

УДК 661.12091.547

А. Л. Загайко, Г. Б. Кравченко, Мусмарі Мохамед Ахмед

Національний фармацевтичний університет

КОРЕКЦІЯ НОВИМИ ІНГІБІТОРАМИ JNK МОРФОСТРУКТУРИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ В УМОВАХ ГІПЕРКАЛОРИЙНОЇ ДІЄТИ

У печінці JNK відіграють провідну роль у розвитку наслідків гіперкалорійної дієти. Ізоформи JNK регулюють клітинну загибель та виживання, диференціацію, проліферацію, накопичення АФК, сигналінг інсуліну та канцерогенез у печінці. Метою даної роботи є дослідження впливу інгібування JNK на морфоструктуру гепатоцитів в умовах інсулінорезистентності. Результати експерименту свідчать, що нові інгібітори JNK знижують дистрофію гепатоцитів, послаблюючи виразність стеатозу та порушень вуглеводного обміну, звужуючи зони дезорганізації структури тканини, можливо цим створюючи передумови до зниження апоптозу.

Ключові слова: інгібітори JNK; інсулінорезистентність; стеатоз печінки

ВСТУП

Інсулінорезистентність (ІР), метаболічний синдром (МС) та залежне від ожиріння запалення серед інших можливих генетичних, харчових факторів та способу життя відіграють провідну роль у розвитку стеатогепатиту, який є значною медичною проблемою в усьому світі. Ступінь ураження печінки може варіювати від простого стеатозу до стеатозу з запаленням печінки та фіброзом, який відомий як неалкогольний стеатогепатит (НАСГ, nonalcoholic steatohepatitis (NASH)) [12]. Надмірне вживання жирів вважається первинним поштовхом, а наступний вплив оксидативного стресу та цитокінів, які продукує жирова тканина, може призвести до запалення печінки.

На теперішній час відомі три сигнальних шляхи, які асоціюються з розвитком стеатозу: толл-подібні рецептори (toll-like receptors (TLR)), активні форми кисню (АФК, reactive oxygen species (ROS)) та c-jun N-кінцеві кінази (c-Jun N-terminal kinases (JNK)) [4, 11]. JNK, зокрема, індукують синтез хемокинів та інших цитокінів, які викликають запалення та фіброз. У печінці JNK відіграють провідну роль у розвитку наслідків гіперкалорійної дієти. Ожиріння призводить до розвитку інсулінорезистентності та робить свій внесок у розвиток стеатозу, стимулює ліпогенез та пригнічує процес гліколізу [5, 9]. Ізоформи JNK регулюють клітинну загибель та виживання, диференціацію, проліферацію, накопичення АФК, сигналінг інсуліну та канцерогенез у печінці [8].

Ожиріння та ІР, які є факторами ризику розвитку стеатозу печінки, активують JNK не тільки в пе-

чінці, але й у жировій тканині та м'язах. Значна активація JNK спостерігалася в печінці, жировій тканині та м'язах мишей, які утримувалися на гіперкалорійній дієті, та генетично ожирілих мишей [7]. Також у JNK1-дефіцитних мишей за умов гіперкалорійної дієти з підтвердженим стеатозом та запаленням печінки прояви цих патологій достовірно зменшені порівняно з інтактними мишами [6]. Доклінічні дослідження на тваринних моделях та клітинах людини показали, що сполуки, які інгібують JNK, можуть використовуватися для лікування пацієнтів з захворюваннями печінки, включаючи гостре ураження печінки, вплив інсулінорезистентності, фіброз та НАСГ [10].

Метою даної роботи є дослідження впливу інгібування JNK на морфоструктуру гепатоцитів в умовах інсулінорезистентності. В експерименті застосовували сполуки, отримані цільоспрямованим синтезом як інгібітори JNK – G0007 (етил 3-метил-5-(4-фторобензамідо)-4-ціанотифен-2-карбоксилат) і 0006 (6,7-диметокси-4-N-(4-ціанофеніл)амінохіназолін) у Державній науково-дослідній лабораторії з контролю якості лікарських засобів НФаУ та на кафедрі органічної хімії НФаУ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В експерименті використовували нелінійних щурів-самців віком 6 тижнів. Інсулінорезистентність моделювали утриманням тварин на гіперкалорійній дієті, збагаченій фруктозою (60,3 % фруктози, 18,3 % білка, 5,2 % жирів) [3] на протязі 8 тижнів, тварини мали вільний доступ до води та їжі. Експериментальні тварини масою 200-250 г були розподілені на 5 груп: 1) інтактні тварини, які перебували на стандартно-

