

**ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
«ІНСТИТУТ ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ РЕЧОВИН
ІМ. В.П. КОМІСАРЕНКА НАМН УКРАЇНИ»**

ЛУКАШЕНЯ Оксана Сергіївна

УДК 612.453.018:616.453

**УЧАСТЬ СИСТЕМИ ГЕНЕРАЦІЇ ОКСИДУ АЗОТУ,
ПРОТЕЇНКІНАЗНИХ СИСТЕМ ТА ЯДЕРНИХ
ТРАНСКРИПЦІЙНИХ ФАКТОРІВ В РЕГУЛЯЦІЇ ФУНКЦІЇ
КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ**

14.01.14 – ендокринологія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

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

Науковий керівник

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Ковзун Олена Ігорівна**, ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», головний науковий співробітник відділу фундаментальних та прикладних проблем ендокринології, заступник директора з наукової роботи

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор **Горбенко Наталія Іванівна**, ДУ «Інститут проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України», завідувач відділу експериментальної фармакології та токсикології

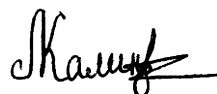
кандидат медичних наук, доцент **Полозова Любов Георгіївна**, Харківська медична академія післядипломної освіти, доцент кафедри ендокринології та дитячої ендокринології

Захист відбудеться «___» _____ 2018 р. о ___ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.558.01 з ендокринології в ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України» (04114, м. Київ-114, вул. Вишгородська, 69)

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України» (04114, м. Київ-114, вул. Вишгородська, 69)

Автореферат розісланий «___» _____ 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
доктор біологічних наук



Л.М. Калинська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. В останні роки велику зацікавленість викликає інформація стосовно численних нових учасників внутрішньоклітинних сигнальних систем, а це дає підстави для якісного перегляду звичних і дуже часто спрощених уявлень в галузі молекулярної ендокринології. Завдяки значним успіхам, які були досягнуті протягом останніх десяти років в розшифровці механізмів білково-білкових взаємодій, відповідальних за збирання сигнальних молекул в окремі месенджерні шляхи, стало зрозумілим, що здатність клітин регулювати просторово розділені функції обумовлена організацією сигнальних шляхів в мережі.

По мірі поглиблення нашого розуміння деталей такої функціональної організації і переходу на наступний рівень аналізу взаємопов'язаних клітинних функцій, повстає надзвичайно важлива проблема виявлення та вивчення властивостей сигнальних мереж в цілому. Від відповіді на ці та інші взаємопов'язані питання в значній мірі буде залежати, в якому напрямку буде розвиватись фундаментальна біологічна наука і які стратегічні підходи буде використовувати медицина в майбутньому. В даний час в класифікації мають потребу вже не тільки первинні регулятори функції ендокринних залоз, але ще в більшому ступені – шляхи і механізми опосередкування сигналів, які вони запускають в клітині.

За класичними уявленнями, механізм дії основних регуляторів стероїдогенезу включає сАМР-залежний каскад протеїнкінази А, який є основним шляхом трансдукції сигналів кортикотропіну [Vinson G.P. et al., 1992; Gallo-Payet N., 2016], та фосфоінозитидний каскад із залученням протеїнкінази С, який забезпечує перенесення сигналу ангіотензину II [Nakano S. et al., 1990; Тронько М.Д. та ін., 2009].

З часом з'явилися докази, що регуляторна дія адренкортикотропного гормону (АКТГ) в корі надниркових залоз також може забезпечуватись месенджерним каскадом протеїнкінази С [Shimada T. et al., 2007; Gallo-Payet N., 2016], була з'ясована роль сигнального шляху Ras/Raf/MAPK в регуляції функції адренкортикоцитів (зокрема, кінази JNK та ядерного фактора транскрипції c-jun) [Ковзун О.І., 2007]. Поліморфність протеїнкіназних каскадів є притаманною для внутрішньоклітинної сигналізації ангіотензину II, а також інших регуляторів стероїдогенезу: іонів калію, естрогенів, ацильованих похідних етанол аміну [Тронько М.Д. та ін., 2009].

Таким чином, постійно зростає як перелік модуляторів адренкортикальної функції, так і механізмів сигнальної трансдукції. Отже, регуляція функції кори надниркових залоз в організмі на сьогодні виглядає значно складнішою, ніж це уявлялося раніше. Системи трансдукції сигналу, їх взаємодія, включення внутрішньоядерних механізмів забезпечують адекватну регуляцію функції адренкортикоцитів. У зв'язку з цим стає зрозумілим, що простеження поетапної трансдукції різних сигналів в адренкортикоцитах є важливим питанням молекулярної ендокринології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота проводилась в рамках наукових тем лабораторії гормональної регуляції обміну речовин відділу фундаментальних та прикладних проблем ендокринології ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»: «Вивчити внутрішньоклітинні месенджерні механізми регуляції функції гіпоталамо-гіпофізарно-адренокортикальної системи» 2011-2013 рр. (№ держреєстрації 0111U002343), «Дослідження ролі ядерних транскрипційних чинників у опосередкуванні зовнішніх регуляторних впливів в пухлинних клітинах ендокринного походження» 2014-2016 рр. (№ держреєстрації 0114U002155).

Мета дослідження. Дослідити основні ланки сигнальної трансдукції: системи протеїнкіназ, ядерних транскрипційних чинників, системи генерації оксиду азоту (NO) у перенесенні регуляторних сигналів агоністів (іонів калію і літію, естрогенів, N-ацильованих похідних етаноламіну (NAE)) в аденокортикоцитах.

Завдання дослідження:

1. Охарактеризувати месенджерні системи, що здійснюють трансдукцію регуляторних сигналів в клітинах кори надниркових залоз:
 - система мітоген-активованих протеїнкіназ (МАРК);
 - система кінази глікогенсинтази (GSK-3 β).
2. Провести аналіз участі ядерних транскрипційних чинників у процесах проліферації та апоптозу, що активуються агоністами.
3. З'ясувати стан системи генерації оксиду азоту в надниркових залозах та її значення в процесах регуляції стероїдогенезу.
4. Дослідити процеси сигнальної трансдукції в корі надниркових залоз за участі іонів калію, літію, естрадіолу, N-ацильованих похідних етаноламіну.
5. Визначити роль факторів, що контролюють процеси стероїдогенезу (білок-регулятор швидкої стадії стероїдогенезу (StAR), цитохром P450_{scc}).

Об'єкт дослідження. Внутрішньоклітинні сигнальні системи, залучені до перенесення регуляторних сигналів модуляторів функції кори надниркових залоз.

Предмет дослідження. Системи пострецепторного перенесення сигналів в аденокортикоциті: протеїнкінази, що активуються мітогенами, кіназа глікогенсинтази, система оксиду азоту, ядерні транскрипційні чинники.

Методи дослідження. У роботі було використано біохімічні (спектрофотометрія, спектрофлуориметрія, електрофорез горизонтальний та ін.), молекулярно-біологічні (екстракція нуклеїнових кислот, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)), імунологічні (імуноблотинг), статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Розширено концепцію мультифакторної регуляції аденокортикальної функції за участю різних систем сигнальної трансдукції в клітинах кори надниркових залоз. Показано, що суттєва роль у трансдукції сигналу в аденокортикоцитах належить сигнальному каскаду протеїнкіназ, що активуються мітогенами, а саме кіназі

ERK1/2, яка бере участь у перенесенні сигналів літію, та ядерним факторам транскрипції c-jun та c-fos, експресія яких змінюється за дії ацильованих похідних етаноламіну.

З'ясовано участь протеїнкінази GSK-3 β в реалізації дії іонів калію. Ця протеїнкіназа є важливим регулятором проліферативних процесів, апоптозу, диференціації, транспорту глюкози та інших біохімічних процесів.

Проаналізовано експресію синтаз оксиду азоту в адренкортикоцитах людини. Система генерації оксиду азоту в клітинах кори надниркових залоз змінюється за дії іонів калію, літію та естрогенів.

На клітинах кори надниркових залоз людини показано зміни експресії мРНК цитохрому P450_{sc} і білка-регулятора швидкої стадії стероїдогенезу (StAR) під впливом іонів калію.

