

А. Л. Загайко, О. А. Красільнікова, Г. Б. Кравченко
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, ХАРКІВ

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ШЛЯХІВ АКТИВАЦІЇ КІНАЗ JNK

c-Jun N-термінальні протеїнкінази (JNK) – представники сімейства мітогенактивованих протеїнкіназ (MAP-кіназ) – активуються у відповідь на дію різноманітних факторів, серед яких виділяють оксидативний, тепловий, осмотичний стрес, дію на клітини цитокінів та факторів росту і багато інших. Їх активація залучена в патогенез інсулінорезистентності, цукрового діабету та супутніх патологій, що визначає вибір JNK як терапевтичної мішені при створенні нових препаратів.

Метою даної роботи було проаналізувати й узагальнити інформацію про шляхи активації JNK, а також про основні клітинні метаболіти, які беруть участь у цьому процесі.

На даний час встановлено існування основних шляхів активації JNK, серед яких запуск MAP-кіназного каскаду, опосередкований взаємодією лігандів з рецепторами на плазматичній мембрані, утворення активних форм кисню, а також стрес ендоплазматичного ретикулула. Серед клітинних метаболітів до активації JNK залучені метилглюксаль, лізо- і сфінголіпіди, жирні кислоти.

У клітині одночасно існує кілька головних механізмів активації ферменту. Деякі метаболіти, зокрема вільні жирні кислоти і лізоліпіди, мають також свій шлях активації ферменту. В активації JNK спостерігають тканинну специфічність, що важливо враховувати при розробці нових інгібіторів JNK.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: *c-Jun N-термінальні протеїнкінази, мітогенактивовані протеїнкінази, активні форми кисню, стрес ендоплазматичного ретикулула, жирні кислоти, метилглюксаль, сфінголіпіди.*

c-Jun N-термінальні протеїнкінази (JNK), також відомі як стресактивовані протеїнкінази (SAPK), є компонентами великого сімейства мітогенактивованих протеїнкіназ (MAP-кіназ) [1]. Уперше JNK було ідентифіковано як кінази, що зв'язують і фосфорилують регуляторний протеїн c-Jun за залишками серину в транскрипційно активному домені [2]. JNK активуються у відповідь на стресові сигнали поза- і внутрішньоклітинного походження, серед яких виділяють оксидативний стрес, ультрафіолетове опромінення, тепловий або осмотичний шок, різні цитокіни і багато інших [1, 3, 4].

На цей час відомо 10 ізоформ JNK, що утворюються як продукти трьох генів шляхом альтернативного сплайсингу: JNK1 (4 ізоформи), JNK2 (4 ізоформи) і JNK3 (2 ізоформи) [5]. JNK1 і JNK2 широко експресовані в різних тканинах, тоді як JNK3 селективно експресується у нервовій тканині, серці, яєчках [6].

Неактивні молекули JNK локалізовані в цитоплазмі. Активація JNK відбувається шляхом фосфорилування з наступною транслокацією

ферменту в інші компартменти клітини, зокрема до ядра або мітохондрій, де локалізована більшість субстратів (білків, ферментів, факторів транскрипції) [1, 3, 5].

Найчастіше активацію JNK розглядають як ключову подію апоптозу клітини, процесу запалення або канцерогенезу [4, 7, 8]. Проте, на наш погляд, найважливішу свою роль JNK відіграють у патогенезі станів, які супроводжуються порушеннями вуглеводного та ліпідного обміну і зниженням чутливості клітин до дії інсуліну, зокрема стану ожиріння, метаболічного синдрому, інсулінорезистентності (IP), діабету та його ускладнень [5, 9, 10]. Активація JNK призводить до фосфорилування субстрату інсулінового рецептора 1 – IRS1 та порушення сприйняття клітиною інсулінового сигналу, яке вважають ключовим фактором розвитку IP [11]. Тому JNK останнім часом розглядають як терапевтичну мішень при корекції станів, які супроводжуються резистентністю до інсуліну. Проте на цей час уже зрозуміло, що вибіркоче інгібування JNK не тільки не ефективно, але й не доцільне [12]. На наш погляд, розробку нових терапевтичних

© А. Л. Загайко, О. А. Красільнікова, Г. Б. Кравченко, 2016.

шляхів потрібно починати з детального вивчення тонких механізмів активації JNK та узагальнення вже відомої інформації, яка стосується даного питання.

Шляхи активації JNK, пов'язані з рецепторним апаратом

Найважливішим шляхом є активація, опосередкована взаємодією специфічних лігандів (факторів росту, фактора некрозу пухлини-альфа, інтерлейкінів (IL)) з рецепторами на поверхні плазматичної мембрани. Ці сигнали опосередковані активацією G-білків (білків, що зв'язують гуанілові нуклеотиди), оскільки поверхневі рецептори асоційовані з адаптерними білками і малими ГТФазами сімейства Rho, такими, як Cdc42, Rac1, RhoA [1–4, 13].

Важливу роль в активації JNK-шляху відіграють ферменти, які належать до надзвичайно поширеного сімейства MAP-кіназ. MAP-кіназний каскад складається з 3-х етапів [14]. На першому етапі MAP-кіназа кінази кінази кінази (MAP 4 кінази) фосфорилує MAP-кіназу кінази кінази (MAP 3 кінази), на другому – MAP 3 кінази активують MAP-кіназу кінази (MAP 2 кінази), на третьому – MAP 2 кінази активують шляхом фосфорилування специфічні сигнальні MAP-кінази. Так, після активації TCR (рецепторів Т-клітин) має місце активація MAP 4 кінази 1 типу або протеїнкінази HPK1 (гематопоетичної кінази з клітин-попередників 1), яка фосфорилує JNK, NFκB, AP-1 та інгібує ERK2, IL-2 [15]. Також HPK1 активує лінкерний білок SLP-76, з яким зв'язані білки Vav та Nck (некаталітична ділянка тирозин-кіназного адапторного білка 1), що, у свою чергу, призводить до активації JNK та реорганізації цитоскелета [16]. На наш погляд, реорганізація цитоскелета, яка супроводжує активацію JNK, може відігравати важливу роль у внутрішньоклітинних переміщеннях ферменту, зокрема до ядра клітин та мітохондрій, які необхідні для реалізації біологічних ефектів JNK.

