

О.С. Лукашеня,
Н.І. Левчук,
О.С. Микоша,
О.І. Ковзун

N-ацильовані похідні етаноламіну збільшують експресію мРНК проапоптотичного білка Вах у корі надниркових залоз людини

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

Резюме. N-ацилетаноламіни (NAE) — клас мінорних ліпідів, які за хімічною природою є ацильними похідними етаноламіну. Показано, що NAE справляють широкий спектр біологічних ефектів в організмі: мембранопротекторний, антиоксидантний, антиалергічний, протизапальний, антивірусний, антибактеріальний. Крім того, останніми роками широко досліджується їх участь у регуляції апоптозу та пригніченні проліферації пухлинних клітин різного походження. Продемонстровано також проапоптотичний вплив NAE на позапухлинну тканину кори надниркових залоз людини. Проте механізми, за якими реалізуються проапоптотичні та антипроліферативні ефекти, залишаються майже не вивченими. **Мета.** Дослідити вплив різних концентрацій NAE *in vitro* на рівень експресії мРНК проапоптотичного білка Вах у позапухлинній тканині кори надниркових залоз.

Матеріали та методи. Дослідження проводили на зрізах позапухлинної тканини кори надниркових залоз хворих із гормонально неактивними пухлинами. Рівень експресії мРНК Вах оцінювали методом диференційної полімеразної ланцюгової реакції після зворотної транскрипції (ПЛР). **Результати.** Інкубація зрізів позапухлинної тканини кори надниркових залоз у присутності різних концентрацій NAE призводила до збільшення рівня мРНК проапоптотичного білка Вах. Найбільш суттєвий ефект спостерігали для концентрації 10^{-6} моль/л.

Висновок. N-ацилетаноламіни *in vitro* викликали підвищення рівня експресії Вах у позапухлинній тканині кори надниркових залоз, що дозволяє віднести NAE до проапоптотичних чинників. Проапоптотичні ефекти NAE реалізуються завдяки підвищенню експресії білка Вах.

Ключові слова: NAE, проапоптотичний білок Вах, позапухлинна тканина кори надниркових залоз.

Ендоканабіноїдна система бере участь у регуляції багатьох фізіологічних функцій, у тому

числі ендокринних. Основними ендоканабіноїдами сьогодні вважаються арахідоноїлетаноламін (анандамід) і 2-арахідоноїлгліцерол, проте багато N-ацилпохідних етаноламіну мають канабоміметичні властивості.

* 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: kovzun@newmail.ru

© О.С. Лукашеня, Н.І. Левчук, О.С. Микоша, О.І. Ковзун

Особливу зацікавленість викликало повідомлення групи дослідників на чолі з Di Marzo V. щодо пригнічення анандамідом проліферації клітин раку молочної залози людини [1]. У подальшому неодноразово з'являлися повідомлення про активацію ендоканабіноїдами апоптозу в різних пухлинних клітинах [2, 3].

Ефекти ендоканабіноїдів реалізуються головним чином шляхом лігандування з рецепторами двох типів: CB1 і CB2. Проте деякі похідні етаноламіну, що містять насичені ацили, не зв'язуються з рецепторами, а справляють свій вплив шляхом вбудовування в мембрани.

Досліджено вплив N-стеароїлетаноламіну (NSE) *in vitro* на апоптотичну фрагментацію ДНК у пухлинній і позапухлинній тканинах кори надниркових залоз людини [4]. Виявилось, що NSE посилював інтенсивність фрагментації ДНК лише в тканині гормонально неактивних пухлин. Водночас тканина гормонально активних пухлин, гіперплазована тканина (хвороба Іценка-Кушинга) та злоякісні пухлини кори надниркових залоз людини виявились нечутливими до дії NSE. Суміш NAE, яка містила здебільшого ненасичені ацили, посилювала інтенсивність фрагментації ДНК як у позапухлинній тканині, так і в тканині гормонально неактивних і гормонально активних пухлин кори надниркових залоз людини [5].