Обґрунтованість і достовірність наукових положень, висновків і рекомендацій. Положення, висновки і рекомендації базуються на достатній кількості спостережень (загалом залучено 61 тварину, а також постопераційні тканини 27 пацієнтів, які були прооперовані в клініці інституту з приводу патології надниркових залоз і підписали інформовану згоду на добровільну участь у науковому дослідженні), використані сучасні адекватні завданням методи дослідження (біохімічні, молекулярно-біологічні) та їх математична обробка з використанням методів статистики за допомогою стандартного пакета для статистичних розрахунків Microsoft Office Excel, 2010.

Отримані дані проаналізовані, порівняні та обговорені з урахуванням даних літератури за останні 10 років. Висновки базуються на даних виконаного дослідження.

Наукове значення роботи. На підставі експериментального дослідження розширено концепцію взаємодії між різними системами сигнальної трансдукції (протеїнкіназ ERK і GSK-3 β , синтаз оксиду азоту (NOS), транскрипційних чинників фосфо-c-jun, c-jun, c-fos), які опосередковують внутрішньоклітинне перенесення сигналів регуляторів та модуляторів функції кори надниркових залоз: іонів калію і літію, естрогенів, NAE. Ці ланки сигнальних каскадів є важливими для розуміння молекулярно-біологічних процесів, що лежать в основі патології надниркових залоз, та можуть увійти до системи знань, яка необхідна для подальшої розробки методів лікування.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи доводять участь низки сигнальних молекул в регуляції процесів росту та трансформації в клітинах кори надниркових залоз. Отримані дані можуть бути використані в розробці нових підходів до корекції трофічних та функціональних процесів в надниркових залозах за умов патології.

Особистий внесок здобувача. Всі результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі. Робота виконана автором відповідно до програми наукових досліджень, спланованих, проведених і узагальнених протягом 2011-2017 рр. у лабораторії гормональної регуляції обміну речовин відділу фундаментальних та прикладних проблем

ендокринології ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України». Дисертантом особисто здійснено пошук та аналіз літературних джерел, розроблено методичні підходи. Текст дисертаційної роботи написано здобувачем особисто. Головні завдання роботи, а також основні наукові положення дисертації і висновки сформульовано разом з науковим керівником – доктором біол. наук О.І. Ковзун. Співучасть співробітників відділу фундаментальних та прикладних проблем ендокринології у виконанні роботи відображено у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Головні положення дисертаційної роботи були представлені та обговорені на VIII з'їзді Асоціації ендокринологів України (Київ, 2014), XI Українському біохімічному з'їзді (Київ, 2014), VII Національному конгресі патофізіологів України (Харків, 2016).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 11 робіт, з яких 7 – статті у фахових наукових журналах (з них одна у закордонному виданні та 5 – у фахових наукових журналах, внесених до міжнародних наукометричних баз), 4 – тези доповідей у матеріалах наукових з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертацію викладено на 131 сторінці друкованого тексту. Робота складається із вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, 5 розділів результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, який налічує 249 посилань і займає 26 сторінок. Текст дисертації проілюстровано 16 рисунками та 6 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень. В дослідях використовували післяопераційні тканини надниркових залоз 27 хворих, прооперованих у клініці ДУ «Інституту ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України». Дослідження проведено на пухлинах і ділянках візуально незміненої тканини (позапухлинна тканина) кори надниркових залоз. В роботі також були використані експериментальні тварини (всього 61) – самки та самці щурів лінії Вістар масою 170-260 г, самці морських свинок масою 260-500 г. Утримання та використання тварин здійснювали згідно біоетичних вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (м. Страсбург, 1986 р.).

Детекцію протеїназ, факторів транскрипції проводили імуноблот-аналізом із використанням моноклональних та поліклональних антитіл [Kurien V.T., Scofield R.H., 2006]. Розділені методом електрофорезу у поліакриламідному гелі за присутності додецилсульфату натрію білки [Laemmli U.K., 1970] переносили на нітроцелюлозну мембрану напівсухим способом. Після інкубації з первинними і вторинними антитілами імунні

комплекси візуалізували за допомогою реагенту ECL. Після денситометричного визначення інтенсивності засвічення рентгенівської плівки результати обробляли у програмі «Gel Pro Analyzer».

Екстракцію ДНК із зрізів проводили, послідовно інкубуючи адренкортикальну тканину з протеїназою К та рибонуклеазою А [Kostyuchenko N. et al., 2005]. Депротейнізацію проводили сумішшю хлороформ : ізоаміловий спирт (24 : 1). ДНК осаджували з водної фази етанолом. Екстракцію РНК проводили, використовуючи реагент TRIzol LS («Invitrogen», США).

Реакцію зворотної транскрипції проводили в реакційній суміші, що містила: стандартний буфер для ПЛР, хлористий магній, суміш дНТФ, а саме АТФ, ТТФ, ГТФ, ЦТФ, інгібітор РНКаз, зворотну транскриптазу, суміш випадкових гексамерів та 1 мкг екстрагованої РНК. Інкубація в термоциклері проводилась за таких умов: 22 °С – 10 хв, 42 °С – 15 хв, 99 °С – 5 хв, 4 °С – 5 хв.

Реакцію ПЛР проводили в суміші, що містила: стандартний буфер для ПЛР, прямий та зворотний праймери до Вах («Sigma», США), прямий та зворотний праймери до StAR і цитохрому P450_{sc} («Sigma», США), прямий та зворотний праймери до ендотеліальної NOS (eNOS) та індукбельної NOS (iNOS) («Sigma», США), комплементарну ДНК, одержану в результаті реакції зворотної транскрипції. Умови інкубації: (eNOS, iNOS) 94 °С – 1 хв, 55 °С – 30 с, 72 °С – 1 хв, а потім температуру знижували до 4 °С, 35 циклів; (Вах) 94 °С – 45 с, 53 °С – 45 с, 72 °С – 1,5 хв, 4 °С, 30 циклів; (StAR) 94 °С – 45 с, 55 °С – 75 с, 72 °С – 15 с, 4 °С, кількість циклів становила 27; (цитохром P450_{sc}) 94 °С – 45 с, 53 °С – 45 с, 72 °С – 1,5 хв, 4 °С, 30 циклів. Продукти ПЛР аналізували в 1,7 % агарозному гелі.

Концентрацію 11-гідроксикортикостероїдів визначали за флуориметричним методом De Moore у модифікації Ю.Г. Балашова [Балашов Ю.Г., 1990].

Впродовж всієї роботи використовували калію хлорид, літію хлорид («Merck», Німеччина), естрадіол бензоат («Koch-Ligth», Велика Британія), R(+)-метанандамід («Sigma», США). Суміш N-ацилетаноламінів (NAЕс більш ніж на 60 % складала ацили ненасичених жирних кислот) було синтезовано в Інституті біології моря (Владивосток, Російська Федерація).

У роботі були використані антитіла до протеїнкіназ GSK-3 β і ERK1/2; факторів транскрипції – c-jun, фосфо-c-jun, c-fos; бета-актину («Sigma» або «Cell Signaling Technology», США); IgG, кон'юговані з пероксидазою хрому («Sigma», США), нітроцелюлозна мембрана Hybond C та реагенти для посиленої хемілюмінесценції («Amersham Life Science», Велика Британія), набори для проведення полімеразної ланцюгової реакції, агароза, трис, протеїназа К, рибонуклеаза А («Sigma», США), усі солі, NaOH, HCl («Merck», Німеччина).

Експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики за допомогою програми Excel. Для характеристики генеральної сукупності

вираховували середнє значення M та середню похибку m . Різницю між двома вибірками визначали за параметричним t -критерієм Стьюдента, непараметричним U -критерієм Вілкоксона-Манна-Уїтні. Різницю вважали вірогідною при рівні значимості $P \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення.

Дослідження було розпочато з вивчення змін експресії мРНК двох найважливіших протеїнів, що відіграють вирішальну роль в регуляції процесу стероїдогенезу (StAR та цитохрому P450_{scc}) та їх ролі у перенесенні сигналу іонів калію в адренкортикоцитах. Як показано на рисунках 1 та 2, підвищення рівня мРНК StAR та цитохрому P450_{scc} мало виражену пряму залежність від концентрації калію.