MAP 3 кіназа 9 типу (MLK1), MAP 3 кіназа 10 типу (MLK2) та MAP 3 кіназа 11 типу (MLK3), які активуються у відповідь на дію специфічних агентів на клітині, фосфорилують MAP 2 кінази (MKK4, MKK7) [4]. Два представники сімейства MAP 2 кіназ (MKK4, або MEK, MEK4, і MKK7, або MEK7) безпосередньо залучені до фосфорилування JNK-кіназ [17, 18]. Хоча MKK4 та MKK7 мають подвійну специфічність відносно треонінових і тирозинових кіназ, попередні дослідження активації JNK показали, що MKK4 переважно фосфорилує залишок тирозину в петлі активації JNK, тоді як MKK7 – треоніну [19, 20]. До активації JNK можуть бути залучені MEKK1, 2, 3 і 4, “змішане” сімейство кіназ (MLK) та кіназа, яка регулюється сигналом апоптозу (ASK1). Це

свідчить про те, що широкий діапазон стимулів може впливати на даний шлях активації JNK [4, 21].

В активації JNK беруть участь різні каркасні білки, які взаємодіють з JNK, зокрема JIP1, JIP2, JIP3 (також відомий як JNK/SAPK-асоційований білок-1 (JSAP1)) та JIP4 [20, 22]. Спочатку JIP1 було ідентифіковано як інгібітор JNK, що мало дуже позитивні наслідки, зокрема синтез пептидного інгібітора JNK – JNK-зв'язувального домена (JBD), який блокує активність JNK за умов *in vivo* [23]. Згодом встановили, що JIP-білки також взаємодіють з JNK, MKK4, MKK7, MLK-кіназами і можуть активувати JNK [24]. JIP1 і JIP2 зв'язуються з усіма ізоформами JNK (JNK1, JNK2 та JNK3) через JBD, тоді як центральна і С-кінцеві ділянки – з MKK7 та MLK відповідно. Водночас з'ясували, що JIP1 під дією декількох MAP-кіназ може піддаватися гіперфосфорилуванню в ділянках зв'язування з JNK та MAPKK [25]. Додаткове фосфорилування з участю MAP-кіназ свідчить про існування інших механізмів регулювання сигнальних шляхів, до яких залучені JIP та JNK.

JIP3 також зв'язується з MLK-MKK7-JNK-сигнальним модулем і підсилює активацію JNK [19, 26], JIP3 (або JSAP1) взаємодіє з MEKK1-MKK4-модулем [20, 27]. Білок JIP4, який з'єднується з MEKK3-MKK4-JNK-модулем, також сприяє активації JNK [11, 16], хоча сам білок JIP4 не активує JNK [10]. Обидва білки JIP3 і JIP4 можуть взаємодіяти з іншими кіназами (MKKK, ASK1) та іншими активаторами JNK-сигнальних шляхів [20, 21]. Таким чином, білки JIP-сімейства є важливими регуляторами функціонального стану JNK-кіназ.

Внутрішньоклітинні шляхи активації JNK

До важливих активаторів JNK-сигнальних шляхів належать активні форми кисню (АФК). АФК є нормальними побічними продуктами клітинних функцій або генеруються для забезпечення внутрішньоклітинної передачі сигналу. Їх можна поділити на нерадикальні АФК (пероксид водню (H_2O_2)), вільні радикали кисню (супероксид ($O_2^{\cdot-}$) або гідроксильні радикали (OH \cdot)) [25, 28]. Основними джерелами внутрішньоклітинних АФК є мітохондрії, що генерують $O_2^{\cdot-}$ і H_2O_2 як побічні продукти [29, 30]. Викид H_2O_2 з мітохондрій активує JNK у цитоплазмі й запускає її транслокацію в мітохондрії, що може викликати проникність мембрани мітохондрії, вихід цитохрому с та інші негативні зміни. На цей час точний механізм активації JNK з участю АФК, зокрема H_2O_2 , не відомий. Активація може бути опосередкована руйнуванням комплексу JNK – GST (глутатіон-S-трансферази) [31, 32] або викликати дисоціацію комплексу тіоредоксину з ASK1, яка, у свою чергу, активує апоптоз, опосередко-

ваний активацією JNK та MAPK p38 [33]. Також генерація АФК призводить до активації фосфатази MAP-кінази (МКР1), що також може супроводжуватися активацією JNK-сигнального шляху [34].

Одним із найважливіших шляхів активації JNK є стрес ендоплазматичного ретикула (ЕПР). Найважливішими функціями шорсткого ЕПР є біосинтез та фолдинг протеїнів, останній забезпечується присутністю резидентних фолдаз і шаперонів [35]. Гіпоксія, ішемія, запалення, нестача поживних речовин, зміни редокс-балансу, кальцієвого гомеостазу, вірусна і бактеріальна інфекції, експресія не придатних для нормального фолдингу мутантних протеїнів, переповнення ЕПР білками – далеко не всі фактори, що порушують нормальні умови функціонування ЕПР і призводять до накопичення в просвіті ЕПР аберантних незгорнутих або неправильно згорнутих протеїнів, так званого стресу ЕПР [36, 37]. В ході “реакції незгорнутих білків” активуються кінази, які локалізовані на мембрані ЕПР: активуючий фактор транскрипції 6 (ATF6); РНК-активована протеїнкіназа (PKR); кіназа ЕПР, яка подібна до РНК-залежної кінази (EPR-PERK), та інозитолзалежний фермент 1 α (IRE1 α). Активація цих кіназ у рамках адаптивної відповіді спрямована на руйнування білків неправильної структури, що накопичилися, та їх фрагментів [30, 48]. IRE1 α взаємодіє з адапторним фактором TRAF2 (рецепторасоційованим фактором некрозу пухлини 2), що призводить до апоптозу. IRE1 α є атипичним трансмембранним білком, що має як кіназну, так і рибонуклеазну активність [17, 38]. Після стресу ЕПР IRE1 α активується шляхом олігомеризації і трансавтофосфорилування. Діючи як рибонуклеаза, активний IRE1 α може вирізати мРНК фактора транскрипції X-Vox ДНК-зв'язувального білка 1 (1XBP1), що призводить до змін активності декількох генів, у тому числі шаперонів (наприклад, GRP78), і факторів транскрипції, зокрема CHOP [39].

