УДК 577.115 + 577.125.343:612.17

В. В. ФРОЛЬКІС[1], М. В. АРТАМОНОВ[2], О. Д. ЖУКОВ[2],
В. М. КЛІМАШЕВСЬКИЙ[2], В. М. МАРГІТИЧ[2], Н. М. ГУЛА[2].

ЛІПІДНИЙ СКЛАД І СКОРОЧУВАЛЬНА АКТИВНІСТЬ ІЗОЛЬОВАНОГО СЕРЦЯ ЩУРІВ ЗА ПОСТІШЕМІЧНОЇ РЕПЕРФУЗІЇ ТА ЗА УМОВ ВПЛИВУ НАСИЧЕНИХ ДОВГОЛАНЦЮЖКОВИХ N-АЦИЛЕТАНОЛАМІНІВ

Были исследованы изменения липидного состава ткани изолированного сердца и его сократительная функция при реперфузии после полной ишемии. Показано, что под влиянием N-стеароилэтаноламина происходит ремоделирование жирнокислотных остатков фосфолипидной фракции ткани миокарда: уменьшается количество полиненасыщенных жирнокислотных остатков (18:2ω6, 20:3ω6, 20:4ω6, 22:5ω3, 22:5ω6, 22:6ω3 и 22:6ω6), а также увеличивается количество стеариновой кислоты. Следует отметить снижение синтеза полиненасыщенных жирных кислот. В изолированном сердце при перфузии и ишемии-реперфузии идентифицированы минорные малополярные липиды — N-ацилфосфатидилэтаноламин и N-ацилэтаноламин. Показано, что приблизительно 12% от общего количества свободного N-ацилэтаноламина составляет анандамид. Анализ жирнокислотных остатков свободного N-ацилэтаноламина и полученного при обработке N- ацилфосфатидилэтаноламина фосфолипазой D свидетельствует об их подобности, при этом основными жирнокислотными остатками являются остатки пальмитиновой, стеариновой и арахидоновой кислот. Кроме того, екзогенный N-стеароилэтаноламин существенно не влияет на уровень N-ацилфосфатидилэтаноламина и эндогенного N-ацилэтаноламина, но достоверно снижает уровень лизофосфатидилхолина и фосфатидилглицерола.

Показано, что скорость сокращения и расслабления миокарда возрастает на первых минутах реперфузии. N-стеароилэтаноламин предотвращает эти изменения и вызывает отрицательный инотропный эффект. Таким образом, мембранопротекторный эффект N-стеароилэтаноламина хотя бы частично зависит от его способности ингибировать накопление арахидоновой и докозагексаеновой кислот, а также ремоделирования жирнокислотных остатков фосфолипидов сердца и снижать уровень лизофосфатидилхолина.

Ключевые слова: ишемия-реперфузия, лизофосфатидилхолин, N-ацилфосфатидилэтаноламин, N-ацилэтаноламин, анандамид.

Останнім часом увагу дослідників привертає вивчення феномену реперфузії міокарда. Реперфузійний синдром спостерігається за відновлення кровопостачання, яке було обмежено. Показано, що в першому періоді реперфузії виникають вкрай негативні зміни метаболізму та скорочувальної функції. Припускається, що це пов'язано з активацією процесів вільнорадикального окислення за умов відновлення постачання кисню. Під час цього можливим є розвиток значних порушень внаслідок надмірного входу іонів Са у цитозоль та зменшення утворення АТР [1]. Зниження загальної кількості клітинного АТР в ішемічному серці пов'язано з роз'єднанням окислювального фосфорилювання, перерозподілом фосфатидилетаноламіну (РЕ) між зовнішнім та внутрішнім листками плазматичної мембрани, набуханням мітохондрій, реорганізацією мітохондріальних крист [2]. Продемонстровано, що протягом 24 год ішемії міокарда кількість загальних фосфоліпідів у тканині серця зменшується внаслідок підвищення їх катаболізму за рахунок активування фосфоліпаз. Це спричинює до збільшення кількості лізофосфоліпідів та арахідонової кислоти [3]. Зауважимо, що лізофосфатидилхолін (LPC) є активним агентом, який викликає аритмію в ішемізованому міокарді [4].