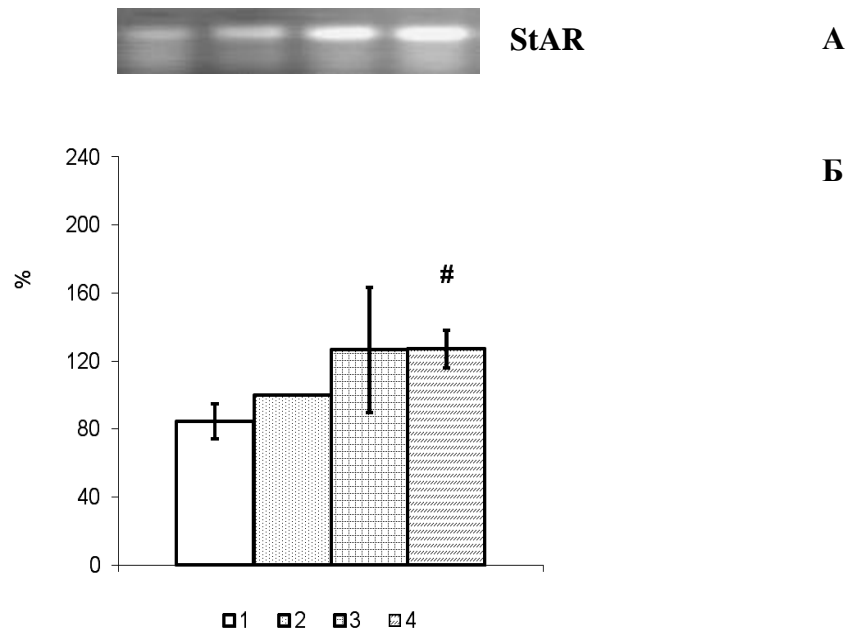


Рис. 1. Рівень експресії мРНК StAR у позапухлинній тканині кори надниркових залоз людини за дії іонів калію

Примітки: А – електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР із використанням праймерів до StAR; Б – кількісна характеристика експресії мРНК. 1 – середовище без калію, 2 – контроль, фізіологічна концентрація 3,5 ммоль/л KCl, 3 – 5,5 ммоль/л KCl, 4 – 8,5 ммоль/л KCl. # – різниця з контролем є вірогідною ($p \leq 0,05$, $M \pm m$, $n = 4$, U -критерій).

В різних тканинах, які продукують стероїди, білок-регулятор гострої фази стероїдогенезу StAR є одним з найважливіших субстратів протеїнкіназ [Stocco D.M., 2001; Stocco D.M. et al., 2017]. Фосфорилування StAR посилюється під дією кортикотропіну та є cAMP-залежним каскадом протеїнкінази А. Регуляція експресії StAR та цитохрому P450_{scc} має складний багаторівневий характер і контролюється на всіх етапах біосинтезу: від транскрипції до стабілізації білка. Методом ПЛР у реальному часі були знайдені транскрипти мРНК StAR та стероїдогенних ферментів як у

фетальних стероїдогенних органах, так і в інших органах, що не мають відношення до стероїдогенезу, таких як мозок, печінка, легені [Pezzi V., 2003].

Таким чином, отримані результати дозволяють зробити висновок, що в разі дії іонів калію на кору надниркових залоз *in vitro* до посилення процесів стероїдогенезу залучені механізми впливу на рівень експресії білка-регулятора швидкої фази стероїдогенезу та цитохрому P450_{scc}, які можуть реалізуватись на рівні мРНК. Суттєве зростання рівня мРНК StAR у клубочковій зоні спостерігали за дії надлишку калію *in vivo* у щурів, які отримували дієту з вмістом 4 % хлориду калію [Peters B., 2007].

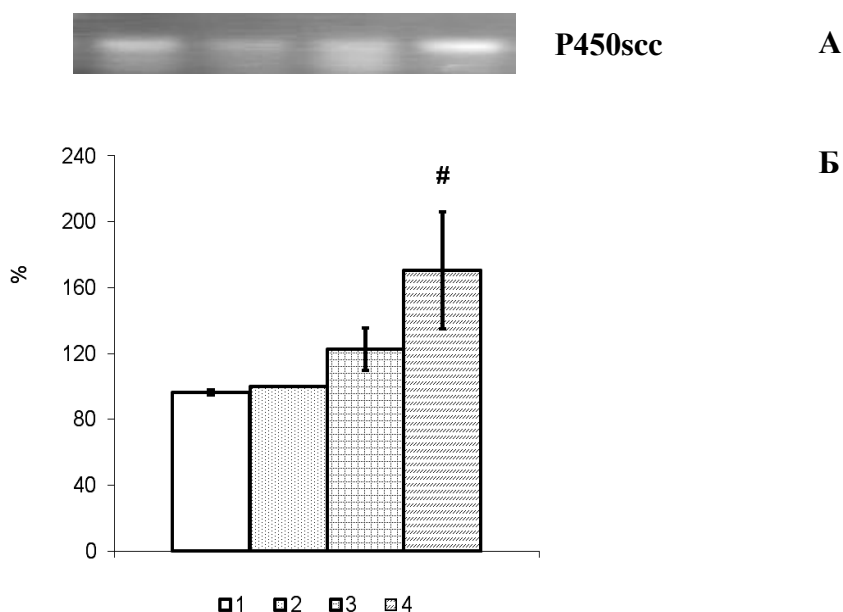


Рис. 2. Рівень експресії мРНК цитохрому P450_{scc} в умовно нормальній тканині кори надниркових залоз людини за дії іонів калію

Примітки: А – електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР-реакції із використанням праймерів до цитохрому P450_{scc}; Б – кількісна характеристика експресії мРНК. 1 – середовище без калію, 2 – контроль, фізіологічна концентрація 3,5 ммоль/л КСІ, 3 – 5,5 ммоль/л КСІ, 4 – 8,5 ммоль/л КСІ. # – різниця з контролем є вірогідною ($p \leq 0,05$, $M \pm m$, $n = 3$, U-критерій).

Однією з важливих ланок механізму внутрішньоклітинного переносу сигналів агоністів є зміни у активності кінази глікогенсинтази. Тому наступним етапом наших досліджень було вивчення залучення цієї кінази у перенесення регуляторних сигналів іонів калію в адренкортикоцитах.

Кіназа глікогенсинтази-3 β , ідентифікована як регулятор метаболізму глікогену, зараз розглядається як важливий компонент сигнального шляху Wnt/бета-катенін, регулятор білкового синтезу, проліферації, диференціації, рухливості клітин та апоптозу [Hermida M.A. et al., 2017].

Високі концентрації калію (які призводять до стимуляції синтезу кортикостероїдів) призводять до зменшення кількості GSK-3 β вдвічі.

Навпаки, при концентрації калію нижче за фізіологічний (0,5 ммоль/л) рівень кінази глікогенсинтази зростає втричі (рис. 3).

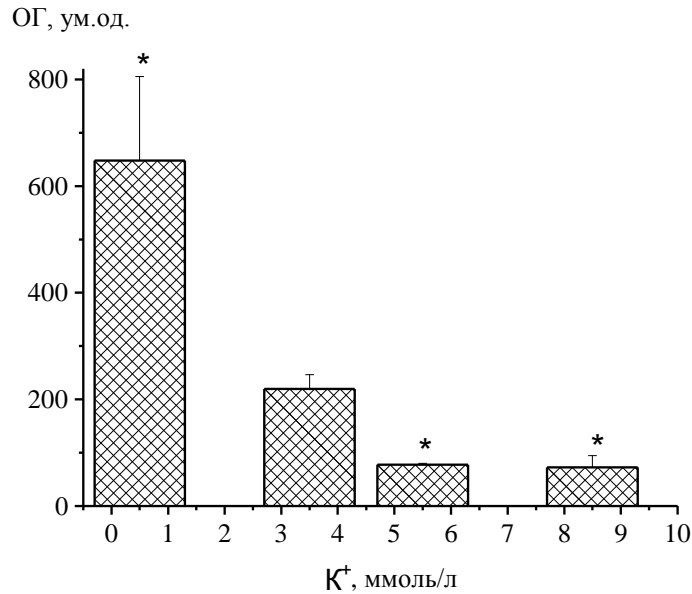


Рис. 3. Вплив іонів калію на експресію GSK-3 β в адренкортикоцитах морських свинок

Примітки: Кількість GSK-3 β визначали методом Вестерн-блотингу. Вісь ординат – оптична густина в умовних одиницях. * – відміни від контролю (3,5 ммоль/л K⁺) вірогідні, $p < 0,05$. $M \pm m$, $n = 6$, t-критерій Стьюдента.