Крім того, шляхом зв'язування з рецепторасоційованим фактором некрозу пухлини 2 (TRAF2) IRE1 α може активувати кіназу ASK1, що призводить до активації JNK-опосередкованих шляхів [7, 40]. Таким чином, активація IRE1 α аберантними білками може або пом'якшити стрес ЕПР, сприяючи виживанню клітин, або викликати загибель клітин шляхом активації JNK. Активація JNK і CHOP є ключовим механізмом, відповідальним за ліпоапоптоз клітин печінки [40]. Активація сприяє запуску механізму апоптозу через інгібування білків сімейства Bcl-2 (регулятор апоптозу Bcl-2) шляхом фосфорилування [41].

Участь вільних жирних кислот в активації JNK

Цілий ряд патологічних станів, таких, як ожиріння, метаболічний синдром, ІР, неалкогольне жирове переродження печінки та інші, супроводжується збільшенням рівня вищих жирних кислот (ВЖК), що циркулюють у крові [42, 43]. Це викликає дисфункцію деяких органів, тобто ліпотоксичність і апоптоз клітин, так званий ліпоапоптоз. Відомо, що ключовим фактором у реалізації ВЖК-індукованого ліпоапоптозу є пролонгована активація JNK [44]. Більшою мірою цей процес вивчено для клітин печінки (гепатоцитів і клітин Купфера), а також для β -клітин острівців Лангерганса підшлункової залози [43–45]. Отримано дані про те, що активацію JNK викликає цілий ряд насичених і мононенасичених ЖК, наприклад пальмітинова, стеаринова, міристинова, пальмітоолеїнова, олеїнова [46–49]. Крім того, ненасичені ЖК збільшують внутрішньоклітинний пул тригліцеринів, але істотно не активують JNK, тоді як насичені ЖК не підвищують внутрішньоклітинного вмісту тригліцеринів, однак є індукторами активації JNK і резистентності до інсуліну [50].

Надлишковий вміст ВЖК, особливо насичених, чинить шкідливу дію на ЕПР [51]. Одним із вивчених аспектів дії надлишку насичених ЖК є зв'язування кальцію, що призводить до порушення функції шаперонів та накопичення пошкоджених протеїнів і протеїнових комплексів [52]. Тому вплив ВЖК на JNK та індукцію ліпоапоптозу пов'язують насамперед з їх опосередкованою дією на ЕПР. ВЖК транспортуються через мембрану за допомогою представників сімейства білків-переносників ЖК (FATP), які локалізовані в клітинних мембранах [53]. FATP5 – універсальний переносник ЖК у гепатоцитах, проте мінорним представником є FATP4, який специфічний до пальмітинової кислоти та локалізований у мембранах ЕПР [54]. Активація FATP4 є початковим етапом ліпоапоптозу, який опосередкований зміною фосфоліпідного складу клітин, збільшенням рівня нейтральних ліпідів, активацією JNK, каспази-3 і полі(АДФ-рибози)-полімерази (PARP-1). Окрім того, отримано дані про те, що в гепатоцитах мишей, яких утримували на високожировому харчуванні, кіназа MLK3 опосередковує активацію JNK насиченими ЖК [44, 55]. При цьому інгібування MLK3 частково відмінняє активацію JNK, яку індукували тапсигаргіном – речовиною, що викликає стрес ЕПР. Проте ASK1 не залучена до ВЖК-активації JNK, що свідчить про наявність декількох сигнальних шляхів активації JNK [44]. У первинній культурі гепатоцитів мишей пальмітинова кислота активує зв'язану з мембраною РНК-подібну кіназу

ЕПР (PERK) і протеїнкіназу PKR, які, у свою чергу, викликають активацію JNK, її транслокацію до мітохондрій і взаємодію з мітохондріальним білком Sab [56].

Лізофосфоліпіди як активатори JNK

Важливим регулятором надходження ВЖК до клітини є зв'язана з мембраною фосфоліпаза A2 (PLA2), активація якої також супроводжується утворенням лізофосфоліпідів, зокрема лізофосфатидилхоліну (ЛФХ) [57, 58]. Відомо, що при розвитку ожиріння, атеросклерозу, діабету в складі ліпопротеїнів крові підвищується вміст ЛФХ, ацильованого олеїновою та лінолевою ЖК [59]. Також спостерігають накопичення ЛФХ у мембранах клітин міокарда у стані ішемії, що супроводжується активацією кінази, яка регулюється позаклітинним сигналом ERK, JNK, MAPK p38, та індукцією апоптозу [60]. Флавоноїд бікалейн гальмує накопичення ЛФХ, утворення АФК та підвищує рівень Ca^{2+} у міокардіоцитах, що попереджує розвиток апоптозу. Накопичення ЛФХ спостерігають у гепатоцитах при розвитку неалкогольного стеатогепатиту [61]. При цьому апоптоз, індукований ЛФХ, блокується інгібіторами JNK; SP600125 та кіназами глікогенсинтази GSK3, що свідчить про залучення GSK3 до ЛФХ-індукованої активації JNK [62]. На культурі моноцитів людини було показано, що важливим шляхом перетворення ЛФХ є утворення лізофосфатидної кислоти (ЛФК), яка, у свою чергу, зв'язується зі специфічними рецепторами, що асоційовані з G-білками [63]. На цей час відомо 6 видів рецепторів до ЛФК. У літературі можна знайти досить суперечливі дані щодо участі ЛФК у регуляції активності, так, у клітинах м'язів сечового міхура ЛФК індукує активність JNK [64], тоді як у культурі макрофагів ЛФК блокує запальний процес, викликаний ліпополісахаридами, при цьому пригнічує активність JNK [65].

