

Вплив метанандаміду на рівень експресії мітоген-активованої протеїнкінази р38 у тканині надниркових залоз щурів

Н.І. Левчук,
О.І. Ковзун,
О.С. Микоша

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

Резюме. Мета — дослідити вплив різних концентрацій метанандаміду *in vitro* на рівень експресії мітоген-активованої протеїнкінази р38 (р38МАРК) у тканині надниркових залоз щурів. **Матеріали та методи.** Матеріалом для досліджень слугувала тканина надниркових залоз статевозрілих самиць щурів лінії Вістар. Детекцію р38МАРК проводили імуноблот-аналізом із використанням моноклональних антитіл. **Результати.** Встановлено, що метанандамід підвищував рівень експресії р38МАРК лише в концентрації 10^{-8} моль/л. **Висновок.** Метанандамід за умов низьких концентрацій (коли він активує апоптоз у клітинах кори надниркових залоз самиць щурів) може справляти цей ефект через залучення р38МАРК.

Ключові слова: метанандамід, р38МАРК, надниркові залози.

Ендоканабіноїди давно привернули увагу дослідників-ендокринологів, але основні роботи присвячено центральним механізмам регуляції ендокринних функцій.

Раніше нами було показано, що метанандамід, який є метаболічно стійким похідним ендогенного канабіноїду анандаміду та зберігає його біологічні властивості як в адренкортикоцитах інтактних самиць щурів, так і в позапухлинній тканині від хворих жінок із гормонально неактивними пухлинами кори

надниркових залоз, може підвищувати інтенсивність фрагментації ДНК *in vitro* [1, 2]. Проте внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, які опосередковують проапоптозні ефекти метанандаміду в адренкортикальній тканині, залишаються майже не дослідженими.

Отримані *in vitro* дані свідчать, що реалізація проапоптозних ефектів ендоканабіноїдів у переважній більшості випадків опосередковується через активацію р38МАРК. Це фермент, який належить до родини серин/треонінових протеїнкіназ, що активується мітогенами та залучений до багатьох сигнальних механізмів, які регулюють процеси

* 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

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

проліферації, диференціації та апоптозу [3, 4]. Порушення її функції призводить до розвитку запальних процесів [5] і виникнення низки захворювань [6], у тому числі й канцерогенезу [7]. Натомість участь цієї кінази в опосередкуванні ефектів ендоканабіноїдів, зокрема метанандаміду, в адренкортикальній тканині залишається недослідженою.

З огляду на вищезазначене метою роботи було дослідження впливу метанандаміду *in vitro* на рівень експресії p38MAPK в адренкортикоцитах самиць щурів.

Матеріали та методи

Досліди проведено на статевозрілих щурах-самицях лінії Вістар масою 180-220 г, які перебували в стандартних умовах віварію ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України». Усі експерименти та евтаназію тварин здійснювали згідно з положеннями «Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом із біоетики (Київ, 2001).

Після декапітації тварин надниркові залози видаляли, переносили на лід, очищали від сполучної та жирової тканини, готували зрізи тканини (завтовшки ~0,5 мм) та інкубували їх на водяній бані за 37 °С упродовж 3 год із постійним струшуванням в 1 мл живильного середовища RPMI-1640 (20 ммоль/л NEPES і L-glutamine, Sigma, США), що містило 5% бичачої сироватки (Sigma, США). У дослідні проби перед початком інкубації вносили спиртовий розчин R-(+)-метанандаміду (Sigma, США) до кінцевих концентрацій 10⁻⁸ моль/л, 10⁻⁷ моль/л і 10⁻⁶ моль/л. Контрольні проби містили розчинник у відповідній концентрації.

Після закінчення інкубації зрізи тканини гомогенізували в скляному гомогенізаторі з додаванням охолодженого лізис-буфера (Sigma, США) (1:3 – вага:об'єм), що містив суміш інгібіторів протеаз і фосфатаз для збереження інтактності та активності білків. Отриманий гомогенат тканини центрифугували за 24100 g упродовж 10 хв. Супернатант відбирали та заморожували за мінус 60 °С для подальшого аналізу.

