

ВПЛИВ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ НА ІНТЕНСИВНІСТЬ ФРАГМЕНТАЦІЇ ДНК У ПУХЛИННІЙ ТА ПОЗАПУХЛИННІЙ ТКАНИНАХ КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ ЛЮДИНИ

Н. І. ЛЕВЧУК¹, В. М. ПУШКАРЬОВ¹, О. І. КОВЗУН¹,
О. С. МИКОША¹, Н. М. ГУЛА², М. Д. ТРОНЬКО¹

¹ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин
ім. В. П. Комісаренка НАМН України», Київ;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: levnataly@meta.ua

Вивчали вплив різних концентрацій N-стеароїлетаноламіну (NSE 18:0) на фрагментацію ДНК у пухлинній та позапухлинній тканинах надниркових залоз *in vitro*. У роботі досліджено: позапухлинну тканину від хворих з гормонально активними пухлинами, тканину доброякісних пухлин (гормонально активну і гормонально неактивну), тканину злоякісних пухлин, а також гіперплазовану тканину кори надниркових залоз (хвороба Іценка–Кушинга). Встановлено, що NSE посилює інтенсивність фрагментації ДНК лише в тканині гормонально неактивних пухлин. Доброякісні гормонально активні пухлини, злоякісні пухлини та гіперплазована тканина кори надниркових залоз є резистентними до дії NSE. Обговорено можливі механізми їхньої стійкості до препарату.

Ключові слова: N-стеароїлетаноламін, фрагментація ДНК, апоптоз, пухлини надниркових залоз.

N-ацилпохідні етаноламіну (NAE) привернули увагу дослідників своїми біологічними властивостями, які дозволяють вважати їх важливими регуляторами, що беруть участь у захисті клітин у відповідь на дію стресогенних чинників. Зокрема, N-стеароїлетаноламін (NSE) діє як антиоксидант та бере участь у регуляції адренкортикальної функції [1–4]. NAE можуть виявляти фармакологічні ефекти в організмі: протизапальні, антивірусні та антибактеріальні, крім того, з'явилися дані про їх участь у регуляції апоптозу та пригніченні проліферації пухлинних клітин різного генезу [5–6].

Раніше нами було показано, що суміш поліненасичених NAE посилювала апоптоз у тканині пухлин кори надниркових залоз людини *in vitro* [7]. Продемонстровано також проапоптотичний вплив NSE на тканину кортикостероми [8].

Метою роботи було дослідження ефекту NSE щодо міжнуклеосомної фрагментації ДНК у різних типах пухлинних тканин кори надниркових залоз людини.

Матеріали і методи

На проведення досліджень одержано дозвіл від комісії Інституту ендокринології з питань біоетики.

Було вивчено 18 зразків тканини надниркових залоз: сім зразків тканини доброякісних гормонально активних пухлин (альдостером – 4, андростером – 3), три зразки тканини доброякісних гормонально неактивних пухлин, три зразки гіперплазованої тканини кори надниркових залоз хворих на хворобу Іценка–Кушинга, три зразки позапухлинної тканини від хворих із гормонально активними пухлинами і два зразки злоякісних пухлин (кортикоандробластома та андробластома).

Зрізи тканин інкубували протягом 3 год при 37 °С у буфері, який містив: 10 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, 130 мМ NaCl, 1,27 мМ MgSO₄, 2 мМ CaCl₂ (Merck, Німеччина), 20 мМ HEPES (рН 7,4), 2 мг/мл БСА (Sigma, США). У дослідні проби перед початком інкубації додавали спиртовий розчин NSE (Інститут біохімії НАН України) у кінцевій концентрації 10⁻⁸, 10⁻⁶ та 10⁻⁴ М. У контрольні проби додавали таку саму кількість етанолу у концентрації, яка не перевищувала 1%. Метод виділення ДНК та проведення електрофорезу в агарозному гелі описано раніше [7]. Після електрофорезу гелі фотографували цифровою відеокамерою в транслюмінаторі і сканували за допомогою програми «GelPro». Інтенсивність флуоресценції (вміст) низькомолекулярних фрагментів ДНК (різних фракцій нуклеосом) розраховували у відсотках по

відношенню до загальної кількості нанесеної на гель ДНК, яку приймали за 100%. Ефект NSE оцінювали як різницю кількості нуклеосом між контрольними пробами та пробами, в які вносили розчин NSE.

