

НЕЙРОПРОТЕКТОРНИЙ ЕФЕКТ N-АЦИЛЭТАНОЛАМІНІВ ЗА ХРОНІЧНОЇ МОРФІННОЇ ЗАЛЕЖНОСТІ. I. ФОСФОЛІПІДИ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ЯК МІШЕНЬ ДЛЯ ЇХНЬОЇ ДІЇ

Н. М. ГУЛА, В. М. МАРГІТИЧ, М. В. АРТАМОНОВ, О. Д. ЖУКОВ,
Т. М. ГОРІДЬКО, В. М. КЛІМАШЕВСЬКИЙ

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: ngula@biochem.kiev.ua

Изучали влияние смеси насыщенных и ненасыщенных N-ацилэтанололаминов на липидный состав ткани мозга крыс при хронической морфинной зависимости. Установлено, что длительное применение этих соединений восстанавливает вызванное морфином уменьшение содержания основных фосфолипидов в мозгу животных с экспериментальной морфинной зависимостью. Такое влияние, по-видимому, осуществляется вследствие переноса ацильного остатка от N-ацетилэтанололаминов к некоторым фосфолипидам ткани мозга крыс, в частности кардиолипину и фосфатидилэтанолмину, а также из-за уменьшения действия на организм окислительного стресса, что обеспечивает ремоделирование фосфолипидного состава клеток. Увеличение содержания основных фосфолипидов ткани мозга под действием N-ацетилэтанололаминов у животных с морфинной зависимостью ассоциируется с существенным уменьшением добровольного потребления морфина.

К л ю ч е в ы е с л о в а: N-ацилэтанололамины, фосфолипиды, морфинная зависимость, мозг.

N-ацилэтаноламіни (NAE) належать до нещодавно відкритого класу біологічно активних сполук ліпідної природи, які за нормальних умов утворюються в пікомолярній кількості в головному мозку та деяких периферійних тканинах інших органів [1]. Їхню функціональну роль ще й досі вивчено недостатньо, хоча вже зараз зрозуміло, що N-арахідоноілетаноламін (тривіальна назва анандамід) і інші NAE з поліненасиченими ацильними залишками, які є агоністами канабіноїдних [2] та ванілоїдних [3] рецепторів нейронів, формують анандамідергічну систему головного мозку. Функція останньої тісно пов'язана з ендogenousними опіатами [4], хоча механізм взаємодії цих сигнальних систем у нормі та за опійної наркоманії практично не досліджено. Цікаво, що дія NAE на нервові клітини, як і морфін, опосередковується індукцією конститутивної NOS і синтезом NO [5–7], рецептори яких (канабіноїдні та опіоїдні відповідно), здебільшого локалізуються в одних і тих самих клітинах [8]. У нейронах головного мозку анандамід й інші поліненасичені та насичені NAE утворюються, переважно, з N-ацилфосфатидилетаноламіну на залежному від фосфоліпази D метаболічному шляху. При цьому основну частину утворених NAE становлять молекули з насиченими вуглеводневими ланцюгами [9].

На відміну від поліненасичених, насичені NAE специфічно не зв'язуються з канабіноїдними рецепторами, а здійснюють вплив на кліти-

ни, переважно, за позарецепторними механізмами [4]. Доведено потужні антиоксидантні та мембраностабілізуювальні [10, 11] властивості насичених NAE за оксидативного стресу внаслідок безпосередньої фізико-хімічної взаємодії з ліпідним бішаром мембран. Ці сполуки також здатні спричинювати біохімічну модифікацію ліпідного складу деяких тканин, загальмовувати розщеплення основних фосфоліпідів мембран та стимулювати активне транспортування кальцію у плазматичній мембрані і в мембранах субклітинних структур [12, 13]. Деякі автори виявили здатність N-пальмітоілетаноламіну запобігати глутаматіндукованому ексайтотоксичному ушкодженню нейронів [14] [14]. Наведені дані дозволяють раціонально обґрунтувати можливе використання екзогенних NAE як нейропротекторних агентів у разі інтоксикації ЦНС, зокрема за морфинної залежності. Принагідно зауважимо, що на сьогодні ще не запропоновано лікарських засобів для патогенетичного лікування опійної наркоманії, через недостатньо вивчений патогенез цього захворювання. Нині основна увага науковців фокусується на вивченні нейрональних механізмів наркотичної залежності, що регулюють поведінкові реакції у хворих на опійну наркоманію та розвиток толерантності до наркотика, однак загальним метаболічним ефектам хронічного вживання морфіну все ще відводиться другорядна роль.

