

Статеві відмінності експресії ERK у надниркових залозах щурів

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

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

Резюме. Досліджували рівень експресії ERK1 і ERK2 та вплив *in vitro* на нього різних концентрацій метанандаміду в тканині надниркових залоз самиць і самців щурів. Встановлено різний рівень експресії ERK1 і ERK2 в адренкортикальній тканині щурів різної статі: у тканині надниркових залоз самиць щурів рівень експресії ERK1 і ERK2 був вірогідно нижчим порівняно з адренкортикальною тканиною самців. Також у самиць відзначено більший рівень експресії ERK2, на відміну від ERK1. Виявлену різницю може бути пов'язано з впливом статевих гормонів на синтетичні процеси в клітині. Метанандамід не впливав на рівень експресії ERK1 і ERK2 у тканині надниркових залоз щурів різної статі.

Ключові слова: метанандамід, ERK1, ERK2, надниркові залози, статеві відмінності.

У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що метанандамід — метаболічно стійкий синтетичний аналог ендогенного канабіноїду анандаміду — залучений до регуляції стероїдогенезу та проявляє різноспрямований ефект на інтенсивність синтезу і секреції кортикостерону у щурів різної статі [1]. За результатами дослідження впливу метанандаміду на міжнуклеосомну фрагментацію ДНК в адренкортикоцитах самців і самиць щурів та позапухлинній тканині кори надниркових залоз хворих жінок і чоловіків із гормонально неактивними пухлинами також виявлено різний ефект сполуки залежно від статі та концентрації [2, 3]. Проте сигнальні шляхи, які опосередковують ефекти метанандаміду в адренкортикальній тканині, залишаються майже не дослідженими.

Відомо, що ендоканабіноїди можуть діяти через ERK1/2 [4, 5]. ERK (від англ. extracellular signal regulated kinase — кінза, що активується позаклітинними сигналами) — це група ферментів, які належать до родини MAP-кіназ, залучених до сигнальних механізмів, що регулюють проліферацію, диференціацію, ріст і виживання клітин [6]. ERK у клітині представлено декількома ізоформами, найбільш вивченими є ERK1 (379 амінокислотних залишків, Мг 44 кДа) і ERK2 (360 амінокислотних залишків, Мг 42 кДа), які на 85% ідентичні за амінокислотним складом і можуть компенсувати більшість функцій одна одної, хоча у деяких випадках показано їх антагоністичну дію [7]. Ці кінзи експресуються у клітинах різних типів, але рівень їх експресії різниться. Підвищення загальної активності ERK1/ERK2 спостерігається в тканині деяких злоякісних пухлин, зокрема раку шлунка, молочної залози, нирок, простати, сечового міхура, хондросаркоми, гліобластоми та недрібно-

* 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: levnataly@meta.ua

клітинного раку легень [6]. Проте участь ERK1/ERK2 в цих процесах на різному гормональному тлі не відома. Щодо надниркових залоз показано, що ця кіназа бере участь у регуляції синтезу кортикостероїдних гормонів [8].

З огляду на те, що анандамід є біологічно активною речовиною, яка бере участь у регуляції низки фізіологічних функцій, зокрема перебігу адаптаційних процесів, метою роботи було дослідити рівень експресії ERK1 і ERK2 та вплив на неї метанандамиду в адренкортикальній тканині щурів обох статей *in vitro*.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на статевозрілих щурах-самцях та щурах-самицях лінії Вістар масою 180-220 г. Під час проведення досліджень на тваринах дотримували принципів біоетики, законодавчих норм і вимог згідно з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних і наукових цілей» (Страсбург, 1986) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). На проведення досліджень було одержано дозвіл від комісії Інституту з питань біоетики.

