

**Н. І. Левчук, О. І. Ковзун, М. Д. Тронько**

Державна установа “Інститут ендокринології та обміну речовин  
ім. В. П. Комісаренка НАМН України”, 04114 Київ

## **СТАТЕВІ ВІДМІННОСТІ ВПЛИВУ МЕТАНАНДАМІДУ *IN VITRO* НА ІНТЕНСИВНІСТЬ МІЖНУКЛЕОСОМНОЇ ФРАГМЕНТАЦІЇ ДНК В ПОЗАПУХЛИННІЙ ТКАНИНІ КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ ВІД ХВОРИХ ІЗ ГОРМОНАЛЬНО НЕАКТИВНИМИ ПУХЛИНАМИ**

Досліджували *in vitro* вплив різних концентрацій метанандаміду на інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК в позапухлинній тканині кори надниркових залоз від хворих жінок і чоловіків з гормонально неактивними пухлинами. Встановлена різна інтенсивність термінальної стадії апоптозної фрагментації ДНК у хворих різної статі. У позапухлинній тканині кори надниркових залоз жінок вміст фрагментів розміром 200 і 600 пар основ, а також сумарний вміст олігонуклеосом був вірогідно нижчим порівняно з позапухлинною тканиною кори надниркових залоз, отриманою від чоловіків. При дослідженні впливу метанандаміду на міжнуклеосомну фрагментацію ДНК в позапухлинній тканині також виявлений різний ефект сполуки залежно від статі. У позапухлинній тканині кори надниркових залоз чоловіків спостерігали зниження вмісту моно-, ди-, три- і сумарного вмісту олігонуклеосом при дії метанандаміду у концентрації  $10^{-7}$  і  $10^{-6}$  моль/л, а у жінок — підвищення вмісту фрагментів розміром 200-400 пар основ та загальний їх вміст при концентрації  $10^{-8}$  моль/л. Виявлена різниця може бути наслідком різного впливу статевих гормонів на процеси апоптозу.

**Ключові слова:** гормонально неактивні пухлини кори надниркових залоз, позапухлинна тканина кори надниркових залоз, міжнуклеосомна фрагментація ДНК, метанандамід.

До класу ендоканабіноїдів належать N-ацилетаноламіни (NAE) — група біологічно активних сполук ліпідної природи, які за хімічною структурою є ацильними похідними етаноламіну. NAE характеризуються чисельними біологічними властивостями та проявляють широкий спектр фармакологічних ефектів в організмі: вони мають антиалергічні, антибактеріальні, протизапальні, антивірусні властивості [11]. Крім того, показано, що ці сполуки здатні гальмувати проліферацію ракових клітин, ріст пухлин, неоангіогенез, процес метастазування та брати участь в регуляції апоптозу [16]. NAE опосередковують свій ефект шляхом зв'язування з канабіноїдними ( $CB_1$  і  $CB_2$ ) [13, 15], ванілоїдними (TRPV1) рецепторами [10], а також рецепторами, що активують проліферацію пероксисом — PPAR

[17]. Крім активації специфічних рецепторів дія NAE залежить також від прямої їх взаємодії з холестерином плазматичної мембрани [2, 7]. Встановлено, що реалізація антипроліферативної активності та проапоптозних ефектів окремих представників NAE відрізняється та залежить від типу клітини [8, 9, 12, 18]. Проте внутрішньоклітинні сигнальні механізми, які опосередковують біологічні ефекти цих речовин, залишаються далекими від повного розуміння.

Раніше нами було показано, що метанандамід, який є метаболічно стійким похідним ендоканабіноїда анандаміду — першого з відомих NAE, проявляє *in vitro* різноспрямовану дію щодо апоптозної фрагментації ДНК у тканині надниркових залоз щурів різної статі [4].

М. Д. Тронько — директор інституту, керівник відділу фундаментальних і прикладних проблем ендокринології, акад. НАМН України

Лабораторія гормональної регуляції обміну речовин

О. І. Ковзун — заступник директора інституту з наукової роботи, зав. лабораторії, д.б.н.

Н. І. Левчук — с.н.с., к.б.н. (levnataly@meta.ua)

© Н. І. Левчук, О. І. Ковзун, М. Д. Тронько, 2014.

