

УДК 577.126:57.042

А. Л. Загайко, О. А. Красильникова, Мухамед Ахмед Мусмари

Национальный фармацевтический университет

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ JNK КИНАЗ

Поиск новых ингибиторов JNK киназ является актуальной проблемой современной фармакологии. Ранее показано, что некоторые ингибиторы киназ JNK проявляют антиоксидантную активность. Целью настоящего исследования было изучение антиоксидантной активности группы потенциальных ингибиторов JNK. В работе определяли содержание ТБК-реактивных продуктов и диеновых конъюгатов, а состояние ферментативного звена антиоксидантной защиты определяли по активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы. Вещества Х0001, G0002, G0003 снижали содержание ТБК-РП, ДК и активность СОД. При этом вещества G0002 и G0003 проявляли активность только в концентрации 100 мкМ, а Х0001 – в обеих концентрациях. Наибольшую активность показало вещество Х0001.

Ключевые слова: печень; JNK; супероксиддисмутаза; каталаза; диеновые конъюгаты; ТБК-реактивные продукты

ВВЕДЕНИЕ

c-jun N-концевые киназы (JNK) – подкласс митоген активируемых протеинкиназ (МАРК), которые участвуют в передаче сигналов от клеточной мембраны к ядру и аппарату генной транскрипции, играют ключевую роль в развитии многих заболеваний человека, в частности, различных видов опухолей, сердечно-сосудистых расстройств, диабета, нейродегенеративных заболеваний, нарушений иммунитета [9, 12]. В настоящее время JNK является важной терапевтической мишенью, а поиск новых ингибиторов JNK – актуальной проблемой фармакологии.

Ранее мы исследовали активность ряда потенциальных ингибиторов JNK. Было показано, что целый ряд соединений ингибирует активность JNK киназ, которую стимулировали под действием ацетаминофена.

Известно, что в активацию JNK вовлечены различные факторы и сигнальные пути. Взаимодействие факторов роста и некоторых цитокинов приводит к активации MAP-киназных сигнальных путей, активирующие JNK [8]. Активация JNK также происходит под влиянием ряда физических факторов, которые генерируют образование активных форм кислорода и развитие оксидативного стресса в клетке [10].

Имеются данные о том, что некоторые ингибиторы JNK киназ проявляют антиоксидантную актив-

ность. Показано, что JNK в гладкомышечных клетках ингибируется в присутствии антиоксидантов [10]. Аналог куркумина (2E,6E)-2,6-бис(2-(трифлуорометил)бензилиден) циклогексан, антиоксидант, который подавляет развитие диабетической кардиомиопатии, тормозит образование фосфорилированной формы JNK в кардиомиоцитах [15]. Применение антиоксидантов приводит к ингибированию JNK в миообластах крыс и восстанавливает чувствительность клеток к инсулину [14]. В то же время данные об антиоксидантной активности исследуемых потенциальных ингибиторов JNK отсутствуют.

Поэтому целью настоящей работы было изучение антиоксидантной активности соединений – потенциальных ингибиторов JNK киназ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты были проведены на белых крысах массой 180-200 г, которые содержались на стандартном рационе вивария Национального фармацевтического университета. При выполнении экспериментов придерживались «Общих этических принципов экспериментов на животных» (Украина, 2001), гармонизированных с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей».

Животных декапитировали под хлоразоло-уретановым наркозом. Печень перфузировали *in situ* физиологическим раствором. Печень измельчали на холоде и готовили 10 %-ный гомогенат на 50 мМ трис-HCl буфере, содержащем 50 мМ NaCl.

Таблица 1

**ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ
НА ОБРАЗОВАНИЕ ТБК-РЕАКТИВНЫХ
ПРОДУКТОВ В ГОМОГЕНАТЕ ПЕЧЕНИ КРЫС
(нмоль/мг БЕЛКА, $M \pm m$, $n = 6$)**

Условия эксперимента		
вещество	концентрация	
Интакт		0,567 ± 0,013
X0001	50 мкМ	0,453 ± 0,021*
	100 мкМ	0,484 ± 0,019*
G0002	50 мкМ	0,529 ± 0,018
	100 мкМ	0,432 ± 0,024*
G0003	50 мкМ	0,499 ± 0,028
	100 мкМ	0,467 ± 0,024*
G0004	50 мкМ	0,566 ± 0,019
	100 мкМ	0,535 ± 0,022
G0005	50 мкМ	0,544 ± 0,021
	100 мкМ	0,552 ± 0,016
G0006	50 мкМ	0,550 ± 0,018
	100 мкМ	0,547 ± 0,023
G0007	50 мкМ	0,569 ± 0,018
	100 мкМ	0,565 ± 0,014
G0008	50 мкМ	0,497 ± 0,028
	100 мкМ	0,570 ± 0,013
Гарцинол	50 мкМ	0,467 ± 0,021*
	100 мкМ	0,430 ± 0,019*

Примечание: * – отклонение достоверно относительно интакта ($p \leq 0,05$).