Залучення сфінголіпідів до активації JNK

Сфінголіпіди – біоактивні ліпіди, які беруть участь у клітинній сигналізації, проліферації та апоптозі. Цераміди (Цер) – підклас сфінголіпідів, є центральною ланкою метаболічних перетворень сфінголіпідів і попередниками синтезу сфінгомієлінів. Вони також утворюються при дії сфінгомієлінази і глікозилцерамідаз на відповідні субстрати: сфінгомієлін та глікозилцераміди. Церамідкіназа перетворює цераміди в церамід-1-фосфат. Сфінгомієлінсинтази і глікозил- або галактозилцерамідсинтази включають цераміди у сфінгомієліни, глікозил- чи галактозилцерамід відповідно [66].

Відомо, що накопичення Цер є важливим стимулятором апоптозу [67]. Проте даних щодо активації JNK під дією Цер у літературі небагато. Показано, що Цер сприяють формуванню ауто-

фагічної вакуолі шляхом підвищення синтезу білка Bcl₂, індукції стресу ЕПР і фосфорилування [68]. Етанол стимулює зростання рівня церамідів у клітинах печінки, що підвищує фосфорилування MAPK p38 та JNK [69]. Цер опосередковують активацію JNK та анандамідіндукований апоптоз у гепатоцитах лінії Chang [13]. Є дані, що Цер залучені до розвитку IP у печінці та інших тканинах [70]. У клітинах лінії HepG2, які були оброблені Цер, підвищувався рівень фосфорильованої JNK [71]. Проте механізм дії Цер остаточно не з'ясовано. Припускають, що накопичення Цер у клітинах і, зокрема, в мембранах мітохондрій може призводити до збільшення продукції АФК [72]. У тубулярних клітинах нирок Цер стимулюють утворення фосфорильованої форми JNK і до цього процесу залучена MLK-кіназа [73]. Окрім того, церамідази деацилюють Цер з утворенням сфінгозину, який під дією сфінгозинкінази перетворюється у сфінгозин-1-фосфат (С1Ф), який впливає на метаболізм клітини шляхом зв'язування зі специфічними рецепторами. На цей час відомо 4 типи рецепторів до С1Ф [74]. Інгібування сфінгозинкінази 1 (СК1) гепатоцитів призводить до зниження рівня С1Ф, активності JNK, кінази, яка активує ERK, MAPK p38, що має значний гепатопротекторний ефект, проте інгібування рецепторів 1 і 3 типів не демонструє такого ефекту [75]. Система СК1 – С1Ф залучена до патогенезу діабетичної нефропатії, опосередкованої підвищенням активності JNK [76], тоді як куркумін, який пригнічує активність СК1, знижує вміст pJNK [77].

Метилглюксаль – важливий активатор JNK

Метилглюксаль (МГ) – високореакційноздатний метаболіт, що утворюється в організмі в нормальних та патологічних умовах, як ферментативним, так і неферментативним шляхами [78]. Утворення МГ у клітині каталізують МГ-синтаза, цитохром P₄₅₀ 2E1, мієлопероксидаза, амінооксидази [79–81]. Він також утворюється неензиматичним шляхом при спонтанному перетворенні діоксиацетонфосфату, в реакції Майяра, процесі пероксидного окиснення ліпідів і багатьох інших процесах. Навколишнє середовище є також важливим джерелом МГ, який міститься в сигаретному димі, забрудненому повітрі, дощовій воді, утворюється у водопровідній воді як побічний продукт її очищення, а також у продуктах харчування.

Дані про участь МГ у регуляції активності JNK численні, суперечливі й отримані на різних типах клітин і тканин. Так, в ендотеліоцитах МГ викликає накопичення кінцевих продуктів глікування білків (КПГ), активацію MAP-кіназ, а саме: MAPK p38, JNK, ERK1/2, що зумовлює активацію

апоптозу [81, 82]. При цьому в ендотеліальних клітинах судин мозку мають місце збільшення АФК, накопичення ТБК-реактивних продуктів, яке не спостерігають при передінкубації клітин із тахшіноеном, що спричиняє зниження рівня рJNK [82]. А. А. Akhand та колеги показали, що гліоксаль і МГ ініціюють два сигнальних шляхи в культурі ендотеліальних клітин людини [83]. Один із них залежить від протеїн-тирозинових кіназ (РТК) та контролює ERK, інший – РТК-незалежний – призводить до окисно-відновної активації JNK/p38 MAP-кіназ і каспази-3 [84].

У панкреатичних β -клітинах МР також індукує утворення АФК і стимулює експресію JNK та її фосфорилування, що, в результаті, призводить до порушення функціонування клітин і зниження продукції інсуліну [85]. Утримування тварин на раціоні з високим вмістом фруктози спричиняє зростання рівня МГ у клітинах печінки, що супроводжується збільшенням синтезу Цер, утворення АФК, активації МКК7 та JNK, це свідчить про вірогідне залучення кількох сигнальних шляхів до активації JNK [86]. У синовіальних клітинах НІG-82 МГ підвищує рівень КПГ, стимулює транскрипцію мРНК циклооксигенази-2 (ЦОГ-2) та рівня рJNK, що сприяє розвитку синовіального запалення як складової діабетогенного остеоартриту [87].

У нервовій тканині МГ підвищує вміст КПГ, знижує рівень відновленого глутатіону, активує JNK, ERK1/2, MAPK p38, що призводить до розвитку нейродегенеративної складової діабету [88, 89].

У клітинах ARPE-19 (ендотеліальних ретинальних пігментованих клітинах людини) МГ стимулює фосфорилування протеїнкінази (РКВ, або Akt), ERK1/2, MAPK p38 і JNK1/2 [25]. Бло-

кування кіназної активності свідчить про те, що гіперфосфорилування Akt, ERK1/2, MAPK p38 і JNK1/2 залучене до МГ-індукованої аутофагії. Цей факт може вказувати на існування додаткових шляхів регуляції JNK.