Метою роботи було проаналізувати вплив метанандаміду на інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК в позапухлинній тканині кори надниркових залоз, отриманої при оперативному втручанні від хворих жінок і чоловіків з гормонально неактивними пухлинами цих залоз.

**Матеріал і методи.** Експерименти виконані *in vitro* на матеріалі, що був отриманий під час операцій на надниркових залозах хворих, які лікувалися у хірургічному відділенні нашого інституту. На проведення досліджень було одержано дозвіл від комісії Інституту з питань біоетики.

Надниркові залози після видалення переносили на лід, відділяли позапухлинну тканину від тканини пухлини, очищали від сполучної, жирової тканини та мозкового шару. Наважку зрізів позапухлинної тканини (200 мг) інкубували при 37 °С в буфері, який містив 10 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1 ммоль/л  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 130 ммоль/л  $\text{NaCl}$ , 1,27 ммоль/л  $\text{MgSO}_4$ , 2 ммоль/л  $\text{CaCl}_2$ , 20 ммоль/л *HEPES* (рН 7,4), 2 мг/мл БСА. До середовища інкубації додавали спиртовий розчин *R*(+)-метанандаміду (*Sigma*, США) в кінцевій концентрації  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  моль/л. В контрольні проби додавали етиловий спирт, концентрація якого не перевищувала 1 %. Тривалість інкубації становила 3 год.

Виділення ДНК та умови проведення електрофорезу в агарозному гелі описані в роботі [14]. Після електрофорезу гелі фотографували цифровою відеокамерою в транслюмінаторі та сканували за допомогою програми "Gel Pro Analyzer". Розрахунок вмісту олігонуклеосом різного розміру в позапухлинній тканині проводили як описано в попередній роботі [4].

Статистичну обробку даних проводили з використанням непараметричного *U*-критерію Вілкоксона — Манна — Уїтні.

**Результати та їх обговорення.** Результати проведених експериментів свідчать про різний базальний рівень олігонуклеосом, які утворилися при міжнуклеосомній фрагментації ДНК, виділеної з позапухлинної тканини кори надниркових залоз чоловіків і жінок (таблиця). Так, загальний вміст 200-800 пар основ (п. о.) у жінок є вірогідно нижчим порівняно із тканиною, отриманою від чоловіків. Нижчим також є вміст фрагментів 200 і 600 п. о. (див. табл.). Різний вміст олігонуклеосом нами було відзначено також при аналізі ДНК, яка була виділена з адренкортикальної тканини самців і самиць щурів [4]. При цьому у самиць щурів спостерігали вищий рівень олігонуклеосом розміром 400, 600, 800 п.о. та загального їх вмісту порівняно з адренкортикальною тканиною самців. У той же час, вміст 200 п. о. був менший, що співпадає із таким у жінок.

**Вплив різних концентрацій метанандаміду на інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК у позапухлинній тканині від хворих з гормонально неактивними пухлинами кори надниркових залоз *in vitro*, %**

Розмір фрагментів ДНК, п. о.	Конт- роль	Метанандамід, моль/л		
		$10^{-8}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$
Чоловіки (n = 3)				
200	19,2 (17,1–20,8)	19,8 (19,0–21,2)	9,00* (3,3–14,1)	8,01* (3,2–12,4)
400	22,5 (19,6–26,2)	21,8 (16,4–27,6)	13,0* (8,80–18,4)	12,6* (8,6–17,4)
600	19,7 (17,9–22,9)	18,0 (13,9–23,0)	13,0* (11,8–14,6)	13,6* (11,9–15,4)
800	15,3 (13,2–17,4)	15,9 (12,6–21,8)	14,0 (13,1–15,9)	14,6 (11,7–18,1)
Σ 200-800	76,7 (72,0–83,5)	75,5 (61,9–91,4)	49,0* (39,8–60,6)	48,8* (43,4–59,2)
Жінки (n = 3)				
200	12,2* (7,1–17,0)	20,6* (18,9–23,5)	20,8 (9,13–28,6)	15,8 (7,11–22,1)
400	16,6 (12,4–22,1)	25,2* (23,5–27,5)	23,5 (16,6–28,1)	21,2 (17,6–23,1)
600	15,3* (13,9–17,3)	21,4 (17,0–27,1)	18,6 (16,9–19,5)	17,6 (16,9–18,6)
800	14,2 (12,7–16,5)	14,3 (11,5–17,1)	15,4 (8,39–22,1)	15,5 (14,7–16,0)
Σ 200-800	58,3* (50,6–69,0)	81,5* (76,6–87,7)	78,3 (67,3–85,6)	70,1 (57,3–79,8)

*Примітки:* наведені середні арифметичні та межі коливальності. \* —  $P = 0,05$  — порівняно з контрольною пробєю без метанандаміду; # —  $P = 0,05$  — порівняно з вмістом олігонуклеосом у позапухлинній тканині від хворих чоловіків з гормонально неактивними пухлинами кори надниркових залоз.