Ми постулюємо, що морфінізм є системним нейро-соматичним захворюванням, яке зу-

мовлено порушенням різних ланок обміну речовин та пов'язаного з ним структурно-функціонального ушкодження біологічних мембран, що призводить до прогресування розладів у нейро-трансмітерних системах мозку.

Таку концепцію патогенезу опійної наркоманії підтверджують важливі, на наш погляд, дані, що за морфінної інтоксикації об'єм нейрона зменшується на 25% [15]. Істотні морфологічні зміни є наслідком загального порушення метаболізму при цьому захворюванні. Нашими дослідженнями було встановлено, що в разі експериментальної опійної наркоманії у клітинах головного мозку шурів на 29 та 22% зменшується відповідно рівень загальних ліпідів і фосфоліпідів [16]. Ці дані збігаються з наведеними в літературі результатами щодо інгібування під впливом морфіну включення холіну до молекули фосфатидилхоліну [17] та порушення метаболізму деяких сигнальних фосфоліпідів [18]. Таке масивне зниження рівня ліпідів у тканині головного мозку може бути основним чинником нейродегенеративного процесу, спричиненого хронічним вживанням наркотика. Тому є нагальна необхідність створення нових лікарських засобів, які б відновлювали метаболічні порушення, зумовлені хронічним вживанням морфіну, що відкрило би принципово нові можливості в патогенетичному лікуванні опійної наркоманії. Загалом на сьогодні нейропротекторні властивості NAE досить широко висвітлено в літературі [19]. Проте нами не виявлено робіт, присвячених вивченню нейропротекторної дії NAE за опійної наркоманії.

З огляду на вищезазначене, метою роботи було дослідити вплив напівсинтетичної суміші NAE на ліпідний склад тканини головного мозку шурів за їхньої хронічної морфінної інтоксикації.

Матеріали та методи

Досліди проводили на 44 білих шурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 200–350 г. До групи 1 (контрольної) увійшло 6 інтактних шурів. Шури інших груп протягом тижня мали можливість вибору: пити воду чи 15%-й розчин етанолу. Після цього тваринам упродовж семи тижнів надавали можливість вибирати для пиття 0,01%-й розчин морфіну або питну воду. Під час перших семи днів експерименту тварини споживали пересічно 0,25 мг морфіну / кг маси тіла. Наприкінці досліду доза випитого морфіну збільшувалась майже в 10 разів (2,0–2,2 мг / кг маси тіла). Цих тварин поділили на групи. До групи 2 увійшло 15 шурів-морфіністів, яким не робили ін'єкції NAE. Тваринам третьої-сьомої груп ($n = 5, 4, 6, 6$ і 4 відповідно) протягом 7 днів внутрішньоочеревинно вводили суміш NAE

в курсових дозах 3,5; 35; 200; 350 та 700 мг/кг маси тіла відповідно. Шурів декапітували під ефірним наркозом. Мозок виймали і негайно поміщали у скраплений азот перед екстракцією ліпідів методом Bligh-Dyer et al. [20], детально описаним нами в роботі [16]. Для розділення фосфоліпідів використовували такі системи розчинників:

- хлороформ – метанол – бензол – аміак (28%) в об'ємному співвідношенні 65 : 30 : 10 : 6–8 (перший напрямок);

- хлороформ – метанол – бензол – ацетон – льодова оцтова кислота – вода у співвідношенні 70 : 30 : 10 : 5 : 4 : 1 (другий напрямок).

Для детекції розподілу діацильних та плазмалогенних форм фосфоліпідів використовували реакційну мікротонкошарову хроматографію із проведенням метанолізу безпосередньо на скляній пластинці. В експерименті застосовували такі системи розчинників:

- перший напрямок: хлороформ – метанол – 28%-й аміак (65 : 35 : 5);

- другий напрямок, для проведення метанолізу: 3М HCl в метанолі;

- другий напрямок, для розділення продуктів реакції: хлороформ – метанол – ацетон – льодова оцтова кислота – вода (100 : 20 : 40 : 20 : 10).