Таким чином, проведений аналіз літератури дозволив виявити деякі факти, які стосуються активації JNK. По-перше, у клітині існує і діє водночас декілька головних механізмів активації ферменту, серед яких найважливішими є запуск MAP-кіназного каскаду, що опосередкований активацією рецепторів на поверхні плазматичної мембрани, утворення АФК, а також розвиток стресу ЕПР. Деякі метаболіти, зокрема ВЖК та лізоліпіди, мають свій шлях активації ферменту, та у більшості випадків вони залучають один або декілька з головних шляхів. По-друге, має місце тканинна специфічність активації JNK, і цей факт, на нашу думку, дуже важливий для розробки нових інгібіторів даного ферменту для застосування за умов *in vivo*, оскільки в різних типах клітин один і той же сигнал може викликати різні реакції. Тому розробці нового препарату, дія якого буде спрямована на пригнічення активності JNK, на наш погляд, має передувати вивчення загальної метаболічної ситуації в клітинах, шляхів активації JNK, оскільки їх одночасно може бути декілька, та, що важливо, тканинних особливостей їх реалізації. Окрім того, існування факту гіперфосфорилування JNK свідчить про існування тонких механізмів активації JNK та їх недостатню вивченість. На наш погляд, подальша робота в цьому напрямку дозволить більш ефективно підійти до розглядання JNK як терапевтичної мішені, пошуку та створення нових препаратів з метою корекції різних патологічних станів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cuadrado A. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling / A. Cuadrado, A. R. Nebreda // J. Biochem. – 2010. – **429** (3). – P. 403–417.
2. p38 α suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway / L. Hui, L. Bakiri, A. Mairhorfer [et al.] // Nat. Genet. – 2007. – **39**. – P. 741–749.
3. Sehgal V. Network motifs in JNK signaling / V. Sehgal, P. T. Ram // Genes. Cancer. 2013. – **4**. – P. 409–413.
4. Kyriakis J. M. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update / J. M. Kyriakis, J. Avruch // Physiol. Rev. – 2012. **92** (2). – P. 689–737.

5. Manieri E. Stress kinases in the modulation of metabolism and energy balance / E. Manieri, G. Sabio // J Mol. Endocrinol. – 2015. – **55** (2). – P. R11–R22.
6. 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. – **25** (8). – P. 849–872.
7. C-Jun N-terminal kinase signalling pathway in response to cisplatin / D. Yan, G. An, M. T. Kuo // J. Cell Mo.l Med. – 2016. – **20** (11). – P. 2013–2019.
8. Šrámek J. Kinase signaling in apoptosis induced by saturated fatty acids in pancreatic β -cells / J. Šrámek, V. Němcová-Fürstová, J. Kovář // Int. J. Mol. Sci. – 2016. – **17** (9). – P. E1400.

