

Зміни рівня холестерину в надниркових залозах щурів, викликані метанандамідом, залежні від статевих гормонів

Н.І. Левчук,
О.В. Калініченко,
О.І. Ковзун,
О.С. Микоша

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

Резюме. Для з'ясування можливої участі холестерину в реалізації ефектів метанандаміду (метаболічно стійкого синтетичного похідного ендogenous канабіноїду анандаміду) в тканині надниркових залоз щурів було поставлено за мету дослідити вплив різних концентрацій метанандаміду *in vitro* на вміст загального холестерину в адренкортикоцитах інтактних самців і самиць щурів, а також кастрованих тварин за умов введення естрадіолу. Кількісний вміст загального холестерину визначали ензиматичним методом. Показано, що в самців рівень холестерину знижувався внаслідок інкубації зрізів надниркових залоз із концентраціями 10^{-8} - 10^{-6} моль/л метанандаміду, у самиць – збільшувався за концентрації 10^{-7} - 10^{-6} моль/л. Кастрація самиць цілком усувала ефект метанандаміду, а в самців після орхіектомії зниження вмісту холестерину спостерігалось лише за концентрації 10^{-6} моль/л метанандаміду. Триденне введення естрадіолу кастрованим тваринам приводило до відновлення відповіді на цю сполуку лише в тканині надниркових залоз самиць. Зроблено висновок, що метанандамід справляв різноспрямований ефект на вміст загального холестерину в адренкортикоцитах самців і самиць, що може бути пов'язано зі статтю тварин.

Ключові слова: метанандамід, холестерин, надниркові залози, статеві відмінності.

Участь ендоканабіноїдів у регуляції діяльності гіпофізарно-адренкортикальної системи не викликає сумнівів. Їх залучено, зокрема, у реалізацію швидкого зворотного зв'язку в умовах стресу [1, 2]. Аналіз літератури щодо зв'язку статевих гормонів та ендоканабіноїдної системи наведено в огляді [3]. Ендоканабіноїдна система

та секреція андрогенів реципрокно пов'язані зворотнім зв'язком [3]. Набагато гірше досліджено ефекти ендоканабіноїдів в ендокринних залозах на клітинному й тканинному рівнях. Механізми впливу ендоканабіноїдів на стероїдогенез практично не досліджено. Встановлено, що важливим етапом реалізації ефектів є зв'язування ендоканабіноїдів із рецепторами різного типу (CB₁ і CB₂). CB₁-рецептори експресуються в клітинах надниркових залоз людини [4]. Утворення кортикостероїдних гормонів контролюється склад-

* 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: levnataly@meta.ua

ною системою регуляторів, в якій важливе місце належить естрогенним сполукам [5, 6].

Відомо, що в гіпофізі, який секретує адренокортикотропний гормон, також експресуються CB_1 -рецептори [7]. Експресія CB_1 -рецепторів у гіпофізі регулюється статевими гормонами як у самців, так і у самиць щурів. Активація гіпофізарно-адренокортикальної системи, викликана введенням антагоніста CB_1 -рецепторів, залежить від статі тварин [8].

Нами було показано, що метанандамід, який є метаболічно стійким похідним анандаміду та зберігає його біологічні властивості, справляє різноспрямовані ефекти на стероїдогенез й апоптоз у надниркових залозах самців і самиць щурів [9, 10]. Відомо, що в залозах, які продукують стероїдні гормони, холестерин, крім участі в побудові мембранних структур, є попередником, з якого синтезуються гормони. Це визначило завдання нашого дослідження – оцінити вплив метанандаміду на вміст холестерину в тканині надниркових залоз щурів різної статі.

Матеріали та методи

Утримання та використання в експерименті лабораторних тварин відповідало міжнародним нормам з біоетики [11]. На проведення досліджень отримано дозвіл від комісії з питань біоетики ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України».

Експерименти проводили на статевозрілих щурах-самцях і щурах-самицях лінії Вістар. Вага тварин перед початком експерименту становила 140-200 г. Використовували такі експериментальні групи: інтактні тварини; щури після орхіектомії та оваріектомії, яким вводили розчинник (рафіновану соняшникову олію); щури після орхіектомії та оваріектомії, які отримували естрадіол, розчинений у рафінованій соняшниковій олії. Видалення яєчників у самиць і сім'яників у самців проводили під ефірним наркозом. Щурів використовували в експериментах через 8 тижнів після кастрації. Розчин естрадіолу бензоату (Koch-Light, Велика Британія) у дозі 100 мкг на тварину вводили щурам внутрішньом'язово впродовж 3 діб. Введення гормону та забій тварин здійснювали в один і той же час доби (вранці). Тварини, які отримували естрадіол бензоат або розчинник, забивали декапітацією через добу після останньої ін'єкції препарату. Надниркові залози очищали від жирової та сполучної тканини, зважували, нарізали на зрізи завтовшки $\approx 0,5$ мм лезом. Останні ін-