Можна надати два пояснення отриманих результатів: по-перше, низькі концентрації калію в інкубаційному середовищі здатні гальмувати синтез альдостерону [Пушкарьов В.М., 2005], а збільшення кількості GSK-3 β при 0,5 ммоль/л калію може бути конкретним механізмом такого гальмування.

По-друге, зростання кількості кінази глікогенсинтази може бути реакцією адренкортикоцита на зменшення вмісту калію у середовищі.

У літературі приводяться суперечливі дані щодо впливу хлориду літію на процеси стероїдогенезу, тому ми дослідили вплив різних концентрацій хлориду літію *in vitro* на секрецію 11-гідрокортикостероїдів. Результати досліджень показали, що хлорид літію в концентрації 5 ммоль/л не впливав на інтенсивність синтезу кортикостероїдних гормонів у позапухлинній тканині кори надниркових залоз людини, хоча у концентрації 10 ммоль/л спостерігали вірогідне підвищення (на 38 %) вмісту 11-гідрокортикостероїдів у середовищі інкубації. Таким чином, отримані нами результати свідчать про стимулюючий вплив хлориду літію на процеси стероїдогенезу *in vitro* у позапухлинній тканині кори надниркових залоз людини.

Наступним етапом наших досліджень було вивчення залучення системи оксиду азоту до процесів регуляції функції надниркових залоз. Конститутивний синтез NO є одним з ключових чинників регуляції судинного тонуусу, нейротрансмісії і ряду інших функцій цієї молекули. Так,

оксид азоту, синтезований при дії eNOS, гальмує транскрипцію прозапального ядерного фактора NF-kB, блокує експресію адгезивних молекул ендотелію, інфільтрацію, агрегацію нейтрофілів і моноцитів та перетворення останніх у макрофаги, гальмує агрегацію та адгезію тромбоцитів [Pechanova O., Simko F., 2010]. Тому наступним етапом дослідження було встановлення експресії ізоформ NOS в корі надниркових залоз людини і визначення впливу іонів калію та літію на їх експресію. За нашими даними, підвищення концентрації іонів калію стимулює експресію обох ізоформ NOS в адренкортикальній тканині людини (рис. 4). Проте рівень мРНК iNOS збільшується в кілька разів інтенсивніше, ніж рівень мРНК eNOS (рис. 4 А, Б).

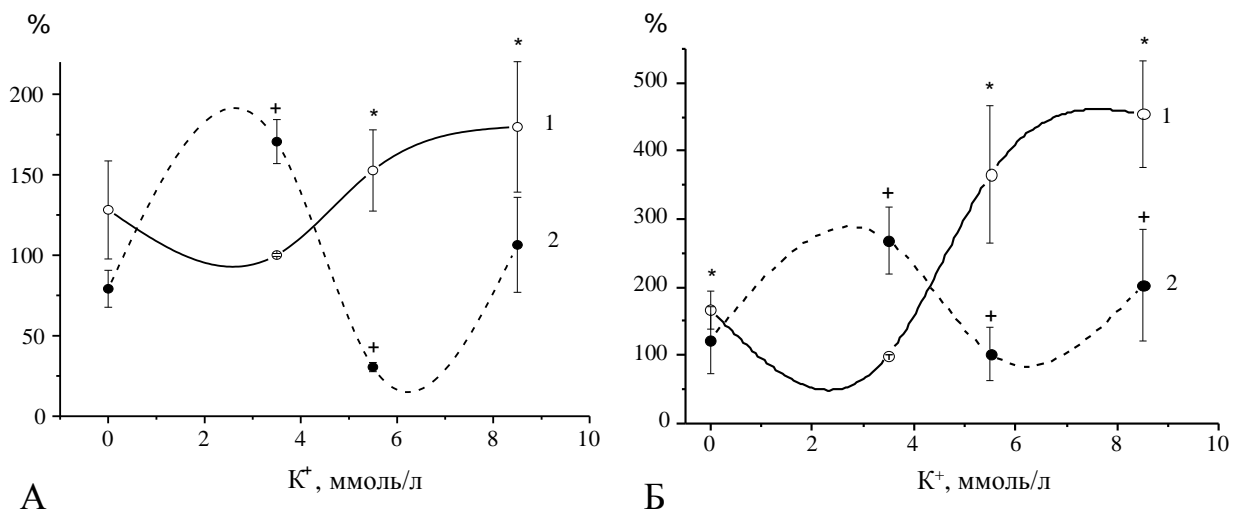


Рис. 4. Експресія мРНК eNOS (А) та iNOS (Б) при різних концентраціях K⁺ та у присутності літію

Примітки: 1 – KCl; 2 – KCl + 10 ммоль/л LiCl (за 100 % приймають значення при фізіологічній концентрації іонів калію 3,5 ммоль/л). * – вірогідна різниця в порівнянні з 3,5 ммоль/л K⁺; + – різниця між кривими 1 і 2 є вірогідною ($P \leq 0,05$, $M \pm m$, $n = 5$, U-критерій).

Іони літію певною мірою можуть імітувати ефект іонів калію – при базальній концентрації K⁺ (3,5 ммоль/л) – Li⁺ посилює експресію, а при підвищених концентраціях калію, за яких стимулюється стероїдогенез, пригнічує у порівнянні з контролем [Ковзун Е.И. и др., 2013]. Ланкою, в якій можуть перетинатись впливи іонів калію і NO, може бути такий важливий кофактор як внутрішньоклітинний білок кальмодулін. При підвищенні вмісту іонів кальцію в клітині він приєднується до молекули NOS, що призводить до активації ферменту і синтезу NO. Безперечним є те, що ключову роль в опосередкуванні посилення стероїдогенезу іонами калію відіграє Ca²⁺/кальмодулін-залежна протеїнкіназа, активації якої передують швидке підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію [Eneart J.J., Eneart J.A., 2013].

Ми визначали також активність NOS за дії естрадіолу, яка може брати участь в опосередкуванні регуляторних сигналів естрогенів в адренкортикоцитах. Максимальна активність ферменту за дії естрадіолу *in vivo* спостерігається у плазмі крові, вона зростає в 1,68 рази. Активність NOS вірогідно збільшується також у надниркових залозах щурів, що отримували естрадіол (на 21 %). Поясненням цього може бути здатність естрогенів впливати не тільки на специфічні метаболічні процеси, що ведуть до активації синтезу стероїдів, а й на весь метаболізм адренкортикоцитів в цілому. Раніше було показано, що естрадіол стимулює біосинтез білків та нуклеїнових кислот у корі надниркових залоз, збільшує вміст кінази ERK1/2, яка залучається до процесів проліферації і диференціювання клітин [Ковзун О.І., 2008]. Отже, вплив естрогенних гормонів на кору надниркових залоз виявляється значно складнішим, ніж це уявлялося раніше і до реалізації цього впливу наразі може бути долучена система оксиду азоту.

Наступним кроком досліджень стало визначення участі протеїнкіназ, що активуються мітогенами (МАРК), зокрема, ERK (від *extracellular signal regulated kinase*) в регуляції синтезу кортикостероїдних гормонів і проліферації адренкортикальної тканини. МАРК/ERK каскад є головним шляхом сигнальної трансдукції, що залучається до реалізації широкого спектру ефектів, спрямованих на проліферацію і диференціювання різних типів клітин; в реалізації процесів стероїдогенезу в адренкортикоцитах останнім часом важливе місце також відводиться месенджерним системам, які використовують в якості вторинних посередників протеїнкінази, що активуються мітогенами. З трьох підродин МАРК (ERK1/2, JNK та p38) рівень протеїнкінази JNK суттєво збільшується під впливом АКТГ, а вміст ERK1/2 кіназ істотно зростає за дії естрадіолу в адренкортикоцитах [Ковзун О.І., 2008]. За нашими даними, месенджерна система МАРК/ERK відіграє значну роль у проведенні та ампліфікації різних регуляторних сигналів в адренкортикальних клітинах.