Наприкінці 70-х – на початку 80-х років співробітниками Гормелівського інституту (США) під керівництвом проф. H.H.O. Schmid було відкрито накопичення малополярних ліпідів з незвичною структурою – N-ацилфосфатидилетаноламіну (NAPE) та N-ацилетаноламіну (NAE) в інфарктній зоні міокарда собаки протягом 6–27 годин після оклюзії коронарної артерії [5]. У центральній та периферичній інфарктній зонах NAPE містився у значній кількості – 4-6% від загального фосфору фосфоліпідів [5]. Рівень же вільних NAE досягав приблизно 0,5 мкМ/г тканини [6]. Слід відмітити, що NAPE є прекурсором біологічно активної сполуки NAE, яка відщеплюється від нього під впливом фосфоліпази D. У роботах, виконаних групами H.H.O.Schmid, H.S.Hansen та H.M.Гулої [7–9], висунуто гіпотезу про мембранопротекторну дію NAE, яка реа-

лізується в умовах ушкодження клітини. Слід зауважити, що утворення NAE за фосфоліпаза D - фосфодіестеразним шляхом є Ca^{2+} - залежним процесом, яке досягає максимуму при концентрації вільних іонів Са ~ 1-5 мМ [10]. Така концентрація Ca^{2+} є токсичною для клітини, тому для реалізації протекторної дії NAE важливим було б забезпечити раннє надходження його у клітину. На сьогодні є всього декілька публікацій стосовно того, що NAE є потужним кардіотропним агентом, який має позитивні інотропні властивості [11]. Нашими дослідженнями було показано, що раннє введення піддослідним тваринам NAE у дозі 3 мкг/100 г маси тіла припиняє розвиток викликаної вазопресином аритмії та істотно пригнічує утворення LPC у тканині міокарда [12]. Можна припустити, що за умов ішемії екзогенно введений NAE виявлятиме протекторний ефект.

Виходячи з вказаного вище, за мету роботи було покладено вивчити вплив N-стеароїлетаноламіну на ліпідний склад тканини серцевого м'яза та скорочувальну активність міокарда за ішемії–реперфузії.