кубували за температури 37°C впродовж 3 год. із постійним струшуванням в 1 мл живильного середовища RPMI-1640 (20 ммоль/л HEPES і L-glutamine) (Sigma, США), що містило 5% бичачої сироватки (Sigma, США), у присутності розчину R(+)-метанандаміду в етанолі (Sigma, США) у кінцевій концентрації 10^{-8} - 10^{-6} моль/л. У контрольну пробу додавали відповідну кількість етанолу. Після інкубації зрізи тканини гомогенізували в 0,05 моль/л трис-НСl (рН 7,4) буфері для отримання 10% гомогенату. Кількісний вміст загального холестерину визначали за допомогою набору C7510 (Pointe Scientific, США). Метод включає гідроліз ефірів холестерину холестеринестеразою, окислення холестерину оксидазою холестерину та подальше кількісне визначення утвореного холестериноксидазою H_2O_2 .

Вміст загального холестерину виражали в мкг/мг тканини. Статистичний аналіз отриманих результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента та *U*-критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні. Статистично значущою вважали відмінність за $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Інкубація зрізів тканини надниркових залоз інтактних самців і самиць із метанандамідом викликала різноспрямовані зміни вмісту холестерину: у самців рівень холестерину знижувався за всіх досліджуваних концентрацій метанандаміду, у самиць – збільшувався за концентрації 10^{-7} - 10^{-6} моль/л (табл.). Ця різниця ефекту метанандаміду на інтенсивність стероїдогенезу та фрагментацію ДНК у тканині надниркових залоз у щурів різної статі, що його було продемонстровано раніше [9, 10], може бути опосередкована змінами вмісту холестерину. Метанандамід *in vitro* не впливав на рівень холестерину в щурів після оваріектомії та лише за умов високої концентрації діяв у щурів після орхіектомії, що підтверджує думку про роль статевих гормонів у реалізації ефектів ендоканабіноїдів [3].

Внаслідок трьохденного введення естрадіолу ефект метанандаміду на вміст холестерину у кастрованих самиць, але не в самців після орхіектомії, відновлювався. Відомо, що зміни рівня естрогенів впродовж естрального циклу в самиць щурів і менструального циклу в жінок впливають на рівень експресії мРНК CB_1 -рецепторів та активність ферментів, які відповідають за синтез і метаболізм ендоканабіноїдів у різних типах клітин [3].

Кастрація тварин викликала підвищення вмісту холестерину як у самців, так і в самиць,

Оригінальні дослідження

але трактувати ці зміни складно, оскільки кастровані тварини отримували олію. Введення естрадіолу кастрованим самцям не призводило до змін вмісту холестерину в тканині, а в самиць після оварієктомії рівень холестерину знижувався та наближався до контрольного показника.

Вміст холестерину в стероїдопродукуючих залозах визначається балансом між його використанням у стероїдогенезі та надходженням у клітини. Холестерин може синтезуватися *de novo* та проникати в клітину в складі ліпопротеїнів із плазми крові. Сьогодні найбільше значення надається надходженню холестерину в надниркові залози щурів після зв'язування ліпопротеїнів високої щільності (HDL) зі скавенджер-рецептором. Високі дози естрогенів різко посилюють експресію цього рецептора на плазматичних мембранах адренортикоцитів [12]. Цей ефект естрогенів опосередковується адренортикотропним гормоном [13]. Можливо, статеві гормони беруть участь у регуляції експресії СВ₁-рецепторів багатьох органів. Показано, що кастрація самців щурів знижує щільність СВ₁-рецепторів у слинній залозі, а тестостерон відновлює кількість рецепторів у цій тканині [14]. Відсутність ефекту метанандаміду в кастрованих самців щурів може бути наслідком зменшення щільності СВ₁-рецепторів у тканині надниркових залоз. Зв'язок ендоканабіноїдної системи та гомеостазу холестерину наразі не зрозумілий, але в макрофагах активація цієї системи посилює накопичення холестерину [15].

Отже, отримані нами дані дозволяють припустити, що в тканині кори надниркових залоз ендоканабіноїдна система може модулювати функцію адренортикоцитів, змінюючи вміст у клітинах холестерину. Цей ефект пов'язано зі статтю тварин.

