



УДК 612.453.015

© 2010

**Н. І. Левчук, В. М. Пушкарьов,**  
член-кореспондент НАН України **М. Д. Тронько**

### **Вплив N-стеароїлетаноламіну на апоптозні процеси в гормонально активних пухлинних тканинах кори надниркових залоз людини**

*Досліджено вплив N-стеароїлетаноламіну (NSE) на експресію проапоптозного білка Bax, активацію каспази-3 та розщеплення полі(АДФ-рибозо) полімерази в пухлинній тканині кори надниркових залоз людини. Виявлено захисний, антиапоптозний ефект NSE в гормонально активних пухлинних тканинах. Розглянуто можливі механізми гальмування апоптозних процесів у деяких типах пухлинних тканин кори надниркових залоз людини.*

N-ацилетаноламіни (NAE) — клас біологічно активних речовин, молекули яких складаються з етаноламіну, сполученого із залишком певної жирної кислоти, насиченої або ненасиченої. NAE характеризуються широким спектром біологічних та фармакологічних властивостей, найважливішим з яких є їх захисна дія при ішемічних процесах, насамперед при інфаркті міокарда [1]. Проте механізм, за яким реалізуються захисні ефекти NAE щодо пошкоджених тканин, залишається нез'ясованим. З іншого боку, була показана здатність цих сполук посилювати апоптоз, пригнічувати проліферацію та міграцію пухлинних клітин [1], що робить їх перспективними протипухлинними агентами.

У даному повідомленні наведено результати дослідження впливу N-стеароїлетаноламіну (NSE) на розвиток апоптозних процесів у пухлинних клітинах кори надниркових залоз людини.

Дослідження проводили на постопераційних тканинах, отриманих від хворих, прооперованих у хірургічному відділенні ДУ “Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка АМН України”. На проведення досліджень був одержаний дозвіл від комісії Інституту з питань біоетики. Усього досліджено сім зразків пухлинних тканин, які за клінічними показниками виявились гормонально активними (альдостероми та кортикостероми).

Зрізи тканини (100 мг) завтовшки ~ 0,5 мм інкубували в 1 мл середовища 199 (Державний завод медичних препаратів, Україна), що містило 10 мМ HEPES (рН 7,4) (“Calbiochem”, США) та 2 мг/мл сироваткового альбуміну бика (“Serva”, Німеччина), при 37 °С протягом

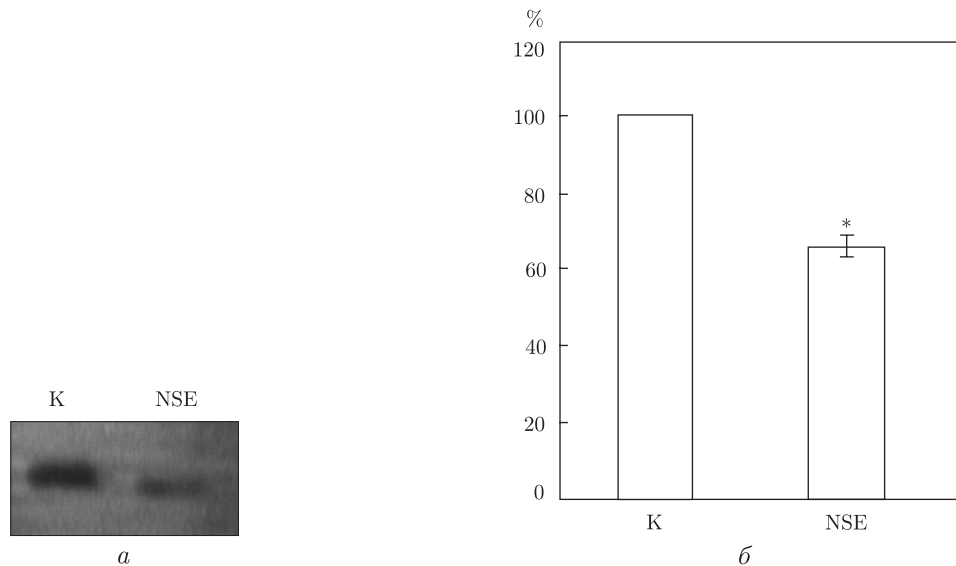


Рис. 1. Вплив NSE ( $10^{-6}$  М) на активацію каспази-3 в гормонально активній пухлинній тканині кори надниркових залоз людини. *a* — результат імуноблотингу (К — контроль); *б* — кількісна оцінка вмісту каспази-3 (%);  $M \pm m$ ;  $n = 3$ . \* —  $P < 0,05$ , вірогідні зміни щодо контролю (без NSE)

3 год у присутності спиртового розчину NSE (N-стеароїлетаноламін 18 : 0, Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України) у кінцевій концентрації  $10^{-6}$  М. Контрольна проба містила етиловий спирт у відповідній концентрації, яка не перевищувала 1%. Після інкубації зрізи тканини гомогенізували в холодному буфері, який містив 25 мМ трис-НСІ (рН 7,4), 1 мМ ЕГТА, 1 мМ ЕДТА, 1 мМ лейпептин, 10 мМ 2-меркаптоетанол, 0,5% тритон Х-100.