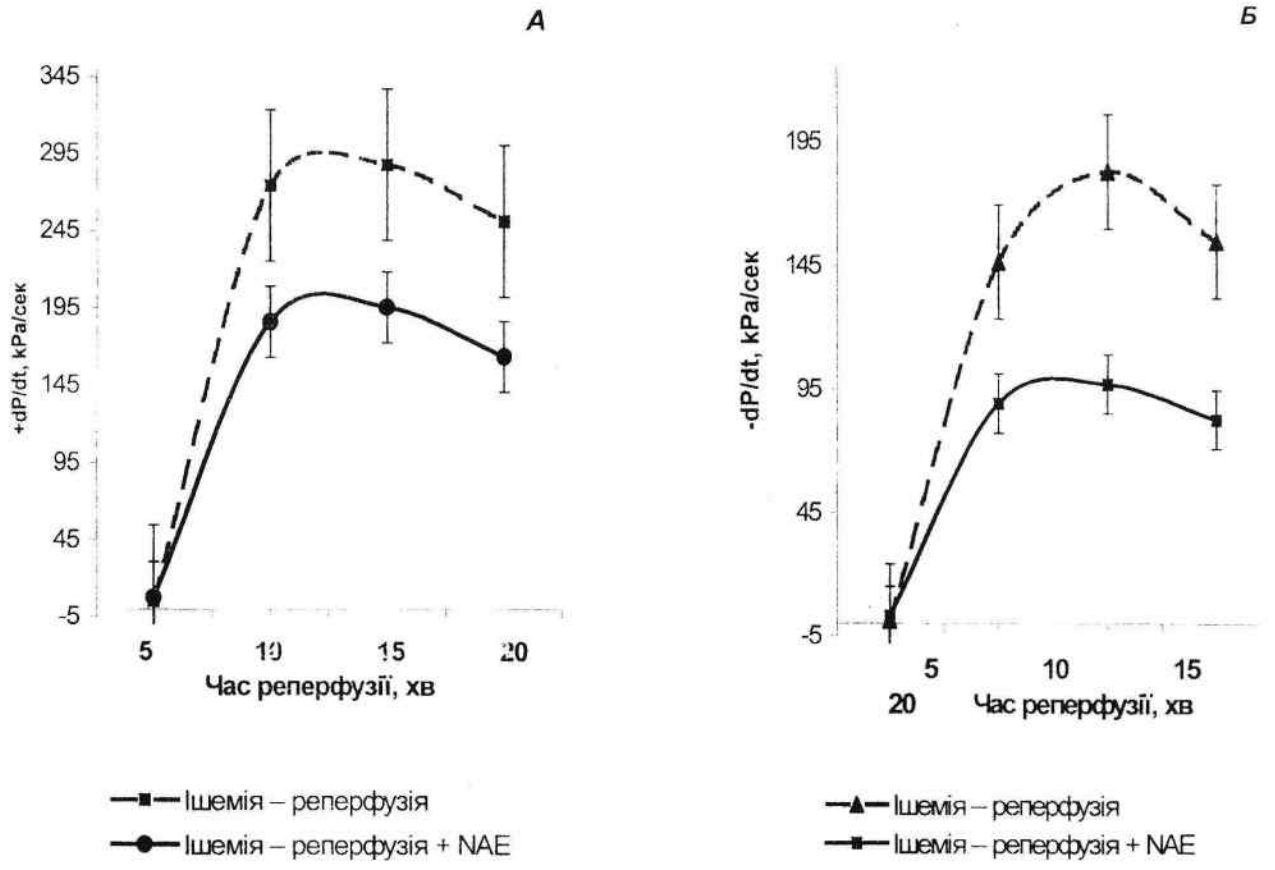
Матеріали і методи

Досліди проводили на ізольованих серцях 26 шурів-самців лінії Вістар у віці 9 місяців. Досліджувані ізольовані серця було поділено на три підгрупи: контроль (серця, що піддавали перфузії протягом 1 год), ішемія – реперфузія (на 30-й хв після підключення серця до перфузії на 10 хв припинялось постачання кисню та перфузату з наступною 20-хвилинною реперфузією) та ішемія – реперфузія + NAE (також на 30-й хв перфузії припинялось на 10 хв постачання кисню та перфузату з наступною 20-хвилинною реперфузією і з додаванням у перфузат NAE 18:0 у кінцевій концентрації 1 мкМ). NAE вводили у вигляді етанольного розчину з концентрацією етанолу в перфузаті 0,01%. Коронарну перфузію здійснювали за Lagendorf і з використанням розчину такого складу (мМ): NaCl — 118; KCl — 4,7; $MgCl_2$ — 1,0; Na_2HPO_4 — 1,2; $NaHCO_3$ — 25; $CaCl_2$ — 2,5; глюкоза — 11. Перфузат аерували карбогеном (O_2:CO_2 / 95:5). Температура розчину 37 °С, pH 7,4. Ізольоване серце скорочувалось у спонтанному ритмі в ізоволемічному режимі. Період адаптації ізольованого серця складав 30 хв. На 30 хв у групах ішемія —реперфузія та ішемія – реперфузія + NAE повністю перекривали доступ перфузійного розчину до серця, моделюючи гостру аноксію. Через 10 хв перфузію відновлювали, реперфузія продовжувалась протягом ще 20 хв Після цього серце вміщували у скраплений азот до часу проведення біохімічних досліджень.

Ліпідний екстракт готували згідно з методом E.G.Bligh та W.I.Dyer [13]. Для більш повної екстракції аніонних фосфоліпідів використовували рекомендації F.B.Palmer [14]. Фосфоліпідний склад серця аналізували методом двовимірної високоефективної мікротонкошарової хроматографії (МТШХ) на силікагелі КСК-2 (Росія) з використанням системи хлороформ : метанол : бензол : 28%-й аміак (65 : 30 :10 : 6) у першому напрямку та системи хлороформ : метанол : бензол : ацетон : льодова оцтова кислота : вода (70 : 30 : 10 : 4 : 5 : 1) – у другому.

Плазмалогенні форми фосфоліпідів визначали з використанням систем хлороформ : метанол : 28%-й аміак (65 : 35 : 5) у першому напрямку, 3 М розчину HCl – у другому та хлороформ : ацетон : метанол : льодова оцтова кислота : вода (50 : 20 : 10 : 10 : 5) – у третьому. Вміст фосфоліпідів виражали через кількість неорганічного фосфору.

Ідентифікацію індивідуальних фосфоліпідів проводили так, як описано нами раніше [12]. Для ідентифікації малополярних ліпідів – NAPE та NAE – застосовували таку схему. Первинну ідентифікацію проводили за допомогою методу високоефективної МТШХ на силікагелі L 5/40 («Lachema», Чехія) у системі хлороформ : метанол : 28%-й аміак (80 : 20 : 2). Первинну ідентифікацію доповнювали аналізом із застосуванням методу (^{1}H-ЯМР)-спектроскопії на ЯМР-спектрометрі Varian model («Mercury», США) з робочою частотою 300 МГц. Наявність NAPE та NAE визначали за співставленням ПМР–спектрів загального ліпідного екстракту та чистих NAPE і NAE. Плями, ідентифіковані як NAPE та NAE, зішкрібали із платівки разом із силікагелем. NAE метилювали, а NAPE елюювали і далі проводили гідроліз фосфоліпазою D (із *Streptomyces chromofuscus*, «Sigma», США) [15]. Для цього NAPE розчиняли в 1 мл діетилового ефіру та додавали 180 мкл цитратного буферу (pH 5,5), 20 мкл 0,1 М розчину $CaCl_2$ та 15 мкл розчину фосфоліпази D (125 од/мл). Суміш витримували протягом 2-3 годин при температурі 32 °С. Після цього ліпофільні продукти реакції екстрагували згідно з методом E.G.Bligh та W.I.Dyer [13], знов розганяли в системі для малополярних ліпідів. Внаслідок ферментативного гідролізу утворювався NAE, який у подальшому метилювали. Для отримання метилових ефірів жирних кислот (МЕЖК), які входять до складу NAE та фосфоліпідів, використовували методичні прийоми, наведені W.W.Christie [16]. Жирнокислотний аналіз проводили з використанням методу газорідинної хроматографії на хроматографі Carlo Erba