**ВМІСТ ГЛЮКОЗИ, ТРИГЛЦЕРИДІВ, ЗАГАЛЬНОГО ХОЛЕСТЕРОЛУ ТА ІНСУЛІНУ
В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ (M ± m, n = 6)**

| Інтакт | Дієта | Дієта + 006 | Дієта + G0007 | Дієта + «Гарцинія» |
|------------------|--------------|---------------|---------------|--------------------|
| Глюкоза, ммоль/л | | | | |
| 4,5 ± 0,12 | 14,9 ± 0,19* | 7,9 ± 0,21*# | 9,4 ± 0,17*# | 8,5 ± 0,18*# |
| ВЖК, ммоль/л | | | | |
| 0,38 ± 0,04 | 0,71 ± 0,05* | 0,49 ± 0,02*# | 0,56 ± 0,04*# | 0,48 ± 0,03*# |
| ТГ | | | | |
| 0,48 ± 0,1 | 1,21 ± 0,09* | 0,61 ± 0,12*# | 0,65 ± 0,08*# | 0,59 ± 0,12*# |
| ХС | | | | |
| 2,25 ± 0,2 | 5,21 ± 0,98* | 3,49 ± 0,18*# | 3,21 ± 0,09*# | 3,18 ± 0,14*# |
| Інсулін, пг/мл | | | | |
| 1287 ± 32 | 2911 ± 37* | 1698 ± 35*# | 2121 ± 29*# | 1845 ± 25*# |

Примітки:

1) * – відхилення достовірне відносно інтакту (p ≤ 0,05);

2) # – відхилення достовірне відносно контрольної патології (p ≤ 0,05).

му раціоні віварію Національного фармацевтичного університету (НФаУ); 2) тварини, які утримувалися впродовж 6 тижнів на гіперкалорійній дієті (контрольна патологія); 3-5: тварини, які знаходились впродовж 6 тижнів на гіперкалорійній дієті і 2 тижнів на даній дієті зі щоденним введенням суспензії: 3) досліджуваної речовини 0006; 4) досліджуваної речовини G0007; 5) суспензії препарату порівняння «Garcinia 1.000» (Nature's Life) (кожна субстанція в дозі 20 мг/кг). Виведення з експерименту всіх тварин проведено через 24 години після останнього введення досліджуваних сполук та припинення доступу до їжі на 12 годин. Тварин декапітували під хлоразоло-уретановим наркозом. Об'єктами дослідження були сироватка крові та тканина печінки. При виконанні експериментів дотримувалися «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах» (Україна, 2001), гармонізованих з «Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Вміст глюкози, вільних жирних кислот (ВЖК), тригліцеридів (ТГ), загального холестеролу (ХС) та інсуліну в сироватці крові визначали з використанням стандартних наборів фірми «Фелісіт-Діагностика» (Україна) та фірми «Lachema» (Чехія).

Для проведення морфоструктурного аналізу зразки печінки фіксували у 10 % розчині формаліну, дегідрували у спиртах зростаючої міцності, заливали в целоїдин-парафін. Мікротомовані зрізи товщиною 4-5 мкм фарбували гематоксиліном та еозинном, проводили periodic acid-Schiff (PAS)-реакцію для виявлення глікогену (контролем служила діастаза слини). Додатково зразки печінки різали на заморожуючому мікротомі, зрізи фарбували суданом IV для виявлення нейтральних жирів [1, 2]. Перегляд мікропрепаратів проводили під мікроскопом Mikros 400 (Австрія), мікрофотографування мікроскопічних зоб-

ражень виконували цифровим фотоапаратом Nikon Cool Pix 4500. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми Nikon View 5.

Статистична обробка отриманих даних проводилася на персональному комп'ютері з використанням пакету програм Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для підтвердження розвитку ІР у сироватці крові експериментальних тварин досліджували вміст глюкози, ТГ, ХС, ВЖК та інсуліну (див. табл.). Рівень глюкози в сироватці крові щурів з контрольною патологією майже в два рази перевищив цей показник у інтактних тварин. Підвищений рівень інсуліну у тварин з гіперінсулінемією вказує на втрату чутливості тканин до інсуліну, тобто розвиток ІР [12]. Значне зростання вмісту ліпідів також є ознакою наслідків порушень ліпідного метаболізму при ІР.