Розділення білків у поліакриламідному гелі виконували за методом Леммлі [2], імуноблотинг — за раніше описаною методикою [3]. При проведенні вестерн-блотингу використовували такі антитіла: моноклональні антитіла до Вах, каспази-3 та полі(АДФ-рибозо) полімерази (ПАРП) від “Cell Signaling Technology” (США). Комплекси білків з антитілами візуалізували за допомогою реагенту ECL (“Sigma”, США).

Інкубацію тканин, виділення ДНК, електрофорез ДНК в агарозному гелі проводили як описано в роботі [4]. Для визначення інтенсивності фрагментації ДНК зрізи тканин інкубували в присутності NSE у кінцевій концентрації  $10^{-8}$ – $10^{-4}$  М.

Статистичну обробку даних проводили за Стьюдентом.

Раніше нами було показано, що гормонально активні пухлини є стійкішими до дії канцеростатичних препаратів порівняно з гормонально неактивними [5]. Щоб з’ясувати можливий механізм такої резистентності, ми вивчали дію NAE, а саме NSE, що містить насичений ацильний залишок, на ключові етапи розвитку апоптозних процесів.

Проапоптозний білок Вах, який впливає на стабільність мітохондріальної мембрани, відіграє значну роль в ініціації апоптозу. Виявилось, що під впливом NSE експресія цього білка вірогідно зменшується (не показано).

Одним з найважливіших етапів апоптозу є активація каспази-3, яка вважається головною ефекторною каспазою. Виявлено, що кількість активованої каспази-3 помітно зменшується в присутності NSE (рис. 1).

Найбільш показовим процесом, що характеризує динаміку апоптозних процесів у клітині, є розщеплення ПАРП — одного із субстратів каспаз. Завдяки тому, що інтактний білок

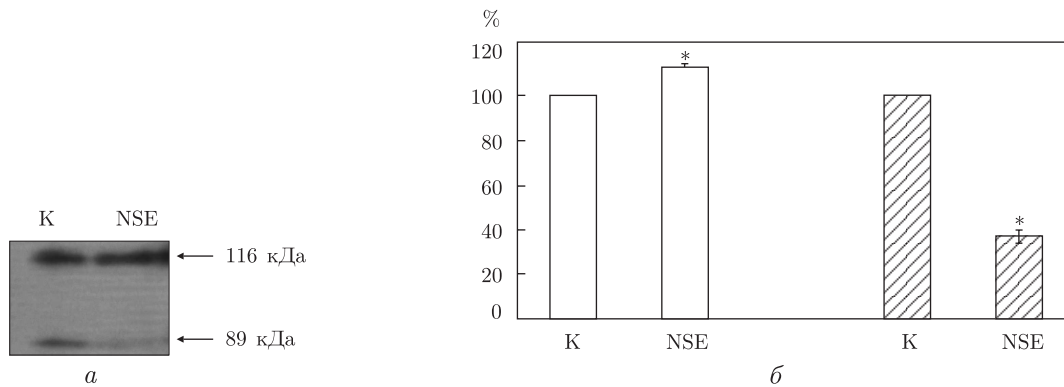


Рис. 2. Вплив NSE ( $10^{-6}$  М) на розщеплення ПАРП в гормонально активній пухлинній тканині кори надниркових залоз людини. *a* — результат імуноблотингу (К — контроль); *б* — оцінка кількості інтактного ПАРП з молекулярною масою 116 кДа (білі стовпчики) та його фрагмента з масою 89 кДа (заштриховані стовпчики);  $M \pm m$ ;  $n = 3$ . \* —  $P < 0,05$ , вірогідні зміни щодо контролю (без NSE)

та його більший фрагмент є близькими за масою, можна одночасно спостерігати збільшення кількості останнього та зменшення кількості інтактного ПАРП. Одержані нами дані свідчать про захисний ефект NSE щодо деградації ПАРП: кількість інтактного білка вірогідно збільшується, а його фрагмента — зменшується (рис. 2).

Антиапоптозний ефект NSE виявляється і на рівні фрагментації ДНК, яка є однією з фінальних стадій апоптозу. У присутності всіх досліджених концентрацій NSE фрагментації ДНК не спостерігалось (не показано).