Для статистичної обробки даних застосовували парний критерій Стьюдента [9]. Вірогідними вважалися значення $P < 0,05$.

Результати та обговорення

З даних, представлених у таблиці видно, що рівень моно-, ди-, три-, тетра-нуклеосом та їх сумарного вмісту у позапухлинній тканині кори надниркових залоз хворих із гормонально активними пухлинами, у тканині власне гормонально активних пухлин (альдостероми і андростероми) та в гіперплазованій тканині кори надниркових залоз хворих із хворобою Іценка–Кушинга у присутності NSE (10^{-8} – 10^{-4} М) не змінюється. Водночас, у тканині гормонально неактивної пухлини кори надниркової залози відмічено посилення інтенсивності апоптозу: сумарний вміст олігонуклеосом розміром 200–800 пар основ (п.о.) збільшувався під дією всіх досліджуваних концентрацій NSE. Ці зміни відбувалися за рахунок рівномірного підвищення вмісту моно-, ди-, три- та тетра-нуклеосом. Статистичний аналіз підтвердив збільшення рівня моно-, три- та тетра-нуклеосом під впливом NSE в концентрації 10^{-8} М, ди- та тетра-нуклеосом за додавання NSE в концентрації 10^{-6} М і мононуклеосом за дії NSE в концентрації 10^{-4} М (таблиця). Слід відмітити, що в більшості випадків ефективнішими щодо фрагментації ДНК виявились низькі концентрації сполуки.

У роботі також проаналізовано вплив NSE на фрагментацію ДНК у тканині двох типів злоякісних пухлин надниркових залоз людини – кортикоандробластоми та андробластоми. Розділення ДНК, виділеної з тканини цих пухлин, після інкубації з різними концентраціями препарату показало, що фрагментація ДНК практично відсутня. Враховуючи, що фрагментація ДНК є однією з ознак термінальної стадії апоптозу, можна зробити висновок, що злоякісні пухлини надниркових залоз характеризуються значною стійкістю до проапоптотичної дії NSE.

Таким чином, результати досліджень свідчать про те, що лише у тканині гормональ-

но неактивних пухлин надниркових залоз NSE посилює інтенсивність фрагментації ДНК, тоді як у тканині гормонально активних пухлин (альдостерома і андростерома), злоякісних пухлин, а також у гіперплазованій тканині хворих із хворобою Іценка–Кушинга інкубація з NSE не впливає на кількість олігонуклеосом. Отже, можна зробити висновок, що чутливість пухлинних клітин кори надниркових залоз людини до NSE визначається, головним чином, типом пухлинної тканини.

Стійкість злоякісних пухлин до NSE можна пояснити втратою або пригніченням апоптотичних механізмів, що зазвичай мають місце в більшості пухлин внаслідок мутацій таких генів як *TP53*, *pRb*, *PTEN* або надекспресії антиапоптотичних факторів (наприклад, Bcl-2) [10, 11].

Той факт, що NSE не змінює інтенсивності фрагментації ДНК у позапухлинній тканині кори надниркових залоз хворих з гормонально активними пухлинами, у тканині альдостероми і андростероми та у гіперплазованій тканині кори надниркових залоз, можливо, пояснюється негативним впливом стероїдів щодо індукції програмованої загибелі клітин, як це спостерігали внаслідок дії таксанів [12]. Необхідно відмітити, що у тканині кори надниркових залоз хворих із гормонально активними пухлинами відмічено пригнічення активації каспази-3 та розщеплення PARP [13], що також свідчить про послаблення апоптотичних процесів.