Показники сили скорочень міокарда серця щурів за умов постішемічної реперфузії: А — швидкість скорочення (+dP/dt (kPa/сек)); Б — швидкість розслаблення (-dP/dt (kPa/сек))

Таблиця 1. Фосфоліпідний склад серця щурів за умов постішемічної реперфузії (10^{-8} М P_i/мг білка), (M±m; n=6 — 10).

Фосфоліпіди	Контроль	Ішемія—реперфузія	Ішемія—реперфузія+ NAE (1 мкМ)
Фосфатидилсерин	1,56 ±0,16	1,29 ±0,13	1,31 ±0,10
N-ацилфосфатидилсерин	0,10 ±0,08	0,13 ±0,04	0,19 ±0,05
Фосфатидилінозитол	1,46 ±0,16	2,14 ±0,32	1,62 ±0,13
Лізофосфатидилхолін	0,33 ±0,11	0,32 ±0,04	0,19 ±0,03#
Лізофосфатидилетаноламін	0,19 ±0,05	0,41 ±0,11	0,26 ±0,08
Сфінгомієлін	1,85 ±0,36	1,77 ±0,20	1,45 ±0,14
Фосфатидилхолін	20,8 ±1,0	22,4 ±1,90	18,1 ±0,92
Фосфатидилетаноламін	17,0 ±1,87	18,8 ±1,25	15,6 ±1,0
Фосфатидилгліцерол	0,59 ±0,07	0,77 ±0,10	0,52 ±0,04#
Кардіоліпін	8,20 ±0,81	7,61 ±0,63	6,92 ±0,50
N- ацилфосфатидилетаноламін	0,35 ±0,07	0,46 ±0,08	0,31 ±0,05
Неідентифікований фосфор	9,97 ±2,11	2,46 ±0,52	1,79 ±0,23

Тут і далі помічено вірогідні зміни в порівнянні з даними, одержаними для групи ішемія — реперфузія, $p<0,05$.

Таблиця 2. Співвідношення діацильної та плазмалогенної форм головних фосфоліпідів у складі серця щурів за умов постішемічної реперфузії (%), (M±m; n=6 — 10)

Форми фосфоліпідів	Контроль	Ішемія — реперфузія	Ішемія — реперфузія + NAE (1 мкМ)
Плазмалоген-РС	6,70 ± 1,07	7,741 ± 0,46	7,19 ± 0,56
Діацил-РС	93,30 ± 1,07	92,26 ± 0,46	92,80 ± 0,56
Плазмалоген-РЕ	23,22 ± 1,38	18,35 ± 2,28	19,86 ± 1,44
Діацил-РЕ	76,78 ± 1,38	81,65 ± 2,28	80,14 ± 1,44

Таблиця 3. Жирнокислотний склад фосфоліпідів серця щурів за умов постішемічної реперфузії (10^{-8} М/мг білка), (M±m; n=6 — 10)