При визначенні рівня протеїнкіназ ERK1 та ERK2 ми спостерігали, що їх вміст в надниркових залозах залежить від статі експериментальних тварин. Виявилось, що експресія ERK1 і ERK2 є вірогідно нижчою в адренкортикальній тканині самиць (у 3,3 та у 1,9 разів відповідно) порівняно з тканиною надниркових залоз самців. Крім того, рівень експресії ERK1 та ERK2 у тканині надниркових залоз самиць різний, зокрема експресія ERK2 вдвічі вища ніж експресія ERK1. На відміну від самиць, в тканині надниркових залоз самців статистично вірогідної різниці між рівнями цих кіназ не спостерігалось (табл. 1).

Інкубація зрізів адренкортикальної тканини самців і самиць щурів з метанандамідом у різних концентраціях не призводила до вірогідних змін рівня експресії ERK1 та ERK2 порівняно з контрольною пробою (табл. 1).

Таблиця 1

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)

Кіназа	Контрольна проба	Концентрація метанандаміду, мкмоль/л		
		0,01	0,1	1
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)

Примітки: наведені середні арифметичні та межі коливань; нормалізацію здійснювали за вмістом β -актину. * – $P = 0,05$ – різниця вірогідна порівняно з вмістом ERK1 в тканині надниркових залоз щурів-самців; [&] – $P = 0,05$ – різниця вірогідна порівняно з вмістом ERK2 в тканині надниркових залоз щурів-самців; [#] – $P = 0,05$ – різниця вірогідна порівняно з вмістом ERK1 в тканині надниркових залоз щурів-самиць. U-критерій, $n = 3$.

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 у 2 рази більший. При цьому слід зазначити, що із збільшенням віку тварини (з 3-го по 11-й тиждень) рівень експресії фосфорильованої форми ERK1/2 не змінюється [Bielohuby M. et al., 2009]. Це може свідчити про незалежність активації ERK1/2 від змін гормонального фону впродовж естрального циклу. Статеві відмінності активації ERK1/2 також було відмічено і у мозку мишей, проте, рівень експресії фосфорильованої форми у цій тканині самиць був вищим, ніж у самців [Barabas K. et al., 2006].

У роботі вперше встановлено зміни вмісту ERK1/2 у тканині кори надниркових залоз під впливом хлориду літію. Тенденція до зростання у корі надниркових залоз морських свинок спостерігається вже у присутності 5 ммоль/л хлориду літію, а підвищення концентрації до 10 ммоль/л призводить до збільшення вмісту ERK1/2 в 1,9 рази.

До процесів регуляції протеїнкіназних каскадів залучена низка ядерних транскрипційних факторів. Активація факторів транскрипції та регуляція експресії специфічних генів є ланками внутрішньоядерного етапу перенесення сигналу агоністів. Продукти протоонкогенів *c-jun* та *c-fos*, білки *jun* і *fos*, утворюючи гомодимерні та гетеродимерні комплекси, входять до складу фактора транскрипції AP-1, який є надзвичайно важливим елементом трансдукції і ампліфікації сигналу в ядрі. Підвищення експресії *c-jun* і *c-fos* за дії АКТГ, естрогенів в корі надниркових залоз вже було описано [Ковзун О.І., 2008]. Проте дослідження ядерних етапів впливу канабіноїдів у надниркових залозах не проводилось.

Дані щодо впливу ендоканабіноїдів на ядерні транскрипційні фактори вкрай нечисленні. Нами показано, що помітне зростання вмісту транскрипційного фактора *c-fos* та *c-jun* в адренкортикальній тканині людини спостерігається вже при концентрації суміші NAE 1 мкмоль/л, при збільшенні концентрації NAE до 10 мкмоль/л рівень фактора *c-fos* збільшується у 3 рази, а *c-jun* – у 1,5 рази (рис. 5).

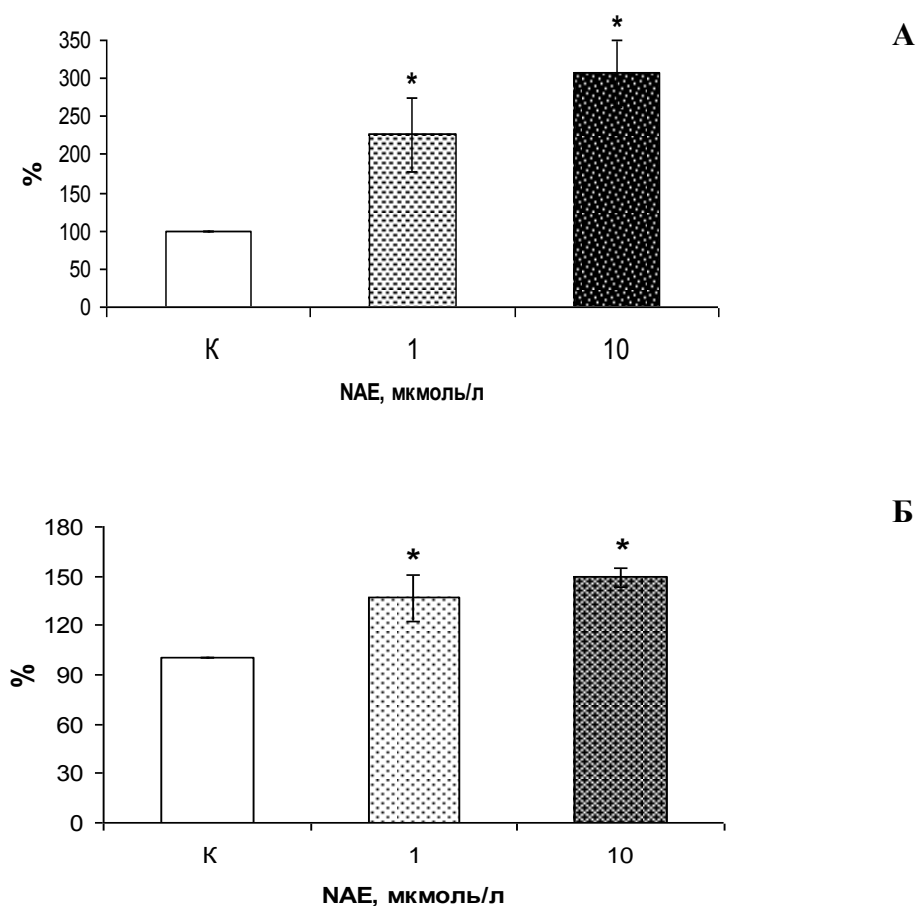


Рис. 5. Вплив суміші NAE на рівень фактора транскрипції *c-fos* (А) та *c-jun* (Б) у корі надниркових залоз людини

Примітки: К – контроль. * – різниця з контролем є вірогідною ($p \leq 0,05$, $n = 3$, $M \pm m$, U-критерій).

Цікаво, що синтетичний аналог арахідоноїлетаноламіну (метанандамід) призводив до вірогідного підвищення вмісту фосфорильованої форми c-jun в тканині надниркових залоз щурів, особливо помітну за концентрації 1 мкмоль/л (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив різних концентрацій метанандаміду на рівень експресії c-jun і фосфо-c-jun в тканині надниркових залоз самиць щурів *in vitro* (умовні одиниці)

Білок	Контрольна проба	Концентрація метанандаміду, мкмоль/л		
		0,01	0,1	1
c-jun	3,73 (3,59-3,93)	3,58 (3,45-3,78)	4,07 (3,30-4,46)	4,89 * (4,34-5,40)
Фосфо-c-jun	5,50 (5,01-6,44)	5,14 (4,63-6,06)	9,12 * (8,48-10,1)	10,5 * (9,77-11,6)

Примітки: наведені середні арифметичні та межі коливань;

* – $P = 0,05$ – порівняно з контрольною пробою без метанандаміду (U-критерій, $n = 3$).

