

УДК 577.126:57.042

А. Л. ЗАГАЙКО, О. А. КРАСІЛЬНИКОВА, Г. Б. КРАВЧЕНКО, Ю. І. КОЧУБЕЙ

Національний фармацевтичний університет

ІНГІБУВАННЯ КОМПЛЕКСОМ ПОЛІФЕНОЛІВ ВИНОГРАДУ АКТИВНОСТІ JNK-КІНАЗ В ІЗОЛЬОВАНИХ ГЕПАТОЦИТАХ ЩУРІВ

Активізація JNK-кіназ, які залучені до сигнальних механізмів, що регулюють ріст, диференціювання клітин і процес апоптозу спостерігаються при токсичному ураженні клітин печінки, неалкогольному стеатозі, цирозі та інших захворюваннях печінки. Рослинні поліфеноли можуть пригнічувати активність JNK-кіназ у клітинах печінки. Метою цієї роботи було порівняльне вивчення впливу кверцетину та комплексу поліфенолів винограду на вміст ліпідів і активність JNK-кіназ в ізольованих гепатоцитах щурів. Інкубація ізольованих гепатоцитів у присутності ацетамінофену – активатора JNK супроводжується збільшенням активності АЛТ і АСТ в інкубаційному середовищі гепатоцитів, у клітинах печінки спостерігалось підвищення вмісту триацилгліцеринів, жирних кислот та зниження рівня фосфоліпідів. Поліфеноли винограду та кверцетин значно нормалізували ці показники. Ацетамінофен підвищує рівень p-JNK, що підтверджує її активізацію. Внесення в середовище інкубації кверцетину або концентрату поліфенолів винограду значно знижує вміст p-JNK, що свідчить про інактивізацію JNK-кінази.

Ключові слова: гепатоцити; кверцетин; поліфеноли винограду; JNK; ацетамінофен; аланінаміотрансфераза; триацилгліцерини

ВСТУП

JNK – це група серин-треонінових кіназ, які належать до родини MAP-кіназ, залучених до сигнальних механізмів, що регулюють ріст, диференціювання клітин і процес апоптозу [10]. Активізація JNK спостерігається при токсичному ураженні клітин печінки, неалкогольному стеатозі, цирозі, широкому спектрі онкологічних захворювань печінки [8]. Тому пошук інгібіторів JNK є надзвичайно актуальною проблемою. Проте існуючі синтетичні інгібітори JNK дуже токсичні, отже, метою нашої роботи був пошук речовин природного походження, які можуть виявляти активність у відношенні JNK.

Кверцетин – натуральний флавоноїд, потужний антиоксидант, як і всі біофлавоноїди стабілізує клітинні мембрани, захищає стінки судин та модулює імунну функцію. Крім того, кверцетин здатний гальмувати запальний процес шляхом активації тирозинових кіназ Src і p38 [11]. Останнім часом з'явилися дані про те, що кверцетин пригнічує індукований іонами свинцю каскад сигнальних PI3K/Akt і IRE1/JNK кіназ [5]. Однак точний механізм дії рослинних поліфенолів залишається до кінця не з'ясованим. Багатим джерелом природних поліфенолів, у тому числі кверцетину, є кримський виноград і продукти його

переробки. Тому їх вивчення може бути перспективним у напрямку використання для терапії захворювань печінки.

Метою цієї роботи було порівняльне вивчення впливу кверцетину та комплексу поліфенолів винограду на вміст ліпідів і активність JNK-кіназ в ізольованих гепатоцитах щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Досліди проводили на білих щурах-самцях рандомбредних масою 180-220 г, які утримувалися на стандартному раціоні віварію НФаУ. При виконанні експериментів дотримувалися «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 [9]. Печінку подрібнювали, суспензію з фрагментами печінки інкубували впродовж 1-2 хв, клітини фільтрували через нейлоновий сітчастий фільтр з діаметром пор 100 мкм. Гепатоцити витримували на льоду протягом усього процесу.

Остаточний осад клітин переважно містить 90 % гепатоцитів. Далі клітини інкубували в середовищі Кребса-Хенселейта впродовж 20 годин при 37°C.