З метою препаративного виділення фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну застосовували двовимірну тонкошарову хроматографію на силікагелі КСК-2. Для візуалізації плям платівки обприскували дистильованою водою. Проявлені плями зішкрібали й накопичували. Фосфатидилхолін елюювали із силікагелю сумішшю хлороформ–метанол (50 : 50), а фосфатидилетаноламін – сумішшю тих самих розчинників, але в іншому об'ємному співвідношенні – 80 : 20. Якісний та кількісний аналіз загальних та індивідуальних фосфоліпідів детально описано нами в роботі [16].

Синтез міченого [$1-^{14}\text{C}$]-пальмітоїлетаноламіну (^{14}C -NPE) проводили так, як описано у статті [21]. Розподіл міченого ^{14}C -NPE досліджували після внутрішньоочеревинного введення тваринам мітки (100 мкКі). Шурів декапітували на п'ятій хвилині експерименту під ефірним наркозом. Досліджували розподіл мітки в ліпідах різних класів та в індивідуальних у фосфоліпідах тканини головного мозку інтактних шурів.

Одержані результати оброблено статистично з використанням t -критерію Стьюдента.

Результати та обговорення

Дані, наведені в табл. 2, свідчать, що NAE в курсовій дозі 3,5, 350 та 700 мг/кг маси тіла пов-

Таблиця 1. Основні жирнокислотні залишки суміші NAE, що вводили щурам із морфінною залежністю

Жирні кислоти	Відсоток до загальної кількості
Міристинова	10,92
Пальмітинова	23,27
Пальмітолеїнова	12,25
Стеаринова	5,10
Олеїнова	13,62
Лінолева	1,79
Бегенова	2,78
Арахідонова	1,19
Ейкозопентаєнова	11,46
Докозагексаєнова	3,05
Інші	14,57

ністю відновлюють кількість загальних ліпідів та загальних фосфоліпідів у тканині головного мозку щурів-морфіністів. Якщо морфін зумовлює істотне зниження їхнього рівня, то введення тваринам NAE в цих дозах усуває несприятливу дію морфіну. Такий ефект може бути зумовлений пригніченням спричиненого морфіном розщеплення ліпідів та інтенсифікацією їхнього синтезу. В літературі не висвітлено дані щодо дії NAE на синтез ліпідів, хоча вже відомо, що деякі з них істотно впливають на внутрішньоклітинну трансдукцію сигналів, зокрема через фосфоінозитид-3'-кіназу, Ras, р38-мітогенактивовану протеїнкіназу [23], впливаючи, у такий спосіб на метаболічні процеси.

З огляду на одержані нами результати, було проведено вивчення (на п'ятій хвилині після

ін'єкції) інкорпорації в ліпіди мозку мітки ¹⁴C-NPE, введеної інтактним щурам у дозі 100 мкКі (табл. 3). Виявлено, що за цей період близько 3/4 її концентрується у фракції NAE, 1/5 – у загальних фосфоліпідах, у той час як у нейтральні ліпіди включаються лише слідова кількість радіоактивності сполуки.

Наступні дослідження (табл. 4) показали, що головними мішенями включення радіоактивного попередника NAE у фосфоліпіди є кардіоліпін (дифосфатидилгліцерол, DPG) та фосфатидилетаноламін (PE). Теоретично можна було б очікувати, що NAE у клітині розщеплюється ферментом амідазою на жирну кислоту та етаноламін [24]. Однак очікуваного накопичення радіоактивної мітки у фракції вільних жирних кислот нами не виявлено. Цей факт змушує шукати альтернативні метаболічні шляхи перенесення жирної кислоти з міченого NAE до молекули фосфоліпіду. Здається, така альтернатива можлива, якщо базуватись на особливостях Ca²⁺-залежного ендогенного синтезу N-ацильованих ліпідів. Цей метаболічний шлях включає два основні етапи:

1 – перенесення ацилу із sn-1 позиції дифосфатидилгліцеролу (головний донор ацильного залишку), фосфатидилхоліну або іншого фосфоліпіду на аміногрупу фосфатидилетаноламіну під впливом трансацилази, внаслідок чого утворюється N-ацилфосфатидилетаноламін;

2 – фосфоліпазна D-залежна реакція відщеплення NAE від N-ацилфосфатидилетаноламіну з утворенням фосфатидної кислоти [25].