9. Lenna S. Endoplasmic reticulum stress and endothelial dysfunction / S. Lenna, R. Han, M. Trojanowska / *IUBMB Life*. – 2014. – **66** (8). – P. 530–537.
10. Kaneto H. Involvement of oxidative stress in suppression of insulin biosynthesis under diabetic conditions / H. Kaneto, T. A. Matsuoka // *Int. J. Mol. Sci.* – 2012. – **13** (10). – P. 13680–13690.
11. A central role for JNK in obesity and insulin resistance / J. Hirosumi, G. Tuncman, L. Chang [et al.] // *Nature*. – 2002. – **420**. – P. 333–336.
12. Bogoyevitch M. A. Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JuNK no more? / M. A. Bogoyevitch, P. G. Arthur // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2008. – **1784** (1). – P. 76–93.
13. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges / M. A. Bogoyevitch, K. R. W. Ngoei, T. T. Zhao [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2010. – **1804** (3). – P. 463–475.
14. MAP kinase pathways / M. Qi, E. A. Elion // *J. Cell Sci.* – 2005. – **118** (Pt 16). – P. 3569–3572.
15. Boomer J. S. Functional interactions of HPK1 with adaptor proteins / J. S. Boomer, T.-H. Tan // *J. Cell Biochem.* – 2005. – **95** (1). – P. 34–44.
16. Regulation of PAK activation and the T cell cytoskeleton by the linker protein SLP-76 / J. Bubeck Wardenburg, R. Pappu, J. Y. Bu [et al.] // *Immunity*. – 1998. – **9** (5). – P. 607–616.
17. JNK Signaling in Apoptosis / D. N. Dhanasekaran, E. P. Reddy // *Oncogene*. – 2008. – **27** (48). – P. 6245–6251.
18. Glucose and fatty acids synergize to promote B-cell apoptosis through activation of glycogen synthase kinase $\beta 3$ independent of JNK activation / K. Tanabe, Y. Liu, S. D. Hasan [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – **6** (4). – P. e18146.
19. Different properties of SEK1 and MKK7 in dual phosphorylation of stress-induced activated protein kinase SAPK/JNK in embryonic stem cells / H. Kishimoto, K. Nakagawa, T. Watanabe [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – **278** (19). – P. 16595–16601.
20. Moon J. Reassembly of JIP1 scaffold complex in JNK MAP kinase pathway using heterologous protein interactions / J. Moon, S.-H. Park // *PLoS One*. – 2014. – **9** (5). – P. e96797.
21. Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: How can ROS activate MAPK pathways / Y. Son, Y.-K. Cheong, N.-H. Kim [et al.] // *J. Signal Transduc.* – 2011. – **79**. – P. 2639.
22. JNKs, insulin resistance and inflammation: A possible link between NAFLD and coronary artery disease / G. Tarantino, A. Caputi // *World J. Gastroenterol.* – 2011. – **17** (33). – P. 3785–3794.
23. Cell-permeable peptide inhibitors of JNK: novel blockers of beta-cell death / C. Bonny, A. Oberson, S. Negri [et al.] // *Diabetes*. – 2001. – **50** (1). – P. 77–82.
24. Whitmarsh A. J. The JIP family of MAPK scaffold proteins / A. J. Whitmarsh // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – **34** (Pt 5). – P. 828–832.
25. Methylglyoxal, a reactive glucose metabolite, enhances autophagy flux and suppresses proliferation of human retinal pigment epithelial ARPE-19 cells / Y. C. Chang, M. C. Hsieh, H. J. Wu [et al.] // *Toxicol. In Vitro*. – 2015. – **29** (7). – P. 1358–1368.
26. Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3 / N. Kelkar, S. Gupta, M. Dickens, R. J. Davis // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – **20** (3). – P. 1030–1043.
27. A scaffolding protein that tethers JNK/p38MAPK signaling modules and transcription factors / C. M. Lee, D. Onesime, C. D. Reddy [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – **99** (22). – P. 14189–14194.
28. Liou G.-Y. Reactive oxygen species in cancer / G.-Y. Liou, P. Storz // *Free Radic. Res.* – 2010. – **44**. – P. 479–496.
29. Storz P. Mitochondrial ROS—radical detoxification, mediated by protein kinase D / P. Storz // *Trends Cell Biol.* – 2007. – **17**. – P. 13–18.
30. Yin F. Metabolic triad in brain aging: mitochondria, insulin/IGF-1 signalling and JNK signalling / F. Yin, T. Jiang, E. Cadenas // *Biochem. Soc. Trans.* – 2013. – **41** (1). – P. 101–105.
31. The Role of Glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation / K. D. Tew, Y. Manevich, C. Grek [et al.] // *Cancer Free Radic. Biol. Med.* – 2011. – **51** (2). – P. 299–313.
32. Glucose and fatty acids synergize to promote B-cell apoptosis through activation of glycogen synthase kinase $\beta 3$ independent of JNK activation / K. Tanabe, Y. Liu, S. D. Hasan [et al.] // *PLoS One*. – 2011. – **6** (4). – P. e18146.
33. Bansal M. Oxidative Stress Mechanisms and their Modulation. Springer / M. Bansal, N. Kaushal // *New Dehli*. – 2014. – 345 p.
34. Pae Reactive oxygen species in the activation of MAP kinases / Y. Son, S. Kim, H. T. Chung, H. O. Methods // *Enzymol.* – 2013. – **528**. – P. 27–48.
35. Kitamura M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in renal pathophysiology: Janus faces / M. Kitamura // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* – 2008. – **295** (2). – P. F323–F334.
36. Zhang K. Identification and characterization of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in vivo / K. Zhang, D. J. Kaufman // *Methods Enzymol.* – 2008. – **442**. – P. 395–419.
37. Inagi R. Endoplasmic reticulum stress in the kidney as a novel mediator of kidney injury / R. Inagi // *Nephron. Exp. Nephrol.* – 2009. – **112** (1). – P. e1–e9.
38. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response / J. H. Lin, H. Li, D. Yasumura [et al.] // *Science*. – 2007. – **318**. – P. 944–949.
39. Ron D. How IRE1 reacts to ER stress / D. Ron, S. R. Hubbard // *Cell*. – 2008. – **132**. – P. 24–26.
40. Malhi H. Endoplasmic reticulum stress in liver disease / H. Malhi, R. J. Kaufman // *J. Hepatol.* – 2011. – **54**. – P. 795–809.
41. Davis R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases / R. J. Davis // *Cell*. – 2000. – **103**. – P. 239–252.
42. Weinberg J. M. Lipotoxicity / J. M. Weinberg // *Kidney Int.* – 2006. – **70**. – P. 1560–1566.
43. Capurso C. From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids / C. Capurso, A. Capurso // *Vascul. Pharmacol.* – 2012. – **57** (2–4). – P. 91–97.
44. Ibrahim S. H. Who pulls the trigger: JNK activation in liver lipotoxicity? / S. H. Ibrahim, G. J. Gores // *J. Hepatol.* – 2012. – **56** (1). – P. 17–19.
45. Kupffer cells: increasingly significant role in nonalcoholic fatty liver disease / Z. Wenfeng, W. Yakun, M. Di [et al.] // *Ann. Hepatol.* – 2014. – **13** (5). – P. 489–495.