Слід зазначити, що іншими авторами в дослідженнях на холангіоцитах також показано, що ендоканабіноїд анандамід викликає зростання рівня c-fos та c-jun білків [DeMorrow S. et al., 2008].

Отримані нами дані підтверджують, що c-fos залучається до перенесення регуляторних сигналів канабіноїдів, як це показано для нейронів, ядер гіпоталамуса та кори головного мозку самиць щурів [Ruginsk S.G. et al., 2013; Soria-Gomez E. et al., 2007; Sticht M.A. et al., 2016].

Вважається, що ефекти канабіноїдів проявляються у впливі на апоптичні процеси, тому очікувалося, що їх дія буде посилювати експресію мРНК проапоптичного білка Вах в адренкортикоцитах та інтенсивність фрагментації ядерної ДНК.

За нашими даними, внесення суміші NAE до середовища інкубації викликає збільшення експресії мРНК проапоптичного фактора Вах та інтенсифікацію фрагментації ДНК в адренкортикоцитах людини. Внесення до середовища інкубації NAEс викликає вірогідні зміни експресії мРНК Вах в адренкортикоцитах (рис. 6). Рівень експресії мРНК Вах у присутності суміші NAE 1 мкмоль/л збільшується по відношенню до контролю (на 55 %). При концентрації NAEс 10 мкмоль/л експресія мРНК Вах по відношенню до контролю становить 141 %.

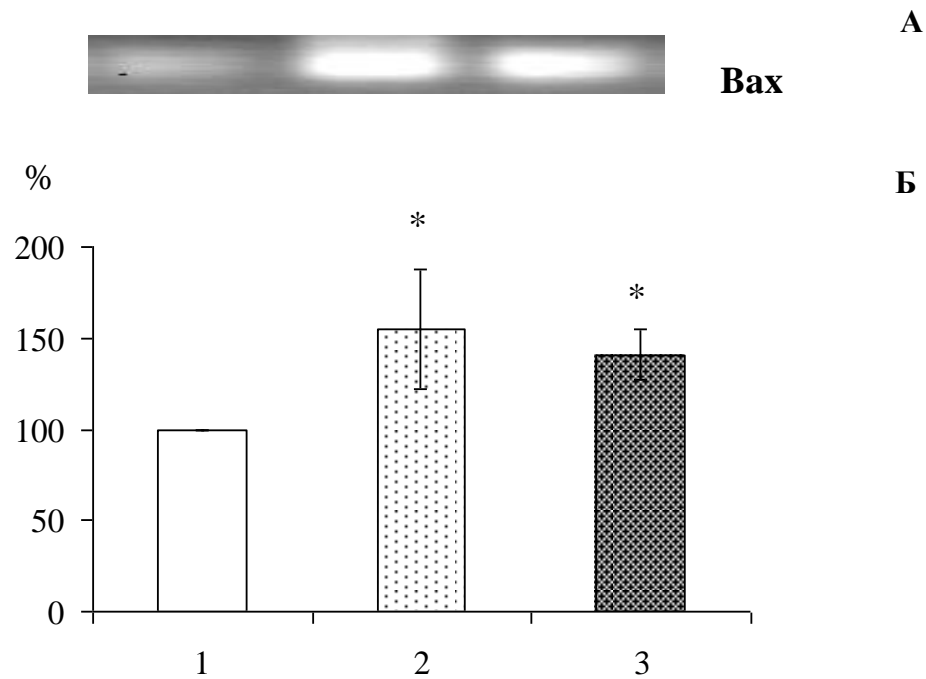


Рис. 6. Вплив суміші NAE на рівень експресії мРНК Вах у позапухлинній тканині кори надниркових залоз людини

Примітки: А – електрофоретичний аналіз продуктів ПЛР із використанням праймерів до Вах (типові результати одного дослідження з 4-х); Б – кількісна характеристика експресії мРНК. 1 – контроль; 2 – NAEс 1 мкмоль/л; 3 – NAEс 10 мкмоль/л. * – різниця з контролем є вірогідною ($p \leq 0,05$, $M \pm m$, $n = 4$, U-критерій).

Таким чином, базуючись на одержаних нами та літературних даних, можна стверджувати, що вплив NAE на кору надниркових залоз є значно складнішим, ніж вважалось до цього часу: надниркові залози є органом-мішенню для ендоканабіноїдів, які мають здатність впливати на низку шляхів сигнальної трансдукції: протеїнкіназу С, сАМР, ERK, PI3K/Akt, Wnt/бета-катенін, на експресію ядерних транскрипційних факторів c-fos і c-jun, NF-kB [Kokona D., Thermos K., 2015; Laezza C. et al., 2013; Lee S.Y. et al., 2005; Correa F. et al., 2010]. Отримані нами дані щодо впливу суміші N-ацильованих похідних етаноламіну на експресію проапоптичного білка Вах та фрагментацію ДНК дозволяють віднести його до чинників, що також регулюють апоптичні процеси в адренкортикоцитах.

Отже, формуються нові уявлення щодо месенджерних регуляторних впливів у корі надниркових залоз, до яких залучаються значна кількість сигнальних каскадів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі досліджена участь низки систем сигнальної трансдукції (системи генерації оксиду азоту, системи протеїнкіназ і транскрипційних чинників) в регуляції секреції кортикостероїдів наднирковими залозами та встановлені молекулярні механізми цієї регуляції як процесу взаємодії месенджерних систем.

1. Посилення процесів синтезу мінералокортикоїдів в корі надниркових залоз людини у відповідь на дію іонів калію забезпечується механізмами, що залучують білок-регулятор швидкої фази стероїдогенезу (StAR) та цитохром P450_{scc}. Підвищення концентрації K⁺ у середовищі інкубації до 8,5 ммоль/л призводить до збільшення в адренкортикоцитах кількості мРНК StAR та цитохрому P450_{scc} відповідно на 27 % та 70 % у порівнянні з контролем. Іони літію (10 ммоль/л) збільшують синтез 11-оксикортикостероїдів у корі надниркових залоз людини.

2. Вперше показано, що зміни концентрації іонів калію у позаклітинному середовищі нижче за фізіологічний (0,5 ммоль/л) збільшують рівень кінази глікогенсинтази (GSK-3β) в адренкортикоцитах морських свинок. Високі концентрації калію (5,5 ммоль/л і 8,5 ммоль/л) призводять до зменшення кількості GSK-3β вдвічі.

3. Встановлено експресію ендотеліальної та індучибельної ізоформ NOS у пухлинах і позапухлинній адренкортикальній тканині людини. Експресія обох ізоформ NOS (ендотеліальної та індучибельної) стимулюється іонами калію в адренкортикальній тканині людини.

4. Введення естрадіолу підвищує активність синтази оксиду азоту в тканині надниркових залоз та плазмі крові щурів.

5. Встановлено різний рівень експресії ERK1 і ERK2 в адренкортикальній тканині щурів різної статі в контролі і за дії метанандаміду: у тканині надниркових залоз самиць щурів рівень експресії ERK1 і ERK2 був вірогідно нижчим порівняно з адренкортикальною тканиною самців. Показано, що хлорид літію призводить до підвищення рівня експресії ERK1/2 в тканині надниркових залоз морських свинок.

6. Доведено, що рівень експресії транскрипційних факторів c-fos і c-jun збільшується за дії 1 мкмоль/л та 10 мкмоль/л суміші N-ацильованих похідних етаноламіну, що підтверджує важливу роль ядерного фактора транскрипції AP-1 у трансдукції сигналу NAE в адренкортикоцитах.

