

## УЧАСТЬ JNK-КІНАЗИ В ГЕНЕРАЦІЇ НІТРОГЕН ОКСИДУ В УМОВАХ МОДЕЛЮВАННЯ КАРБОНІЛЬНОГО СТРЕСУ В ЩУРІВ

Метою роботи було з'ясувати участь JNK-кіназ в утворенні нітроген оксиду (NO) в умовах моделювання карбонільного стресу. Тривале утримування щурів на раціоні з високим рівнем глюкози викликало стійке підвищення рівня нітритів у крові, що свідчить про розвиток карбонільного стресу. Ділянки аорти інкубували за присутності метилглюксалу, відтворюючи умови розвитку карбонільного стресу. Для визначення ролі JNK-кіназ у процесі утворення вносили специфічний інгібітор JNK-кіназ SP600125. За присутності метилглюксалу спостерігалось підвищення рівня NO в середовищі інкубації ділянок аорти. Внесення інгібітора не впливало на рівень стабільних метаболітів NO протягом 2 год, проте достовірно знижувало їх утворення протягом довготривалої інкубації. Отримані результати можуть свідчити про те, що за цих експериментальних умов JNK-кінази залучені до утворення NO.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: карбонільний стрес, гіперглікемія, JNK-кінази, нітроген оксид.

ВСТУП. Відомо, що довготривала гіперглікемія, яка спостерігається при таких патологічних станах, як тривалий стрес, метаболічний синдром, інсулінорезистентність, цукровий діабет тощо, призводить до накопичення в крові й клітинах органів і тканин дикарбонільних сполук: метилглюксалу, глюксалу, 3-деокси-глюкозону та ін. [1]. Ці високореактивні продукти глікують білки, ліпіди, нуклеїнові кислоти, призводячи до утворення кінцевих продуктів глікування (КПГ). Такий стан має назву "карбонільний стрес" [10]. Гліковані білки сприяють розвитку атеросклеротичного пошкодження судин, виникненню мікроангіопатій, нефропатій та нейропатій. Вони стимулюють секрецію запальних цитокінів, агрегацію тромбоцитів, хемотаксис моноцитів, експресію ендотеліального фактора росту судин і багато іншого [10].

Нітроген оксиду (NO) продукується різними типами клітин організму і контролює безліч біохімічних процесів і функцій: тонус гладкої мускулатури судин, підтримку імунітету, є нейромедіатором, пригнічує агрегацію тромбоцитів, опосередковує взаємодію останніх з ендотеліальними клітинами та ін. [5]. Проте NO, супероксид і продукт їх реакції – пероксинітрит є медіаторами запалення, беруть участь у розвитку

атеросклерозу, модифікують білки і пошкоджують нуклеїнові кислоти [6]. На цей час встановлено, що метилглюксаль може стимулювати утворення NO у різного типу клітинах. Відомо, що до процесу активації синтази нітроген оксиду залучені MAP-кінази, зокрема їх підклас JNK-кінази [4]. Проте дані літератури щодо механізму їх участі суперечливі. Показано, що активація синтази нітроген оксиду (NOS) є необхідною умовою активації ERK та JNK в ендотеліоцитах, яка індукується окисненими ліпоротеїнами низької густини [8]. Разом із тим, активація у макрофагах, яка спричинена підвищенням рівня вільних радикалів, стимулює процеси транскрипції iNOS [3].

Метою даної роботи було з'ясувати участь JNK-кіназ в утворенні NO при моделюванні карбонільного стресу.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проводили на щурах масою 150–200 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Карбонільний стрес моделювали шляхом внутрішньошлункового введення тваринам водного розчину глюкози з розрахунку 2,5 г на 1 кг маси тіла протягом 60 днів [2]. У ході експерименту визначали концентрацію глюкози, метилглюксалу, аргініну,  $\alpha$ -токоферолу в крові. Вміст нітроген оксиду оцінювали за утворенням ста-

більних метаболітів – нітратів за методом Гріса [7]. Ізолювали ділянки аорти інтактних щурів й інкубували в інкубаційному середовищі, запропонованому в роботі D. L. Brouwers-Ceiler et al. [9]. В окремих випадках середовище інкубації містило 1 мМ метилглюксалу ("Sigma", США) та специфічний інгібітор JNK-кіназ SP600125 (100 нМ) (Tocris, США) протягом 2 і 24 год. Після цього визначали вміст стабільних метаболітів NO. Статистичну обробку даних проводили з використанням варіаційної статистики (ANOVA).  $P \leq 0,05$  – статистично достовірні результати.

Всі маніпуляції з тваринами проводили під хлорал-уретановим наркозом. Дослідження виконували відповідно до національних Спільних етичних принципів експериментів на тваринах (Україна, 2001), які узгоджені з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986).