Середовище інкубації гепатоцитів містило активатор JNK-кіназ ацетамінофен (2,5 мМ), кверцетин

© Загайко А. Л., Красільникова О. А., Кравченко Г. Б., Кочубей Ю. І., 2014

Таблиця

**ВПЛИВ КВЕРЦЕТИНУ ТА КОНЦЕНТРАТУ ПОЛІФЕНОЛІВ ВІНОГРАДУ НА ВМІСТ ЗЛ, ФЛ, ТГ, ВЖК
В ІЗОЛЬОВАНИХ ГЕПАТОЦИТАХ ТА АКТИВНІСТЬ МАРКЕРНИХ ФЕРМЕНТІВ
У СЕРЕДОВИЩІ ІНКУБАЦІЇ КЛІТИН (M±m, n=6)**

| Показник | Інтакт | Кверцетин | Концентрат поліфенолів винограду | Ацетамінофен | Ацетамінофен + Кверцетин | Ацетамінофен + Концентрат поліфенолів винограду |
|---|-------------------|-------------------|--|--------------------|-----------------------------|--|
| Гепатоцити | | | | | | |
| ЗЛ, ммоль на 7,8•10 ⁶ клітин | 5,33± 0,32 | 5,49± 0,27 | 5,41± 0,22 | 5,66± 0,34 | 5,46± 0,23 | 5,51± 0,19 |
| ТГ, ммоль на 7,8•10 ⁶ клітин | 1,547± 0,025 | 1,491± 0,031 | 1,585± 0,054 | 2,301± 0,028† | 1,781± 0,149 †† | 1,585± 0,054 †† |
| ФЛ, ммоль на 7,8•10 ⁶ клітин | 3,72± 0,14 | 3,67± 0,17 | 3,89± 0,09 | 1,92± 0,11 † | 2,43± 0,12 †† | 2,98± 0,14 †† |
| ВЖК, ммоль на 7,8•10 ⁶ клітин | 1,24± 0,04 | 1,27± 0,05 | 1,19± 0,08 | 1,49± 0,09 † | 1,31± 0,05 †† | 1,32± 0,04 †† |
| Інкубаційне середовище | | | | | | |
| Активність АЛТ, мкмоль/(ч•мл) | 0,0389± 0,0024 | 0,0373± 0,0017 | 0,0369± 0,0014 | 0,0567± 0,0043† | 0,0475± 0,0051†† | 0,0393± 0,0026†† |
| Активність АСТ, мкмоль/(ч•мл) | 0,0311± 0,0024 | 0,0332± 0,0018 | 0,0327± 0,0018 | 0,478± 0,0013† | 0,391± 0,0021†† | 0,0375± 0,0012†† |

Примітки: † – відхилення вірогідне відносно інтакту (p≤0,05), †† – відхилення вірогідне відносно ацетамінофену (p≤0,05).

(100 мкМ) та концентрат поліфенолів, отриманих з насіння винограду (100 мкМ у перерахунку на поліфеноли). В інкубаційному середовищі визначали активність аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартат-амінотрансферази (АСТ). У клітинах печінки визначали вміст триацилгліцеринів (ТГ), фосфоліпідів (ФЛ), вільних жирних кислот (СЖК), загальних ліпідів (ЗЛ). Дані показники визначали з використанням стандартних наборів реактивів фірми «Філісіт-Діагностика», (Дніпропетровськ, Україна) та фірми «Lachema», (Чехія). Для визначення рівня загальної JNK використовували набір реактивів Total JNK Pan Specific DuoSet IC ELISA (R&D Systems, Inc., USA), для фосфорильованої JNK (p-JNK) використовували набір реактивів [pThr183/Tyr185] JNK1/2 EIA kit (Enzo Life Sciences).

