

Вплив різних концентрацій метанандаміду на інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК в адренокортикоцитах щурів *in vitro*

Н.І. Левчук*

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. Досліджували вплив різних концентрацій метанандаміду на інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК у тканині надниркових залоз щурів різної статі. Показано, що препарат у концентрації 10^{-8} - 10^{-6} М призводить до зниження інтенсивності міжнуклеосомної фрагментації ДНК у самців та самиць щурів *in vitro*. Особливістю впливу метанандаміду на інтенсивність фрагментації ДНК у самиць є різноспрямована дія препарату на вміст олігонуклеосом різного розміру (у самців знижується рівень фрагментів розміром 200 п.о., у самиць підвищується вміст мононуклеосом та знижується рівень ди-, три- та тетра нуклеосом), що може бути пов'язано з дією естрогенів. Обговорюються механізми участі естрогенів у реалізації ефекту метанандаміду.

Ключові слова: метанандамід, фрагментація ДНК, апоптоз, надниркові залози, самці і самиці щурів.

Раніше ми показали, що метанандамід впливає на синтез і секрецію кортикостероїдів *in vitro* в адренкортикальній тканині в щурів різної статі. Виявлені зміни синтезу гормонів за умов дії метанандаміду, синтетичного аналога ендogenous канабіноїду анандаміду, а саме, пригнічення рівня 11-оксикортикостероїдів у самців та підвищення його вмісту

в самиць, дають підставу припустити модулюючий вплив естрогенів на регуляцію стероїдогенезу [1].

На сьогодні доведено, що N-ацилетаноламіни (NAE) здатні регулювати процеси пухлинного росту (ангіогенез, інвазивність, метастатичну активність) та ініціювати апоптоз у пухлинних клітинах різного типу [2]. Виявилось, що дія NAE опосередковується не тільки специфічними канабіноїдними рецепторами (CB1 і CB2), але і прямим впливом на мембранні структури [3,4]. Встановлено, що реалізація проапоптозних ефектів окремих представників NAE відрізняєть-

* адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна; e-mail: zdovado@ukr.net

ся та залежить від природи клітини та ступеня її диференціювання [5-8]. У наших попередніх дослідженнях було показано, що як суміш NAE, що містила похідні етаноламіну, здебільшого з ненасиченими залишками жирних кислот, так і N-стеароїлетаноламін (NSE) – сполука, яка має у своєму складі насичену жирну кислоту, проявляли *in vitro* проапоптозний ефект у тканині гормонально активних та гормонально неактивних пухлин кори надниркових залоз людини [9,10]. Проте вплив NAE на інтенсивність фрагментації ДНК у нормальній тканині надниркових залоз залишається нез'ясованим.

У зв'язку з цим представляло інтерес дослідити вплив метанандаміду на термінальну стадію апоптозу – міжнуклеосомну фрагментацію ДНК – в адренкортикальній тканині щурів різної статі.

Матеріали та методи

На проведення досліджень одержано дозвіл від комісії Інституту ендокринології з питань біоетики. Експерименти проведені на 6 самцях та 10 самицях щурів лінії Вістар. Після декапітації щурів надниркові залози зважували, очищали від сполучної та жирової тканини, готували зрізи та інкубували їх при 37 °С впродовж 3 год. та постійному струшуванні в 1 мл живильного середовища RPMI-1640 («Sigma», США), що містило 5% бичачої сироватки («Sigma», США). До середовища інкубації додавали спиртовий розчин R-(+)-метанандаміду («Sigma», США) в кінцевій концентрації 10^{-8} - 10^{-6} М. Контрольні проби містили розчинник у відповідній концентрації.

Екстракцію ДНК та розділення її фрагментів в агарозному гелі проводили як описано в роботі [11]. Після електрофорезу гелі фотографували цифровою відеокамерою в транслюмінаторі і сканували за допомогою програми «GelPro». Вміст олігонуклеосом різного розміру встановлювали при розрахунку долі інтенсивності флуоресценції смужок фрагментів ДНК по відношенню до загальної (100%), яка відповідала кількості нанесеної на гель ДНК.