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Тривале введення щурам розчину глюкози викликало стійке підвищення рівня глюкози в крові тварин, яке супроводжувалося збільшенням вмісту в крові у другій половині експерименту (табл. 1), що в даних умовах свідчить про розвиток карбонільного стресу.

При цьому на 60-й день експерименту вміст нітритів складав ( $22,8 \pm 1,9$ ) мкмоль/л, що достовірно вище показника у контрольних тварин, який становив ( $13,6 \pm 1,8$ ) мкмоль/л. Це

може свідчити про посилення утворення NO, що, разом із посиленням процесів вільнорадикального окиснення, на що вказує зниження вмісту антиоксиданта  $\alpha$ -токоферолу, може сприяти утворенню нітроген пероксиду, посиленню процесів пероксидації, що, ймовірно, викличе активацію специфічних сигнальних кіназ.

У наступній серії експериментів ділянки аорти інкубували за присутності метилглюксалу, відтворюючи умови розвитку карбонільного стресу. Для визначення ролі JNK-кіназ у процесі утворення вносили специфічний інгібітор JNK-кіназ SP600125. Результати наведено в таблиці 2.

За присутності метилглюксалу спостерігалось підвищення рівня NO в середовищі інкубації ділянок аорти. Внесення інгібітора не впливало на утворення стабільних метаболітів NO протягом 2 год, проте достовірно знижувало їх утворення протягом тривалої інкубації. Отримані результати можуть свідчити про те, що за цих експериментальних умов JNK-кінази залучені до утворення NO.

**ВИСНОВКИ.** 1. Хронічна гіперглікемія призводить до підвищення концентрації метилглюксалу у крові.

2. В умовах *in vitro* метилглюксаль посилює утворення нітроген оксиду в стінці аорти.

3. Інгібітор JNK-кінази відмінняє утворення NO при тривалій дії.

Таблиця 1 – Динаміка змін вмісту глюкози, метилглюксалу, аргініну та  $\alpha$ -токоферолу у крові тварин у різні терміни введення глюкози ( $M \pm m$ ,  $n=6$ )

Умови експерименту	Глюкоза, ммоль/л	Метилглюксаль, мкмоль/л	Аргінін, ммоль/л	$\alpha$ -токоферол, ммоль/л
Контроль	$3,97 \pm 0,71$	$57,71 \pm 5,11$	$68,7 \pm 4,33$	$8,02 \pm 0,39$
5-й день	$4,84 \pm 1,21$	$101,5 \pm 10,06^*$	$69,5 \pm 2,88$	$7,99 \pm 0,98$
10-й день	$6,37 \pm 1,36$	$134,23 \pm 13,79^*$	$59,3 \pm 3,12$	$7,56 \pm 0,79$
20-й день	$7,51 \pm 0,98^*$	$148,89 \pm 11,34^*$	$54,8 \pm 2,78^*$	$7,64 \pm 1,52$
30-й день	$9,11 \pm 1,09^*$	$165,02 \pm 15,55^*$	$52,8 \pm 4,01^*$	$7,44 \pm 0,82$
40-й день	$10,94 \pm 1,54^*$	$175,94 \pm 21,34^*$	$44,9 \pm 2,34^*$	$6,46 \pm 1,11^*$
50-й день	$11,68 \pm 2,76^*$	$165,71 \pm 19,97^*$	$45,7 \pm 2,67^*$	$6,03 \pm 0,56^*$
60-й день	$13,64 \pm 1,68^*$	$173,7 \pm 21,66^*$	$43,7 \pm 1,99^*$	$5,70 \pm 0,35^*$

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю.

Таблиця 2 – Вплив метилглюксалу та інгібітора JNK в умовах *in vitro* на утворення стабільних метаболітів NO у стінці аорти (мкмоль/л,  $M \pm m$ ,  $n=5$ )

Умови експерименту	Термін інкубації, год	
	2	24
Контроль	$34,28 \pm 2,47$	$29,79 \pm 3,41$
Метилглюксаль	$58,19 \pm 4,17^*$	$76,25 \pm 5,59^*$
Метилглюксаль+SP600125	$55,26 \pm 4,33^*$	$45,72 \pm 5,88^{**}$