46. Long-chain saturated fatty acids induce pro-inflammatory responses and impact endothelial cell growth / K. A. Harvey, C. L. Walker, T. M. Pavlina [et al.] // *Clin. Nutr.* – 2010. – **29** (4). – P. 492–500.
47. Myristic acid potentiates palmitic acid-induced lipotoxicity and steatohepatitis associated with lipodystrophy by sustaining de novo ceramide synthesis / L. Martínez, S. Torres, A. Baulies [et al.] // *Oncotarget.* – 2015. – **6** (39). – P. 41479–41496.
48. Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis / Y. Akazawa, S. Cazanave, J. L. Mott [et al.] // *J. Hepatol.* – 2010. – **52** (4). – P. 586–593.
49. Oleic acid-induced hepatic steatosis is coupled with downregulation of aquaporin 3 and upregulation of aquaporin 9 via activation of p38 signaling / L. Y. Gu, L. W. Qiu, X. F. Chen [et al.] // *Horm. Metab. Res.* – 2015. – **47** (4). – P. 259–264.
50. Circulating Unsaturated Fatty Acids Delineate the Metabolic Status of Obese Individuals / Y. Ni, L. Zhao, H. Yu [et al.] // *EBio. Medicine.* – 2015. – **2** (10). – P. 1513–1522.
51. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis / K. Kakisaka, S. C. Cazanave, C. D. Fingas [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2012. – **302** (1). – P. G77–G84.
52. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue / N. Kawasaki, R. Asada, A. Saito [et al.] // *Sci. Rep.* – 2012. – **2**. – P. 799.
53. Malhi H. Molecular mechanisms of lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease / H. Malhi, G. J. Gores // *Semin. Liver Dis.* – 2008. – **28** (4). – P. 360–369.
54. Palmitate activation by fatty acid transport protein 4 as a model system for hepatocellular apoptosis and steatosis / J. Seeßle, G. Liebisch, G. Schmitz [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – **1851** (5). – P. 549–565.
55. Role of the mixed-lineage protein kinase pathway in the metabolic stress response to obesity / S. Kant, T. Barrett, A. Vertii [et al.] // *Cell Rep.* – 2013. – **4** (4). – P. 681–688.
56. Kaplowitz N. Sab (Sh3bp5) dependence of JNK mediated inhibition of mitochondrial respiration in palmitic acid induced hepatocyte lipotoxicity / S. Win, T. A. Than, B. H. Le [et al.] // *J. Hepatol.* – 2015. – **62** (6). – P. 1367–1374.
57. Plasma membrane phospholipase A2 controls hepatocellular fatty acid uptake and is responsive to pharmacological modulation: implications for nonalcoholic steatohepatitis / W. Stremmel, S. Staffer, A. Wannhoff [et al.] // *FASEB J.* – 2014. – **28** (7). – P. 3159–3170.
58. Lysophosphatidylcholine triggers TLR2- and TLR4-mediated signaling pathways but counteracts LPS-induced NO synthesis in peritoneal macrophages by inhibiting NF- κ B translocation and MAPK/ERK phosphorylation / A. B. Carneiro, B. M. Iaciura, L. L. Nohara [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – **8** (9). – P. e76233.
59. Biomarkers of morbid obesity and prediabetes by metabolomic profiling of human discordant phenotypes / S. Tulipani, M. Palau-Rodriguez, A. Miñarro Alonso [et al.] // *Clin. Chim. Acta.* – 2016. – 463. – P. 53–61.
60. Baicalein, an active component of *Scutellaria baicalensis* Georgi, prevents lysophosphatidylcholine-induced cardiac injury by reducing reactive oxygen species production, calcium overload and apoptosis via MAPK pathways / H. M. Chen, J. H. Hsu, S. F. Liou [et al.] // *BMC Complement. Altern. Med.* – 2014. – **14**. – P. 233.
61. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes / M. S. Han, S. Y. Park, K. Shinzawa [et al.] // *J. Lipid Res.* – 2008. – **49** (1). – P. 84–97.
62. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis / K. Kakisaka, S. C. Cazanave, C. D. Fingas [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2012. – **302** (1). – P. G77–G84.
63. Saturated fatty acids inhibit induction of insulin gene transcription by JNK-mediated phosphorylation of insulin-receptor substrates / G. Solinas, W. Naugler, F. Galimi [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – **103** (44). – P. 16454–16459.
64. Possible effect of lysophosphatidic acid on cell proliferation and involvement of lysophosphatidic acid and lysophosphatidic acid receptors in mechanical stretch-induced mitogen-activated protein kinase / Y. Kawashima, N. Kushida, S. Kokubun [et al.] // *Int. J. Urol.* – 2015. – **22** (8). – P. 778–784.
65. Attenuation of LPS-induced cyclooxygenase-2 and inducible NO synthase expression by lysophosphatidic acid in macrophages / H. Y. Chien, C. S. Lu, K. H. Chuang [et al.] // *Innate Immun.* – 2015. – **21** (6). – P. 635–646.
66. Choi S. Sphingolipids in high fat diet and obesity-related diseases / S. Choi, A. J. Snider // *Mediators Inflamm.* – 2015. – 2015. – P. 520–618.
67. Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease / M. Pagadala, T. Kasumov, A. J. McCullough [et al.] // *Trends Endocrinol. Metab.* – 2012. – **23** (8). – P. 365–371.
68. Vorinostat and sorafenib increase ER stress, autophagy and apoptosis via ceramide-dependent CD95 and PERK activation / M. A. Park, G. Zhang, A. P. Martin [et al.] // *Cancer Biol. Ther.* – 2008. – **7** (10). – P. 1648–1662.
69. Imipramine blocks ethanol-induced ASMase activation, ceramide generation, and PP2A activation, and ameliorates hepatic steatosis in ethanol-fed mice / S. Liangpunsakul, Y. Rahmini, R. A. Ross [et al.] // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* – 2012. – **302** (5). – P. G515–G523.
70. Central role of ceramide biosynthesis in body weight regulation, energy metabolism, and the metabolic syndrome / G. Yang, L. Badeanlou, J. Bielawski [et al.] // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2009. – **297** (1). – P. E211–E224.
71. Ceramide induces human hepcidin gene transcription through JAK/STAT3 pathway / S. Lu, S. K. Natarajan, J. L. Mott [et al.] // *PLoS One.* – 2016. – **11** (1). – P. e0147474.
72. Marí M. Sphingolipid signaling and liver diseases / M. Marí, Fernández J. C. Checa // *Liver Int.* – 2007. – **27** (4). – P. 440–450.
73. Ueda N. Ceramide-induced apoptosis in renal tubular cells: a role of mitochondria and sphingosine-1-phosphate / N. Ueda // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – **16** (3). – P. 5076–5124.
74. C Decoding cell death signals in liver inflammation / Brenner, L. Galluzzi, O. Kepp, G. Kroemer // *J. Hepatol.* – 2013. – **59** (3). – P. 583–594.
75. Sphingosine kinase 1 inhibition improves lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver failure by inhibiting mitogen-activated protein kinases

pathway / T. Tian, W. Tian, F. Yang [et al.] // United Eur. Gastroenterol. J. – 2016. – 4 (5). – P. 677–685.

76. AP-1 regulates sphingosine kinase 1 expression in a positive feedback manner in glomerular mesangial cells exposed to high glucose / K. Huang, J. Huang, C. Chen [et al.] // Cell Signal. – 2014. – 26 (3). – P. 629–638.

77. The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond / M. S. Silva, R. A. Gomes, A. E. Ferreira [et al.] // Biochem. J. – 2013. – 453 (1). – P. 1–15.

