

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

УДК 612.453.018:615.252.453:615.07.9

ВПЛИВ МЕТАНАНДАМІДУ НА СТЕРОЇДОГЕНЕЗ В АДРЕНОКОРТИКОЦИТАХ ЩУРІВ *IN VITRO*

Н. І. ЛЕВЧУК

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В. П. Комісаренка НАМН України», Київ;
e-mail: levnaty@meta.ua

Із літератури відомо про антиоксидантні, протизапальні, мембрано-протекторні, а також адренорегуляторні властивості N-ацетилетаноламінів, але щодо їх участі в регуляції стероїдогенезу даних недостатньо. З метою вивчення впливу синтетичного аналога ендogenous канабіноїду анандаміду — метанандаміду — на інтенсивність стероїдогенезу було досліджено вплив різних концентрацій препарату на вміст 11-гідроксикортикостероїдів (11-ОКС) в живильному середовищі після інкубації тканини надниркових залоз щурів обох статей. Кількісне визначення рівня 11-ОКС проводили флуориметричним мікрометодом. Показано, що інкубація зрізів тканини з метанандамідом призводить до зниження рівня 11-ОКС у самців та підвищення його вмісту в самиць. Зроблено висновок, що гальмування секреції та синтезу кортикостероїдів у самців в умовах дії метанандаміду може бути наслідком зниження рівня cAMP і гальмування cAMP-залежної протеїнкінази A (PKA). Протилежна і дозозалежна дія препарату в самиць, можливо, пов'язана із впливом естрогенів на механізм дії препарату.

Ключові слова: метанандамід, 11-ОКС, надниркові залози, самці і самиці щурів.

Метанандамід — метаболічно стійкий синтетичний аналог N-арахідонолетаноламіну (тривіальна назва — анандамід). Останній є одним із найдослідженіших представників класу N-ацетилетаноламінів (NAE) з ненасиченим ацилом і є типовим ендоканабіноїдом, тобто активує канабіноїдні рецептори (CB1, CB2). Ідентифікація цієї сполуки в мозку свині дала поштовх для пошуку інших ендogenous NAE, дослідження їхньої функціональної ролі в організмі та механізмів реалізації цих ефектів. На сьогодні встановлено шляхи біосинтезу та деградації ендоканабіноїдів, а також описано різноманітні фізіологічні їхні функції, зокрема участь у регуляції запрограмованої загибелі клітини (апоптоз), гальмуванні проліферації пухлинних клітин та їхньої здатності до метастазування. Продемонстровано антиоксидантні, протизапальні, мембранопротекторні властивості NAE [1].

Відома роль NAE в регуляції адренорегуляторної функції [2–7]. Проте участь NAE, зокрема анандаміду і метанандаміду, в регуляції стероїдогенезу залишається далекою

від повного розуміння. Метою роботи було дослідження впливу метанандаміду в різних концентраціях на синтез кортикостероїдів у надниркових залозах щурів різної статі *in vitro*.

Матеріали і методи

За дозволом комісії Інституту з питань біоетики досліди проведено на 12 щурах-самцях та 10 щурах-самицях лінії Вістар. Після декапітації щурів надниркові залози вилучали, очищали їх від жирової та сполучної тканини, зважували і робили зрізи. Останні інкубували при 37 °C впродовж 3 год в 1 мл живильного середовища RPMI-1640, що містило 5% бичачої сироватки, у присутності розчину R-(+)-метанандаміду в етанолі (всі реактиви фірми Sigma, США) в кінцевій концентрації 10^{-8} – 10^{-6} M. В контрольну пробу додавали відповідну кількість етанолу.

Загальний вміст 11-ОКС в середовищі інкубації визначали флуориметричним методом De Mooge в модифікації Ю. Г. Балашова [8]. Флуоресценцію реєстрували на спектрофлуориметрі MPF – 4 (Hitachi, Японія) за довжини хвиль збудження/флуоресценції

470/524 нм. Як стандарт для визначення 11-ОКС використовували кортикостерон (Koch-Light, Велика Британія). Концентрацію сумарних 11-ОКС виражали в мкг/мг тканини.