Відсутність ефекту NSE щодо інтенсивності фрагментації ДНК у гіперплазованій тканині кори надниркових залоз хворих із хворобою Іценка–Кушинга можна пояснити антиапоптотичним ефектом кортикотропіну [14]. І хоча інкубація тканини з NSE відбувається за відсутності кортикотропіну, вже ініційовані цим гормоном процеси можуть блокувати дію NSE на тканину.

Таким чином, NSE індукує апоптотичні ефекти у тканині гормонально неактивних пухлин кори надниркових залоз людини. Клітини гормонально активних пухлин, гіперплазованої тканини та злоякісних пухлин кори надниркових залоз людини є нечутливими до дії NSE.

Вплив NSE на кількість олігонуклеосом у позапухлинній тканині, пухлинах та гіперплазованій тканині кори надниркових залоз людини

| Розмір фрагментів ДНК, п.о. | Контроль | NSE, 10 ⁻⁸ М | Різниця | NSE, 10 ⁻⁶ М | Різниця | NSE, 10 ⁻⁴ М | Різниця |
|---|---------------|-------------------------|---------------|-------------------------|---------------|-------------------------|---------------|
| Позапухлинна тканина від хворих з гормонально активними пухлинами (n = 3) | | | | | | | |
| 200 | 3,33 ± 0,97 | 0,99 ± 0,43 | -2,34 ± 1,08 | 4,42 ± 0,58 | 1,09 ± 1,44 | 5,86 ± 0,52 | 2,53 ± 1,24 |
| 400 | 7,07 ± 0,95 | 2,41 ± 1,91 | -4,66 ± 1,50 | 8,88 ± 3,45 | 1,81 ± 3,05 | 10,96 ± 2,25 | 3,89 ± 1,87 |
| 600 | 9,05 ± 1,20 | 3,71 ± 2,59 | -5,34 ± 1,97 | 10,32 ± 2,72 | 1,27 ± 2,12 | 12,77 ± 1,75 | 3,72 ± 0,97 |
| 800 | 11,93 ± 0,93 | 4,63 ± 2,82 | -7,30 ± 2,51 | 12,02 ± 2,29 | 0,08 ± 1,95 | 16,44 ± 0,20 | 4,51 ± 1,09 |
| 200–800 | 31,06 ± 5,80 | 11,43 ± 7,43 | -19,64 ± 8,94 | 35,30 ± 8,06 | 4,24 ± 9,59 | 45,70 ± 4,31 | 14,64 ± 7,18 |
| Тканина гормонально активних пухлин (n = 7) | | | | | | | |
| 200 | 3,62 ± 0,43 | 3,72 ± 1,22 | 0,11 ± 1,24 | 3,09 ± 1,10 | -0,53 ± 0,92 | 4,32 ± 1,26 | 0,70 ± 1,29 |
| 400 | 5,74 ± 1,04 | 5,33 ± 0,87 | -0,41 ± 0,83 | 6,95 ± 2,29 | 1,21 ± 1,66 | 6,19 ± 0,96 | 0,45 ± 1,30 |
| 600 | 8,05 ± 1,62 | 7,59 ± 0,77 | -0,46 ± 1,15 | 9,47 ± 2,32 | 1,41 ± 1,57 | 9,25 ± 0,65 | 1,19 ± 1,87 |
| 800 | 10,50 ± 2,00 | 10,37 ± 0,99 | -0,13 ± 1,79 | 11,40 ± 2,92 | 0,90 ± 1,68 | 12,06 ± 0,82 | 1,56 ± 1,76 |
| 200–800 | 27,91 ± 4,94 | 27,01 ± 2,49 | -0,89 ± 4,10 | 30,90 ± 8,34 | 2,99 ± 5,47 | 31,80 ± 3,09 | 3,89 ± 5,72 |
| Гіперплазована тканина (хвороба Іценка–Кушинга) (n = 3) | | | | | | | |
| 200 | 5,67 ± 3,48 | 6,81 ± 3,65 | 1,14 ± 0,41 | 6,85 ± 3,27 | 1,19 ± 0,76 | 6,58 ± 3,30 | 0,92 ± 1,09 |
| 400 | 7,40 ± 3,65 | 10,35 ± 2,80 | 2,95 ± 1,94 | 11,69 ± 2,79 | 4,29 ± 3,74 | 8,21 ± 3,61 | 0,81 ± 2,35 |
| 600 | 9,70 ± 2,51 | 11,69 ± 1,33 | 1,99 ± 1,88 | 13,19 ± 2,01 | 3,49 ± 2,79 | 11,56 ± 4,06 | 1,86 ± 4,45 |
| 800 | 10,23 ± 2,63 | 13,14 ± 0,52 | 2,90 ± 2,31 | 15,49 ± 0,73 | 5,26 ± 2,83 | 13,43 ± 4,10 | 3,20 ± 5,19 |
| 200–800 | 33,07 ± 11,79 | 41,98 ± 8,21 | 8,91 ± 6,36 | 47,23 ± 8,17 | 14,16 ± 10,06 | 39,79 ± 14,37 | 6,72 ± 13,08 |
| Тканина гормонально неактивних пухлин (n = 3) | | | | | | | |
| 200 | 1,67 ± 0,97 | 3,96 ± 0,70 | 2,28 ± 0,28* | 4,25 ± 0,26 | 2,57 ± 0,71 | 5,12 ± 1,02 | 3,45 ± 0,29* |
| 400 | 4,97 ± 1,41 | 12,11 ± 3,12 | 7,14 ± 2,54 | 12,27 ± 1,66 | 7,31 ± 0,88* | 11,75 ± 3,09 | 6,79 ± 1,69 |
| 600 | 7,60 ± 2,04 | 13,72 ± 2,63 | 6,12 ± 1,23* | 14,21 ± 1,83 | 6,61 ± 2,02 | 12,60 ± 2,73 | 5,00 ± 1,22 |
| 800 | 9,97 ± 2,88 | 17,46 ± 3,64 | 7,50 ± 1,63* | 19,08 ± 2,40 | 9,11 ± 1,80* | 15,71 ± 2,47 | 5,74 ± 1,56 |
| 200–800 | 24,20 ± 6,30 | 47,23 ± 9,52 | 23,03 ± 5,13* | 49,80 ± 5,89 | 25,60 ± 3,90* | 45,18 ± 7,88 | 20,98 ± 2,43* |