78. The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond / M. S. Silva, R. A. Gomes, A. E. Ferreira [et al.] // Biochem. J. – 2013. – 453(1). – P. 1–15.

79. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation / G. Vistoli, D. De Maddis, A. Cipak [et al.] // Free Rad. Res. – 2013. – 47 (S1). – P. 3–27.

80. 1,2-dicarbonyl compounds in commonly consumed foods / J. Degen, M. Hellwig, T. Henle // J. Agricult. and Food Chem. – 2012. – 60 (28). – P. 7071–7079.

81. δ -Tocopherol prevents methylglyoxal-induced apoptosis by reducing ROS generation and inhibiting apoptotic signaling cascades in human umbilical vein endothelial cells / M. Do, S. Kim, S. Y. Seo [et al.] // Food Funct. – 2015. – 6 (5). – P. 1568–1577.

82. Tanshinone IIA protects against methylglyoxal-induced injury in human brain microvascular endothelial cells / W. J. Zhou, Q. F. Gui, Y. Wu, Y. M. Yang // Int. J. Clin. Exp. Med. – 2015. – 8 (2). – P. 1985–1992.

83. Glyoxal and methylglyoxal induce aggregation and inactivation of ERK in human endothelial cells / A. A. Akhand, K. Hossain, M. Kato [et al.] // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – 31 (10). – P. 1228–1235.

84. Methylglyoxal mediates vascular inflammation via JNK and p38 in human endothelial cells / H. Yamawaki, K. Saito, M. Okada, Y. Hara // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 2008. – 295 (6). – P. C1510–C1507.

85. Methylglyoxal impairs insulin secretion of pancreatic β -Cells through increased production of ROS and mitochondrial dysfunction mediated by upregulation of UCP2 and MAPKs / J. Bo, S. Xie, Y. Guo [et al.] // J. Diabetes Res. – 2016. – 202. – P. 98–54.

86. Fructose-induced stress signaling in the liver involves methylglyoxal / Y. Wei, D. Wang, G. Moran [et al.] // Nutr. Metab. (Lond). – 2013. – 10. – P. 32.

87. Methylglyoxal activates NF- κ B nuclear translocation and induces COX-2 expression via a p38-dependent pathway in synovial cells / C. C. Lin, C. M. Chan, Y. P. Huang [et al.] // Life Sci. – 2016. – 149. – P. 25–33.

88. Methylglyoxal-induced neuroinflammatory response in in vitro astrocytic cultures and hippocampus of experimental animals / J. M. Chu, D. K. Lee, D. P. Wong [et al.] // Metab. Brain Dis. – 2016. – 31 (5). – P. 1055–1064.

89. Neuroprotective effect of sulforaphane against methylglyoxal cytotoxicity / C. Angeloni, M. Malaguti, B. Rizzo [et al.] // Chem. Res. Toxicol. – 2015. – 28 (6). – P. 1234–1245.

А. Л. Загайко, О. А. Красильникова, А. Б. Кравченко
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПУТЕЙ АКТИВАЦИИ КИНАЗ JNK

Резюме

c-Jun N-терминальные протеинкиназы (JNK) – представители семейства митогенактивируемых протеинкиназ (MAP-киназ) – активируются в ответ на действие разнообразных факторов, среди которых выделяют оксидативный, тепловой, осмотический стресс, действие на клетки цитокинов и факторов роста и многие другие. Их активация вовлечена в патогенез инсулинорезистентности, сахарного диабета и сопутствующих патологий, что определяет выбор JNK как терапевтической мишени при создании новых препаратов.

Целью данной работы было проанализировать и обобщить информацию о путях активации JNK, а также об основных клеточных метаболитах, которые принимают участие в этом процессе.

В настоящее время установлено существование основных путей активации JNK, среди которых запуск MAP-киназного каскада, опосредованный взаимодействием лигандов с рецепторами на плазматической мембране, образование активных форм кислорода, а также стресс эндоплазматического ретикулула. Среди клеточных метаболитов в активацию JNK вовлечены метилглиоксаль, лизо- и сфинголипиды, жирные кислоты.

В клетке одновременно существует несколько главных механизмов активации фермента. Некоторые метаболиты, в частности свободные жирные кислоты и лизолипиды, имеют также свой путь активации фермента. В активации JNK наблюдают тканевую специфичность, что важно учитывать при разработке новых ингибиторов JNK.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *c-Jun N-терминальные протеинкиназы, митогенактивируемые протеинкиназы, активные формы кислорода, стресс эндоплазматического ретикулула, жирные кислоты, метилглиоксаль, сфинголипиды.*

GENERAL CHARACTERISTICS OF JNK ACTIVATION PATHWAYS

Summary

c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) – members of mitogen-activated protein kinase (MAP-kinases) families activate in response to various factors, oxidative, thermal, osmotic stress, the effect on the cells of cytokines and growth factors, and many others among them. Their activation is involved in the pathogenesis of insulin resistance, diabetes and related pathologies. This fact is determined the choice of JNK, as a therapeutic target for new drugs design.

The aim of this work was the analysis and synthesis of information on the ways of JNK activation, as well as the basic cell metabolites that are also involved in this process.

There are basic pathways of JNK activation, including MAP kinase cascade start mediated interaction of ligands with receptors on the plasma membrane, reactive oxygen species formation, and endoplasmic reticulum stress. The main cellular metabolites involved in activation of JNK are methylglyoxal, lyso- and sphingolipids, fatty acids (FFA).

In the cell at the same time, there are several major enzyme activation mechanisms. Some metabolites, particularly FFA and lysolipids have their own activation pathways. There is tissue specificity of JNK activation, it is important to consider in the design of new JNK inhibitors.

KEY WORDS: c-Jun N-terminal protein kinase, mitogen-activated protein kinase, reactive oxygen species, stress EPR, fatty acids, methylglyoxal, sphingolipids.

Отримано 17.10.16

Адреса для листування: Г. Б. Кравченко, Національний фармацевтичний університет, вул. Куликівська, 12, Харків, 61068, Україна, e-mail: annabk2014@gmail.com.