Исследуемые ингибиторы (X0001, G0002, G0003, G0004, G0005, G0006, G0007) вносили в пробы в концентрации 50 и 100 мкМ. В качестве препарата сравнения был использован гарцинол (камбоджинол) (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 25 мкМ [7]. Суспензии исследуемых веществ готовили с добавлением твина-80. Суспензия контрольных клеток содержала твин-80 соответствующей концентрации.

Для определения содержания ТБК-реактивных продуктов к гомогенату печени добавляли 10 % раствор трихлоруксусной кислоты и центрифугировали при скорости 3000 об/мин. К супернатанту добавляли 0,75 % раствора ТБК. Пробы инкубировали на протяжении 15 минут на кипящей водяной бане, охлаждали. Оптическую плотность измеряли при длине волны 532 нм [1].

Уровень кетодиенов определяли по методу, описанному в работе [2]. Активность супероксиддисмутазы (СОД, КФ 1.15.1.1) определяли по В. И. Чумакову, активность фермента выражали в условных ед./г белка [6], активность каталазы (КФ 1.11.1.6) – по методу М. А. Королюка и соавт. [2]. Содержание белка в гомогенате печени определяли по методу Лоури [5].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы STATISTICA (StatSoft Inc., США, версия 6.0). Значимость межгрупповых отличий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Таблица 2

**ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ НА УРОВЕНЬ
ДИЕНОВЫХ КОНЬЮГАТОВ В ГОМОГЕНАТЕ
ПЕЧЕНИ КРЫС (УСЛОВНЫЕ ЕДИНИЦЫ,
E232/220, $M \pm m$, $n = 6$)**

Условия эксперимента		
вещество	концентрация	
Интакт		0,340 ± 0,013
X0001	50 мкМ	0,253 ± 0,021*
	100 мкМ	0,244 ± 0,019*
G0002	50 мкМ	0,402 ± 0,024
	100 мкМ	0,301 ± 0,018*
G0003	50 мкМ	0,319 ± 0,012
	100 мкМ	0,252 ± 0,014*
G0004	50 мкМ	0,355 ± 0,018
	100 мкМ	0,372 ± 0,024
G0005	50 мкМ	0,309 ± 0,028
	100 мкМ	0,332 ± 0,014
G0006	50 мкМ	0,319 ± 0,018
	100 мкМ	0,299 ± 0,027
G0007	50 мкМ	0,319 ± 0,017
	100 мкМ	0,345 ± 0,014
G0008	50 мкМ	0,351 ± 0,012
	100 мкМ	0,333 ± 0,013
Гарцинол	50 мкМ	0,251 ± 0,015*
	100 мкМ	0,233 ± 0,017*

Примечание: * – отклонение достоверно относительно интакта ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе уровень развития оксидативного стресса, а также антиоксидантные свойства исследуемых соединений оценивали по содержанию первичных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК), а также вторичных – соединений, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП) [3]. Полученные результаты представлены в табл. 1, 2.

Было показано, что при внесении в среду инкубации веществ X0001, G0002, G0003 наблюдалось снижение уровня ТБК-реактивных продуктов (табл. 1). Внесение вещества X0001 в концентрации 50 мкМ в среду инкубации гомогената снижало уровень ТБК-РП на 21 %, а в концентрации 100 мкМ – на 18 %. Соединения G0002 и G0003 оказывали действие только в концентрации 100 мкМ и снижали уровень ТБК-РП на 24 % и 18 %, соответственно. Внесение вещества X0001 в концентрации 50 мкМ в среду инкубации гомогената снижало уровень ДК на 26 %, а в концентрации 100 мкМ – на 29 %. Соединения G0002 и G0003 оказывали действие только в концентрации 100 мкМ и снижали уровень ТБК-РП на 12 % и 26 %, соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что данные вещества проявляют антиоксидантную активность. При этом наибольшую активность проявило вещество X0001, тогда как соединения G0002 и G0003 оказывали эффект только в концентрации 100 мкМ.