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми STATISTICA (StatSoft Inc., США, версія 6.0). Значущість міжгрупових відмінностей оцінювали за *t*-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Отримані результати показали, що інкубація ізолюваних гепатоцитів у присутності ацетамінофену супроводжується збільшенням активності АЛТ і АСТ в інкубаційному середовищі гепатоцитів в 1,46 і 1,54 рази відповідно (табл.). При цьому в клітинах печінки спостерігалось підвищення вмісту ТГ, ВЖК та зниження вмісту ФЛ. Відомо, що токсична дія ацетамінофену на гепатоцити опосередкована активацією JNK-кінази, генерацією активних форм кисню та розвитком оксидативного стресу [3, 7]. Фрагментація ДНК, нітрозильний стрес та ушкодження плазматичних мембран супроводжуються вивільненням у плаз-

му крові ферментів – маркерів цитолізу гепатоцитів АЛТ та АСТ. У нашому експерименті ми спостерігали підвищення активності цих ферментів у середовищі інкубації гепатоцитів (табл.). Внесення до інкубаційного середовища кверцетину або концентрату поліфенолів винограду в значній мірі нормалізувало негативні ефекти ацетамінофену, знижуючи активність ферментів в інкубаційному середовищі, а також відмінюючи накопичення ТГ в ізолюваних клітинах. При цьому слід зазначити, що ці ефекти можуть бути пов'язані як з високою антиоксидантною активністю кверцетину та концентрату поліфенолів винограду, так і з їх здатністю впливати на активність сигнальних кіназ.

Достатньо широко відомо, що кверцетин та інші поліфенольні сполуки винограду виявляють антиоксидантну активність [1]. Проте останнім часом з'являються дані, які свідчать про те, що поліфенольні сполуки з винограду можуть не тільки виявляти антиоксидантну активність, але й регулювати різні сигнальні шляхи у клітинах, зокрема ФІЗ-кіназа/Акт, p38 MAPK і JNK шляхи [2, 6].

Так, ми показали, що ацетамінофен не змінює загальний рівень JNK-кінази у клітинах печінки (рис. 1), проте він викликає її активацію, про що свідчить підвищення рівня p-JNK (рис. 2). Внесення до середовища інкубації кверцетину або концентрату поліфенолів винограду значно знижує вміст p-JNK, що свідчить про інактивацію JNK-кінази. Слід зазначити, що при внесенні комплексу поліфенолів у складі концентрату поліфенолів винограду зниження рівня p-JNK було більш виразним, ніж при окремому внесенні кверцетину. Отримані дані можуть

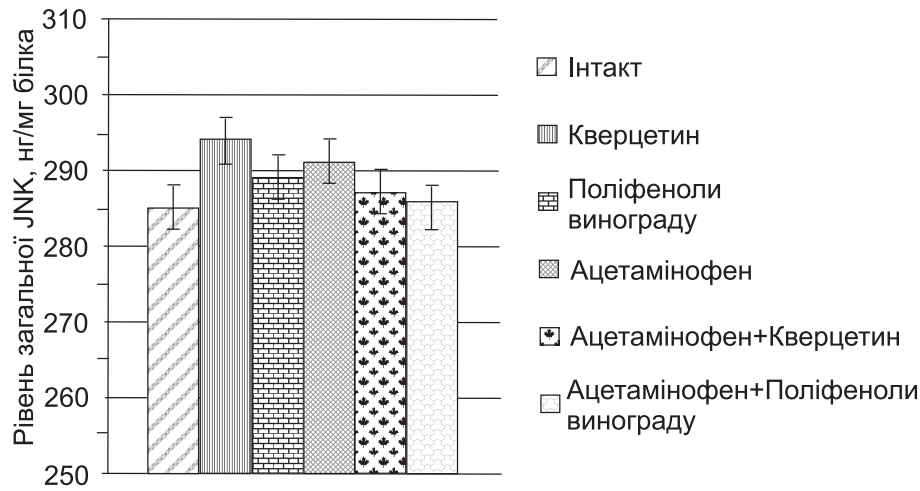


Рис. 1. Рівень загальної JNK (нг/мг білка) в ізольованих гепатоцитах.