7. Вплив суміші N-ацильованих похідних етаноламіну на експресію Вах та інтенсивність фрагментації ДНК дозволяють віднести його до чинників, що регулюють апоптичні процеси в адренкортикоцитах.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях та виданнях, які включені до міжнародних наукометричних баз:

1. Ковзун ОІ, Костюченко НМ, Пушкарьов ВМ, Лукашеня ОС, Микоша ОС. Вплив різних концентрацій калію на експресію мРНК протеїну StAR та цитохрому P-450_{sc} в адренкортикальній тканині людини. Укр біохім журн. 2011;83(4):104-7. (*)
 2. Ковзун ЕИ, Лукашеня ОС, Пушкарев ВМ, Микоша АС, Тронько НД. Влияние ионов калия и лития на экспрессию NO-синтаз в коре надпочечников человека. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013;156(9):307-9. (*)
 3. Ковзун ОІ, Лукашеня ОС, Горносталь ОА, Микоша ОС. Участь фактора транскрипції AP-1 у перенесенні регуляторного сигналу N-ацильованих похідних етаноламіну в адренкортикоцитах людини. Ендокринологія. 2015;20(1):396-400. (**)
 4. Левчук НІ, Лукашеня ОС, Микоша ОС, Ковзун ОІ. Статеві відмінності експресії ERK в надниркових залозах щурів. Ендокринологія. 2015;20(4):706-9. (*)
 5. Левчук НІ, Лукашеня ОС, Ковзун ОІ, Микоша ОС. Вплив іонів літію на стероїдогенез і рівень експресії протеїнкінази ERK у тканині кори надниркових залоз. Ендокринологія. 2016;21(2):144-7. (*)
 6. Лукашеня ОС, Левчук НІ, Микоша ОС, Ковзун ОІ. N-ацильовані похідні етаноламіну збільшують експресію мРНК проапоптотичного білка Вах у корі надниркових залоз людини. Ендокринологія. 2016;21(3):220-4. (*)
 7. Лукашеня ОС. Сучасні уявлення про системи сигнальної трансдукції в адренкортикоцитах (огляд літератури та власні дослідження). Ендокринологія. 2017;22(2):146-59. (**)
- Тези наукових доповідей:**
8. Ковзун ОІ, Лукашеня ОС, Микоша ОС. Експресія конститутивної та індукційної ізоформ синтази оксиду азоту в позапухлинній тканині та гормонально неактивних пухлинах надниркових залоз людини. Укр біохім журн. 2014;86(5)Suppl.1:161-2. (*)
 9. Ковзун ОІ, Лукашеня ОС. Участь ядерних транскрипційних факторів в регуляції функції кори надниркових залоз. Ендокринологія. 2014;19(4):306. (**)
 10. Левчук НІ, Пушкарьов ВВ, Лукашеня ОС. Експресія кінази глікогенсинтази в клітинах кори надниркових залоз морських свинок за дії іонів калію. Збірник тез VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», Харків. 2016:141. (*)

11. Лукашеня ОС, Гончар ІВ. Зміни активності та експресії синтази оксиду азоту в тканині надниркових залоз за дії агоністів. Ендокринологія. 2017;22(1):83. (**)

Примітки. Здобувачу належить:

(*) – розробка плану досліджень, ключова участь у проведенні та інтерпретації експериментальних досліджень, участь у підготовці матеріалу до друку;

(**) – розробка плану досліджень, проведення та аналіз експериментальних досліджень, написання наукової праці.

АНОТАЦІЯ

Лукашеня О.С. Участь системи генерації оксиду азоту, протеїнкіназних систем та ядерних транскрипційних факторів в регуляції функції кори надниркових залоз. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 14.01.14 «Ендокринологія» (091 – Біологія). – ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», Київ, 2018.

У дисертації розширено концепцію мультифакторної регуляції адренкортикальної функції за участю різних систем сигнальної трансдукції в клітинах кори надниркових залоз.

Досліджено участь в регуляції адренкортикальної функції, процесах проліферації і апоптозу іонів калію, літію, естрогенів, N-ацильованих похідних етаноламіну. Охарактеризовано важливі пострецепторні месенджерні системи, які беруть участь в опосередкуванні дії регуляторів адренкортикальної функції у клітинах кори надниркових залоз, зокрема систем мітоген-активованих протеїнкіназ і кінази глікогенсинтази. Проаналізовано участь системи оксиду азоту в регуляції функції надниркових залоз. Іони калію стимулюють експресію NOS в адренкортикальній тканині людини. Рівень мРНК іNOS збільшується значно інтенсивніше, ніж eNOS. Показано, що стимуляція синтезу стероїдних гормонів в адренкортикальній тканині літієм може відбуватись шляхом залучення протеїнкінази ERK1/2. Важливим етапом у перенесенні сигналу в адренкортикоцитах є активація ядерних факторів транскрипції c-fos і c-jun. Показано проапоптичну дію NAE шляхом посилення експресії фактора Вах і фрагментації ДНК.

Ключові слова: кора надниркових залоз, стероїдогенез, трансдукція сигналу, протеїнкінази, ядерні транскрипційні фактори, синтази оксиду азоту.

АННОТАЦИЯ

Лукашеня О.С. Участие системы генерации оксида азота, протеинкиназных систем и ядерных транскрипционных факторов в регуляции функции коры надпочечников. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 14.01.14 «Эндокринология» (091 – Биология). – ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины», Киев, 2018.

В диссертации расширена концепция мультифакторной регуляции адренкортикальной функции с участием разных систем сигнальной трансдукции в клетках коры надпочечников.

В работе изучены изменения экспрессии мРНК двух важнейших соединений, которые играют решающую роль в регуляции процесса стероидогенеза (StAR и цитохрома P450_{sc}) и их роль в переносе сигнала ионов калия в адренкортикоцитах. Повышение уровня мРНК StAR и цитохрома P450_{sc} имеет четко выраженную зависимость от концентрации калия. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что в случае действия ионов калия на кору надпочечников *in vitro* к усилению процессов стероидогенеза вовлечены механизмы воздействия на уровень экспрессии белка-регулятора быстрой фазы стероидогенеза и цитохрома P450_{sc}, которые могут реализовываться на уровне мРНК.

Одним из важных звеньев механизма внутриклеточного переноса сигналов агонистов являются изменения в активности киназы гликогенсинтазы (GSK-3 β). Поэтому в работе исследовано участие этой киназы в переносе регуляторных сигналов ионов калия в адренкортикоцитах.

Высокие концентрации калия уменьшают количество GSK-3 β вдвое. Наоборот, при снижении концентрации калия ниже физиологического показателя (0,5 ммоль/л) уровень киназы гликогенсинтазы возрастает втрое. С одной стороны, низкие концентрации калия в среде способны тормозить синтез альдостерона, а увеличение количества GSK-3 β при 0,5 ммоль/л калия может быть конкретным механизмом такого торможения. С другой стороны, повышение количества киназы гликогенсинтазы может быть реакцией адренкортикоцита на уменьшение содержания калия в среде.

Следующим этапом наших исследований было изучение вовлечения системы оксида азота к процессам регуляции функции надпочечников.

Показано, что ионы калия стимулируют экспрессию обеих изоформ NOS в адренкортикальной ткани человека. Однако уровень мРНК индуцибельной NOS увеличивается в несколько раз интенсивнее, чем уровень мРНК эндотелиальной NOS. Продемонстрировано действие эстрадиола *in vivo* на активность синтазы оксида азота, которая может участвовать в опосредовании регуляторных сигналов эстрогенов в адренкортикоцитах. Максимальная активность фермента под влиянием

эстрадиола, что наблюдается в плазме крови, возрастает в 1,68 раз. Активность NO-синтазы также достоверно увеличивается в надпочечниках крыс, получавших эстрадиол (на 21%).

Показано, что существенная роль в трансдукции сигналов в адренкортикоцитах принадлежит сигнальному каскаду протеинкиназ, активируемых митогенами, а именно киназе ERK1/2, которая принимает участие в переносе сигналов лития, и ядерным факторам транскрипции c-jun и c-fos, экспрессия которых изменяется под влиянием ацилированных производных этаноламина.

При определении уровня протеинкиназы ERK1 и ERK2, мы наблюдали, что их содержание в надпочечниках зависит от пола экспериментальных животных. Оказалось, что экспрессия ERK1 и ERK2 является достоверно ниже в адренкортикальной ткани самок (в 3,3 и в 1,9 раза соответственно) по сравнению с тканью надпочечников самцов. Кроме того, уровень экспрессии ERK1 и ERK2 в ткани надпочечников самок разный, в частности экспрессия ERK2 вдвое выше, чем экспрессия ERK1.