N	Жирні кислоти	Контроль	Ішемія—реперфузія	Ішемія—реперфузія + NAE (1мкМ)
1	8:0	0,007 ±0,001	0,008 ±0,002	0,008 ±0,002
2	10:0	0,008 ±0,0007	0,010 ±0,001	0,016 ±0,004
3	11:0	—	0,013 ±0,003 *	0,021 ±0,004 *
4	12:0	—	0,020 ±0,011 *	0,007 ±0,000 *
5	13:0	—	0,025 ±0,005 *	0,047 ±0,005 *
6	14:0	0,059 ±0,003	0,098 ±0,015 *	0,063 ±0,022
7	15:0	0,064 ±0,002	0,078 ±0,008	0,061 ±0,004
8	i16:0	1,143 ±0,342	0,658 ±0,233	1,277 ±0,296
9	16:0	11,30 ±0,73	12,69 ±1,16	12,24 ±0,56
10	16:1ω9	0,391 ±0,053	0,450 ±0,046	0,377 ±0,034
11	16:1ω7	0,062 ±0,011	0,062 ±0,013	0,074 ±0,015
12	17:0	0,345 ±0,028	0,396 ±0,036	0,469 ±0,039
13	17:1ω9	0,045 ±0,009	0,052 ±0,009	0,044 ±0,009
14	17:1ω8	0,095 ±0,016	0,087 ±0,012	0,124 ±0,014
15	i18:0	0,594 ±0,190	0,272 ±0,119	0,700 ±0,174
16	18:0	23,50 ±1,06	25,49 ±2,03	27,45 ±1,40 *
17	18:1ω9	7,724 ±0,649	8,273 ±0,768	8,096 ±0,569
18	18:2ω6	28,23 ±2,65	29,77 ±2,45	21,81 ±1,23 *, #
19	18:2ω4	0,089 ±0,021	0,069 ±0,008	0,050 ±0,008
20	18:3ω6	0,047 ±0	0,047 ±0,002	0,064 ±0,010
21	20:0	0,42 ±0,04	0,443 ±0,041	0,540 ±0,038
22	20:1ω11	0,19 ±0,02	0,186 ±0,014	0,232 ±0,015
23	21:0	0,282 ±0,028	0,283 ±0,026	0,269 ±0,022
24	20:3ω6	0,419 ±0,019	0,437 ±0,043	0,256 ±0,020 *, #
25	20:4ω6	27,80 ±1,49	29,07 ±2,07	16,64 ±1,50 *, #
26	22:0	0,424 ±0,093	0,471 ±0,053	0,449 ±0,046
27	22:1ω11	0,063 ±0,014	0,095 ±0,002 *	0,055 ±0,025
28	22:3ω6	0,182 ±0,018	0,196 ±0,020	0,242 ±0,019
29	22:4ω6	—	—	0,473 ±0,049 *
30	22:5ω6	0,737 ±0,063	0,760 ±0,056	0,432 ±0,061 *, #
31	22:5ω3	0,800 ±0,058	0,873 ±0,087	0,115 ±0,035 *, #
32	22:6ω6	0,446 ±0,026	0,612 ±0,060	0,082 ±0,008 *, #
33	22:6ω3	2,767 ±0,234	3,253 ±0,404	1,009 ±0,158 *, #
34	Неідент.	—	0,052 ±0,013	0,052 ±0,013
35	Ненасичені/ насичені	1,830 ±0,066	1,833 ±0,031	1,093 ±0,066 *, #

* Тут і далі помічено вірогідні зміни в порівнянні з даними, одержаними для групи "контроль", $p<0,05$.

Таблиця 4. Співвідношення метаболіт/прекурсор серця щурів за умов постішемічної реперфузії, (M±m; n=1 — 10)

Співвідношення		Контроль	Ішемія — реперфузія	Ішемія — реперфузія + NAE (1 мкМ)
1	$C_{20:4\omega6}/C_{18:2\omega6}$	1,009 ±0,059	0,989 ±0,034	0,771 ±0,056 *, #
2	$C_{22:6\omega3}/C_{18:3\omega3}$	9,121 ±0,000	8,173 ±0,646	2,070 ±0,345 *, #

(Італія) зі скляними набивними колонками (2,5м×3мм) з носієм Silar 5 CP («Serva», ФРН).

Білок визначали за методом O.H.Lowry [17].

Статистичний аналіз проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента; вірогідними вважали дані при $p<0,05$.

Результати та обговорення

Як представлено на рисунку, внаслідок ішемії—реперфузії істотно порушуються швидкість скорочення та розслаблення міокарда; за присутності NAE скорочувальна функція відновлюється більш повільно. Вже після 20 хв постішемічної реперфузії з'являється тенденція до зростання кількості лізофосфатидилетаноламіну (t=1,82) та фосфатидилінозитолу (t=1,90) (табл. 1). Слід зауважити, що NAE запобігає зростанню утворення цих фосфоліпідів, а також достовірно знижує кількість LPC та фосфатидилгліцерола (PG). Привертає увагу факт наявності N-ацильованих фосфоліпідів у тканині як контрольного серця, так і міокарда за умов ішемії—реперфузії. У табл. 2 наведено дані щодо розподілу діацильних та плазмалогенних форм фосфоліпідів. Як випливає з них, під час 10-хвилинної ішемії істотних змін у розподілі плазмалогенних форм фосфоліпідів не відбувається.