Статистичний аналіз одержаних результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента. Вірогідними вважали значення за $P < 0,05$.

Результати та обговорення

Інкубація зрізів надниркових залоз щурів-самців з метанандамідом впродовж 3 год призводить до вірогідного зниження порівняно з контролем рівня 11-ОКС в інкубаційному середовищі за всіх досліджених його концентрацій. Найзначніший ефект препарату спостерігали при 10^{-8} М. Навпаки, за інкубації зрізів надниркових залоз самиць відбувалося підвищення рівня кортикостероїдів, але лише за найвищої із досліджених концентрацій метанандаміду (табл.). Таким чином, це свідчить про різну спрямованість змін секреції гормонів під впливом метанандаміду *in vitro* у тварин різної статі, а також про дозозалежну дію препарату на стероїдогенез *in vitro* у самиць.

Одержані нами результати узгоджуються з даними літератури, що NAE (як із насиченим, так і з ненасиченим ацилом) і *in vitro* [2, 4], і *in vivo* [3, 5–7] здатні впливати на синтез і секрецію кортикостероїдних гормонів. Також підтверджено, що вплив NAE на стероїдогенез залежить від статі тварин і є подібним до змін, виявлених нами: рівень 11-ОКС у середовищі інкубації зрізів надниркових залоз самців за дії N-стеароїлетаноламіну та суміші NAE, що містила похідні етаноламіну, здебільшого з ненасиченими залишками жирних кислот, зменшують, а в самиць – підвищують [9]. Зауважимо, що як і в наших дослідженнях з метанандамідом найефективнішою концентрацією за дії зазначених сполук у самиць *in vitro* є концентрація 10^{-6} М.

Інгібуючий вплив препарату в усіх досліджених концентраціях на утворення

11-ОКС зрізами надниркових залоз щурів-самців може бути наслідком зниження рівня сАМР і гальмування сАМР-залежної протеїнкінази А. Це було показано за вивчення дії різних концентрацій суміші NAE [10]. Зміни активності ПКА, яка регулює процес стероїдогенезу, може відбуватися внаслідок активації СВ1-типу канабіноїдних рецепторів, експресію яких було виявлено в надниркових залозах [11].

Пояснити механізм впливу метанандаміду на стероїдогенез в адренкортикальній тканині самиць можливо, спираючись на відмінність ефектів метанандаміду в самиць і самців, яка ймовірно пов'язана з різним вихідним гормональним фоном у цих тварин. Про стимуляцію естрогенами синтезу кортикостероїдів свідчать дані літератури [12, 13]. Різний ефект метанандаміду, напевно, пов'язаний з неоднаковим характером метаболічних процесів в адренкортикальних клітинах самиць і самців. Припускаємо, що на рівні окремої адренкортикальної клітини має місце антагонізм між метанандамідом і естрогенами, оскільки такі взаємозв'язки було показано для гіпоталамуса [14]. Слід також зазначити існування статевої різниці щодо вмісту анандаміду в гіпофізі та гіпоталамусі щурів. Так, у самиць цей рівень є значно вищим та прямо залежить від рівня естрогенів у крові [15]. Рівень анандаміду в плазмі крові здорових жінок також залежить від фази менструального циклу, показано позитивний кореляційний зв'язок між рівнем естрадіолу і концентрацією анандаміду [16]. Крім того, у самиць вміст мРНК рецептора СВ1 у гіпофізі змінювався протягом оваріального циклу обернено пропорційно рівню естрогенів [15].

Привертає увагу також той факт, що відмінність вмісту ендоканабіноїду в різних клітинах залежить від впливу естрогенів на процеси біосинтезу та деградації ендogenous канабіноїду. В ендотеліальних клітинах 17- β естрадіол активує фосфоліпазу D N-арахідоноїлфосфатидилетаноламін (NAPE-PLD) – ен-

Синтез кортикостерону зрізами надниркових залоз щурів in vitro у присутності різних концентрацій метанандаміду (мкг/мг тканини за 3 год)

Стать щурів	Концентрація метанандаміду			
	Контроль	10^{-8} М	10^{-7} М	10^{-6} М
Самці	$1,85 \pm 0,21$ (5)	$1,00 \pm 0,11^*$ (6)	$1,29 \pm 0,06^*$ (6)	$1,20 \pm 0,12^*$ (6)
Самиці	$1,66 \pm 0,10$ (5)	$1,82 \pm 0,18$ (5)	$1,87 \pm 0,33$ (5)	$1,98 \pm 0,06^*$ (5)

* $P < 0,05$ – зміни вірогідні порівняно з контрольною пробєю без метанандаміду. В дужках наведено кількість незалежних експериментів.