Гістологічна будова печінки самців щурів з інтактної групи відповідає нормі. Часточковий рисунок тканини невиразний, що характерно для даного виду. Печінкові часточки складаються з радіально спрямованих тяжів гепатоцитів. Межі часточок визначали за триадами, зони триад вузькі. Внутрішньодолькові синусоїдальні гемокапіляри помірно розширені, клітини Купфера звичайні. Гепатоцити та їхні ядра мають характерну форму та розмір, цитоплазма рівномірно забарвлена, не містить включень, які можна побачити при світловій мікроскопії. PAS-реакція показала, що цитоплазма клітин рівномірно і досить щільно заповнена дрібними гранулами глікогену, забарвлення суданом не виявило присутності триацилгліцеролів у гепатоцитах (рис. 1).

Після тривалого утримання на гіперкалорійній дієті відзначається крупновогнищеве порушення балкової будови печінкової паренхіми, гепатоцити в таких зонах часто розташовуються хаотично. Самі клітини дистрофічно змінені, вони крупніші, клітинні

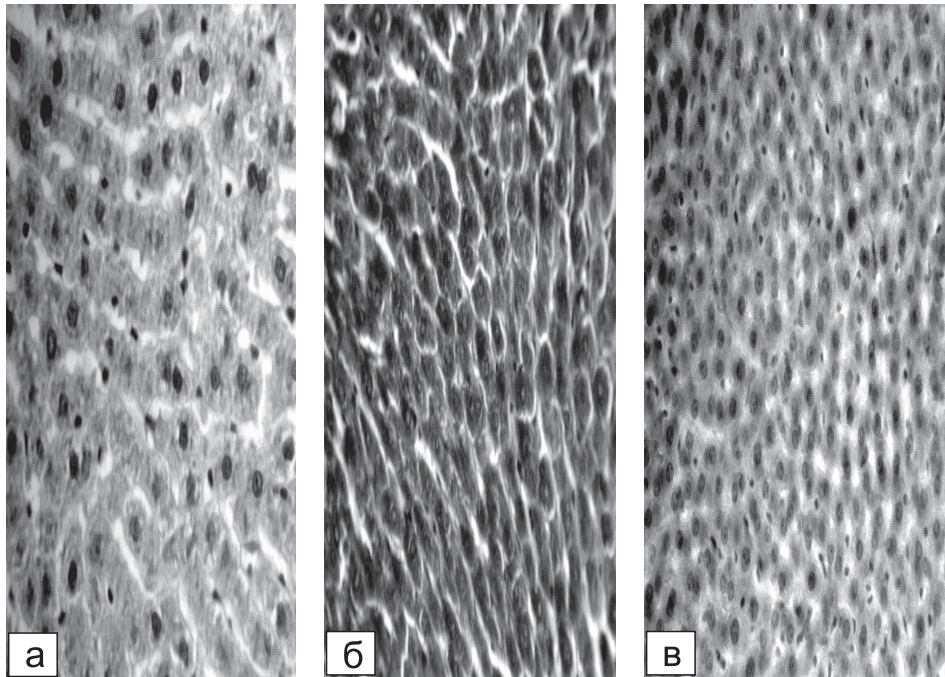


Рис. 1. Печінка інтактного щура: а – радіальна спрямованість гепатоцитів не порушена, клітини звичайні за розміром, цитоплазма без помітних включень (гематоксилін-еозин); б – цитоплазма гепатоцитів рівномірно заповнена гранулами глікогену (PAS-реакція); в – відсутність жиру в клітинах (судан IV). X250.

граничі чіткіші, цитоплазма слабше забарвлювалася еозином, внаслідок чого часто дифузно або зонально виглядає оптично порожньою. Разом з тим досить чітко простежується вакуолізація в цитоплазмі гепато-

цитів. Ядра клітин часто «тьмяні». Через більш великі розміри клітин синусоїдальні капіляри помітно звужені. Виразність таких порушень у різних тварин дещо варіювала. Локалізація осередків переваж-