Відомо, що один і той самий фермент, згідно із законом діючих мас, може каталізувати залежно від умов як пряму, так і зворотну реакцію. У клітинах, в яких утворюються пікомолярна кількість NAE, трансацилаза, зазвичай, каталізує

Таблиця 2. Зміни вмісту загальних ліпідів та неорганічного фосфору загальних фосфоліпідів (мг/г тканини) у тканині мозку щурів-морфіністів під впливом NAE ($M \pm m$) ($n = 4-6$)

Групи тварин	Сума загальних ліпідів	Сума фосфоліпідів
Інтактні щури	89,6 ± 1,4	2,00 ± 0,04
Щури-морфіністи	75,7 ± 2,5 *	1,69 ± 0,04 *
Щурам-морфіністам введено NAE, мг/кг маси тіла (курсова доза):		
3,5	84,2 ± 3,9	1,87 ± 0,06 #
35	73,0 ± 4,8 *	1,62 ± 0,14 *
200	75,0 ± 4,0 *	1,74 ± 0,11
350	81,9 ± 3,3	1,74 ± 0,12
700	89,0 ± 2,1#	1,88 ± 0,05 #

Тут і в інших таблицях: * зміни порівняно з інтактним контролем вірогідні, # зміни вірогідні порівняно зі щурами-морфіністами, $p < 0,05$.

Таблиця 3. Відсотковий розподіл мітки в ліпідних класах головного мозку інтактних щурів за внутрішньоочеревинного введення їм (^{14}C -пальмітоїл)етаноламіну

Класи ліпідів	Відсоток від загальної радіоактивності сполук
Фосфоліпіди	18,5
Холестерол	0,0
Вільні жирні кислоти	0,0
Триацилгліцероли	2,6
Ефіри холестеролу	0,4
NAPE	4,0
NAE	74,5

Примітка: NAE – N-ацилетаноламіни, NAPE – N-ацилфосфатидилетаноламіни.

безпосередньо реакцію N-ацилювання фосфатидилетаноламіну. Цілком іншою, ймовірно, є ситуація, коли у клітину надходять мікромолярні кількості NAE. Не виключено, що в такому разі NAE за участю фосфоліпази D здатен взаємодіяти з фосфатидною кислотою, утворюючи N-ацилфосфатидилетаноламін (рисунок). Можна припустити, що трансацилаза за певних умов каталізує перенесення ацильного залишку з N-позиції N-ацилфосфатидилетаноламіну на позицію sn-1 лізодифосфатидилгліцеролу, лізофосфатидилетаноламіну або якогось іншого лізофосфоліпіду з утворенням діацилгліцерофосфоліпіду. Попередні досліди, проведені в нашій лабораторії, схоже, підтверджують можливість такого шляху метаболізму екзогенно введеного в організм NAE, оскільки в зоні з R_p , який близький до R_f

Таблиця 4. Відсотковий розподіл мітки у фосфоліпідах головного мозку інтактних щурів за внутрішньоочеревинного введення (^{14}C -пальмітоїл)етаноламіну (% від загальної кількості мітки, включеної до фосфоліпідів)

Фосфоліпіди	Відсоток від загальної радіоактивності сполук
Фосфатидилхолін	4,32
Фосфатидилетаноламін	26,08
Фосфатидилсерин	5,96
Сфінгомієлін	1,58
Фосфатидилінозитол	6,14
Дифосфатидилгліцерол	55,91