Отже, механізми міжнуклеосомної фрагментації ДНК у особин різної статі відрізняються, про що свідчить різна спрямованість змін вмісту більших за розміром фрагментів ДНК, що може бути пов'язано із різним впливом статевих гормонів на різні стадії апоптозної фрагментації ДНК. Дані літератури щодо статевих відмінностей відсутні, проте у досліджах *in vitro* показано, що  $17\beta$ -естрадіол у позапухлинній тканині надниркових залоз хворих з пухлинами цих залоз пригнічує інтенсивність фрагментації ДНК та знижує рівень мРНК проапоптозного білка Вах, тобто виявляє антиапоптозний ефект [6]. Ці результати співзвучні з отриманими нами щодо нижчої інтенсивності фрагментації ДНК у жінок порівняно з чоловіками.

Звертає на себе увагу різний характер фрагментації ДНК в адренкортикальній тканині щурів та позапухлинній тканині у хворих. На нашу думку, можливо, це пов'язано зі змінами метаболізму в тканині, яка оточує пухлину. Біохімічні відмінності між нормальною і позапухлинною тканиною встановлено і іншими дослідниками за наявності

пухлини різної локалізації [1-3]. Так, вивчення ліпідного складу легень інтактних тварин і умовно нормальної легеневої тканини, що межує з метастазами, у мишей з карциномою Льюїс показало, що вміст фосфоліпідів у цих тканинах істотно відрізняється: в легеневій тканині, що межує з метастазами за умов пухлинного росту спостерігається зниження вмісту фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну, фосфатидилсерину та підвищення вмісту фосфатидилінозиту та лізофосфатидилхоліну. Також відзначено підвищення концентрації ТБК-реагуючих продуктів та зменшення активності каталази в цій тканині порівняно з відповідними показниками для тканини легень інтактних тварин [2]. Виявлена підвищена активність лактатдегідрогенази (ключового ферменту метаболізму вуглеводів) не тільки у тканині слизової оболонки шлунка, що оточує пухлину, але і у віддалених регіонах органа [1]. У тканині щитоподібної залози за наявності карциноми встановлено підвищення рівня фрагментованої ДНК у порівнянні з такою у позавузловій тканині щитоподібної залози при вузловому еутиреоїдному зобі [3].

Результати проведених досліджень показали, що інкубація зрізів позапухлинної тканини кори надниркових залоз від хворих чоловіків з метанандамідом у концентрації  $10^{-8}$  моль/л не впливала на вміст фрагментів ДНК різного розміру, а в концентрації  $10^{-7}$ - $10^{-6}$  моль/л призводила до вірогідного зниження вмісту моно-, ди-, три- і сумарного вмісту олігонуклеосом (див. табл.), що загал свідчить про гальмування термінальної стадії апоптоза. Необхідно відзначити, що зниження вмісту мононуклеотидів нами було зареєстровано і при вивченні ефектів метанандаміду в адренортикальній тканині самців щурів. Отже, позапухлинна тканина, отримана від хворих чоловіків, виявилася чутливішою до дії вищих концентрацій

метанандаміду у порівнянні з інтактною адренортикальною тканиною щурів [4].

На відміну від чоловіків у позапухлинній тканині кори надниркових залоз від хворих жінок метанандамід призводив до підвищення інтенсивності фрагментації ДНК, однак лише при застосуванні найнижчої з досліджених концентрацій —  $10^{-8}$  моль/л (див. табл.). Ці зміни були вірогідними для моно-, динуклеотидів та сумарного їх вмісту. У надниркових залозах самиць щурів спостерігається дещо інша картина: під впливом метанандаміду загальний вміст фрагментів та вміст 400, 600, 800 п. о. зменшувався при застосуванні високої концентрації метанандаміду. У той же час, кількість мононуклеосом зростала, а вміст 400 п. о. знижувався при концентрації  $10^{-8}$ - $10^{-7}$  моль/л [4]. Отже, і у жінок, і у самиць щурів спостерігається однотиповий напрямок змін вмісту лише фрагментів 200 п. о. Відрізняється також ефект різних концентрацій метанандаміду.