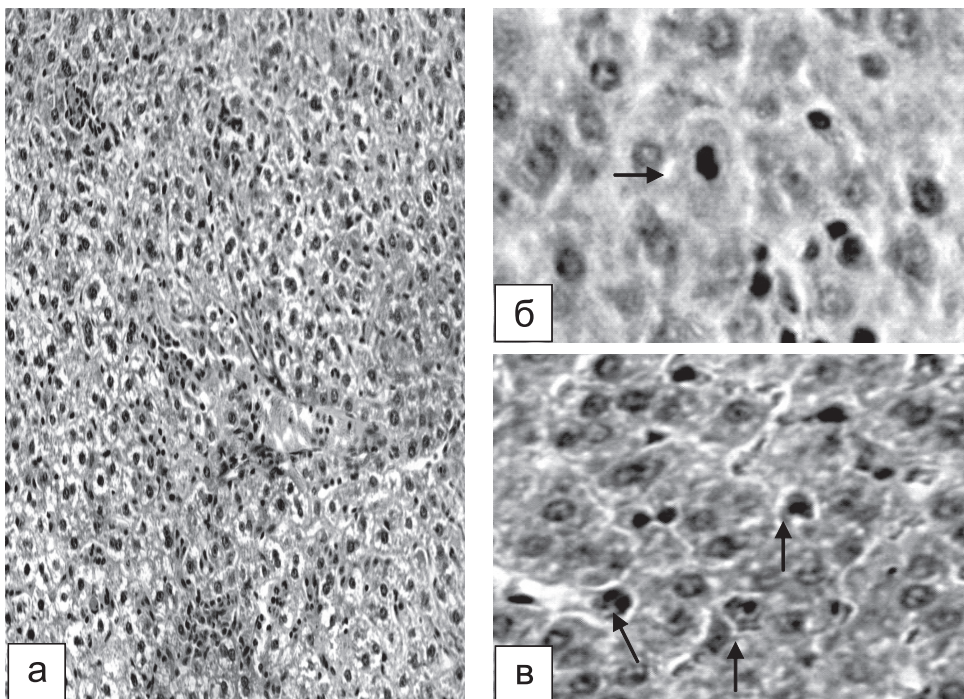


Рис. 2. Печінка щурів, які тривало утримувалися на гіперкалорійній дієті. Радіальна спрямованість тяжів гепатоцитів порушена, цитоплазма клітин оптично порожня (а, x250); початкова (б, x400) і фінальна (в, x400) стадії апоптозу. Гематоксилін-еозин.

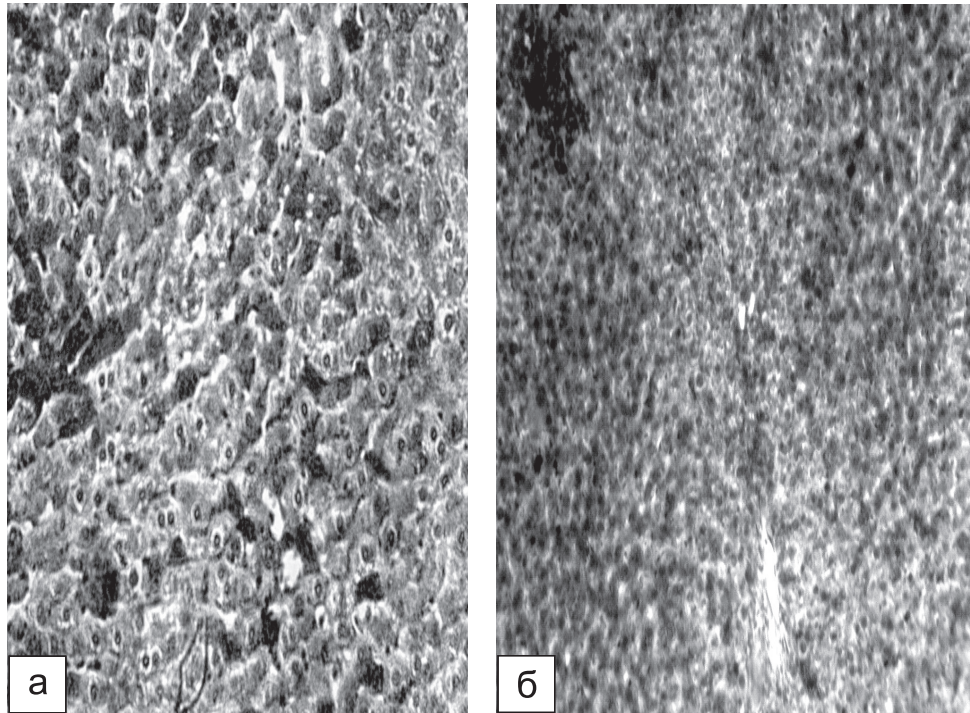


Рис. 3. Печінка щура, який тривало утримувався на гіперкалорійній дієті.
Зниження вмісту глікогену в гепатоцитах (а, PAS-реакція. X250);
накопичення жиру в цитоплазмі клітин (судан IV. x200).