Примітка: * зміни у порівнянні з контрольною пробою без NSE вірогідні. M ± m, P < 0,05 за парним критерієм Стьюдента.

**ВЛИЯНИЕ
N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА НА
ИНТЕНСИВНОСТЬ ФРАГМЕНТАЦИИ
ДНК В ОПУХОЛЕВОЙ И
ВНЕОПУХОЛЕВОЙ ТКАНЯХ КОРЫ
НАДПОЧЕЧНИКОВ ЧЕЛОВЕКА**

*Н. И. Левчук¹, В. М. Пушкарев¹,
Е. И. Ковзун¹, А. С. Микоша¹,
Н. М. Гуляя², Н. Д. Тронько¹*

¹ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренко НАМН Украины», Киев;

²Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев;
e-mail: levnataly@meta.ua

Изучали влияние различных концентраций N-стеароилэтанолamina (NSE 18:0) на фрагментацию ДНК в опухолевой и внеопухолевой тканях надпочечников *in vitro*. В работе исследованы следующие типы тканей: внеопухолевая ткань от больных с гормонально активными опухолями, ткань доброкачественных опухолей (гормонально активная и гормонально неактивная), ткань злокачественных опухолей, а также гиперплазированная ткань коры надпочечников (болезнь Иценко–Кушинга). Установлено, что NSE усиливает интенсивность фрагментации ДНК только в ткани гормонально неактивных опухолей. Доброкачественные гормонально активные опухоли, злокачественные опухоли и гиперплазированная ткань коры надпочечников оказались устойчивыми к действию NSE. Обсуждаются возможные механизмы их устойчивости к препарату.