Важливим шляхом розвитку апоптотичного сигналу NAE може бути експресія проапоптотичного білка Вах, який, у свою чергу, здатен впливати на експресію білків-інгібіторів апоптозу IAP.

Метою роботи було вивчення дії NAE *in vitro* на рівень експресії мРНК проапоптотичного білка Вах у позапухлинній тканині кори надниркових залоз людини.

Матеріали та методи

Проведення експериментів узгоджено з комісією з питань біоетики Інституту. У роботі використовували тканину кори надниркових залоз, видалену у хворих із гормонально неактивними пухлинами. Зрізи тканини вагою 50-100 мг інкубували впродовж 3 годин за 37 °С в 1 мл буфера: 10 ммоль/л Na_2HPO_4 , 1 ммоль/л

NaH_2PO_4 , 130 ммоль/л NaCl , 1,27 ммоль/л MgSO_4 , 2 ммоль/л CaCl_2 , 20 ммоль/л HEPES (рН 7,4). Використовували солі кваліфікації о.с.ч. (Merck, Німеччина). До середовища інкубації додавали розчин в етанолі суміші N-ацилетаноламінів (кінцева концентрація 10^{-6} і 10^{-5} ммоль/л), отриману з рослинної сировини, яка на 85% складається з похідних ненасичених жирних кислот 18:1 ω_9 , 18:2 ω_6 , 18:3 ω_3 , 20:1 ω_9 , 22:1 ω_9 . У контрольні проби додавали відповідну кількість етанолу. Після інкубації з тканини виділяли РНК: зрізи тканини кори надниркових залоз після попередньої інкубації гомогенізували в 1 мл TRIzol LS (Invitrogen, США), гомогенат струшували з хлороформом, фази розділяли центрифугуванням (12000 g, 4 °С, 15 хв). РНК осаджували з водної фази ізопропанолом шляхом центрифугування (12000 g, 4 °С, 15 хв). Осад двічі промивали 75% етанолом (7500 g, 4 °С, 5 хв), підсушували та розчиняли у воді, вільній від рибонуклеаз. Розчин РНК прогрівали за 60 °С протягом 10 хв. Концентрацію РНК визначали на спектрофотометрі Nanodrop (США) із довжинами хвиль 260 нм і 280 нм. Цілісність виділеної РНК перевіряли методом електрофорузу на біочіпах у біоаналізаторі Agilent 2100 (Німеччина) за методикою фірми-виробника.

Реакцію зворотної транскрипції проводили (ампліфікатор GeneTech, Велика Британія) в реакційній суміші, що містила: стандартний буфер для ПЛР, 5 ммоль/л хлористого магнію, по 1 ммоль/л всіх dNTPs, інгібітор РНКаз (1 од/мкл), зворотну транскриптазу (2,5 од/мкл) (Sigma, США), суміш випадкових гексамерів (2,5 мкмоль/л) і 1 мкг екстрагованої РНК. Інкубацію проводили за таких умов: 22 °С – 10 хв, 42 °С – 15 хв, 99 °С – 5 хв, 4 °С – 5 хв.

Реакцію ПЛР проводили (ампліфікатор Techgene, Велика Британія) в суміші, що містила: стандартний буфер для ПЛР, 2 ммоль/л хлористого магнію, по 1 ммоль/л всіх dNTPs, 5 од/мкл Taq ДНК полімерази (Sigma, США), прямий і зворотний праймери до Вах (Sigma, США), по 0,2 мкмоль/л, 5 мкл кДНК, одержаної в результаті реакції зворотної транскрипції. Умови інкубації: 94 °С – 45 с, 53 °С – 45 с,

72 °С — 1,5 хв, потім температуру знижували до 4 °С. Кількість циклів — 30.