Вміст загального білка в лізатах (мкг/мкл) визначали спектрофотометрично за методом Бредфорда [8]. Розділення суміші білків у поліакриламідному гелі в присутності додецилсульфату натрію проводили за методом Леммлі [9]. Для визначення рівня експресії p38MAPK використовували метод Вестерн-блотинг. Детальний опис даних методик наведено в нашій попередній статті [10].

У ході Вестерн-блотингу використовували первинні моноклональні антитіла до p38MAPK (1:1000, Sigma, США) та вторинні антикролячі антитіла, сполучені з пероксидазою хрому (1:2000, Sigma, США). З метою додаткового контролю рівномірності нанесення білка після їх перенесення на нітроцелюлозну мембрану щоразу їх забарвлювали барвником Понсо С (Reanal, Угорщина). Денситометричний аналіз інтенсивності смуг проводили з використанням комп'ютерної програми GelPro Analyzer v. 4.0. Отримані дані виражали в умовних одиницях.

Статистичний аналіз отриманих даних проводили за непараметричним U-тестом Вілкоксона – Манна – Уїтні. Критичний рівень значущості приймали за 0,05.

Результати та їх обговорення

Інкубація зрізів тканини надниркових залоз самиць щурів продовж трьох годин із метанандамідом у концентрації 10⁻⁸ моль/л виявляла статистично значуще посилення рівня експресії p38MAPK (на 44%), тоді як у концентраціях 10⁻⁷-10⁻⁶ моль/л сполука не викликала вірогідних змін кількості цієї кінази (**рис.**). У попередній роботі з дослідження міжнуклеосомної фрагментації ДНК у самиць кількість мононуклеосом зростала за концентрації 10⁻⁸-10⁻⁷ моль/л метанандаміду та залишалася незмінною за концентрації 10⁻⁶ моль/л. Причому суттєвіший ефект препарат справляв у концентрації 10⁻⁸ моль/л [1]. У позапухлинній тканині, отриманій від хворих жінок із гормонально неактивними пухлинами, підвищення вмісту фрагментів ДНК 200-400 пар основ і загального їх вмісту відзначено також за умов найнижчої концентрації сполуки [2]. Отже, отримані дані свідчать про індукцію апоптозу в адренкортикальній тканині самиць щурів лише за найнижчої з досліджених концентрацій метанандаміду.

Оригінальні дослідження

У літературі існують дані щодо участі р38МАРК в опосередкуванні апоптозу, який індукується ендоканабіноїдами в клітинах різного типу *in vitro*. Важливо відзначити, що активацію р38МАРК у переважній більшості випадків виявлено в клітинах, які характеризуються наявністю СВ₁-рецепторів. Так, показано, що анандамід і 2-арахідоноїлгліцерол у гіпокампі щурів і мишей впливали на фосфорилування р38МАРК через активацію СВ₁-рецепторів [11]. Індуковану анандамідом клітинну смерть у децидуальних клітинах щурів також було пов'язано із СВ₁-рецепторами з подальшою активацією р38МАРК, продукцією кераміду *de novo* та ROS [12].

Враховуючи дані літератури та власні результати, можна припустити, що стимульована метанандамідом активація р38МАРК в адренкортикальній тканині може опосередковуватися через СВ₁-рецептори, експресію яких було виявлено в клітинах надниркових залоз людини [13]. З іншого боку, встановлено, що ендоканабіноїди проявляють високу мембранотропну активність, легко вбудовуються в мембранні структури, де можуть справляти безпосередню дію, що не опосередковується рецепторами. Такий позарецепторний ефект відомий навіть для анандаміду [14]. Встановлено, що стимульована анандамідом активність р38МАРК у гепатоцитах не залежить від активації канабіноїдних рецепторів, а зале-

жить від вмісту холестерину в мембрані. Авторами висловлено припущення, що холестерин мембрани може функціонувати як своєрідний ліганд для анандаміду [14]. Раніше нами було показано, що метанандамід *in vitro* підвищує рівень загального холестерину в тканині надниркових залоз самиць щурів, проте це збільшення було виявлено лише за концентрацій 10^{-7} - 10^{-6} моль/л [15]. Тому з'ясування механізмів активації р38МАРК, що індукуються метанандамідом у тканині надниркових залоз самиць щурів, вимагає подальших досліджень.