Одержані дані опрацьовані статистично з використанням критерію t Стьюдента. Вірогідними вважалися значення при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Дані, наведені в табл. 1 і 2, свідчать про різний базальний рівень міжнуклеосомної фрагментації ДНК у тканині надниркових залоз щурів різної статі. Вміст мононуклеосом у тканині надниркових залоз самиць був нижчим, ніж у тканині надниркових залоз самців, тоді як вміст більших за розміром фрагментів ДНК – вищим. Отже можна припустити, що різний характер міжнуклеосомної фрагментації ДНК у тканині надниркових залоз самців і самиць щурів може бути пов'язаний із дією естрогенів. Так, показано, що 17 β -естрадіол у позапухлинній тканині надниркових залоз людини пригнічує *in vitro* інтенсивність фрагментації ДНК та зменшує рівень мРНК проапоптозного білка Вах, тобто виявляє антиапоптозний ефект [12].

При інкубації зрізів надниркових залоз самців щурів препарат знижує порівняно з контролем вміст мононуклеосом у всіх досліджених концентраціях і не впливає на кількість інших олігонуклеосом (400, 600, 800 пар основ (п.о.)) та сумарного їх вмісту 200-800 (табл. 1). Відомо, що більша доля фрагментів ДНК розміром ~200 п.о. утворюється за тривалішої діяльності ендонуклеаз. Отже зменшена кількість мононуклеосом може свідчити про зниження інтенсивності апоптозу в адренкортикальній тканині самців під дією препарату.

У літературі існують дані щодо проапоптозної та антипроліферативної дії NAE в клітинах різного типу *in vitro* [2]. Були описані й протекторні ефекти NAE [13-16]. При цьому необхідно зазначити, що NAE в клітинах різного типу по-різному впливають на перебіг апоптозних процесів. Причиною такої селективності може бути залучення різних сигнальних механізмів до реалізації їхніх ефектів. Крім того, суттєве значення має також природа індукторів апоптозу. Так, показано, що N-арахідоноїлетаноламін (анандамід) у клітинах феохромоцитом щурів PC-12 пригнічував опосередковану CB1-рецепторами активацію ERK

Таблиця 1. Вплив різних концентрацій метанандаміду на інтенсивність фрагментації ДНК у корі надниркових залоз самців щурів *in vitro* (n=3)

Розмір фрагментів ДНК, п.о.	Контроль	Метанандамід 10^{-8} М	Метанандамід 10^{-7} М	Метанандамід 10^{-6} М
200	4,82±0,17	2,35±0,19*	2,58±0,58*	2,49±0,32*
400	6,43±0,76	5,50±0,62	5,27±0,40	5,30±0,41
600	6,51±0,74	7,64±0,29	6,98±0,57	5,62±0,35
800	6,94±1,69	8,18±0,72	7,47±1,00	6,76±0,61
200-800	24,7±3,25	23,7±1,75	22,3±0,96	20,2±0,42

Примітка: * – зміни вірогідні порівняно з контрольною пробою без метанандаміду ($p < 0,05$).

Оригінальні дослідження

(екстрацелюлярної протеїнази, що регулюється мітогенами), яка була індукована фактором росту нервів NGF, через послаблення шляху Rap1/B-Raf [13]. За іншими даними, анандамід також інгібував індуковану 6-гідроксидофаміном клітинну смерть у вищезазначених клітинах. Проте це було пов'язано не з активацією CB1, CB2 або TRPV1-рецепторів, а з пригніченням активності каспази-3, зі зниженням рівня експресії c-Jun, Bim, JNK та активацією PI3K. Автори зробили висновок, що протекторна роль анандаміду в клітинах PC-12 обумовлена підвищенням активності PI3K та зниженням активності JNK [16].

Виявлено, що канабіноїди (біологічно активні речовини, які були вперше виділені із коноплі *Cannabis sativa*) можуть захищати нормальні клітини, зокрема нейрони та гліальні клітини [15]. Одним із механізмів, що призводить до виживання астроцитів за умов дії канабіноїдів у керамід-індукованому апоптозі, є активація PI3K/РКВ-сигнального шляху [14]. Таким чином, ефекти NAE в клітинах різного типу можуть бути опосередковані різними сигнальними механізмами та залежать від певних умов, що викликають апоптоз. Тому з'ясування механізмів, за якими реалізуються антиапоптозні ефекти метанандаміду в тканині надниркових залоз щурів-самців, потребують подальших досліджень.