но носила перипортальний характер. Місцями дифузно по часточці проглядаються гепатоцити з ущільненим ядром та інтенсивно забарвленою цитоплазмою (початковими ознаками апоптотичних змін, що визначаються на світлооптичному рівні) і вже ви-

штовхнуті в синусоїдальний простір апоптотичні тільця (рис. 2).

У зоні деяких тріад збільшена круглоклітинна інфільтрація. При постановці PAS-реакції відмічається значне зниження вмісту глікогену в гепатоцитах,

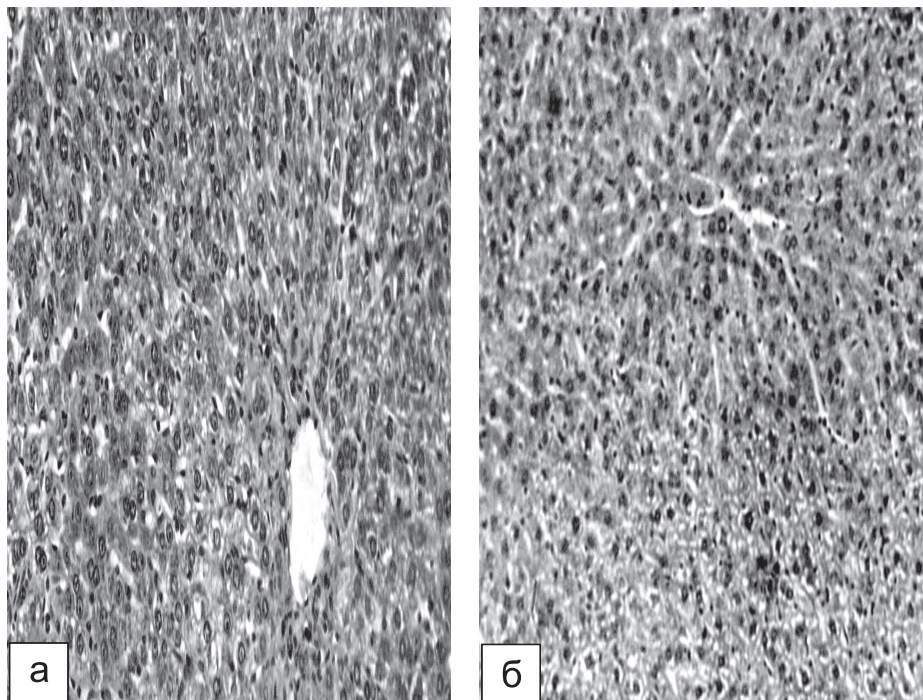


Рис. 4. Печінка щурів, які отримували інгібітор JNK G0007 (а) або інгібітор JNK 0006 (б).
Зменшення зон порушення структури тканини, дистрофії гепатоцитів. Гематоксилін-еозин. x200.