Результати проведених досліджень впливу метанандаміду на фрагментацію ДНК у позапухлинній тканині чоловіків і жінок також можуть вказувати на роль статевих гормонів у реалізації апоптозної загибелі клітин. При обговоренні можливого механізму впливу метанандаміду слід зазначити, що важливими при реалізації його дії є взаємодія з холестерином плазматичної мембрани. Як показали наші дослідження, під дією метанандаміду рівень загального холестерину в адренортикальній тканині щурів-самців знижується, а у самиць підвищується [5]. Отже, в цій роботі можна відзначити односпрямованість змін рівня загального холестерину та фрагментації ДНК: у самців спостерігали зниження, у самиць — підвищення зазначених параметрів.

Таким чином, дозозалежний ефект метанандаміду в позапухлинній тканині від хворих з гормонально неактивними пухлинами кори надниркових залоз залежить від статі хворих.

### Список використаної літератури

1. Бакурова Е. М., Соколовская Л. В., Никонова А. А. та ін. Особенности метаболизма углеводов в процессах регулируемой и нерегулируемой пролиферации в слизистой оболочке желудка // Укр. біохім. журн. — 2002. — 74, № 4а (додаток 1). — С. 22.
2. Гула Н. М., Хмель Т. О., Клімашевський В. М. Вплив N-стеароїлетаноламіну на ліпідний склад метастазів та умовно нормальної тканини легень у мишей з карциномою Льюїс // Укр. біохім. журн. — 2006. — 78, № 2. — С. 97-105.
3. Комаревцева Е. В. Детекция апоптоза в узловых зобах щитовидной железы // Укр. мед. альманах. — 2006. — 7, № 3. — С. 168-170.
4. Левчук Н. І. Вплив різних концентрацій метанандаміду на інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК в адренортикоцитах щурів *in vitro* // Ендокринологія. — 2013. — 18, № 2. — С. 60-64.
5. Левчук Н. І., Калініченко О. В. Вплив метанандаміду на вміст загального холестерину в адренортикоцитах щурів *in vitro* // Укр. біофармацевт. журн. — 2013. — № 4. — С. 25.
6. Тронько М. Д., Ковзун О. І., Грінченко Є. М., Микоша О. С. Вплив  $17\beta$ -естрадіолу на експресію мРНК проапоптичного протеїну Вах і рівень фрагментації ДНК у корі надниркових залоз людини // Укр. біохім. журн. — 2009. — 81, № 2. — С. 80-84.
7. Biswas K. K., Sarker K. P., Abeyama K. et al. Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis // Hepatology. — 2003. — 38, № 5. — P. 1167-1177.

8. Caffarel M. M., Sarrío D., Palacios J. et al.  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol inhibits cell cycle progression in human breast cancer cells through Cdc2 regulation // *Cancer Res.* — 2006. — **66**, № 13. — P. 6615-6621.
9. 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**, № 13. — P. 6748-6755.
10. Davies J. W., Hainsworth A. H., Guerin C. J., Lambert D. G. Pharmacology of capsaicin-, anandamide-, and N-arachidonoyl-dopamine-evoked cell death in a homogeneous transient receptor potential vanilloid subtype 1 receptor population // *Br. J. Anaesth.* — 2010. — **104**, № 5. — P. 596-602.
11. Grotenhermen F. Pharmacology of cannabinoids // *Neuro. Endocrinol. Lett.* — 2004. — **25**, № 1-2. — P. 14-23.
12. 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**. — P. 1612-1620.
13. Herrera B., Carracedo A., Diez-Zaera M. et al. p38 MARK is involved in CB2 receptor-induced apoptosis of human leukaemia cells // *FEBS Lett.* — 2005. — **579**, № 22. — P. 5084-5088.
14. 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**, № 3. — P. 215-219.
15. Liao Y. S., Wu J., Wang P., Zhang H. Anandamide inhibits the growth of colorectal cancer cells through CB1 and lipid rafts // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi [Chinese journal of oncology]*. — 2011. — **33**, № 4. — P. 256-259.
16. Pushkarev V. M., Kovzun O. I., Tronko M. D. Antineoplastic and apoptotic effects of cannabinoids. N-acylethanolamines: protectors or killers? // *Exp. Oncol.* — 2008. — **30**, № 1. — P. 6-21.
17. Ramer R., Heinemann K., Merkord J. COX-2 and PPAR-confer cannabidiol-induced apoptosis of human lung cancer cells // *Mol. Cancer Ther.* — 2012. — **12**, № 1. — P. 69-82.
18. 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**, № 5. — P. 1635-1641.

