЕТИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ JNK НА РАЗВИТИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА 2-ГО ТИПА

Проведено исследование влияния новых синтетических ингибиторов JNK на показатели сахарного диабета 2-го типа, вызванного дексаметазоном. Установлено, что изученные вещества 006 и G0007 оказывают гипогликемическое и гиполипидемическое влияние за счет предотвращения активации JNK. При этом эффективность защитного влияния вещества 006 выше эффективности вещества G0007.

Ключевые слова: JNK; ингибиторы JNK; инсулинорезистентность; сахарный диабет 2 типа; дексаметазон

UDC 577.126:57.042

A. L. Zagayko, V. P. Fylymonenko, M. A. Musmari, I. Yu. Kapustyanskiy, S. V. Vlasov

THE INFLUENCE OF NEW SYNTHETIC JNK INHIBITORS ON THE DEVELOPMENT OF EXPERIMENTAL TYPE 2 DIABETES

The influence of new synthetic JNK inhibitors on Type 2 diabetes indicators, caused by dexamethasone was investigated. It was found that the studied substances 006 and G0007 have hypoglycemic and hypolipidemic effects by preventing the activation of JNK. The substance 006 efficiency of protective effect is higher than the substance G0007 efficiency.

Key words: JNK; JNK inhibitors; insulin resistance; type 2 diabetes; dexamethasone

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.
Тел. (факс): 8(057)7063099.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції
22.11.2014 р.