Ключевые слова: N-стеароилэтаноламин, фрагментация ДНК, апоптоз, опухоли надпочечников.

**EFFECT OF
N-STEAROYLETHANOLAMINE ON THE
DNA FRAGMENTATION INTENSITY
IN TUMOUR AND EXTRATUMORAL
TISSUES OF THE HUMAN ADRENAL
CORTEX**

*N. I. Levchuk¹, V. M. Pushkarev¹,
O. I. Kovzun¹, A. S. Mikosha¹, N. M. Gula²,
M. D. Tronko¹*

¹State Institution V. P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: levnataly@meta.ua

S u m m a r y

The effect of different concentrations of N-stearoylethanolamine (NSE 18:0) on fragmentation of DNA in the tumoural and extratumour tissues of the adrenal glands *in vitro* was studied. In this work the following types of tissue were investigated: extratumoural tissue from patients with hormonally active tumours, benign tumour tissue (hormonally active and hormonally inactive), tissue of malignant tumours and hyperplastic tissue of the adrenal glands (Itsenko-Cushing disease). It has been established that the NSE increases the intensity of DNA fragmentation only in the tissue of hormonally inactive tumours. Benign hormonally active tumours, malignant tumours and hyperplastic tissue of the adrenal glands were resistant to the NSE. The possible mechanisms of resistance to the drug are discussed.

Key words: N-stearoylethanolamine, DNA fragmentation, apoptosis, adrenal glands tumours.

1. Mikosha A., Kovzun O., Zhukov A., Gulaya N. // *Med. Sci. Res.* – 1998. – **26**. – P. 85–88.
2. Гула Н. М., Мікоша О. С., Жуков О. Д., Челнакова І. С. // *Укр. біохім. журн.* – 2000. – **72**, № 3. – С. 82–86.
3. Сторожук Л. М., Жуков О. Д., Артамонов М. В. та ін. // *Ендокринологія.* – 2005. – **10**, № 1. – С. 63–68.
4. Гудзь Є. А., Гула Н. М., Хмель Т. О. та ін. // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 6. – С. 86–91.
5. Pushkarev V. M., Kovzun O. I., Tronko M. D. // *Exp. Oncol.* – 2008. – **30**, N 1. – P. 6–21.
6. Alexander A., Smith P. F., Rosengren R. J. // *Cancer Lett.* – 2009. – **285**, N 1. – P. 6–12.
7. Kostyuchenko N., Pushkarev V., Kashevarov G. et al. // *Exp. Oncol.* – 2005. – **27**, N 3. – P. 215–219.
8. Левчук Н. І., Ковзун О. І., Тронько М. Д., Пушкарьов В. М. // *Ендокринологія.* – 2007. – **12**, № 1. – С. 121–125.
9. Гланц С. *Медико-биологическая статистика.* – М.: Практика, 1998. – 459 с.
10. Фільченков О. О., Стойка Р. С. *Апоптоз і рак.* – Т.: ТДМУ «Укрмедкнига», 2006. – 524 с.
11. Чехун В. Ф., Микитенко Д. О., Лук'янова Н. Ю., Погрібний І. П. // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – **78**, № 6. – С. 5–14.
12. Fan W. // *Biochem. Pharmacol.* – 1999. – **57**. – P. 1215–1221.
13. Левчук Н. І., Пушкарьов В. М., Тронько М. Д. // *Доп. НАНУ.* – 2010. – № 4. – С. 189–192.
14. Ковзун О. І., Костюченко Н. М., Мікоша О. С. // *Укр. біохім. журн.* – 2007. – **79**, № 2. – С. 38–43.

Отримано 20.02.2012