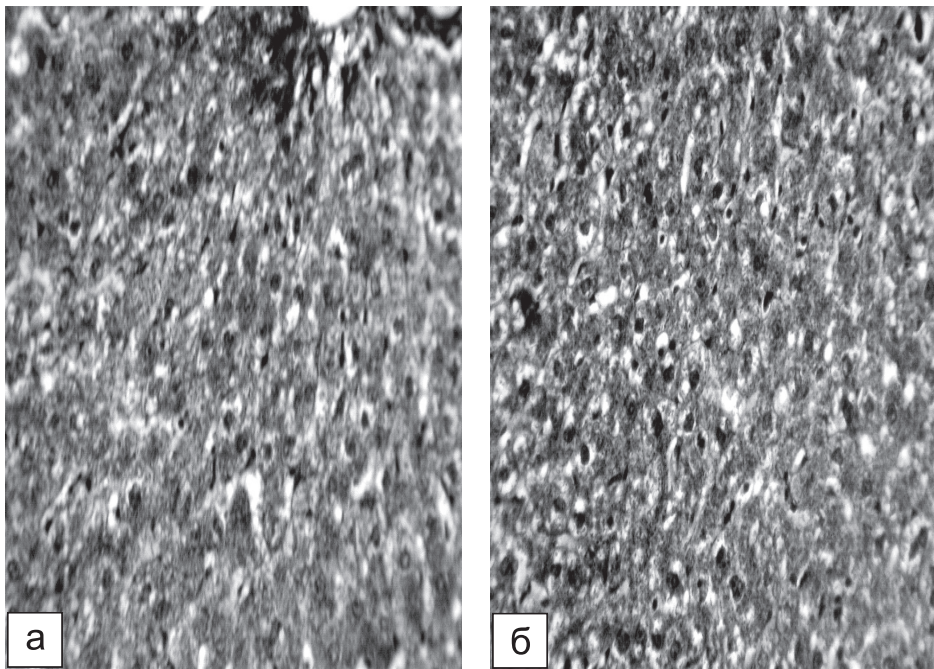


Рис. 5. Печінка щурів, які отримували інгібітор JNK G0007 (а) або інгібітор JNK 0006 (б). Збільшення вмісту глікогену щодо контрольної патології. PAS-реакція. $\times 250$.

особливо в осередках з оптично порожніми клітинами. Забарвлення суданом показує наявність у цитоплазмі таких клітин досить значного вмісту жиру. Жирові включення носили в основному середньокрапельний характер (рис. 3).

У щурів, які впродовж останніх двох тижнів на тлі гіперкалорійної дієти отримували інгібітор JNK

G0007 або інгібітор JNK 0006, відзначається зниження виразності дистрофії гепатоцитів, зменшення зон порушення рисунка паренхіми, апоптоз гепатоцитів непомітний (рис. 4).

PAS-реакція в цілому показала збільшення вмісту глікогену в цитоплазмі клітин, особливо в ділянках з відновленою структурою часточок (рис. 5), а при

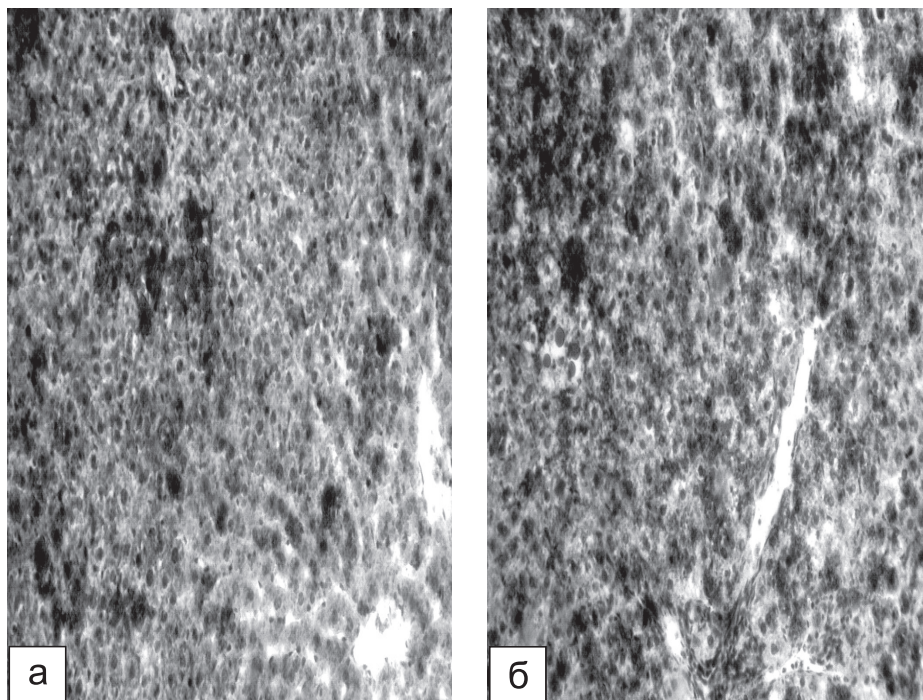


Рис. 6. Печінка щурів, які отримували інгібітор JNK 0006 (а) або інгібітор JNK G0007 (б). Звуження виразності жирової дистрофії. Судан IV. $\times 200$.