На відміну від самців, у самиць вплив метанандаміду на міжнуклеосомну фрагментацію ДНК мав інший характер. Інкубація зрізів надниркових залоз самиць у присутності метанандаміду в різних концентраціях призводила до збільшення вмісту мононуклеосом, вірогідні їх зміни зареєстровані порівняно з контролем за концентрацією метанандаміду 10^{-8} і 10^{-7} М (табл. 2). При цьому суттєвіший ефект препарату спостерігали при концентрації 10^{-8} М. Водночас виявлено зниження відсотка олігонуклеосом, що містять 400-800 п.о., та сумарного вмісту олігонуклеосом. Ці зміни були вірогідними для ди- і тринуклеосом при кон-

центрації 10^{-8} М, динуклеосом – при 10^{-7} М та ди-, три-, тетра- і сумарного їх вмісту – при 10^{-6} М; найсуттєвіші зміни мали місце за умов найвищої концентрації препарату. Ця концентрація виявилась також ефективною щодо впливу метанандаміду на секрецію кортикостероїдів [1]. Таким чином, встановлено, що напрямок змін рівня олігонуклеосом різного розміру під дією метанандаміду є протилежним, що може бути наслідком різного впливу препарату на активність ендонуклеаз, які розщеплюють ДНК на фрагменти різного розміру. Питання про природу ферментів, відповідальних за деградацію хроматину при апоптозі, до кінця ще нез'ясовано.

Різна спрямованість ефектів метанандаміду в самців та самиць може бути пояснена впливом естрогенів, і, можливо, реалізується за участю холестерину мембран. Так, анандамідіндукований апоптоз у гепатоцитах залежав від вмісту холестерину в мембрані і не залежав від активації канабіноїдних рецепторів. За цих умов апоптоз у клітинах був пов'язаний із зупинкою клітинного циклу у фазі G₀/G₁, активацією p38MAPK і JNK та пригніченням антиапоптозного сигнального шляху РКВ/Акт [3]. Автори висловили припущення, що холестерин клітинної мембрани може функціонувати як своєрідний ліганд для анандаміду та визначати долю клітин при дії останнього. Показано, що введення NSE мишам, яким була перещеплена карцинома Льюїса, призводить до багатократного збільшення рівня вільного холестерину в клітинах метастазів легень [4].

Відомо, що однією з функцій естрогенів є участь у синтезі та депонуванні холестерину клітинами різних тканин [17,18]. Було показано, що під впливом низьких доз естрадіолу в плазмі крові щурів спостерігається збільшення рівня ліпопротеїдів високої щільності, основної форми холестерину, що утилізується стероїдогенними клітинами щурів [18]. Також необхідно врахувати той факт, що естрогени в клітинах різного типу

можуть впливати на процеси синтезу та деградації ендоканабіноїдів. Так, в ендотеліальних клітинах 17β -естрадіол активував фермент синтезу анандаміду – фосфоліпазу D N-арахідоноїлфосфатидилетаноламіну (NAPE-PLD) та інгібував фермент його деградації – амідогідролазу жирних кислот (FAAH) [19-21]. Разом із тим, у матці 17β -естрадіол

Таблиця 2. Вплив різних концентрацій метанандаміду на інтенсивність фрагментації ДНК у корі надниркових залоз самиць щурів *in vitro* (n=5)

Розмір фрагментів ДНК, п.о.	Контроль	Метанандамід 10^{-8} М	Метанандамід 10^{-7} М	Метанандамід 10^{-6} М
200	1,96±0,32 [#]	4,50±0,50*	3,24±0,33*	2,66±0,38
400	10,4±0,60 [#]	7,78±0,55*	8,06±0,54*	6,36±0,65*
600	11,7±0,56 [#]	9,30±0,43*	11,7±0,54	6,85±0,82*
800	14,7±2,59 [#]	10,4±0,60	12,7±1,12	8,20±1,12*
200-800	38,8±3,35 [#]	32,0±2,02	35,7±1,81	24,1±2,88*

Примітки: * – зміни вірогідні порівняно з контрольною пробою без метанандаміду (p<0,05); # – різниця вірогідна порівняно з вмістом олігонуклеосом у тканині надниркових залоз самиць щурів (p<0,05) (див. табл. 1).