Таблица 3

**ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ
НА АКТИВНОСТЬ СОД В ГОМОГЕНАТЕ ПЕЧЕНИ
КРЫС (ед./мг БЕЛКА, $M \pm m$, $n = 6$)**

Условия эксперимента		
вещество	концентрация	
Интакт		100,12 ± 1,5
X0001	50 мкМ	81,57 ± 2,9*
	100 мкМ	78,69 ± 1,6*
G0002	50 мкМ	1031,12 ± 1,1
	100 мкМ	83,41 ± 2,4*
G0003	50 мкМ	99,54 ± 1,8
	100 мкМ	79,01 ± 2,5*
G0004	50 мкМ	101,41 ± 1,9
	100 мкМ	109,03 ± 1,4
G0005	50 мкМ	100,03 ± 2,1
	100 мкМ	97,57 ± 2,3
G0006	50 мкМ	98,71 ± 2,2
	100 мкМ	107,24 ± 1,2
G0007	50 мкМ	111,03 ± 4,8
	100 мкМ	98,93 ± 2,6
G0008	50 мкМ	107,17 ± 1,5
	100 мкМ	111,57 ± 2,9
Гарцинол	50 мкМ	89,14 ± 1,2*
	100 мкМ	83,27 ± 1,8*

Примечание: * – отклонение достоверно относительно интакта ($p \leq 0,05$).

Протекание свободнорадикальных процессов в организме уравнивается активностью эндогенной антиоксидантной системы. Антиоксидантная система защищает клетки, органы и ткани от избытка АФК, удаляет или переводит их в менее реакционные соединения, поддерживая таким образом баланс между продукцией АФК и их утилизацией. В настоящей работе уровень ферментативного звена антиоксидантной защиты определяли по активности супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы.

Нами было показано, что внесение веществ X0001, G0002, G0003 в среду инкубации гомогената печени влияет на активность СОД (табл. 3). Так, соединение X0001 в концентрации 50 мкМ снижало активность фермента на 21 %, а в концентрации 100 мкМ – на 18 % (табл. 3). Соединения G0002 и G0003 также снижали активность фермента на 23 % и 27 %, соответственно.

Наблюдаемое снижение активности СОД при внесении в среду инкубации гомогената исследуемых соединений может быть обусловлено тем, что данные вещества проявляют антиоксидантные свойства, связывая АФК, в т. ч. супероксидный радикал, который выступает по отношению к СОД активирующим фактором [8]. Следует отметить, что исследуемые вещества не влияют на активность каталазы в пробах (табл. 4). Падение активности ферментов антиоксидантной защиты закономерно коррелировало со сни-

Таблица 4

**ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ ВЕЩЕСТВ
НА АКТИВНОСТЬ КАТАЛАЗЫ В ГОМОГЕНАТЕ
ПЕЧЕНИ КРЫС (мккат НА 1 мг БЕЛКА,
 $M \pm m$, $n = 6$)**

Условия эксперимента		
вещество	концентрация	
Интакт		7,11 ± 0,72
X001	50 мкМ	8,05 ± 0,97
	100 мкМ	6,35 ± 0,76
G0002	50 мкМ	6,80 ± 0,44
	100 мкМ	7,47 ± 0,51
G0003	50 мкМ	7,94 ± 0,52
	100 мкМ	6,95 ± 0,74
G0004	50 мкМ	7,24 ± 0,51
	100 мкМ	6,77 ± 0,69
G0005	50 мкМ	7,31 ± 0,62
	100 мкМ	6,56 ± 0,72
G0006	50 мкМ	8,95 ± 0,83
	100 мкМ	6,84 ± 0,76
G0007	50 мкМ	6,80 ± 0,63
	100 мкМ	7,27 ± 0,32
G0008	50 мкМ	7,57 ± 0,52
	100 мкМ	7,05 ± 0,77
Гарцинол	50 мкМ	6,74 ± 0,49
	100 мкМ	7,01 ± 0,55

жением процессов ПОЛ, о чем свидетельствовало снижение уровня ТБК-РП и ДК (табл. 1, 2).

ВЫВОДЫ

1. Вещества X0001, G0002, G0003 снижали содержание ТБК-РП и ДК в пробах. При этом вещества G0002 и G0003 проявляли активность только в концентрации 100 мкМ, а X0001 – в обеих концентрациях.
2. Вещества X0001, G0002, G0003 снижали активность СОД в гомогенате печени. При этом вещества G0002 и G0003 проявляли активность только в концентрации 100 мкМ, а X0001 – в обеих концентрациях.
3. Наибольшую активность показало вещество X0001.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ИНФОРМАЦИИ

1. Кондрахин И. П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики: [справ.]. – М.: Колос, 2004. – 520 с.
2. Королюк М. А. Метод определения активности каталазы / М. А. Королюк, А. И. Иванова, И. Г. Майорова, В. Е. Токарев // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.
3. Литовский И. А. Атеросклероз и гипертоническая болезнь. Вопросы патогенеза, диагностики и лечения / И. А. Литовский, А. В. Гордиенко. – С. Пб.: СпецЛит, 2013. – 308 с.