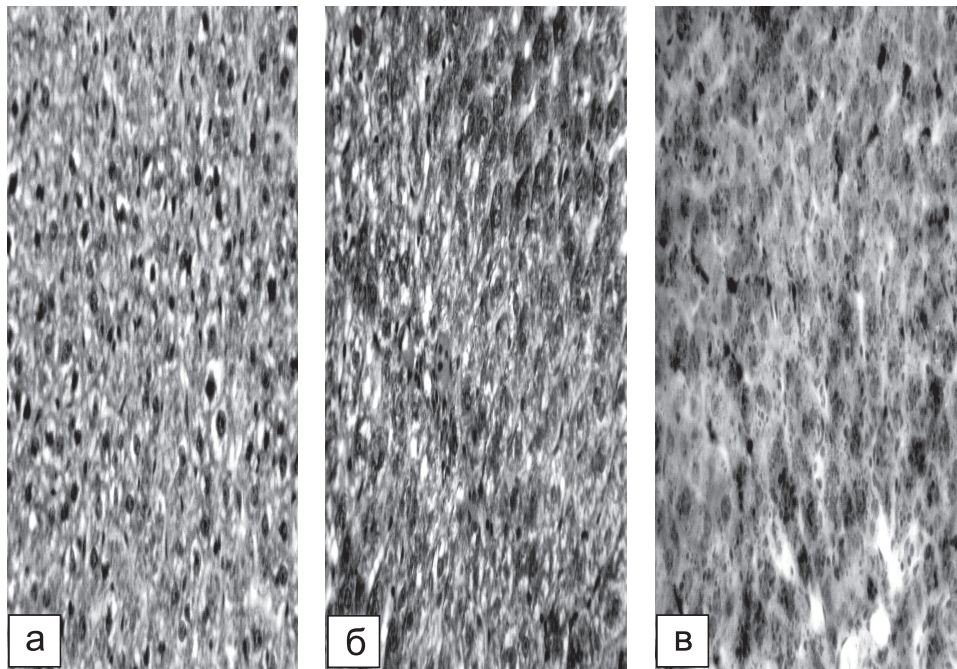


Рис. 7. Печінка щурів, які отримували препарат порівняння «Гарцинія»: зниження виразності дистрофії гепатоцитів (а, гематоксилін-еозин); порушень вуглеводного (б, PAS-реакція) і жирового (в, судан IV) обміну. $\times 250$.

фарбуванні суданом – зниження наявності жиру в гепатоцитах і звуження зон жирової дистрофії (рис. 6). Апоптотично змінені клітини були нечисленні. Позитивний ефект впливу нових інгібіторів JNK на стан печінкової паренхіми більш чітко виражений у щурів, які отримували інгібітор JNK G0007.

Введення в тому ж режимі препарату порівняння «Гарцинія» також покращувало морфологічний стан печінки щурів. Виразність позитивного впливу препарату «Гарцинія» трохи поступаєтья такому при введенні JNK 0006 і JNK G0007 (рис. 7).

ВИСНОВКИ

Таким чином, підбиваючи підсумок за отриманими результатами можна зробити висновок про те, що висококалорійна дієта формує у самців щурів аліментарну дисліпідемію, що призводить до стану інсулінорезистентності та супроводжується осередковою дезорганізацією структури органу, ознаками дистрофії гепатоцитів, посиленням апоптозу. Після утримання тварин на гіперкалорійній дієті у них розвивається стеатоз печінки та виражено знижується рівень глікогену в гепатоцитах.

Нові інгібітори JNK знижують дистрофію гепатоцитів, послаблюючи виразність стеатозу та порушень вуглеводного обміну, звужуючи зони дезорганізації структури тканини, можливо, створюючи цим передумови до зниження апоптозу (зорово зменшуються морфологічні прояви апоптичних змін клітин). За виразності позитивного впливу на стан печінки щурів, які утримуються на гіперкалорійній дієті, ін-

гібітор JNK G0007 дещо перевершує інгібітор JNK 0006. Обидва нових інгібітори JNK не поступаються препарату порівняння «Гарцинія».