пригнічував активність NARE-PLD [22]. За іншими даними, при апоптозі, індукованому при додаванні до середовища інкубації сироватки, продуктом розпаду анандаміду є етаноламін, який може захищати клітини від дії ендоканабіноїду. Захисна роль анандаміду не була пов'язана з активацією CB1, CB2 чи ванілоїдних рецепторів VR1. Вона залежала від активності FAAH та етаноламіну, який виявляв захисний ефект. Можна припустити, що поряд із дією естрогенів на депонування холестерину в наднирковозалозних клітинах самиць щурів, ймовірно, вони також впливають на активність ферментів, які регулюють процеси синтезу або деградації ендоканабіноїдів. Це, у свою чергу, має певне значення в реалізації ефекту метанандаміду, внесеного до середовища інкубації.

Таким чином, метанандамід *in vitro* інгібує інтенсивність фрагментації ДНК у тканині надниркових залоз самців та самиць щурів. При цьому особливістю впливу метанандаміду на інтенсивність фрагментації ДНК у самиць є різноспрямована дія препарату на вміст олігонуклеосом різного розміру, що може бути пов'язано з дією естрогенів.

Список використаної літератури

1. Левчук Н.І. Вплив метанандаміду на інтенсивність стероїдогенезу в адренкортикоцитах щурів *in vitro* // Укр. біохім. журн. 2013 (подана до друку).
2. Pushkarev V.M., Kovzun O.I., Tronko M.D. Antineoplastic and apoptotic effects of cannabinoids. N-acylethanolamines: protectors or killers? // Exp. Oncol. 2008, 30, N 1, 6-21.
3. Biswas K.K., Sarker K.P., Abejama K. et al. Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis // Hepatology. 2003, 38, N 5, 1167-1177.
4. Гула Н.М., Хмель Т.О., Клімашевський В.М. Вплив N-стеароїлетаноламіну на ліпідний склад метастазів та умовно нормальної тканини легенів у мишей з карциномною Льюїс // Укр. біохім. журн. 2006, 78, № 2, 97-105.
5. Sarfaraz S., Afag F., Adhami V.M., Mukhtar H. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer // Cancer Res. 2005, 65, N 5, 1635-1641.
6. Caffarel M.M., Sarrio D., Palacios J. et al. Δ^9 -tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation // Cancer Res. 2006, 66, N 13, 6615-6621.
7. Carracedo A., Gironella M., Lorente M. et al. Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes // Cancer Res. 2006, 66, N 13, 6748-6755.
8. Gustafsson K., Christensson B., Sander B., Flygare J. Cannabinoid receptor-mediated apoptosis induced by R(+)-methanandamide and Win55,212-2 is associated with ceramide accumulation and p38 activation in mantle cell lymphoma // Mol. Pharmacol. 2006, 70, 1612-1620.
9. Левчук Н.І., Ковзун О.І., Тронько М.Д., Пушкарьов В.М. Вплив N-стеароїлетаноламіну на інтенсивність апоптозу в пухлинних тканинах надниркових залоз людини // Ендокринологія. 2007, 12, № 1, 121-125.
10. Левчук Н.І., Пушкарьов В.М., Ковзун О.І. та ін. Вплив N-стеароїлетаноламіну на інтенсивність фрагментації ДНК у пухлинній та позапухлинній тканинах кори надниркових залоз людини // Укр. біохім. журн. 2012, 84, № 4, 49-53.
11. Kostyuchenko N., Pushkarev V., Kashevarov G. et al. Effects of N-acylethanolamines and various antimetabolic agents on apoptotic DNA fragmentation in conventionally normal and tumor tissue of human adrenals // Exp. Oncol. 2005, 27, N 3, 215-219.
12. Тронько М.Д., Ковзун О.І., Грінченко Є.М., Микоша О.С. Вплив 17β -естрадіолу на експресію мРНК проапоптичного протеїну Вах і рівень фрагментації ДНК у корі надниркових залоз людини // Укр. біохім. журн. 2009, 81, № 2, 80-84.
13. Rueda D., Navarro B., Martinez-Serrano A. et al. The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway // J. Biol. Chem. 2002, 277, N 48, 46645-46650.
14. Pulgar del T.G., Ceballos de M.L., Guzman M., Velasco G. Cannabinoids protect astrocytes from ceramide-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B // J. Biol. Chem. 2002, 277, N 39, 36527-36533.
15. Guzman M. Effects on cell viability // Handb. Exp. Pharmacol. 2005, 168, 627-642.
16. Mnich K., Finn D.P., Dowd E., Gorman A.M. Inhibition by anandamide of 6-hydroxydopamine-induced cell death in PC12 cells // Int. J. Cell Biol. 2010, 2010, Article ID 818497. doi: 10.1155/2010/818497.
17. Carr B.R., Simpson E.R., Cholesterol synthesis by human fetal hepatocytes: effects of hormones // J. Clin. Endocr. Metab. 1984, 58, N 6, 1111-1116.
18. Cinci G., Arezzini L., Terzuoli L. et al. Effect of estradiol on phospholipid lipoprotein levels and fatty acid composition in the rat // Life Sci. 1997, 61, N 3, 319-324.
19. Maccarrone M., Bari M., Battista N., Finazzi-Agro A. Estrogen stimulates arachidonylethanolamide release from human endothelial cells and platelet activation // Blood. 2002, 100, N 12, 4040-4048.
20. Maccarrone M., Bisogno T., Valensise H. et al. Low fatty acid amide hydrolase and high anandamide levels are associated with failure to achieve an ongoing pregnancy after IVF and embryo transfer // Mol. Hum. Reprod. 2002, 8, N 2, 188-195.
21. Maccarrone M., Falciglia K., Di Rienzo M., Finazzi-Agro A. Endocannabinoids, hormone-cytokine networks and human fertility // Prostaglandins Leukot. Essen. Fatty Acids. 2002, 66, N 2-3, 309-317.
22. Guo Y., Wang H., Okamoto Y. et al. N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D is an important determinant of uterine anandamide levels during implantation // J. Biol. Chem. 2005, 280, N 25, P. 23429-23432.