Показано, что стимуляция синтеза стероидных гормонов в адренкортикальной ткани литием может происходить путем привлечения протеинкиназы ERK1/2.

К процессам регуляции протеинкиназных каскадов привлечен ряд ядерных транскрипционных факторов. Данные об определении влияния эндоканнабиноидов на ядерные транскрипционные факторы крайне немногочисленны. Нами показано, что заметное повышение содержания транскрипционного фактора c-fos и c-jun в адренкортикальной ткани человека наблюдается уже при концентрации смеси NAE 1 мкмоль/л, при увеличении концентрации смеси NAE до 10 мкмоль/л уровень фактора c-fos увеличивается в 3 раза, а c-jun – в 1,5 раза.

Считается, что эффекты каннабиноидов проявляются в воздействии на апоптические процессы, поэтому ожидалось, что их действие будет усиливать экспрессию мРНК проапоптического белка Вах в адренкортикоцитах и интенсивность фрагментации ядерной ДНК. По нашим данным, внесение смеси NAE к среде инкубации вызывает увеличение экспрессии мРНК проапоптического фактора Вах и интенсификацию фрагментации ДНК в адренкортикоцитах человека.

Результаты работы показывают участие ряда сигнальных молекул в регуляции процессов роста и трансформации в клетках коры надпочечников. Полученные данные могут быть использованы в разработке новых подходов коррекции трофических и функциональных процессов в надпочечниках в условиях патологии. Эти звенья сигнальных каскадов важны для понимания молекулярно-биологических процессов, лежащих в основе патологии надпочечников, и могут использоваться для разработки методов лечения.

Ключевые слова: кора надпочечников, стероидогенез, трансдукция сигнала, протеинкиназы, ядерные транскрипционные факторы, синтазы оксида азота.

SUMMARY

Lukashenya O.S. Participation of the system of nitric oxide generation, protein kinase systems and nuclear transcription factors in the regulation of the function of the adrenal cortex. – Qualifying scientific work as a manuscript.

Thesis for a Degree of Candidate of Biological Sciences (doctor of philosophy), specialty 14.04.14 – «Endocrinology» (091 – Biology). – State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism, National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, 2018.

Conception of multifactorial regulation of adrenocortical function with the participation of different signal transduction systems in the adrenal cortex cells is expanded in the thesis.

Studying the changes in mRNA expression of two most important compounds that play a decisive role in regulating the process of steroidogenesis (StAR and cytochrome P450_{scc}) and their role in signal transduction of potassium ions in adrenocorticytes was the first step of our research. An increase in StAR and cytochrome P450_{scc} mRNA levels has a pronounced dependence on potassium concentration. The obtained results allow us to conclude that in a case of potassium ion effect on the adrenal cortex *in vitro*, the mechanisms influencing the level of expression of rapid phase of steroidogenic acute regulatory protein and cytochrome P450_{scc} that can be realized at the level of mRNA are involved in enhancing the processes of steroidogenesis.

The changes in glycogen synthase kinase (GSK-3 β) activity are one of the important links in the mechanism of intracellular signal transduction antagonists. Therefore, studying the involvement of this kinase in the transduction of regulatory signals of potassium ions in adrenocorticytes was the next stage of the research.

High potassium concentrations (which lead to stimulation of the corticosteroid synthesis) reduce the number of GSK-3 β by half. On the contrary, with a decrease in potassium concentration (0.5 mmol/L), the level of glycogen synthase kinase was increased threefold. On the one hand, low potassium concentrations in the medium can inhibit the aldosterone synthesis, and an increase in the number of GSK-3 β at 0.5 mmol/L potassium can be a specific mechanism of such inhibition. On the other hand, increased glycogen synthase kinase can be a reaction of adrenocorticyte to reduced potassium content in the medium.

The study of the nitric oxide system involvement in regulatory processes of the adrenal function was the next stage of our research.

It has been shown that potassium ions stimulate the expression of both NOS isoforms in human adrenocortical tissue. However, the inducible NOS mRNA level is increased several times more intensively than the endothelial NOS mRNA level. The estradiol effect on the activity of nitric oxide synthase, which may be involved in the mediated regulatory signals of estrogens in adrenocorticytes, was demonstrated *in vivo*. The maximum enzyme activity with estradiol effect is observed in blood plasma, that is increased by 1.68 times. NO-synthase activity is

also significantly increased in the adrenal glands of rats receiving estradiol (by 21 %).

It has been shown that a significant role of signals transduction in adrenocorticytes belongs to a signaling cascade of protein kinases, which are activated by mitogens, namely ERK1/2 kinase that is involved in the transmission of lithium signals, and the nuclear transcription factors c-jun and c-fos, whose expression varies with the action of acylethanolamine derivatives.

Determining the levels of ERK1 and ERK2 protein kinases, we observed that their content in the adrenal glands were dependent on the sex of experimental animals. Expression of ERK1 and ERK2 was found to be significantly lower in adrenocortical tissue of female rats (by 3.3 and 1.9 times, respectively) compared with adrenocortical tissue of male rats. In addition, the level of ERK1 and ERK2 expression in the adrenal tissue of female rats is different, in particular ERK2 expression is twice as high as ERK1 expression.

It has been shown that stimulation of steroid hormone synthesis in adrenocortical tissue by lithium can be occurred by the involvement of protein kinase ERK1/2.

A number of nuclear transcription factors are involved in the processes of protein kinase cascade regulation. Data on the determining endocannabinoid effect on nuclear transcription factors are not numerous. We have shown that a marked increase in the content of the transcription factor c-fos and c-jun in human adrenocortical tissue is already observed at a concentration of NAE mixture of 1 $\mu\text{mol/L}$, the factor c-fos increases by 3 times, and c-jun – by 1.5 times with an increase in the concentration of the NAE mixture to 10 $\mu\text{mol/L}$.

It is considered that cannabinoid effects are manifested by their influence on apoptotic processes, therefore, their effect was expected to enhance the mRNA expression of the proapoptotic protein Bax in adrenocorticytes and the intensity of nuclear DNA fragmentation. According to our data, an increase in mRNA expression of the proapoptotic factor Bax and the intensification of DNA fragmentation in human adrenocorticytes are induced by the addition of NAE mixture to the incubation medium.

The participation of a series of signaling molecules in the regulation of growth and transformation processes in adrenocortical cells is proved by results of the work. The obtained data can be used in the development of new approaches to correct the trophic and functional processes in the adrenal glands under pathological conditions. These links of a signaling cascades are important for understanding the molecular biological processes underlying the pathology of the adrenal glands, and can be used for the development of treatment methods.

Key words: adrenal cortex, steroidogenesis, signal transduction, protein kinases, nuclear transcription factors, nitric oxide synthases.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АКТГ	– адренокортикотропний гормон
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
Akt	– протеїнкіназа В, серин-треонінова кіназа
AP-1	– білок-активатор 1 (транскрипційний комплекс)
Bax	– білок, що активує апоптоз
cAMP	– циклічний аденозинмонофосфат
c-fos	– транскрипційний чинник
c-jun	– транскрипційний чинник
eNOS	– ендотеліальна синтаза оксиду азоту
ERK1/2	– позаклітинні сигнал-регульовані протеїнкінази 1 і 2
GSK-3 β	– кіназа глікогенсинтази 3 β
iNOS	– індукцибельна синтаза оксиду азоту
JNK	– c-Jun N-кінцева кіназа
MAPK	– кіназа, що активується мітогенами
NF- κ B	– ядерний транскрипційний чинник
NO	– оксид азоту
NOS	– синтаза оксиду азоту
NAE	– N-ацильовані похідні етаноламіну
NAE _c	– похідні етаноламіну, ацильовані сумішшю ненасичених жирних кислот
P450 _{scc}	– цитохром P450, що відщеплює бічний ланцюг холестеролу
Raf	– серин-/треонінкіназа, яка запускає MAPK шлях
Ras	– онкоген rat sarcoma (фактор сигнальної трансдукції)
StAR	– білок-регулятор гострої фази стероїдогенезу (steroidogenic acute regulatory protein)