зим, який бере участь у синтезі анандаміду з N-арахідоноїлфосфатидилетаноламіну (NAPE) та інгібує активність амідогідролази жирних кислот (ФААН), яка каталізує його деградацію [17–19]. В той самий час у матці 17- β естрадіол пригнічував активність NAPE-PLD [20].

У попередніх наших дослідженнях [10] було показано, що важлива роль у регуляції стероїдогенезу за дії суміші NAE належить також протеїнкіназі С (ПКС). Так, збільшення концентрації кортикостероїдних гормонів в інкубаційному середовищі зрізів надниркових залоз шурів-самиць під впливом зазначеної сполуки сполучалося зі зміною активності ПКС, активація якої може здійснюватись як через СВ2-рецептори [21], так і нерепторним шляхом [22]. З іншого боку, існує можливість сумісного впливу метанандаміду та естрогенів на активність ПКС. Виявлено, що до регуляції стероїдогенезу 17 β -естрадіолом у корі надниркових залоз шурів та людини причетна як ПКА, так і ПКС [23].

Таким чином, результати досліджень свідчать про гальмівний ефект метанандаміду на стероїдогенез у самців *in vitro*, а також протилежний дозозалежний ефект препарату на секрецію гормонів у самиць, що пов'язано із впливом естрогенів на механізми дії препарату.

ВЛИЯНИЕ МЕТАНАНДАМИДА НА СТЕРЕОИДОГЕНЕЗ В АДРЕНОКОРТИКОЦИТАХ КРЫС IN VITRO

Н. И. Левчук

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко НАМН Украины», Киев;
e-mail: levnaty@meta.ua

Из литературы известно об антиоксидантных, противовоспалительных, мембрано-протекторных, а также адренорегуляторных свойствах N-ацетилэтанолamines, но об их участии в регуляции стероидогенеза данных недостаточно. С целью изучения влияния синтетического аналога эндогенного каннабиноида анандамида – метанандамида – на интенсивность стероидогенеза было исследовано влияние различных концентраций препарата на содержание 11-гидроксикортикостероидов (11-ОКС) в питательной среде после инкубации ткани надпочечников крыс обоих полов. Количественное определение уровня 11-ОКС проводили флуориметрическим микрометодом. Показано, что инкубация срезов ткани с метанандамидом приводит к снижению уров-

ня 11-ОКС у самцов и увеличению его содержания у самок. Сделан вывод, что торможение секреции и синтеза кортикостероидов у самцов при действии метанандамида может быть следствием снижения уровня cAMP и торможения cAMP-зависимой протеинкиназы А (ПКА). Противоположное и дозозависимое действие препарата у самок, возможно, связано с влиянием эстрогенов на механизм действия препарата.

Ключевые слова: метанандамид, 11-ОКС, надпочечники, самцы и самки крыс.

INFLUENCE OF METANANDAMIDE ON STEROIDOGENESIS IN RAT ADRENOCORTICOCYTES IN VITRO

N. I. Levchuk

State Institution “V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, National Academy of Medical Sciences of Ukraine”, Kyiv;
e-mail: levnaty@meta.ua

It is known from literature about antioxidant, anti-inflammatory, membrane protective and adrenoregulatory properties of N-acetyethanolamines, but data concerning their participation in regulation of steroidogenesis are insufficient. In order to study the influence of a synthetic analogue of endogenous cannabinoid anandamide – metanandamide – on the intensity of steroidogenesis the influence of different concentrations of the drug on the contents of 11-hydroxicorticosteroides (11-HCS) in the culture medium after incubation of adrenal tissue in rats of both sexes was investigated. The quantitative determination of 11-HCS was conducted by fluorometric micromethod. It was shown that the incubation of tissue sections with metanandamide leads to a reduction of 11-HCS in males and an increase of their content in females. It was concluded that the inhibition of corticosteroid secretion and synthesis in males may be due to reduction of cAMP and inhibition of cAMP-dependent protein kinase A (PKA) under the effect of metanandamide. The opposite and dose-dependent effects of the preparation in females may be connected with the estrogen influence on the mechanisms of drug effect realization.