Після декапітації тварин надниркові залози видаляли, очищали на льоду від жирової та сполучної тканин. Адренкортикальну тканину індивідуальних тварин нарізали на зрізи завтовшки $\approx 0,5$ мм гострим лезом і проводили їх інкубацію за 37°C впродовж 3 год із постійним струшуванням в 1 мл живильного середовища RPMI-1640 (20 ммоль/л HEPES і L-glutamine) (Sigma, США), що містило 5% бичачої сироватки (Sigma, США), за наявності розчину R(+)-метанандамиду в етанолі (Sigma, США) в кінцевій концентрації 10^{-8} - 10^{-6} моль/л. Після закінчення інкубації зрізи тканини гомогенізували у 2 об'ємах охолодженого лізуючого буферу з додаванням інгібітора протеїназ і фосфатаз (Sigma, США). Гомогенат центрифугували за 24100 g впродовж 10 хв, надосадові фракції зберігали до використання за -60°C .

Концентрацію загальних білків у гомогенатах тканини вимірювали за методом Бредфорд [9]. Розділення білків проводили за методом Леммлі [10]. На гель наносили по 40 мкг

білка на кожний трек. Перед нанесенням на гель проби змішували у співвідношенні 1:1 з буфером, який містив 100 ммоль/л трис-НСІ, 4% додецилсульфату натрію, 0,2% бромфенолового синього, 20% гліцерину, 2% 2-меркаптоетанолу, 10% дитіотреїтолу, та кип'ятили на водяній бані впродовж 5 хв. Електрофорез білків у 12,5% поліакриламідному гелі проводили за постійного струму 45 mA.

Після завершення електрофорезу гель відмивали від додецилсульфату натрію в буфері (25 ммоль/л Трис, 150 ммоль/л гліцин, рН 8,0, 20% метанол) та переносили протеїни на нітроцелюлозну мембрану Hybond C (Amersham Life Science, Великобританія) впродовж 2 год шляхом електроперенесення напівсухим способом (45 mA). Після цього нітроцелюлозну мембрану відмивали в буфері PBS-T (1,7 ммоль/л KH_2PO_4 , 5,2 ммоль/л Na_2HPO_4 , 150 ммоль/л NaCl, 0,1% Твін-20, рН 7,4) та блокували 5% розчином молока, аби запобігти неспецифічному зв'язуванню антитіл. Нітроцелюлозну мембрану промивали тричі по 5 хв буфером PBS-T та інкубували з первинними антитілами до ERK1/2 (1:1000, Sigma, США), специфічними до відповідного білка, впродовж ночі за 40°C .

Після триразового відмивання мембрани PBS-T буфером від залишків первинних антитіл проводили інкубацію з вторинними антитілами (антикроляче антитіло) (1:2000, Sigma, США), міченими пероксидазою хрому, впродовж 1 год за кімнатної температури, після чого нітроцелюлозну мембрану відмивали тричі буфером PBS-T. Комплекси білків з антитілами візуалізували за допомогою розчину, який містив кумарову кислоту — 0,06 мг/мл, люмінал — 0,44 мг/мл, перекис водню 0,03% і 0,1 моль/л Трис-НСІ (рН 8,7). Мембрану експонували на рентгенівській плівці, яку проявляли, використовуючи стандартні реактиви для проявлення рентгенівських плівок (ОНІКО, Україна). Оптико-денситометричний аналіз проводили з використанням програмного забезпечення (програма Gel Pro Analyzer v. 4.0).

З метою контролю рівномірності нанесення білка на гель використовували антитіла до β -актину (1:50000, Sigma, США).

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням непараметричного U-критерію Вілкоксона-Манна-Уїтні. Вірогідно значущою вважали різницю за $p \leq 0,05$.