Продукти ПЛР аналізували в агарозному гелі (1,7%), який готували на ТАЕ-буфері, що містив: 40 ммоль/л трис-ацетат (рН 8,5), 2 ммоль/л ЕДТА. До гелю додавали етидій бромистий до концентрації 1 мкг/мл. Проби готували, змішуючи розчин проби з розчином бромфенолового синього та сахарози (0,025% і 45% відповідно) на ТАЕ-буфері. Загальний об'єм проби не перевищував 20 мкл. У роботі використовували маркери ДНК — 100-1000 пар основ. Тривалість електрофорезу складала 1 год, напруга — 100 мВ. Гелі візуалізували в транслюмінаторі, отримані зображення обробляли за допомогою програми Gel Pro Analyzer v. 4.0. Ефект NAE виражали у відсотках відносно контрольної проби.

Статистичний аналіз одержаних даних проводили за непараметричним U-тестом Вілкоксона-Манна-Уїтні. Вірогідними вважали результати за $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення

Перебіг апоптотичних процесів, що індуються NAE в тканині кори надниркових залоз, оцінювали за допомогою визначення експресії мРНК проапоптотичного білка Вах методом диференційної ПЛР після зворотної транскрипції. Як видно з **рисунка**, внесення до середовища інкубації NAE викликає вірогідні зміни в рівні експресії мРНК Вах в адренокортикоцитах людини. Рівень експресії мРНК Вах у присутності NAE (10^{-5} моль/л) збільшується відносно контролю на 41%. У концентрації 10^{-6} моль/л NAE істотніше впливає на експресію мРНК Вах, цей показник відносно контролю складає 155%.

Попереднім етапом нашої роботи з вивчення апоптотичних процесів у видаленій тканині надниркових залоз людини було визначення залежності ступеня фрагментації ДНК від дії NSE у різних типах тканин [4]. Починаючи з 3 год інкубації спостерігалась чітка фрагментація ДНК з утворенням низькомолекулярних фрагментів. Апоптотичні зміни в клітинах надниркових залоз, оцінювані за ступенем

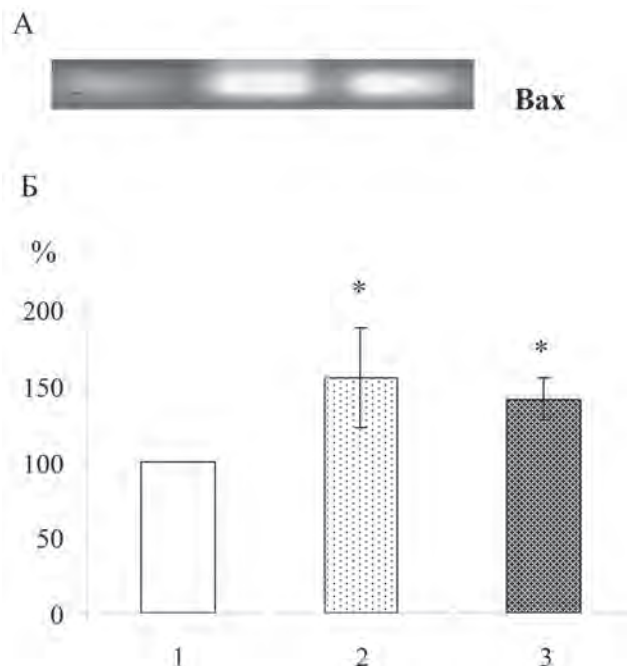


Рис. Вплив NAE на рівень експресії мРНК Вах у позапухлинній тканині кори надниркових залоз людини:

А — електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР із використанням праймерів до Вах (типіві результати одного дослідження з 4); Б — кількісна характеристика експресії мРНК; 1 — контроль; 2 — 10^{-6} моль/л; 3 — 10^{-5} моль/л; * — вірогідна різниця з контролем, $p \leq 0,05$, ($M \pm m$, $n=4$).