У табл. 3 представлено жирнокислотний склад фосфоліпідної фракції міокарда, згідно з яким видно, що за умов ішемії—реперфузії істотно зростає рівень коротколанцюжкових насичених жирних кислот: ундеканової (11:0), лауринової (12:0), тридеканової (13:0), міристинової (14:0), а також докозамоноєнової (22:1ω11). При цьому співвідношення ненасичені/насичені жирні кислоти фосфоліпідів залишається незмінним. У групі ішемія — реперфузія + NAE (1 мкМ) спостерігається зростання кількості більшості насичених та деяких ненасичених жирних кислот порівняно з контролем. Слід відзначити, що при цьому зменшується кількість таких поліненасичених жирних кислот (ПНЖК), як лінолева (18:2ω6), ейкозатриєнова (20:3ω6), арахідонова (20:4ω6), докозапентаєнова (22:5ω3) і (22:5ω6) та докозагексаєнова (22:6ω3) і (22:6ω6). Введення у перфузійний розчин NAE (1 мкМ) запобігає зростанню вмісту міристинової кислоти (14:0), але при цьому з'являється докозатетраєнова кислота (22:4ω6). Всі ці зміни викликають зменшення індексу ненасиченості в порівнянні з одержаними даними у групах контроль та ішемія — реперфузія.

Нещодавно було запропоновано зручний спосіб вивчення метаболізму жирних кислот за оцінкою співвідношення метаболіт/прекурсор жирної кислоти [18]. У табл. 4 показано співвідношення метаболіт/прекурсор головних поліненасичених жирних кислот - арахідонова/лінолева та докозагексаєнова/ліноленова. Як свідчать наведені дані, NAE достовірно знижує показники синтезу докозагексаєнової та арахідонової кислот.

Цікаво, що за ішемії—реперфузії зростає кількість коротколанцюжкових жирних кислот. N-стеароїлетаноламін, введений в перфузат у концентрації 1 мкМ викликає тенденцію (t=1,37) до зменшення кількості довголанцюжкових жирних кислот (табл. 5).

У табл. 6 представлено відсотковий вміст спектру ацильних залишків, що входять до складу аміногрупи NAE та NAPE. Отримані спектри вказують на схожість жирнокислотного складу NAE та N-ацильних залишків NAPE, що є свідченням метаболічного зв'язку між NAPE та

Таблиця 5. Вміст коротко- та довголанцюгових жирних кислот серця щурів за умов постішемічної реперфузії (10^{-8} М/мг білка), (M±m; n=6 — 10)

Вміст жирних кислот		Контроль	Ішемія — реперфузія	Ішемія — реперфузія+ NAE (1 мкМ)
1	C_{8-15}	0,138 ±0,004	0,246 ±0,033*	0,272 ±0,048*
2	C_{16-22}	107,99 ±6,77	116,27 ±9,14	96,47 ±4,96

Таблиця 6. Жирнокислотний склад фракції NAE та N-ацильних залишків NAPE (продуктів фосфоліпаза D-гідролізу NAPE) у тканині міокарда за умов ішемії – реперфузії

№	Жирні кислоти	N-ацильні залишки NAPE, %	Фракція NAE, %
1	12:0	0,914	0,442
2	14:0	1,187	1,400
3	15:0	0,818	0,889
4	16:0	26,34	33,31
5	16:1	1,763	2,038
6	17:0	0,815	1,242
7	17:1ω9	1,781	1,524
8	18:0	11,32	13,50
9	18:1ω9	8,080	7,623
10	18:2ω6	7,516	11,47
11	18:2ω4	1,994	1,852
12	20:0	2,000	1,501
13	20:3	2,433	1,722
14	20:4ω6	25,27	12,23
15	22:0	2,011	2,890
16	22:1ω11	1,440	2,165
17	22:5ω6	2,949	3,249

NAE. Слід відмітити наявність анандаміду (близько 12%) у вільному NAE.