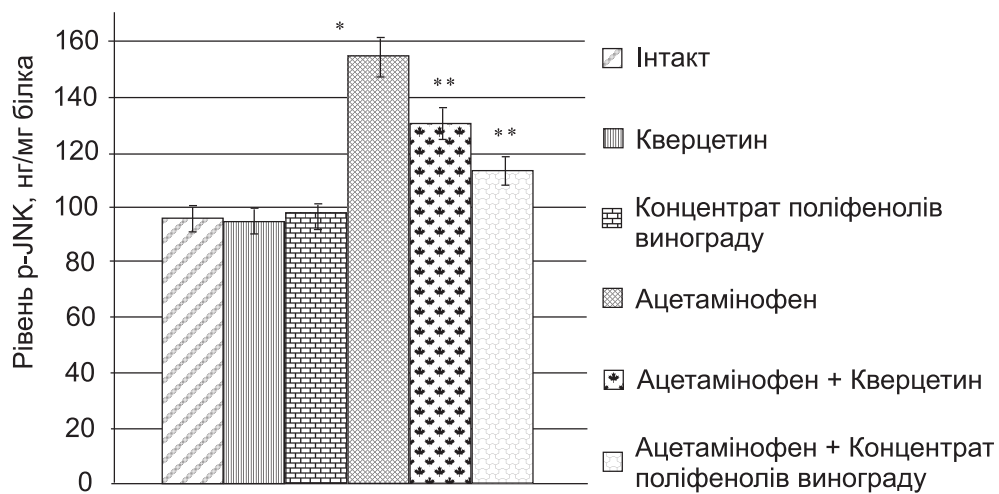


Рис. 2. Рівень p-JNK (нг/мг білка) в ізольованих гепатоцитах. * – відхилення вірогідне відносно інтактну ($p \leq 0,05$), ** – відхилення вірогідне відносно ацетамінофену ($p \leq 0,05$).

свідчити про те, що до складу концентрату поліфенолів винограду, окрім кверцетину, входять поліфеноли, які також можуть впливати на активність JNK-кінази [2, 4].

ВИСНОВКИ

1. Ацетамінофен підвищує рівень p-JNK в ізольованих гепатоцитах щурів. Дія ацетамінофену супроводжується збільшенням вмісту ТГ та вивільненням ферментів – маркерів цитолізу з клітин.
2. Кверцетин та концентрат поліфенолів винограду знижували рівень p-JNK в ізольованих гепатоцитах щурів, що супроводжувалося нормалізацією вмісту ТГ, ФЛ, та знижували активність АЛТ та АСТ.
3. Комплекс поліфенолів винограду проявляв більш виразну інгібуючу дію по відношенню до JNK порівняно з індивідуальним кверцетином.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Загайко А. Л., Филимоненко В. П., Кравченко А. Б., Кочубей Ю. И. Антиоксидантні ефекти поліфенолів винограду в печені крыс при адреналіновому стресі // Матер. XXIX Всеукр. наук.-практ. конф. за міжнар. участю: [Ліки-людині. Сучасні проблеми створення, вивчення та апробації лікарських засобів] (15 березня 2012 р.). – Х.: НФаУ, 2012. – С. 225-232.
2. Alhosin M. Redox-sensitive up-regulation of eNOS by purple grape juice in endothelial cells: role of PI3-kinase/Akt, p38 MAPK, JNK, FoxO1 and FoxO3a / [M. Alhosin, E. Anselm, S. Rashid et al.] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, № 3. – Pp 57883.
3. Gandhi A. Role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in regulating tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) mediated increase of acetaminophen (APAP) and chlorpromazine (CPZ) toxicity in murine hepatocyt-