Одержано 21.02.2014

## ПОЛОВЫЕ РАЗЛИЧИЯ ВЛИЯНИЯ МЕТАНАНДАМИДА *IN VITRO* НА ИНТЕНСИВНОСТЬ МЕЖНУКЛЕОСОМНОЇ ФРАГМЕНТАЦІЇ ДНК ВО ВНЕОПУХОЛЕВОЇ ТКАНИ КОРЫ НАДПОЧЕЧНИКОВ ОТ БОЛЬНЫХ С ГОРМОНАЛЬНО НЕАКТИВНЫМИ ОПУХОЛЯМИ

Н. И. Левчук, Е. И. Ковзун, Н. Д. Тронько

Государственное учреждение “Институт эндокринологии и обмена веществ  
им. В. П. Комиссаренко НАМН Украины”, 04114 Киев

Исследовали *in vitro* влияние различных концентраций метанандамида на интенсивность межнуклеосомной фрагментации ДНК во внеопухолевой ткани коры надпочечников от больных женщин и мужчин с гормонально неактивными опухолями. Установлена разная интенсивность терминальной стадии апоптозной фрагментации ДНК у больных разного пола. Во внеопухолевой ткани коры надпочечников женщин содержание фрагментов размером 200 и 600 пар оснований, а также суммарное содержание олигонуклеосом было достоверно ниже по сравнению с внеопухолевой тканью коры надпочечников, полученной от мужчин. При исследовании влияния метанандамида на межнуклеосомную фрагментацию ДНК во внеопухолевой ткани также обнаружен разный эффект в зависимости от пола. Во внеопухолевой ткани коры надпочечников мужчин наблюдали снижение содержания моно-, ди-, три- и суммарного содержания олигонуклеосом при действии метанандамида в концентрации  $10^{-7}$  и  $10^{-6}$  моль/л, а у женщин — повышение содержания фрагментов размером 200-400 пар оснований и общее их содержание при концентрации  $10^{-8}$  моль/л. Выявленная разница может быть следствием различного влияния половых гормонов на процессы апоптоза.

**GENDER DIFFERENCES OF METHANANDAMIDE EFFECT *IN VITRO*  
ON INTENSITY OF INTERNUCLEOSOME DNA FRAGMENTATION  
IN EXTRATUMOR ADRENAL CORTEX TISSUE FROM PATIENTS  
WITH HORMONALLY INACTIVE TUMOURS**

**N. I. Levchuk, O. I. Kovzun, M. D. Tronko**

State Institution "V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, NAMS Ukraine",  
04114 Kyiv

The *in vitro* effect of various methanandamide concentrations on intensity of internucleosome DNA fragmentation in the extratumor adrenal cortex tissue from male and female patients with hormonally inactive tumors was studied. A varying intensity of the end-stage of apoptotic DNA fragmentation in patients of different gender was revealed. The content of fragments with the size of 200 and 600 pair base, and also the total content of oligonucleosomes were significantly lower in the extratumor adrenal tissue of women compared to that obtained from men. A varying effect of the compound depending on gender was also revealed in the studies of methanandamide effect on internucleosome DNA fragmentation in the extratumor adrenal tissue. A decrease in the content of mono-, di-, tri- and total content of nucleosomes as a result of effect of methanandamide ( $10^{-7}$  and  $10^{-6}$  mol/l) was observed in the extratumor adrenal tissue of men, and an increase in the content of fragments with the size of 200-600 pair base and their total content at  $10^{-8}$  mol/l was noted in women. The revealed difference may result from varying effects of sex hormones on the processes of apoptosis.