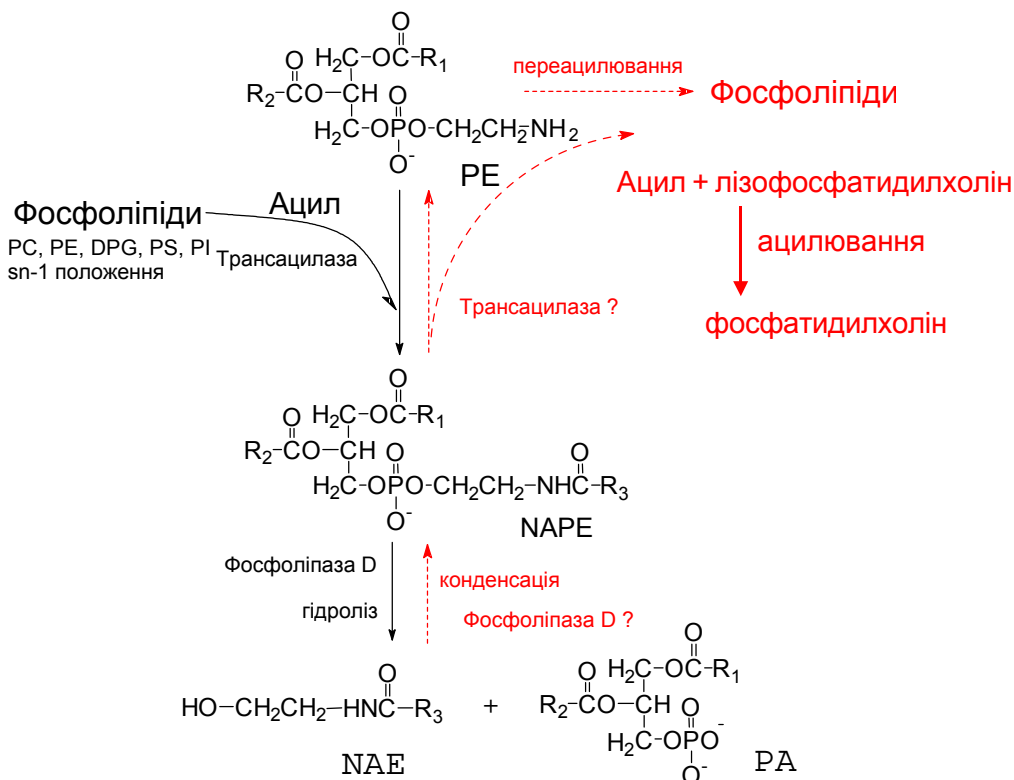
N-ацилфосфатидилетаноламіну зареєстровано істотне накопичення мітки. Однак для остаточного підтвердження цієї гіпотези необхідно здійснити серію додаткових хімічних реакцій для ідентифікації NAE, оскільки виявлення їх у біологічному матеріалі методом мікротонкошарової хроматографії спряжене з багатьма труднощами та артефактами.

У табл. 5 наведено дані щодо змін вмісту індивідуальних фосфоліпідів у тканині головного мозку щурів-морфіністів під впливом NAE. Зауважимо, що за морфінізму кількість фосфатидилхоліну (PC), PE, фосфатидилсерину (PS), сфінгомієліну (SM) та фосфатидилінозитолу (PI) істотно знижується. Внутрішньоочеревинне введення тваринам NAE (курсозна доза 3,5 мг/кг маси тіла) спричинює вірогідне підвищення порівняно зі щурами-морфіністами вмісту PS, SM та DPG. Рівень двох основних фосфоліпідів – PC

Таблиця 5. Зміни вмісту неорганічного фосфору (в мкг P_i /г тканини) в індивідуальних фосфоліпідах мозку щурів-морфіністів під впливом NAE ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Фосфоліпіди	Інтактні щури	Щури-морфіністи	NAE, мг/кг маси тіла				
			3,5	35	200	350	700
PC	672 ± 17	594 ± 18*	621 ± 22	549 ± 65	602 ± 44	686 ± 23 [#]	642 ± 44
PE	727 ± 16	663 ± 16*	706 ± 28	598 ± 79	685 ± 51	734 ± 32	700 ± 54
PS	236 ± 5	192 ± 7*	225 ± 9 [#]	183 ± 15*	197 ± 15*	204 ± 8*	185 ± 17*
SM	121 ± 4	88 ± 6*	121 ± 13 [#]	101 ± 11	97 ± 7*	90,0 ± 3,1*	98 ± 9*
PI	60 ± 3	42 ± 4*	51 ± 4	47 ± 7	53 ± 6	46 ± 5 *	34 ± 6 *
LPS	31 ± 6	24 ± 10	26 ± 3	26 ± 10	12 ± 2*	11 ($n=1$)	10 ($n=1$)
PA	28 ± 2	38 ± 6	33 ± 7	21 ± 4 [#]	28 ± 7	42 ± 25	–
DPG	18 ± 3	26 ± 4	39 ± 3,1**	71 ± 31	27 ± 6	37 ± 5*	26 ± 10
St	97 ± 13	49 ± 3*	50 ± 5*	38 ± 9*	48 ± 9*	53 ± 7*	53 ± 4*

Тут і в табл. 6 та рисунку: PC – фосфатидилхолін, PE – фосфатидилетаноламін, PS – фосфатидилсерин, SM – сфінгомієлін, PI – фосфатидилінозитол, LPS – лізофосфатидилсерин, PA – фосфатидна кислота, DPG – дифосфатидилгліцерол, St – стартова зона.