Таким чином, захисна, антиапоптозна дія NSE виражена на всіх досліджених стадіях апоптозу. Механізми, що опосередковують ці захисні ефекти, поки що невідомі. Рівень NAE помітно зростає при дегенерації тканин та клітин в умовах стресу. Так, NAE і їх попередники — *N*-ацилфосфатидилетаноламін, накопичуються при пошкодженні мозкової тканини і у постмортальній тканині, їх кількість значно підвищується при дії  $\text{CdCl}_2$  на сім'яники щурів, під дією індукованого азидом натрію пошкодження клітин в культивованих нейронах нової кори, при індукованій глутаматом цитотоксичності щодо нейронів, при опроміненні ультрафіолетом епідермальних клітин, при фокальній ішемії головного мозку, в моделях хвороби Альцгеймера і Паркінсона та під впливом оксидативного стресу в дріжджах [1]. Підвищений рівень NAE пов'язаний з клітинною смертю нейронів як через апоптоз, так і через некротичні процеси [6]. Саме на підставі цих фактів можна зробити висновок про захисні властивості NAE.

Оскільки NAE посилюють апоптоз у гормонально неактивних пухлинах надниркових залоз [4], основною причиною стійкості гормонально активних пухлин може бути підвищений рівень стероїдів у цих пухлинах. Антиапоптозні ефекти стероїдних гормонів добре відомі [7]. Іншою причиною може бути залишковий антиапоптозний ефект кортикотропіну — одного з важливих стимуляторів стероїдогенезу в корі надниркових залоз [8]. Імовірним внутрішньоклітинним механізмом антиапоптозної дії NAE може бути активація цими сполуками ERK1/2, які пов'язані здебільшого з проліферативними процесами [9].

1. Pushkarev V. M., Kovzun O. I., Tronko M. D. Antineoplastic and apoptotic effects of cannabinoids. N-acyl-ethanolamines: protectors or killers? // *Exp. Oncol.* – 2008. – **30**, No 1. – P. 6–21.
2. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – **227**. – P. 680–685.

3. *Berdyshev E. V., Schmid P. C., Dong Z., Schmid H. O.* Stress-induced generation of N-acylethanolamines in mouse epidermal JB6 P<sup>+</sup> cells // *Biochem J.* – 2000. – **346**. – P. 369–374.
4. *Kostyuchenko N., Pushkarev V., Kashevarov G. et al.* Effects of N-acylethanolamines and various anti-mitotic agents on apoptotic DNA fragmentation in conventionally normal and tumor tissue of human adrenals // *Exp. Oncol.* – 2005. – **27**, No 3. – P. 215–219.
5. *Левчук Н. І., Пушкарьов В. М., Ковзун О. І., Тронько М. Д.* Вплив таксолу на апоптозну фрагментацію ДНК в позапухлинних та пухлинних тканинах надниркових залозах людини // *Ендокринологія.* – 2009. – **14**, № 1. – С. 126–133.
6. *Hansen H. H., Ikonomidou C., Bittigau P. et al.* Accumulation of the anandamide precursor and other N-acylethanolamine phospholipids in infant rat models of in vivo necrotic and apoptotic neuronal death // *J. Neurochem.* – 2001. – **76**. – P. 39–46.
7. *Fan W.* Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis // *Biochem. Pharmacol.* – 1999. – **57**. – P. 1215–1221.
8. *Регулятори функції кори надниркових залоз* / За ред. М. Д. Тронька, О. С. Микоші, О. І. Ковзун, В. М. Пушкарьова. – Київ: ТОВ “Доктор-Медіа”. Видавничий дім “Здоров’я України”, 2009. – 244 с.
9. *Berdyshev E. V., Schmid P. C., Krebsbach R. J. et al.* Cannabinoid-receptor-independent cell signalling by N-acylethanolamines // *Biochem. J.* – 2001. – **360**. – P. 67–75.

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

*Надійшло до редакції 24.10.2009*

**N. I. Levchuk, V. M. Pushkarev,**  
Corresponding Member of the NAS of Ukraine **M. D. Tronko**

### **The effect of N-stearoylethanolamine on the apoptotic processes in hormonally active tumor tissues of adrenal cortex**

*The effects of N-stearoylethanolamine (NSE) on the proapoptotic protein Bax expression, caspase-3 activation, and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in tumor tissue of human adrenal cortex are studied. The protective antiapoptotic effect of NSE in hormonally active tumors of adrenal cortex is demonstrated. The possible mechanisms of the inhibition of apoptotic processes in some tumor tissues of human adrenal cortex are discussed.*