фрагментації ДНК, значною мірою залежали від типу тканини. N-стеароїлетаноламін здатен вибірково активувати апоптоз у тканині гормонально неактивних пухлин кори надниркових залоз людини [4].

Отже, внесення NAE до середовища інкубації викликає збільшення рівня експресії мРНК проапоптотичного чинника Вах в адренокортикоцитах людини. Поясненням цього може бути здатність NAE впливати не лише на специфічні метаболічні процеси, що ведуть до активації синтезу стероїдів, а й на інші ланки метаболізму в адренокортикоцитах.

За результатами вивчення апоптозу в корі надниркових залоз *in vivo* встановлено посилення апоптозу у гіпофізектомованих щурів, відзначене не раніше 12-24 годин після операції [6]. *In vitro*, за умов інкубації цілих надниркових залоз або їх часток апоптоз починався значно швидше, ніж після гіпофізектомії та був набагато інтенсивнішим. Додавання в інкубаційне середовище 100 нмоль/л кортикотропіну знижувало фрагментацію ДНК [6].

Ангіотензин II в подібних умовах активував процес апоптозу. Автори роблять акцент на антагонізмі АКТГ та ангіотензину II щодо регуляції швидкості апоптозу в надниркових залозах [7].

Окремі ланки сигнальних мереж, залучених до контролю апоптозу, представлено в більшості, якщо не в усіх, клітинах, хоча й у неактивних формах. Регулювання опосередкованого рецепторами апоптозу здійснюється на багатьох рівнях: за рахунок зміни кількості рецепторів смерті, синтезу інгібіторів активації каспаз, а також інгібіторів посткаспазного каскаду. Негативними регуляторами програмованої загибелі клітин є антиапоптотичні білки Bcl-2, Bcl-xl, позитивними — проапоптотичні протеїни Вах, Bad, Bid. Їх взаємодія визначає стабільність мембран мітохондрій і відіграє провідну роль у регулюванні апоптозу. Вихід у цитоплазму білків (насамперед цитохрому c), які в нормі присутні лише в мітохондріях, зумовлює незворотну втрату життєво важливих функцій клітини й активацію протеаз та ендонуклеаз.

Доведено дію синтетичних і природних каннабіноїдів на системи протеїнкіназ PI3K/Акт і MEK/ERK [3, 8], які репрезентують сигнальні ланцюги проліферативного спрямування. Ймовірно, через активацію в адренкортикальній тканині транскрипційних чинників, зокрема AP-1, що було показано в попередніх дослідженнях [9], ERK1/2 здатна додатково активувати клітинні процеси, спрямовані на виживання.

У клітинах раку простати ендоканнабіноїди активують апоптоз із залученням каспазного каскаду, зокрема каспази-3, знижують рівень антиапоптотичного білка Bcl-2 [10]. У клітинах PC12 анандамід здатний активувати також протеїнкіназу JNK і p38MAPK, з активацією яких зазвичай пов'язують індукцію апоптозу в клітині, з наступною активацією транскрипційних чинників c-fos і c-jun, що входять до складу транскрипційного чинника AP-1 [11].

Отже, ґрунтуючись на даних літератури та результатах власних досліджень, можна стверджувати, що вплив NAE на кору надниркових залоз є вельми складним і різнобічним. NAE

беруть участь у регуляції фізіологічної активності надниркових залоз. Отримані нами дані щодо впливу NAE на експресію проапоптотичного білка Вах та інтенсивність фрагментації ДНК [4] дозволяють віднести його до чинників, що регулюють також апоптотичні процеси в адренкортикоцитах.