Можливий механізм включення міченого *N*-пальмітоїлетаноламіну до фосфоліпідів, де PC – фосфатидилхолін, PE – фосфатидилетаноламін, PI – фосфатидилінозитол, PS – фосфатидилсерин, DPG – дифосфатидилгліцерол, PA – фосфатидна кислота, NAE – *N*-ацилетаноламін, NAPE – *N*-ацилфосфатидилетаноламін, R₁CO- та R₂CO- ацильні залишки (далі ацил) в положенні *sn*-1 та *sn*-2, R₃CO-ацил, перенесений із *sn*1-положення іншого фосфоліпиду, або ацил, перенесений від NAE (можливий механізм показано сірим кольором і пунктиром).

та PE – у шурів-морфіністів, яким призначали NAE в курсових дозах 200–700 мг/кг маси тіла вірогідно не відрізняється від такого в інтактних тварин. За ін'єкції NAE в дозі 3,5 та 350 мг/кг кількість DPG порівняно з інтактними щурами зростає майже вдвічі. Можна помітити паралелізм між інкорпорацією міченого NAE в зазначені вище фосфоліпіди та підвищенням загального вмісту їх у тканині головного мозку шурів-морфіністів, а також за хронічного введення NAE в різних курсових дозах.

Що стосується відсоткового вмісту індивідуальних фосфоліпідів (табл. 6), то за морфінної інтоксикації вірогідно зростає лише рівень PE та DPG, у той час як SM – знижується. Ін'єкція щурам NAE в курсовій дозі 3,5 мг/кг зумовлює підвищення кількості PS у тканині мозку шурів з експериментальною опійною наркоманією порівняно зі щурами-морфіністами. Відсотковий вміст індивідуальних фосфоліпідів у мозку шурів з цієї групи, яким призначали NAE в курсовій дозі 35 мг/кг, вірогідно не відрізняється від такого в інтактних тварин. Привертає увагу факт,

що високі дози NAE (200–700 мг/кг) спричиняють виражене зростання вмісту PE щодо інтактного контролю, а також зменшення рівня або відсутність лізофосфатидилсерину (LPS). При цьому ін'єкція щурам NAE в дозі 350 мг/кг спричинює збільшення кількості PI стосовно інтактного контролю і вірогідне зниження вмісту LPS та PS, а у дозі 700 мг/кг – вірогідне зменшення аніонного фосфоліпиду. При цьому в обох останніх групах істотно зростає рівень PC. За ін'єкції NAE в дозі 3,5; 200 та 350 мг/кг спостерігається порівняно з контролем майже дворазове збільшення відносного вмісту DPG у тканині мозку шурів-морфіністів з опійною залежністю.

Експериментальні дослідження, здійснені *in vitro*, свідчать про дозозалежний вплив NAE на перебіг деяких біохімічних процесів, наприклад вератринзалежне транспортування одновалентних катіонів у клітинах нейробластоми C1300 [26]. Відсутність чіткого дозозалежного ефекту NAE на рівні цілісного організму можна пояснити тим, що ці сполуки здійснюють вплив як на клітини, так і на функціональну активність нейроендок-