Оригінальні дослідження

Результати та їх обговорення

Дані, наведені в табл. і на рис., свідчать про різний рівень експресії кіназ у тканині надниркових залоз щурів різної статі. Так, експресія ERK1 і ERK2 є вірогідно нижчою в адренкортикальній тканині самиць (у 3,3 та 1,9 раза відповідно) порівняно з тканиною надниркових залоз самців. Наші дані узгоджуються з результатами інших досліджень, в яких показано, що у самиць мишей рівень фосфорильованих ERK1/2 в тканині надниркових залоз був на 50% нижчим порівняно з рівнем цих кіназ в адренкортикальній тканині самців, незважаючи на те, що у статевозрілих самиць розмір залози вдвічі більший. При чому слід зазначити, що зі збільшенням

Таблиця. Кількісна оцінка рівня експресії вільних форм ERK1 і ERK2 та ефекту метанандаміду *in vitro* на рівень їх експресії в тканині надниркових залоз щурів різної статі (умовні одиниці) (n=3)

Кіназа	Контрольна проба	Концентрація метанандаміду (моль/л)		
		10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶
Щури-самці				
ERK1	0,23 (0,13-0,34)	0,31 (0,19-0,48)	0,29 (0,16-0,44)	0,28 (0,16-0,41)
ERK2	0,31 (0,25-0,39)	0,35 (0,32-0,38)	0,37 (0,30-0,47)	0,38 (0,30-0,49)
Щури-самиці				
ERK1	0,07* (0,04-0,11)	0,06* (0,04-0,09)	0,06* (0,05-0,09)	0,06* (0,05-0,07)
ERK2	0,16* [#] (0,12-0,24)	0,17* (0,12-0,25)	0,17* (0,12-0,24)	0,16* (0,12-0,21)

Примітка: наведені середні арифметичні та межі коливань; нормалізацію здійснювали за вмістом β-актину. *—*p* = 0,05 — різниця вірогідна порівняно із вмістом ERK1 у тканині надниркових залоз щурів-самців; & — *p* = 0,05 — різниця вірогідна порівняно із вмістом ERK2 в тканині надниркових залоз щурів-самців; # — *p* = 0,05 — різниця вірогідна порівняно із вмістом ERK1 у тканині надниркових залоз щурів-самиць.

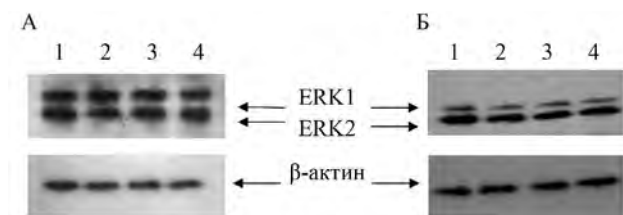


Рис. Вестерн-блот аналіз рівня експресії вільних форм ERK1 і ERK2 і дослідження ефекту метанандаміду в тканині надниркових залоз самців (А) і самиць (Б) щурів (один типовий дослід із трьох).

- 1 — контроль;
2-10⁻⁸ моль/л метанандаміду;
3-10⁻⁷ моль/л метанандаміду;
4-10⁻⁶ моль/л метанандаміду.

віку тварини (з 3-го по 11-й тиждень) рівень експресії фосфорильованої форми ERK1/2 не змінюється [11]. Це може непрямо свідчити, що активація ERK1/2 не залежить від змін гормонального тла впродовж естрального циклу. Статеві відмінності активації ERK1/2 також було відзначено й у мозку мишей, проте рівень експресії фосфорильованої форми у цій тканині самиць був вищим, ніж у самців [12].

Водночас введення трансгенним за гормоном росту самцям мишей АКТГ у віці 11 тижнів призводило до зменшення рівня фосфорильовання ERK1/2 та індукції росту надниркових залоз [11]. Показано, що рівень АКТГ у самиць та самців щурів не має статевих відмінностей, а у самиць не залежить від фази естрального циклу. Проте низка авторів висловили припущення, що і сам АКТГ бере участь у регуляції активації ERK1/2 в адренкортикальній тканині самиць [11] і самців [13].