Наведені результати свідчать про виражений вплив NAE на ліпідний склад та функції серця. Так, NAE достовірно знижує кількість LPC та PG . Водночас можливо суттєво гальмується синтез арахідонової та інших ПНЖК. Загальновідомо, що за оксидативного стресу різко активуються цикло- та ліпоксигеназний шляхи метаболізму арахідонової кислоти. Внаслідок цього утворюються вазо- та кардіоактивні сполуки, які ушкоджують функцію серця. Зауважимо, що важливим джерелом арахідонової кислоти є фосфатидилхолін, від якого вона відщеплюється під впливом фосфоліпази А2 внаслідок дії відповідного агоніста. Під час цього процесу утворюється LPC, який за нормальних умов реестерифікується новоутвореною арахідоновою кислотою. Оскільки за ішемії—реперфузії нами виявлено факт накопичення арахідонової кислоти та інших ПНЖК, то вочевидь LPC може естерифікуватися в sn-2 положенні за допомогою насиченої жирної кислоти. Дійсно, нами встановлено істотне підвищення рівня стеаринової кислоти у фракції фосфоліпідів, що, вочевидь, може вказувати на ремоделювання у тому числі сигнальних фосфоліпідів насиченою жирною кислотою. Це, у свою чергу, блокує утворення фосфоліпаза А2-залежне відщеплення арахідонової кислоти та наступний її оксидативний метаболізм, запобігаючи тим самим утворенню біологічно активних сполук з несприятливою дією. Такий механізм може лежати в основі мембранопротекторного ефекту NAE. З огляду на ці факти можна висловити припущення, що негативна інотропна дія NAE в умовах нашого експерименту в порівнянні з дослідами, де NAE відсутній, є результатом ремоделювання фосфоліпідів міокарда із заміною арахідонової кислоти насиченою (стеариновою) кислотою. Внаслідок цього серцева діяльність набуває економного в енергетичному плані характеру.

Важливо звернути увагу на появу малополярних ліпідів – NAPE та NAE у тканині міокарда щурів усіх трьох груп. Ми не зустрічали робіт, які вказують на появу NAPE на перших хвилинах ішемізації тканин. Це, вочевидь, пояснюється несприятливим впливом вилучення серця із системного кровообігу із наступним підключенням його до системи штучного обігу перфузійного розчину, в якому ряд життєво необхідних речовин та гемоглобінзалежна оксигенація

відсутні. Незважаючи на це, модель реперфузії ізольованого серця має ті переваги, що дає можливість вивчати дію певних сполук на функції серця і виключає вплив на серце з боку організму.

У літературі описано два шляхи утворення NAE. Перший шлях є Ca^{2+}-залежним – фосфоліпаза D–фосфодіестеразний, а другий Ca^{2+}-незалежний амідазазалежний шлях конверсії жирної кислоти та етаноламіну. Внаслідок першого шляху утворюються головним чином насичені NAE, а по другому – головним чином арахідоноїлетаноламін. Застосування нами техніки обробки NAPE фосфоліпазою D дозволило визначити метаболічну спорідненість NAPE та NAE на кшталт прекурсора та продукту. Дійсно, NAE, яке було отримане нами внаслідок ферментативного розщеплення NAPE, має дуже подібний жирнокислотний склад до такого вільного NAE. Як у зв'язаній з фосфоліпідом, так і у вільній фракції NAE переважають пальмітинова та стеаринова кислоти (36 % та 40% від загального вмісту ацильних залишків NAPE і NAE відповідно) над кількістю арахідонової кислоти (анандамід) (25% та 12% відповідно).

Таким чином, вперше показано наявність NAE та NAPE у тканині міокарда ізольованого серця щурів в умовах модельного експерименту під час перфузії та на перших етапах ішемії–реперфузії. Введення екзогенного NAE не впливає на рівень ендогенного NAE та NAPE, однак веде до істотного пониження рівня LPC та PG. Введення екзогенного NAE (1мкМ) зменшує утворення арахідонової та докозагексаєнової кислот. Введення до перфузійного розчину NAE спричинюється до ремоделювання жирнокислотного складу фосфоліпідів і проявляється пониженням рівня арахідонової та інших ПНЖК у складі фосфоліпідної фракції тканини серця. Мембранопротекторний ефект NAE реалізується за допомогою ремоделювання фосфоліпідів тканини серця за умов ішемії–реперфузії, що проявляється зменшенням сили скорочення та розслаблення міокарда.

Робота була частково підтримана грантом Міннауки України № 02.03 / 05560.

Автори висловлюють подяку О. В. Берук за технічне забезпечення моделі перфузованого серця.

V. V. Frolkis[1], *M. V. Artamonov*[2], *A. D. Zhukov*[2], *V. M. Klimashevsky*[2], *V. M. Margitich*[2], *N. M. Gulaya*[2].

INFLUENCE OF THE SATURATED LONG-CHAIN N-ACYLETHANOLAMINES ON LIPID COMPOSITION AND HEART CONTRACTILITY OF ISOLATED RAT HEART UNDER ISCHEMIA-REPERFUSION.

Summary.