Таблиця 6. Зміни відсоткового вмісту індивідуальних фосфоліпідів тканини мозку щурів-морфіністів під впливом NAE ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Фосфоліпіди	Інтактні щури	Щури-морфіністи	NAE, мг/кг маси тіла (курсова доза)				
			3,5	35	200	350	700
PC	33,6 ± 0,4	35,0 ± 0,6	33,2 ± 0,9	33,6 ± 1,5	34,4 ± 0,4	36,3 ± 0,8*	36,9 ± 0,4*#
PE	36,4 ± 0,5	38,8 ± 0,7*	37,7 ± 0,5	36,3 ± 2,1	39,0 ± 0,5*	38,9 ± 0,9*	40,2 ± 0,5*
PS	12,2 ± 0,4	11,2 ± 0,2	12,0 ± 0,2#	11,3 ± 0,2	11,3 ± 0,2	10,8 ± 0,3*	10,6 ± 0,5*
SM	6,1 ± 0,2	5,2 ± 0,2*	6,5 ± 0,9	6,3 ± 0,8	5,6 ± 0,3	4,8 ± 0,1*	5,6 ± 0,4
PI	3,0 ± 0,2	2,6 ± 0,3	2,7 ± 0,2	2,8 ± 0,2	3,1 ± 0,4	2,4 ± 0,2	1,9 ± 0,2*
LPS	1,6 ± 0,3	1,5 ± 0,5	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,4	0,7 ± 0,1*	0,59 ($n = 1$)	0,50 ($n = 1$)
PA	1,4 ± 0,1	2,1 ± 0,4	1,7 ± 0,3	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,3	2,4 ± 1,5	—
DPG	0,9 ± 0,1	1,7 ± 0,2*	2,1 ± 0,2*	5,0 ± 2,3	1,5 ± 0,2*	1,9 ± 0,2*	1,6 ± 0,7
St	4,8 ± 0,6	3,3 ± 0,5	2,7 ± 0,3*	2,3 ± 0,4*	2,9 ± 0,7	2,8 ± 0,4*	3,1 ± 0,2*

ринної системи, значення якої в регуляції обміну ліпідів загальновідоме. Втім, біохімічні та фармакологічні аспекти дозозалежної дії NAE на організм заслуговують бути предметом окремого дослідження.

Хронічне споживання морфіну призводить до істотного зменшення кількості плазмалогенної форми фосфатидилетаноламіну та зростання рівня його діацильної форми (табл. 7). Відомо, що зниження кількості плазмалогенів (алкіл-/алкенільних форм фосфоліпідів) є чутливим індикатором оксидативного стресу [27]. Вважають, що ці сполуки виконують у клітинах роль антиоксидантів [28], а також стабілізують стан біологічних мембран [29]. Нещодавно встановлено кореляцію між зменшенням вмісту плазмалогенів у мембранах деяких клітин і показниками загальної та, зокрема, серцево-судинної смертності [30]. Ці факти є доказом того, що хронічна інтоксикація організму морфіном супроводжується оксидативним стресом. Призначення NAE в курсовій

дозі 700 мг/кг усуває негативний ефект морфіну, практично нормалізуючи розподіл діацильної та плазмалогенної форми фосфатидилетаноламіну. Раніше нами було встановлено, що у високих дозах NAE виявляють виражені антиоксидантні властивості [11].

Відомо, що морфін не тільки зв'язується з опіатними рецепторами, але й легко вбудовується в біологічні мембрани різних тканин, модифікуючи перебіг мембранозв'язаних процесів. Вірогідно, що взаємодія морфіну з опіатними рецепторами призводить до модифікації функціональної активності нейротрансмітерних систем та формування психічної залежності, а його системна метаболічна дія асоціюється з розвитком наркотичної інтоксикації та формуванням фізичної залежності. До того ж морфін у високих дозах запускає апоптоз деяких видів клітин [31].

Для подолання патологічних змін, спричинених хронічним вживанням морфіну, особливо перспективним є застосування NAE як мембра-

Таблиця 7. Зміни відсоткового вмісту ацильної та плазмалогенної форми фосфатидилетаноламіну у тканині мозку щурів-морфіністів за дії NAE ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Групи тварин	Діацильна форма	Плазмалогенна форма
Інтактні щури	39,5 ± 0,5	60,5 ± 0,5
Щури-морфіністи	43,8 ± 0,8*	56,2 ± 0,8*
Введення щурам NAE, мг/кг маси тіла (курсва доза):		
3,5	44,4 ± 3,6	55,6 ± 3,6
35	44,4 ± 5,1	55,6 ± 5,1
200	42,4 ± 0,5*	57,6 ± 0,5*
350	44,2 ± 0,9*	55,8 ± 0,9*
700	41,3 ± 3,7	58,7 ± 3,7