Як видно з даних таблиці, рівень експресії ERK1 і ERK2 в тканині надниркових залоз самиць різний, зокрема експресія ERK2 є у 2,3 раза вищою порівняно з експресією ERK1. На відміну від самиць, у тканині надниркових залоз самців статистично вірогідної різниці між рівнями цих кіназ не спостерігали. Хоча експресія ERK1 і ERK2 притаманна клітинам усіх типів, проте рівень їх експресії може різнитися. Так, у клітинах мозку людини, а також гемопоетичних клітинах рівень ERK2 є вищим [7] порівняно з ERK1, тоді як у клітинах слизової оболонки товстої кишки щурів спостерігали протилежну тенденцію [14]. Зважаючи на отримані нами дані (табл.), можна припустити, що рівень ERK1 і ERK2, а також їх співвідношення залежать не лише від типу клітин, але й від статі тварин.

Під час дослідження впливу метанандаміду встановлено, що інкубація зрізів адренкортикальної тканини самців і самиць щурів із метанандамідом у різних концентраціях впродовж трьох годин не приводила до вірогідних змін рівня експресії ERK1 і ERK2 порівняно з контрольною пробою. Водночас статеві відмінності експресії цих кіназ у тканині надниркових залоз за дії метанандаміду не змінюються.

Раніше нами було показано, що метанандамід проявляє різноспрямований ефект на інтенсивність стероїдогенезу, міжнуклеосомну фрагментацію ДНК, рівень холестерину у тканині надниркових залоз щурів і людей різної статі [1, 2, 3,

15]. Зважаючи на це та на дані цієї роботи, важко зробити остаточний висновок щодо залучення ERK1 і ERK2 в механізми дії метанандаміду. Ми висловили припущення, що встановлений нами апоптоз у тканині надниркових залоз реалізується без участі ERK1 і ERK2. Натомість не можна виключити і можливості дії метанандаміду на фосфорилування ERK1/2 та участі фосфорильованих продуктів у зміні регуляції апоптозу в тканині надниркових залоз.

Список використаної літератури

1. Левчук Н.І. Вплив метанандаміду на стероїдогенез в адренокортикоцитах щурів *in vitro* / Н.І. Левчук // Укр. біохім. журн. — 2013. — Т. 85, № 4. — С. 90-93. (Levchuk N.I. Influence of methanandamide on steroidogenesis in rat adrenocorticoocytes *in vitro* / N.I. Levchuk // Ukr. Biochem. J. — 2013. — Vol. 85, № 4. — P. 90-93).
2. Левчук Н.І. Вплив різних концентрацій метанандаміду на інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК в адренокортикоцитах щурів *in vitro* / Н.І. Левчук // Ендокринологія. — 2013. — Т. 18, № 2. — С. 60-64. (Levchuk N.I. Effect of different methanandamide concentrations on the intensity of internucleosomal DNA fragmentation in adrenocorticoocytes of rats *in vitro* / N.I. Levchuk // Endokrynologia. — 2013. — Vol. 18, № 2. — P. 60-64).
3. Левчук Н.І. Статеві відмінності впливу метанандаміду *in vitro* на інтенсивність міжнуклеосомної фрагментації ДНК в позапуплинній тканині кори надниркових залоз від хворих з гормонально неактивними пухлинами / Н.І. Левчук, О.І. Ковзун, М.Д. Тронько // Журн. НАМН України. — 2014. — Т. 20, № 2. — С. 252-256. (Levchuk N.I. 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 // Zhurn. NAMN Ukrainy. — 2014. — Vol. 20, № 2. — P. 252-256).
4. Mechanism of extracellular signal-regulated kinase activation by the CB(1) cannabinoid receptor / I. Galve-Roperh, D. Rueda, T. Gomez del Pulgar [et al.] // Mol. Pharmacol. — 2002. — Vol. 62, № 6. — P. 1385-1392.
5. Regulation of MAP kinase-directed mitogenic and protein kinase B-mediated signaling by cannabinoid receptor type 1 in skeletal muscle cells / C. Lipina, C. Stretton, S. Hastings [et al.] // Diabetes. — 2010. — Vol. 59, № 2. — P. 375-385.
6. Tuncay S. MAPK3 (mitogen-activated protein kinase 3) / S. Tuncay, S. Banerjee // Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol. — 2010. — Vol. 14, № 11. — P. 1011-1015.
7. ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially / C. Vantaggiato, I. Formentini, A. Bondanza [et al.] // J. Biol. — 2006. — Vol. 5, article 14.
8. Extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) signaling pathway plays a role in cortisol secretion in the long-term hypoxic ovine fetal adrenal near term / V.E. Vargas, K.M. Kaushal, T.R. Monau [et al.] // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. — 2013. — Vol. 304. — P. R636-R643.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248-254.
10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680-685.
11. Decreased p44/42 mitogen-activated protein kinase phosphorylation in gender- or hormone-related but not during age-related adrenal gland growth in mice / M. Bielohuby, M. Sawitzky, I. Johnsen [et al.] // Endocrinology. — 2009. — Vol. 150, № 3. — P. 1269-1277.
12. Sex differences in oestrogen-induced p44/42 MARK phosphorylation in the mouse brain *in vivo* / K. Barabas, E.M. Szego, A. Kaszas [et al.] // J. Neuroendocrinol. — 2006. — Vol. 18. — P. 621-628.
13. Регулятори функції кори надниркових залоз / М.Д. Тронько, О.С. Микоша, О.І. Ковзун, В.М. Пушкар'юв. — К.: «Доктор-Медіа», 2009. —