The heart contractility and changes of lipid composition of isolated rat heart (n=26) under total ischemia and ischemia–reperfusion was studied. The effect of N-stearoylethanolamine under these conditions was investigated. N-stearoylethanolamine leads to remodelling of fatty acyl chain composition of miocardial phospholipids: to drastic fall of polyunsaturated fatty acyl chains (18:2w6, 20:3w6, 20:4w6, 22:5w3, 22:5w6, 22:6w3 and 22:6w6) and enhancement of 18:0. This can be caused by N-stearoylethanolamine – induced supression of polyunsaturated fatty acids synthesis. Naturally occuring minor lipids – N-acyl phosphatidylethanolamine and its derivative N-acylethanolamine were detected in isolated rat heart under ischemia–reperfusion. It is notable that approximately 12% of total N-acylethanolamines were composed by anandamide. Treatment of N-acyl phosphatidylethanolamine by phospholipase D with subsequent fatty acyl chain analysis demonstrates that fatty acid composition of both N-acyl chains of N-acyl phosphatidylethanolamine and free N-acylethanolamine are similar and their main fatty acyl chains are 16:0, 18:0 and 20:4w6. It was shown that exogenous N-stearoylethanolamine did not alter the levels of endogenous N-acyl phosphatidylethanolamine and N-acylethanolamine, but caused the decrease of lyso-phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol levels. The rate of heart contractility and heart relaxation was found to increas during the early period of reperfusion. N-stearoylethanolamine prevents this alteration and exerts a negative inotropic effect. It is concluded that membrane protective properties of N-stearoylethanolamine at least partly depend on its ability to inhibite decrease amount of arachidonic and docosahexaenoic acids, to modulate the fatty acyl chains of cardiac phospholipids and to decrease the level of lyso-phosphatidylcholine.

K e y w o r d s: ischemia–reperfusion, lysophosphatydilcholine, N-acylphosphatidylethanolamine, N-stearoylethanolamine, anandamide.

[1] Institute of Gerontology, Academy of Medical Sciences of Ukraine; [2] Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Science of Ukraine.

1. *Burton K. P., Buja L. M., Sen A. et al..//* Am J. Pathol. 1986. **124**, N2. P. 238-245.
2. *Musters R. J., Probstl-Biegelmann E., van Veen T.A. et al.. //* Mol. Membr. Biol. 1996. **13**, N3. P. 159 - 64.
3. *Man R. Y. K., Slater T. L., Pelletier M. P., Choy P. C.. //* Lipids. 1983. **18**, N10. P. 677 - 681.
4. *Corr P. B., Yamada K. A.. //* Herz. 1995. **20**, N3. P. 156 - 168.
5. *Epps D. E., Natarajan V., Schmid P. C., Schmid H. O. //* Biochim. Biophys. Acta. 1980. **618**. P. 420 - 430.
6. *Schmid H. H. O., Schmid P. C., Natarajan V.. //* Prog.Lipid Res. 1990. **29**. P. 21 -24.
7. *Гула Н. М., Маргітич В. М., Горідько Т. М. та ін.. //* Теоретична медицина. 1996. **2**, N 4. с. 712 - 721.
8. *Parinardi N.L., Schmid H.H.O..//* FEBS Letters. 1988. **237**, N1,2. P. 49 - 52.
9. *Hansen H. S., Lauritzen L., Moesgaard B. et al.. //* Biochem. Pharmacol. 1998. **55**. P. 719 - 725.
10. *Schmid H. H., Schmid P. C., Natarajan V.. //* Chem. Phys. Lipids. 1996. **80**. P. 133 - 142.
11. *Epps D. E., Grupp I. L., Grupp G., Schwartz A..//* IRSC Med. Sci. 1983. N 11. P. 899 - 900.
12. *Горідько Т. М., Маргітич В. М., Клімашевський В. М. та інш.. //* Укр. біохім. журн. 1996. **68**, N2. с. 99 - 102.
13. *Bligh E. G., Dyer W. I.. //* Can. J. Biochem. Physiol. 1959. **37**. P. 911 - 917.
14. *Palmer F. B. St. C.. //* Biochim. Biophys. Acta. 1971. **231**, N1. P. 134 - 144.
15. *Schmid P. C, Natarajan V, Weis B. K, Schmid H. H.. //* Chem. Phys. Lipids. 1986. **41.** P. 195 - 207.
16. *Christie W. W.*. Lipid analysis. Pergamon Press: Oxford. 1979. P. 338.
17. *Lowry O. H. , Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.. //* J.Biol.Chem. 1951. **193**, N2. P. 265 - 275.
18. *Russo C., Olivieri O., Girelli D. et al..//* Hypertension. 1997. **29**. p. 1058 - 1063.

[1] Інститут геронтології АМН України; [2] Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

Одержано 03.06.99