Примітка. \* –  $p \leq 0,05$  відносно контролю; \*\* –  $p \leq 0,05$  відносно метилглюксалу.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fegre-Salvayre A. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications / A. Fegre-Salvayre, R. Salvayre, N. Auge // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2009. – № 11. – P. 3071–3109.
2. Hyperglycaemia-induced impairment of endothelium-dependent vasorelaxation in rat mesenteric arteries is mediated by intracellular methylglyoxal levels in a pathway dependent on oxidative stress / O. Brouwers, P. M. Niessen, G. Haenen [et al.] // *Diabetologia.* – 2010. – № 5. – P. 989–1000.
3. Inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide donor decrease insulin receptor substrate-2 protein expression by promoting proteasome-dependent degradation in pancreatic beta-cells: involvement of glycogen synthase kinase-3beta / T. Tanioka, Y. Tamura, M. Fukaya [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – **286**, № 33. – P. 29388–29396.
4. Methylglyoxal induced activation of murine peritoneal macrophages and surface markers of T lymphocytes in sarcoma-180 bearing mice: involvement of MAP kinase, NF-kappa beta signal transduction pathway / A. Pal, I. Bhattacharya, K. Bhattacharya [et al.] // *Mol. Immunol.* – 2009. – **46**, № 10. – P. 2039–2044.
5. Mori M. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection / M. Mori, T. Gotoh // *J. Nutr.* – 2004. – **134**, № 10. – P. 2820–2825.
6. Nitric oxide and coronary vascular endothelium adaptations in hypertension / A. S. Levy, J. C. Chung, J. T. Kroetsch [et al.] // *Vasc. Health Risk Manag.* – 2009. – № 5. – P. 107510–107587.
7. Nitric oxide inhibits the formation of advanced glycation end products / K. Asahi, K. Ichimori, H. Nakazawa [et al.] // *Kidney Int.* – 2000. – № 4. – P. 1780–1787.
8. NOS-dependent activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase by oxidized low-density lipoprotein / Y. M. Go, A. L. Levonen, D. Moellering [et al.] // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2001. – **281**, № 6. – P. 2705–2713.
9. The influence of angiotensin II-induced increase in aortic wall mass on compliance in rats in vivo / D. L. Brouwers-Ceiler, H. J. Nelissen-Vrancken, J. F. Smits [et al.] // *Cardiovasc Res.* – 1997. – **33**, № 2. – P. 478–484.
10. Turk Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications / Z. Turk // *Physiol. Res.* – 2010. – № 2. – P. 147–156.

А. Л. Загайко<sup>1</sup>, О. А. Красильникова<sup>1</sup>, В. В. Панов<sup>2</sup>  
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ<sup>1</sup>, ХАРЬКОВ  
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА РАН<sup>2</sup>, МОСКВА

## УЧАСТИЕ JNK-КИНАЗЫ В ГЕНЕРАЦИИ ОКСИДА АЗОТА В УСЛОВИЯХ МОДЕЛИРОВАНИЯ КАРБОНИЛЬНОГО СТРЕССА У КРЫС

### Резюме

Целью работы было выяснить участие JNK-киназы в образовании азотного оксида (NO) в условиях моделирования карбонильного стресса. Длительное содержание крыс на рационе с высоким уровнем глюкозы вызвало стойкое повышение уровня глюкозы в крови животных, которое сопровождалось увеличением содержания метилглиоксала и повышением уровня нитритов в крови, что свидетельствует о развитии карбонильного стресса. Участки аорты инкубировали в присутствии метилглиоксала, воспроизводя условия развития карбонильного стресса. Для определения роли JNK-киназы в процессе образования вносили специфический ингибитор JNK-киназы SP600125. В присутствии метилглиоксала наблюдалось повышение уровня NO в среде инкубации участков аорты. Внесение ингибитора не влияло на уровень стабильных метаболитов NO в течение 2 часов, однако достоверно снижало их образование в течение длительной инкубации. Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что в данных экспериментальных условиях JNK-киназа вовлечена в образование NO.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: карбонильный стресс, гипергликемия, JNK-киназы, азотный оксид.

## PARTICIPATION OF JNK-KINASE IN THE GENERATION OF NITROGEN OXIDE IN THE CONDITIONS OF MODELING OF CARBONYL STRESS IN RATS

### Summary

*The aim of the study was to find out the participation of JNK-kinase in the creation of nitrogen oxide (NO) in the conditions of modeling of carbonyl stress. Prolonged keeping of rats on ration with high glucose level caused durable increase of glucose level in animals' blood, accompanied by the growth of methyl glyoxal content and increase of nitrite level in blood affirming the development of carbonyl stress. Aorta parts were incubated in the presence of methyl glyoxal reproducing the conditions of carbonyl stress development. Specific inhibitor of JNK-kinases SP 600125 was carried in for determination of the role of JNK-kinases in the creation process. In the presence of methyl glyoxal there was observed the increase of NO level in the incubation medium of aorta parts. The inhibitor carrying in doesn't influence on the creation of stable metabolites NO during 2 hours, but trustworthy decrease their creation during prolonged incubation. The obtained data can affirm that in such experimental conditions JNK-kinases are involved in the creation of NO.*

KEY WORDS: **carbonyl stress, hyperglycemia, JNK-kinases, nitrogen oxide.**

Отримано 06.10.11

Адреса для листування: А. Л. Загайко, Національний фармацевтичний університет, вул. Мельникова, 12, Харків, 61002, Україна.