Key words: metanandamide, 11-HCS, adrenals, rat males and females.

1. Гула Н. М., Маргімич В. М. Жирні кислоти та їх похідні при патологічних станах. – К.: Наук. думка, 2009. – 334 с.
2. Mikosha A., Kovzun O., Zhukov A., Gulaya N. // Med. Sci. Res. – 1998. – 26. – P. 85–88.

3. Гула Н. М., Мікоша О. С., Жуков О. Д., Челнакова І. С. // Укр. біохім. журн. – 2000. – **72**, № 3. – С. 82–86.
4. Сторожук Л. М., Жуков О. Д., Артамонов М. В. та ін. // Ендокринологія. – 2005. – **10**, № 1. – С. 63–68.
5. Weidenfeld J., Feldman S., Mechoulam R. // Neuroendocrinology. – 1994. – **59**, N 2. – P. 110–112.
6. Wenger T., Jamali K. A., Juaneda C. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – **237**, N 3. – P. 724–728.
7. Manzanares J., Corchero J., Fuentes J. A. // Brain Res. – 1999. – **839**, N 1. – P. 173–179.
8. Балашов Ю. Г. // Физиол. журн. СССР. – 1990. – **76**, № 2. – С. 280–283.
9. Жуков О. Д. Вплив N-ацилетаноламінів на стероїдогенез у корі надниркових залоз. Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – К., 2001. – 16 с.
10. Ковзун О. І., Левчук Н. І., Гула Н. М., Мікоша О. С. // Укр. біохім. журн. – 2007. – **79**, № 5. – С. 133 – 139.
11. Ziegler C. G., Mohn C., Lamounier-Zepter V. et al. // Horm. Metab. Res. – 2010. – **42**, N 2. – P. 88–92.
12. Мікоша А. С., Ковзун Е. І., Гринченко Е. Н. // Укр. біохім. журн. – 2003. – **75**, № 1. – С. 29–32.
13. Ковзун О. І., Гринченко Є. М., Мікоша О. С. // Клін. та експерим. патол. – 2004. – **3**, № 2, Ч. 1. – С. 137 – 139.
14. Scorticati C., Fernandez-Solari J., De Laurentiis A. et al. // PNAS – 2004. – **101**, N 32. – P. 11891–11896.
15. Gonzales S., Bisogno T., Wenger T. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2001. – **270**, N 1. – P. 260–266.
16. Talatini M. R., Taylor A. H., Konje J. C. // Fertil Steril. – 2010. – **93**, N 6. – P. 1989–1996.
17. Maccarrone M., Bari M., Battista N., Finazzi-Agro A. // Blood. – 2002. – **100**, N 12. – P. 4040–4048.
18. Maccarrone M., Bisogno T., Valensise H. et al. // Mol. Hum. Reprod. – 2002. – **8**, N 2. – P. 188–195.
19. Maccarrone M., Falciglia K., Di Rienzo M., Finazzi-Agro A. // Prostaglandins Leukot. Essen. Fatty Acids. – 2002. – **66**, N 2–3. – P. 309–317.
20. Guo Y., Wang H., Okamoto Y. et al. // J. Biol. Chem. – 2005. – **280**, N 25. – P. 23429–23432.
21. Lepicier P., Bouchard J. F., Lagneux C., Lamontagne D. // Br. J. Pharmacol. – 2003. – **139**, N 4. – P. 805–815.
22. De Petrocellis L., Orlando P., Di Marzo V. // Biochem. Mol. Biol. Int. – 1995. – **36**, N 6. – P. 1127–1133.
23. Гринченко Е. Н., Ковзун Е. І., Мікоша А. С. // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 5. – С. 88–92.

Отримано 07.02.2013