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники. – М.: Медицина, Ленингр. отд-ние, 1969. – 424 с.
2. Пирс Э. Гистохимия. Теоретическая и прикладная. – М.: Изд-во ИЛ, 1962. – 962 с.
3. Atlas M. Endothelial dysfunction in high-fructose containing diet fed rats: increasing nitric oxide and decreased endotelin-1 levels in liver tissue / [M. Atlas, A. Var, K. Ozbilgin et al.] // Dicle Med. J. – 2010. – Vol. 37, № 3. – P. 193-198.
4. Brenner D. A. Non-alcoholic steatohepatitis-induced fibrosis: Toll-like receptors, reactive oxygen species and Jun N-terminal kinase / [D. A. Brenner, E. Seki, K. Taura et al.] // Hepatol. Res. – 2011. – № 41. – P. 683-686. doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00814.x
5. Chiang D. J. Obesity, diabetes mellitus, and liver fibrosis / D. J. Chiang, M. T. Pritchard, L. E. Nagy // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. – 2011. – № 300. – P. G697-G702. doi:10.1152/ajpgi.00426.2010.
6. Gautheron J. A positive feedback-loop between RIP3 and JNK controls Non-Alcoholic-Steatohepatitis / [J. Gautheron, M. Vucur, F. Reisinger et al.] // EMBO Molecular Medicine Peer Review Process File – EMM-2014-03856.
7. Minicis S. De Cellular and molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis leading to liver cancer / [S. De

- Minicis, M. Marzioni, S. Saccomanno Transl et al.] // *Gastrointest. Cancer.* – 2012. – № 1. – P. 88-94. doi: 10.3978/j.issn.2224-4778.2011.12.05.
8. 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 et al.] // *Gastroenterol.* – 2012. – № 143. – P. 307-320. <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.004>.
 9. Stebbins J. L. Identification of a new JNK inhibitor targeting the JNK-JIP interaction site / [J. L. Stebbins, S. K. De, T. Machleidt et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2008. – № 105. – P. 16809-16813.
 10. Wang Y. Increased Apoptosis in High-Fat Diet-Induced Nonalcoholic Steatohepatitis in Rats Is Associated with c-Jun NH2-Terminal Kinase Activation and Elevated Proapoptotic Bax / [Y. Wang, L. M. Ausman, R. M. Russell et al.] // *J. Nutr.* – 2008. – № 138. – P. 1866-1871.
 11. Zeng L. Signal transductions and nonalcoholic fatty liver: a mini-review / [L. Zeng, W. J. Tang, J. J. Yin et al.] // *Int. J. Clin. Exp. Med.* – 2014. – № 7(7). – P. 1624-1631. www.ijcem.com / ISSN:1940-5901 / IJCEM0000962.
 12. Zivkovic A. M. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease / [A. M. Zivkovic, J. B. German, A. J. Sanyal et al.] // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2007. – № 86. – P. 285-300.

УДК 661.12091.547

А. Л. Загайко, А. Б. Кравченко, Мусмари Мохамед Ахмед

КОРРЕКЦИЯ НОВЫМИ ИНГИБИТОРАМИ JNK МОРФОСТРУКТУРЫ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ГИПЕРКАЛОРИЙНОЙ ДИЕТЫ

В печени JNK играют роль в развитии последствий гиперкалорийной диеты. Изоформы JNK регулируют клеточную гибель и выживание, дифференциацию, пролиферацию, накопление АФК, сигналинг инсулина и канцерогенез в печени. Целью данной работы было исследование влияния ингибирования JNK на морфоструктуру гепатоцитов в условиях инсулинорезистентности. Результаты эксперимента свидетельствуют, что новые ингибиторы JNK снижают дистрофию гепатоцитов, ослабляя степень стеатоза и нарушений углеводного обмена, уменьшая зоны дезорганизации структуры ткани, возможно, создавая этим условия для снижения апоптоза.

Ключевые слова: ингибиторы JNK; инсулинорезистентность; стеатоз печени

UDC 661.12091.547

A. L. Zagayko, G. B. Kravchenko, Musmari Mohamed Ahmed

CORRECTION BY NEW JNK INHIBITORS RAT LIVER MORPHOSTRUCTURE UNDER THE HIGH-CALORIE DIET

In the liver JNK plays an important role in the development hyper-calorie diet consequences. JNK isoforms regulate cell death and survival, differentiation, proliferation, accumulation of ROS, insulin signaling and carcinogenesis in the liver. The aim of this study was to investigate the effect of the JNK inhibitors on the hepatocytes morphostructure under insulin resistance. The experimental results indicate that the new JNK inhibitors reduce the degeneration of hepatocytes, the intensity of steatosis and disorders of carbohydrate metabolism, diminish the tissue structure disorganization area and possibly lead to apoptosis inhibition.

Key words: JNK inhibitors; insulin resistance; liver steatosis

Адреса для листування:

61002, м. Харків, вул. Мельникова, 12.

E-mail: annabk2014@gmail.com.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 06.08.2015 р.