- 244 с. (Regulators of adrenocortical function / M.D. Tronko, O.S. Mikosha, O.I. Kovzun, V.V. Pushkarev. — К.: «Doctor-Media», 2009. — 244 p.
14. Афіцька К. Активация ERK1/2 та p-38 MAP-кіназних шляхів у товстий киши щурів за дії стресу / К. Афіцька, В. Кухарський, Г. Толстанова // Вісник КНУ імені Тараса Шевченка. Серія «Біологія». — 2012. — Т. 61. — С. 37-39. (Afitska K. Activation of ERK1/2 and p-38 MAP kinase pathways in colon of rats under the influence of stress / K. Afitska, V. Cukharskii, H. Tolstanova // Visnyk KNU imeni Tarasa Shevchenka. Seria «Biologia». — 2012. — Vol. 61. — P. 37-39).
 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, 506-509. (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 // Endokrynologia. 2015, 20, N 2, 506-509).

(Надійшло до редакції 13.11.2015 р.)

Половые различия экспрессии ERK в надпочечниках крыс

Н.И. Левчук, О.С. Лукашениа, А.С. Микоша, Е.И. Ковзун

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

Резюме. Исследовали уровень экспрессии ERK1 и ERK2, а также влияние *in vitro* на него различных концентраций метанандамида в ткани надпочечников самок и самцов крыс. Установлен разный уровень экспрессии ERK1 и ERK2 в аденокортикальной ткани крыс разного пола: в ткани надпочечников самок крыс уровень экспрессии ERK1 и ERK2 был достоверно ниже по сравнению с аденокортикальной тканью самцов. Также у самок отмечен более высокий уровень экспрессии ERK2, в отличие от ERK1. Выявленная разница может быть связана с влиянием половых гормонов на синтетические процессы в клетке. Метанандамид не влиял на уровень экспрессии ERK1 и ERK2 в ткани надпочечников крыс разного пола.

Ключевые слова: метанандамид, ERK1, ERK2, надпочечники, половые различия.

Sex differences of expression ERK in rat adrenal gland

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

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

Summary. The expression level of ERK1 and ERK2, and the effect of various methanandamide concentrations on it in the adrenal gland tissue of female and male rats were investigated *in vitro*. The different levels of ERK1 and ERK2 expression in the adrenocortical tissue of different sex rats were established: the expression level of ERK1 and ERK2 was significantly lower in the adrenal glands of female rats compared with the adrenocortical tissue of male rats. The higher levels of ERK2 expression was also observed in female rats in contrast to ERK1. The observed difference may be due to the influence of sex hormones on synthetic processes in the cell. Metandamide did not effect on the level of ERK1 and ERK2 expression in the adrenal tissue of different sex rats.

Keywords: metandamide, ERK1, ERK2, adrenal glands, rats, sex differences.