Висновок

Ґрунтуючись на отриманих результатах і попередніх даних, можна стверджувати, що метанандамід у низьких концентраціях справляє проапоптозний вплив на клітини кори надниркових залоз самиць щурів, який може бути опосередкований через залучення р38МАРК.

Список використаної літератури

1. Левчук Н.І. Вплив різних концентрацій метанандаміду на інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК в адренкортикоцитах щурів *in vitro*. Ендокринологія. 2013;22(4):60-4. (Levchuk N.I. Effect of different methanandamide concentrations on the intensity of internucleosomal DNA fragmentation in adrenocorticoocytes of rats *in vitro*. Endocrinologia. 2013;22(4):60-4).
2. Левчук Н.І. Ковзун О.І., Тронько М.Д. Статеві відмінності впливу метанандаміду *in vitro* на інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК в позапухлинній тканині кори надниркових залоз від хворих з гормонально неактивними пухлинами. Журн. НАМН України. 2014;20(2):252-6. (Levchuk N.I., Kovzun O.I., Tronko M.D. Gender differences of methanandamide effects *in vitro* on intensity of internucleosome DNA fragmentation in extratumor adrenal cortex tissue from patients with hormonally inactive tumours. Zhurn. NAMN Ukrainy. 2014;20(2):252-6).
3. Osaki L.H, Gama P. MAPKs and signal transduction in the control of gastrointestinal epithelial cell proliferation and differentiation. Int. J. Mol. Sci. 2013 May;14(5):10143-61.
4. Lenassi M., Plemenitas A. The role of p38 MAP kinase in cancer cell apoptosis. Radiol. Oncol. 2006;40(1):51-6.
5. Соловьева И.А., Демко И.В., Собко Е.А., Крапошина А.Ю., Чубарова С.В., Салмина А.Б. Роль р38 MAPK в развитии иммунного воспаления. Бюллетень. 2013;49:105-14. (L.A. Solv'eva, I.V. Demko, E.A. Sobko, A. Yu. Kraposhina, S.V. Chubarova, A.B. Salmina. The role of p38 MARK in the development of immune inflammation. Buluten' 2013;49:105-14).
6. Fadaka A.O., Ojo O.A., Osukoya O.A., Akuboh O., Ajiboye B.O. Role of p38 MAPK Signaling in Neurodegenerative Diseases: A Mechanistic Perspective. Ann Neurodegener. Dis. 2017 Dec;2(1):1026.
7. Song W.J., Dong Y., Luo C., Chen Y.Y. p38MAPK family isoform p38 α and activating transcription factor 2 are associated with the malignant phenotypes and poor prognosis of patients with ovarian adenocarcinoma. Pathol. Res. Pract. 2017 Oct;213(10):1282-8.
8. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976 May;72:248-54.
9. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970 Aug;227(5259):680-5.

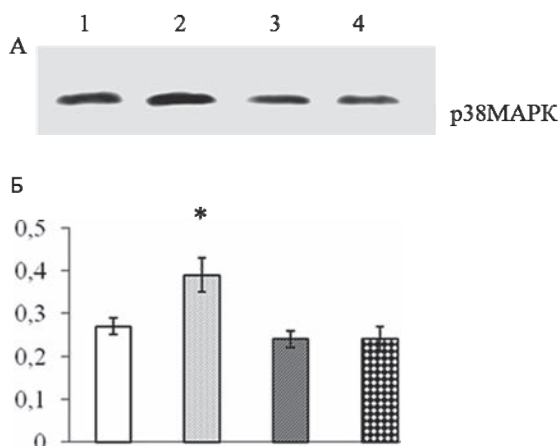


Рис. Вплив різних концентрацій метанандаміду на рівень експресії р38МАРКу тканині надниркових залоз самиць щурів: А — електрофореграма (1 — контроль, 2 — 10^{-8} , 3 — 10^{-7} , 4 — 10^{-6} моль/л метанандаміду); Б — кількісна оцінка рівня експресії р38МАРК в ум. од. * — вірогідна різниця з контрольною пробєю без метанандаміду ($p=0,05$). На рисунку наведено результат типового досліду з трьох.