4. Макаревич О. П. Определение активности супероксиддисмутазы / О. П. Макаревич, П. П. Голиков // Лаб. дело. – 1983. – № 6. – С. 24-28.
5. Практикум по биохимии / Под ред. С. Е. Северина, Г. А. Соловьевой. – М.: Изд-во МГУ, 1989.
6. Чумаков В. И. Количественный метод определения активности Zn, Cu-зависимой СОД в биологическом материале / В. И. Чумаков, Л. Ф. Осинская // Вопросы мед. химии. – 1977. – № 5. – С. 712-718.
7. Ahmad A. Anticancer action of garcinol *in vitro* and *in vivo* is in part mediated through inhibition of STAT-3 signaling / [A. Ahmad, S. H. Sarkar, A. Aboukameel et al.] // Carcinogenesis. – 2012. – Vol. 33, № 12. – P. 2450-2456.
8. Futosi K. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways / K. Futosi, S. Fodor, A. Mócsai // Int. Immunopharmacol. – 2013. – Vol. 17, № 3. – P. 638-650.
9. Gehringer M. c-Jun N-terminal kinase inhibitors: a patent review (2010-2014) / M. Gehringer, F. Muth, P. Koch, S. A. Laufer // Expert Opin. Ther. Pat. – 2015. – Vol. 25, № 8. – P. 849-872.
10. Hotamisligil G. S. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes / G. S. Hotamisligil // Diabetes. – 2005. – Vol. 54 (suppl 2). – P. S73-S78.
11. Kyaw M. Antioxidants inhibit JNK and p38 MAPK activation but not ERK 1/2 activation by angiotensin II in rat aortic smooth muscle cells. / [M. Kyaw, M. Yoshizumi, K. Tsuchiya et al.] // Hypertens. Res. – 2001. – Vol. 24, № 3. – P. 251-261.
12. Pal M. The roles of c-Jun NH2-terminal kinases (JNKs) in obesity and insulin resistance / M. Pal, M. A. Febbraio, G. I. Lancaster // J. Physiol. – 2016. – Vol. 594, № 2. – P. 267-279.
13. Samokhvalov V. Palmitate- and lipopolysaccharide-activated macrophages evoke contrasting insulin responses in muscle cells / [V. Samokhvalov, P. J. Bilan, J. D. Schertze et al.] // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2009. – Vol. 296, № 1. – E37-E46.
14. Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Uchiyama, M. Michara // Analytical Biochem. – 1978. – Vol. 86. – P. 271-278.
15. Wang Y. Inhibition of JNK by novel curcumin analog C66 prevents diabetic cardiomyopathy with a preservation of cardiac metallothionein expression / [Y. Wang, S. Zhou, W. Sun et al.] // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. – 2014. – Vol. 306, № 11. – E1239-E1247.

УДК 577.126:57.042

А. Л. Загайко, О. А. Красильникова, Мухамед Ахмед Мусмари

ВИВЧЕННЯ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ НОВИХ ПОТЕНЦІЙНИХ ІНГІБІТОРІВ JNK КІНАЗ

Пошук нових інгібіторів JNK киназ є актуальною проблемою сучасної фармакології. Раніше показано, що деякі інгібітори киназ JNK виявляють антиоксидантну активність. Метою цього дослідження було вивчення антиоксидантної активності групи потенційних інгібіторів JNK. У роботі визначали вміст ТБК-реактивних продуктів і дієнових кон'югатів (ДК), а стан ферментативної ланки антиоксидантного захисту визначали за активністю супероксиддисмутази (СОД) і каталази. Речовини X0001, G0002, G0003 знижували вміст ТБК-ПП, ДК і активність СОД. При цьому речовини G0002 і G0003 проявляли активність тільки в концентрації 100 мкМ, а X0001 – в обох концентраціях. Найбільшу активність показала речовина X0001.

Ключові слова: печінка; JNK; супероксиддисмутаза; каталаза; дієнові кон'югати; ТБК-реактивні продукти

UDC 577.126:57.042

A. L. Zagayko, O. A. Krasil'nikova, Mohamed Ahmed Musmari

STUDY ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NEW POTENTIAL INHIBITORS OF JNK KINASES

The search for new inhibitors of JNK kinases is an actual problem of modern pharmacology. Previously it was demonstrated that a few of JNK kinases inhibitors exhibit antioxidant activity. The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of a group of potential inhibitors of JNK. In this paper we determined the TBARS and diene conjugates (DC) content, and the state of the enzymatic antioxidant defense level was determined by the activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase. Substances X0001, G0002, G0003 reduced TBARS and DC content and SOD activity. G0002 and G0003 were effective only at 100 μM, and X0001 at both concentrations. X0001 was the most active substance.

Key words: liver; JNK; superoxide dismutase; catalase; diene conjugates; TBARS

Адреса для листування:
61002, м. Харків, вул. Куликівська, 12.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 24.06.2016 р.