Таблиця. Вміст загального холестерину (мкг/мг тканини) в тканині надниркових залоз щурів після інкубації зрізів тканини *in vitro* з різними концентраціями метанандаміду ($M \pm m$, $n=6-8$).

Група тварин	Контрольна проба	Концентрація метанандаміду		
		10 ⁻⁸ моль/л	10 ⁻⁷ моль/л	10 ⁻⁶ моль/л
самці				
Інтактні	17,3 ± 0,26	13,0 ± 1,24*	13,7 ± 1,51*	13,3 ± 1,40*
Тварини після орхієктомії, яким вводили олію	35,0 ± 2,87 [§]	39,1 ± 2,84 [§]	31,8 ± 2,79 [§]	26,6 ± 4,22 ^{§, &}
Тварини після орхієктомії, яким вводили естрадіол бензоат (100 мкг/тварину)	34,4 ± 5,39	36,3 ± 3,92	35,9 ± 3,35	36,1 ± 6,63
самиці				
Інтактні	15,8 ± 3,79	17,8 ± 3,15	34,9 ± 2,66*	30,2 ± 2,40*
Тварини після оварієктомії, яким вводили олію	37,9 ± 2,79 [§]	33,3 ± 3,13 [§]	36,9 ± 3,53	35,1 ± 2,65
Тварини після оварієктомії, яким вводили естрадіол бензоат (100 мкг/тварину)	24,7 ± 5,14 ⁺	24,1 ± 5,80	39,9 ± 4,97 [#]	52,5 ± 5,58 ^{*, +}

Примітки: * – $p < 0,05$ – порівняно з контрольною пробою без метанандаміду (*t*-критерій Стьюдента); ⁺ – $p < 0,05$ – порівняно з контрольною пробою без метанандаміду (*U*-критерій Вількоксона-Манна-Уїтні); [§] – $p < 0,05$ – порівняно з тваринами після оварієктомії (*t*-критерій Стьюдента); [&] – $p < 0,05$ – порівняно з інтактними тваринами (*t*-критерій Стьюдента).

Список використаної літератури

- Cota D. The role of the endocannabinoids system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity // J. Neuroendocrinol. – 2008. – Vol. 20 (Suppl. 1). – P. 35-38.
- Riebe C.J., Wotjak C.T. Endocannabinoids and stress // Stress. – 2011. – Vol. 14 (4). – P. 384-397.
- Gorzalka B.B., Dang S.S. Minireview: Endocannabinoids and gonadal hormones: bidirectional interactions in physiology and behavior // Endocrinology. – 2012. – Vol. 153 (3). – P. 1016-1024.
- Ziegler C.G., Mohn C., Lamounier-Zepter V., Rettori V., Bornstein S.R., Krug A.W., Ehrhart-Bornstein M. Expression and function of endocannabinoid receptors in the human adrenal cortex // Horm. Metab. Res. – 2010. – Vol. 42 (2). – P. 88-92.
- Ковзун О.І. Залучення протеїнкіназ, активованих міогенами, і транскрипційного чинника c-Fos до трансдукції регуляторного сигналу естрадіолу в адренортикоцитах щурів // Фізіол. журн. – 2007. – Т. 53, № 6. – С. 46-51. (Kovzun O.I. Influence of mitogen-activated protein kinases and transcriptional factor c-fos on estradiol signal transduction in the rat adrenocorticocytes // Fiziol. Zh. 2007, 53, N 6, 46-51).
- Микоша А.С., Ковзун Е.І., Гринченко Е.Н. Естрадіол-17 β активує формування кортикостероїдів і затримує проліферацію культивованих кліток надпочечників свиней // Укр. біохім. журн. 2003, 75, N 1, 29-32. (Mikosha A.S., Kovzun O.I., Grinchenko E.N. Estradiol-17 β activates corticosteroids synthesis and inhibits proliferation in the cultured pig adrenocortical cells // Ukr. Biochem. J. 2003, 75, N 1, 29-32).
- Gonzalez S., Bisogno T., Wenger T., Manzanares J., Milone A., Berrendero F., Di Marzo V., Ramos J.A., Fernandez-Ruiz J.J. Sex steroid influence on cannabinoid CB1 receptor mRNA and endocannabinoid levels in the anterior pituitary gland // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000, 270, N 1, 260-266.
- Atkinson H.C., Leggett J., Wood S.A., Cast-rigue E.S., Kershaw Y.M., Lightman S.L. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis circadian rhythm by endocannabinoids is sexually dimorphic // Endocrinology. 2010, 151, N 8, 3720-3727.
- Левчук Н.І. Вплив метанандаміду на стероїдогенез в адренортикоцитах щурів *in vitro* // Укр. біохім. журн. 2013, 85, № 4, 90-93. (Levchuk N.I. Influence of methanandamide on steroidogenesis in rat adrenocorticocytes *in vitro*. Ukr. Biochem. J. 2013, 85, N 4, 90-93).
- Левчук Н.І. Вплив різних концентрацій метанандаміду на інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК в адренортикоцитах щурів *in vitro* // Ендокринологія. 2013, 18, N 2, 60-64. (Levchuk N.I. Effect of different methanandamide concentrations on the intensity of internucleosomal DNA fragmentation in adrenocorticocytes of rats *in vitro* // Endocrinologia. 2003, 18, N 2, 60-64).
- Загальні етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. 2003, 8, № 1, 142-145. (General ethical