Список використаної літератури

1. De Petrocellis L., Melck D., Palmisano A., Bisogno T., Laezza C., Bifulco M., Di Marzo V. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation // PNAS. — 1998. — Vol. 95, N14. — P. 8375-8380.
2. Biswas K.K., Sarker K.P., Abeyama K., Kawahara K., Iino S., Otsubo Y., Saigo K., Izumi H., Hashiguchi T., Yamakuchi M., Yamaji K., Endo R., Suzuki K., Imaizumi H., Maruyama I. Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis // Hepatology. — 2003. — Vol. 38, N5. — P. 1167-1177.
3. Giuliano M., Calvaruso G., Pellerito O., Portanova P., Carlisi D., Vento R., Tesoriere G. Anandamide-induced apoptosis in Chang liver cells involves ceramide and JNK/AP-1 pathway // Int. J. Mol. Med. — 2006. — Vol. 17, N5. — P. 811-819.
4. Левчук Н.І., Пушкарьов В.М., Ковзун О.І., Микоша О.С., Гула Н.М., Тронько М.Д. Вплив N-стеароїлетаноламіну на інтенсивність фрагментації ДНК у пухлинній та позапухлинній тканинах кори надниркових залоз людини // Укр. біохім. журн. — 2012. — Т. 84, № 4. — С. 49-53. (Levchuk N.I., Pushkarev V.M., Kovzun O.I., Mikosha A.S., Gula N.M., Tron'ko M.D. Effect of N-stearoyl ethanolamine on the DNA fragmentation intensity in tumour and extratumoral tissues of the human adrenal cortex // Ukr. Biochem. J. — 2012. — Vol. 84, N4. — P. 49-52).
5. Kostyuchenko N., Pushkarev V., Kashevarov G., Tron'ko M., Komissarenko I., Mikosha O. Effects of N-acyl ethanolamines and various antimetabolic agents on apoptotic DNA fragmentation in conventionally normal and tumor tissue of human adrenals // Exp. Oncol. — 2005. — Vol. 27, N3. — P. 215-219.
6. Carsia R.V., Macdonald G.J., Gibney J.A., Tilly K.I., Tilly J.L. Apoptotic cell death in the rat adrenal gland: an in vivo and in vitro investigation // Cell Tissue Res. — 1996. — Vol. 283, N2. — P. 247-254.
7. Carsia R.V., Nagele R.G., Morita Y., Tilly K.I., Tilly J.L. Models to elucidate the regulation of adrenal cell death // In: Proceedings of the VIII Adrenal Cortex Conference. Endocr. Res. — 1998. — Vol. 24, N3-4. — P. 899-908.
8. Kokona D., Thermos K. Synthetic and endogenous cannabinoids protect retinal neurons from AMPA excitotoxicity in vivo, via activation of CB1 receptors: Involvement of PI3K/Akt and MEK/ERK signaling pathways // Exp. Eye Res. — 2015. — Vol. 136. — P. 45-58.
9. Ковзун О.І., Лукашеня О.С., Горносталя О.А., Микоша О.С. Участь фактора транскрипції AP-1 у перенесенні регуляторного сигналу N-ацильованих похідних етаноламіну в адренкортикоцитах людини // Ендокринологія. — 2015. — Т. 20, № 1. — С. 396-400. (Kovzun O.I., Lukashenia O.S., Gornostal O.A., Mikosha A.S. The involvement of transcriptional factor AP-1 of the N-acyl ethanolamines signal transduction in the human adrenocorticoocytes // Endokrynologia. — 2015. — Vol. 20, N1. — P. 396-400).
10. Orellana-Serradell O., Poblete C.E., Sanchez C., Castellón E.A., Gallegos I., Huidobro C., Llanos M.N., Contreras H.R. Proapoptotic effect of endocannabinoids in prostate cancer cells // Oncol. Rep. — 2015. — Vol. 33, N4. — P. 1599-1608.
11. Sarker K.P., Biswas K.K., Yamakuchi M., Lee K.Y., Hashiguchi T., Kracht M., Kitajima I., Maruyama I. ASK1-p38 MAPK/JNK signaling cascade mediates anandamide-induced PC12 cell death // J. Neurochem. — 2003. — Vol. 85, N1. — P. 50-61.