10. Левчук Н.І., Лукашеня О.С., Микоша О.С., Ковзун О.І. Статеві відмінності експресії ERK в надниркових залозах щурів. Ендокринологія. 2015;20(4):706-9. (Levchuk N.I., Lukashenia O.S., Mikosha O.S., Kovzun O.I. Sex differences of expression ERK in rat adrenal gland. *Endocrinologia*. 2015;20(4):706-9).
11. Derkinderen P., Ledent C., Parmentier M., Girault J.A. Cannabinoids activate p38 mitogen-activated protein kinases through CB1 receptors in hippocampus. *J. Neurochem*. 2001 May;77(3):957-60.
12. Fonseca V.M., Correia-da-Silva G., Teixeira N.A. The endocannabinoid anandamide induces apoptosis of rat decidual cells through a mechanism involving ceramide synthesis and p38 MAPK activation. *Apoptosis*. 2013 Dec;18(12):1526-35.
13. 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 Feb;42(2):88-92.
14. 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 Nov;38(5):1167-77.
15. Левчук Н.І., Калініченко О.В., Ковзун О.І., Микоша О.С. Зміни рівня холестерину в надниркових залозах щурів, викликані метанандамідом, залежні від статевих гормонів. Ендокринологія. 2015;20(2):506-9. (Levchuk N.I., Kalinichenko O.V., Kovzun O.I., Mikosha O.S. Changes in cholesterol levels of rat adrenals, induced by methanandamide, depending on sex hormones *Endocrinologia*. 2015;20(2):506-9).

(Надійшла до редакції 02.07.2018 р.)

Влияние метанандамида на уровень экспрессии митоген-активируемой протеинкиназы p38 в ткани надпочечников крыс

Н.И. Левчук, Е.И. Ковзун, А.С. Микоша

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

Резюме. Цель — исследовать влияние различных концентраций метанандамида *in vitro* на уровень экспрессии мито-

ген-активированной протеинкиназы p38 (p38MAPK) в ткани надпочечников крыс. **Материалы и методы.** Материалом для исследований служила ткань надпочечников половозрелых самок крыс линии Вистар. Детекцию p38MAPK проводили иммуноблот-анализом с использованием моноклональных антител.

Результаты. Установлено, что метанандамид повышает уровень экспрессии p38MAPK лишь при концентрации 10^{-8} моль/л.

Вывод. Метанандамид в низких концентрациях (в которых он активирует апоптоз в клетках коры надпочечников самок крыс) может осуществлять этот эффект через привлечение p38MAPK.

Ключевые слова: метанандамид, p38MAPK, надпочечники.

Effect of methanandamide on expression level of mitogen-activated protein kinase p38 in the tissue of adrenal gland rats

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

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

Abstract. The aim — the effect of various concentrations of methanandamide *in vitro* on the expression level of mitogen-activated protein kinase p38 (p38MAPK) in the adrenal tissue of rats was studied. **Materials and methods.** The material for examination was the tissue of the adrenal glands of matured male female rats in the Wistar line. The detection of p38MAPK was performed by immunoblotting assay using monoclonal antibodies. **Results.** It was found that the level of p38MAPK expression was only increased at methanandamide concentration of 10^{-8} mol/l. **Conclusion.** Methanandamide under low concentrations (when apoptosis is activated in the cells of the adrenal cortex in female rats) can effect through the involvement of p38MAPK.

Keywords: methanandamide, p38MAPK, adrenal glands.