- principles of animal experimentation // *Endocrinologia*. 2003, 8, N 1, 142-145).
12. Landschulz K.T., Pathak R.K., Rigotti A., Krieger M., Hobbs H.H. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat // *J. Clin. Invest.* 1996, 98, 984-995.
 13. Stangl H., Graf G.A., Yu L., Cao G., Wyne K. Effect of estrogen on scavenger receptor B₁ expression in the rat // *J. Endocrinol.* 2002, 175, N 3, 663-672.
 14. Busch L., Sterin-Borda L., Borda E. Effects of castration on cannabinoid CB₁ receptor expression and on the biological actions of cannabinoids in the parotid gland // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2006, 33, N 3, 258-263.
 15. Jiang L.S., Pu J., Han Z.H., Hu L.H., He B. Role of activated endocannabinoid system in regulation of cellular cholesterol metabolism in macrophages // *Cardiovasc. Res.* 2009, 81, N 4, 805-813.

(Надійшла до редакції 30.03.2015 р.)

Изменения уровня холестерина в надпочечниках крыс, вызванные метанандамидом, в зависимости от половых гормонов

Н.И. Левчук, Е.В. Калиниченко, Е.И. Ковзун,
А.С. Микоша

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

Резюме. Для выяснения возможного участия холестерина в реализации эффектов метанандамида (метаболически стойкого синтетического производного эндогенного каннабиноида анандамида) в ткани надпочечников крыс была поставлена цель исследовать влияние различных концентраций метанандамида *in vitro* на содержание общего холестерина в адренортикоцитах интактных самцов и самок крыс, а также кастрированных животных в условиях введения эстрадиола. Количественное содержание общего холестерина определяли энзиматическим методом. Показано, что у самцов содержание холестерина снижалось в результате инкубации срезов надпочечников при концентрациях 10^{-8} - 10^{-6} моль/л метанандамида, у самок – увеличивалось при концентрации 10^{-7} - 10^{-6} моль/л. Кастрация самок полностью устраняла эффект метанандамида, а у орхиэктомированных самцов снижение содержания холестерина наблюдалось только при 10^{-6} моль/л концентрации метанандамида. Трехдневное введение эстрадиола

кастрированным животным приводило к восстановлению ответа на это вещество только в ткани надпочечников самок. Сделан вывод, что метанандамид проявлял разнонаправленный эффект на содержание общего холестерина в адренортикоцитах самцов и самок, что может быть связано с полом животных.

Ключевые слова: метанандамид, холестерин, надпочечники, половые различия.

Changes in cholesterol levels of rat adrenals, induced by methanandamide, depending on sex hormones

N.I. Levchuk, O.V. Kalinichenko, O.I. Kovzun,
O.S. Mikosha

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

Summary. The aim of the study was to clarify cholesterol involvement in realizing the effect of different concentrations of methanandamide (a metabolically stable synthetic derivative of endogenous cannabinoid anandamide) *in vitro* on the content of total cholesterol in adrenocorticocytes of intact male and female rats and castrated animals under estradiol administration, to study the possible involvement of cholesterol in the implementation of methanandamide effects in rat adrenal tissue. The quantitative content of total cholesterol was determined using enzymatic method. Cholesterol level was shown to be decreased in males as a result of adrenal slices' incubation at 10^{-8} - 10^{-6} mol/L methanandamide concentrations, and in females it was increased at a concentration of 10^{-7} - 10^{-6} mol/L. The methanandamide effect was completely eliminated by castration of females, and a decrease in cholesterol content was only observed at a 10^{-6} mol/L methanandamide concentration in orchietomized males. Three-day administration of estradiol to castrated animals resulted in a recovery of response to this substance only in the tissue of female adrenals. It was concluded that methanandamide showed multidirectional effects on total cholesterol content in adrenocorticocytes of males and females, which may be associated with animal gender.

Keywords: methanandamide, cholesterol, adrenal glands, gender differences.