(Надійшла до редакції 25.07.2016)

N-ацилированные производные этаноламина увеличивают экспрессию мРНК проапоптотического белка Bax в коре надпочечников человека

О.С. Лукашеня, Н.И. Левчук, А.С. Микоша,
Е.И. Ковзун

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

Резюме. N-ацилэтанолламины (NAE) — класс минорных липидов, которые по химической природе являются ацильными производными этаноламина. Показано, что NAE осуществляют широкий спектр биологических эффектов в организме: мембранопротекторный, антиоксидантный, антиаллергический, противовоспалительный, противовирусный, антибактериальный. Кроме того, в последние годы широко исследуется их участие в регуляции апоптоза и угнетении пролиферации опухолевых клеток различного генеза. Продемонстрировано также проапоптотическое влияние NAE на внеопухолевую ткань коры надпочечников человека. Однако механизмы реализации проапоптотических и антипролиферативных эффектов остаются практически не изученными. **Цель.** Исследовать влияние различных концентраций NAE *in vitro* на уровень экспрессии мРНК проапоптотического белка Bax во внеопухолевой ткани коры надпочечников. **Материалы и методы.** Исследования проводили на срезах внеопухолевой ткани коры надпочечников больных с гормонально неактивными опухолями. Уровень экспрессии мРНК Bax оценивали методом дифференциальной полимеразной цепной реакции после обратной транскрипции (ПЦР). **Результаты.** Инкубация срезов внеопухолевой ткани коры надпочечников в присутствии различных концентраций NAE приводила к увеличению уровня мРНК проапоптотического белка Bax. Наиболее существенный эффект наблюдали при концентрации 10^{-6} моль/л. **Вывод.** N-ацилэтанолламины *in vitro* вызывали повышение уровня экспрессии Bax во внеопухолевой ткани коры надпочечников, что позволяет отнести NAE к факторам проапоптотического направления. Проапоптотические эффекты NAE реализуются посредством повышения экспрессии белка Bax.

Ключевые слова: NAE, проапоптотический белок Bax, внеопухолевая ткань коры надпочечников.

N-acylated derivatives of ethanolamine increase mRNA expression of Bax proapoptotic protein in the human adrenal cortex

O.S. Lukashenia, N.I. Levchuk, O.S. Mikosha,
O.I. Kovzun

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

Abstract. N-acyletanolamines (NAE) is a class of minor lipids that, as to their chemical character, represent acyl derivatives of ethanolamine. It is well known that NAE have a variety of biological effects in the body such as: membrane protective, antioxidant, anti-allergic, anti-inflammatory, antiviral, antibacterial ones. In addition, their involvement in the regulation of apoptosis and inhibition of tumor cell proliferation of different genesis is being studied intensively in recent years. NAE proapoptotic effect on human extratumoral adrenal tissue was also demonstrated. However, the mechanisms through which the proapoptotic and antiproliferative effects are realized, remain almost unknown. **Aim.** The aim of this work is to investigate the effect of different NAE concentrations on the level of Bax proapoptotic protein mRNA expression in extratumoral tissue of the human adrenal cortex *in vitro*. **Materials and methods.** The study was carried out on sections of extratumor tissue of the adrenal glands with hormonally inactive tumors. The level of Bax mRNA expression was evaluated by differential polymerase chain reaction after reverse transcription (RT-PCR). **Results.** The incubation of extratumoral tissue slices of the adrenal cortex resulted in an increased level of mRNA proapoptotic protein in the presence of NAE. The most significant effect was observed when the NAE concentration was 10^{-6} mol/l. **Conclusion.** The increased level of Bax expression in extratumoral tissue of the adrenal cortex, which allows NAE to be attributed to the factors of proapoptotic direction, was induced by N-acyletanolamines *in vitro*. The findings of experiments show that **proapoptotic** effects of NAE can be realized through an increase in Bax expression.

Keywords: NAE, Bax proapoptotic protein, extratumoral tissue of the adrenal cortex.