Влияние различных концентраций метанандамида на интенсивность межнуклеосомной фрагментации ДНК в адренокортикocyтах крыс *in vitro*

Н.И. Левчук

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ
им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

Резюме. Исследовали влияние различных концентраций метанандамида на интенсивность межнуклеосомной фрагментации ДНК в ткани надпочечников крыс разного пола. Показано, что препарат в концентрации 10^{-8} - 10^{-6} М приводит к снижению интенсивности межнуклеосомной фрагментации ДНК у самцов и самок крыс *in vitro*. Особенностью влияния метанандамида на интенсивность фрагментации ДНК у крыс разного пола является разнонаправленное действие препарата на содержание олигонуклеосом разного размера (у самцов снижается уровень фрагментов размером 200 п.о., у самок повышается содержание моонуклеосом и снижается уровень ди-, три- и тетрануклеосом), что может быть связано с действием эстрогенов. Обсуждаются механизмы участия эстрогенов в реализации эффекта метанандамида.

Ключевые слова: метанандамид, фрагментация ДНК, апоптоз, надпочечники, самцы и самки крыс.

Effect of different methanandamide concentrations on the intensity of internucleosomal DNA fragmentation in adrenocorticocytes of rats *in vitro*

N.I. Levchuk

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Nat. Acad. of Med. Sci. of Ukraine»

Summary. The author has studied the effect of different methanandamide concentrations on the intensity of internucleosomal DNA fragmentation in adrenal tissue of male and female rats. The drug at a concentration of 10^{-8} - 10^{-6} M was shown to lead to a decreased intensity of internucleosomal DNA fragmentation in male and female rats *in vitro*. One peculiarity of methanandamide impact on the intensity of DNA fragmentation in rats of different gender is a differently directed effect of the drug on the content of oligonucleosomes of different size (the levels of fragments measuring 200 bp was reduced in males, the content of mononucleosomes was increased in females, and the levels of di-, tri- and tetranucleosomes was decreased), which can be due to estrogens effect. The mechanisms of estrogen involvement in the realization of methanandamide effect are under discussion.

Keywords: methanandamide, DNA fragmentation, apoptosis, adrenal glands, male and female rats.