- tes / A. Gandhi, T. Guo, R. Ghose // *J. Toxicol. Sci.* – 2010. – Vol. 35, № 2. – P. 163-173.
4. Ji L. Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism / [L. Ji, P. Jiang, B. Lu et al.] // *J. Nutr. Biochem.* – 2013. – Vol. 24, № 11. – P. 1911-1919.
 5. Marcolin E. Quercetin treatment ameliorates inflammation and fibrosis in mice with nonalcoholic steatohepatitis / [E. Marcolin, B. San-Miguel, D. Vallejo et al.] // *J. Nutr.* – 2012. – Vol. 142, № 10. – P. 1821-1828.
 6. Overman A. Polyphenol-rich grape powder extract (GPE) attenuates inflammation in human macrophages and in human adipocytes exposed to macrophage-conditioned media / [A. Overman, A. Bumrungpert, A. Kennedy et al.] // *Int. J. Obes. (Lond).* – 2010. – Vol. 34, № 5. – P. 80080-8.
 7. 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.
 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 // *Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 143, № 2. – P. 307-320.
 9. 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.
 10. 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.
 11. Yu T. HangAmDan-B, an ethnomedicinal herbal mixture, suppresses inflammatory responses by inhibiting Syk/NF- κ B and JNK/ATF-2 pathways / [T. Yu, S. H. Moh, S. B. Kim et al.] // *J. Med. Food.* – 2013. – Vol. 16, № 1. – P. 56-65.

УДК 577.126: 57.042**А. Л. Загайко, О. А. Красильникова, А. Б. Кравченко, Ю. И. Кочубей****ИНГИБИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОМ ПОЛИФЕНОЛОВ ВИНОГРАДА АКТИВНОСТИ JNK КИНАЗ В ИЗОЛИРОВАННЫХ ГЕПАТОЦИТАХ КРЫС**

Активация JNK киназ, которые вовлечены в сигнальные механизмы, которые регулируют рост, дифференцировку клеток и процесс апоптоза, наблюдается при токсичном поражении клеток печени, неалкогольном стеатозе, циррозе и других заболеваниях печени. Растительные полифенолы могут подавлять активность JNK киназ в клетках печени. Целью этой работы было сравнительное изучение влияния кверцетина и комплекса полифенолов винограда на содержание липидов и активность JNK-киназ в изолированных гепатоцитах крыс. Инкубация изолированных гепатоцитов в присутствии ацетаминофена – активатора JNK сопровождается увеличением активности аминотрансфераз в инкубационной среде гепатоцитов, в клетках печени наблюдалось повышение содержания триацилглицеринов, жирных кислот и снижение уровня фосфолипидов. Полифенолы винограда и кверцетин значительно нормализовали эти показатели. Ацетаминофен повышает уровень p-JNK, тогда как внесение в среду инкубации кверцетина или концентрата полифенолов винограда значительно снижает уровень p-JNK, что свидетельствует об ингибировании JNK.

Ключевые слова: гепатоциты; кверцетин; полифенолы винограда; JNK; ацетаминофен; аланинаминотрансфераза; триацилглицерины

UDC 577.126: 57.042**A. L. Zagayko, O. A. Krasilnikova, G. B. Kravchenko, Yu. I. Kochubey****INHIBITION BY GRAPE POLYPHENOLS COMPLEX JNK KINASE ACTIVITY IN THE ISOLATED HEPATOCYTES OF RATS**

Activation of JNK kinases that are involved in signaling pathways that regulate growth, cell differentiation and apoptosis was observed in toxic lesion of liver, non-alcoholic steatosis, cirrhosis and other liver diseases. Plant polyphenols can inhibit the activity of JNK kinase in the liver cells. The aim of this work was a comparative study of the effect of quercetin and grape polyphenols complex on lipids level and activity of JNK-kinase in isolated rat hepatocytes. Incubation of isolated hepatocytes in the presence of acetaminophen (JNK activator), accompanied by the increase of transaminases activity in the hepatocytes incubation medium, the increase of triacylglycerols, free fatty acids content and phospholipids level decrease. Grape polyphenols and quercetin normalized these indicators. Acetaminophen stimulates p-JNK formation, while introducing into the incubation medium quercetin or grape polyphenol concentrate what significantly reduces the level of p-JNK and suggesting inhibition of JNK.

Key words: hepatocytes; quercetin; grape polyphenols; JNK; acetaminophen; alaninaminotranspherase; triacylglycerin

Адреса для листування:

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

E-mail: citochrom@gmail.com.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 17.01.2014 р.