нотропного засобу, що здатний нормалізувати ліпідний склад тканини головного мозку та мінімізувати негативний вплив оксидативного стресу. Хоча в цій роботі ми не досліджували морфометрію нейронів головного мозку щурів-морфіністів після ін'єкції тваринам NAE, не виключено, що репарація ліпідного складу мембран нейрона здатна призвести до відновлення його об'єму та нормального функціонування мембранозалежних процесів. Вірогідно, що NAE могли би бути лікарськими засобами, які впливатимуть на фосфоліпіди мембран і, отже, зможуть розірвати порочне коло порушення метаболізму ліпідів та нейротрансмітерів, а також ефективно впливати на наркотичну залежність. Якщо така гіпотеза, хоча б частково, відповідає дійсності, то можна сподіватися, що щури, яким вводять NAE, принаймні, не збільшуватимуть кількості добровільно спожитого морфіну протягом останнього восьмого тижня експерименту.

Як впливає з даних, наведених у табл. 8, щури з експериментальною опійною залежністю протягом восьмого тижня експерименту нарощували об'єми добровільно спожитого 0,01%-го розчину морфіну. Водночас, щури-морфіністи усіх груп, яким вводили NAE в різних курсових дозах, не тільки перестали збільшувати обсяги випитого морфіну, але й скоротили добровільне його споживання. В останньому випадку найефективнішою виявилася ін'єкція тваринам NAE (35 мг/кг), за якої щури-морфіністи майже наполовину, вірогідно зменшили кількість добровільно спожитого морфіну. Ці факти чітко свідчать, що нормалізація ліпідного складу тканини головного мозку у щурів з експериментальною опійною залежністю асоціюється зі скороченням добро-

вільного споживання морфіну, і, отже, про послаблення наркотичної залежності у тварин.

Нещодавно висловлено припущення, згідно з яким деякі ефекти морфіну можуть реалізуватися через ендоканабіноїдну систему [32]. Деякі науковці вважають, що анандаміду також притаманні наркотичні властивості, подібно до його екзогенного аналога – Δ^9 -тетрагідроканабінола [4]. З огляду на це, теоретично можна дійти хибного висновку, що у тварин зменшується потреба в морфіні внаслідок отримання іншого “наркотика” – NAE. Звичайно, це питання потребує додаткових досліджень. Однак вже нині відомі факти, які спростовують таку думку, передусім дані щодо різноспрямованої дії морфіну та NAE на розподіл ліпідів у тканині головного мозку: якщо морфін зумовлює зменшення кількості основних фосфоліпідів, то NAE сприяє підвищенню їхнього рівня. Якби ін'єкція тваринам NAE лише замінювала б наркотичний ефект морфіну, то, очевидно, вплив їх на ліпідний склад мозку нагадував би саме наркотичний. Іншим важливим доказом є те, що більшу частину використаного щурами NAE становлять сполуки з насиченими ацильними залишками, які не є агоністами канабіноїдних рецепторів. Вони виявляють свою біологічну активність за позарецепторними механізмами і не належать до психотропних речовин [33]. Наведені дані свідчать, що NAE є швидше нейропротекторним агентом, ніж субститутивним наркотиком.

Таким чином, нами вперше показано, що хронічне застосування NAE нівелює зумовлену морфіном зниження рівня важливих фосфоліпідів у тканині мозку щурів з експериментальною опійною залежністю. Такий вплив цих сполук

Таблиця 8. Зміни у споживанні (мл/добу) 0,01%-го розчину морфіну щурами з експериментальною опійною залежністю (протягом 7 тижнів) до призначення NAE та після призначення NAE (протягом 8-го тижня морфінної залежності) ($M \pm m$, $n = 4-6$)

Групи тварин	До призначення NAE	Після призначення NAE	Зміна споживання морфіну, %
Інтактні щури	–	–	–
Щури-морфіністи	4,32 ± 0,50	5,72 ± 0,90	+32,4
Введення щурам NAE, мг/кг маси тіла (курсова доза):			
3,5	4,23 ± 0,68	3,60 ± 0,94	-14,9
35	5,48 ± 0,58	2,82 ± 0,51*	-48,5*
200	4,98 ± 0,35	3,95 ± 0,52	-20,7
350	5,08 ± 0,39	3,70 ± 0,68	-27,2
700	6,93 ± 0,71	6,08 ± 0,33	-12,3

* Зміни вірогідні порівняно зі щурами з експериментальною опійною залежністю до призначення NAE (сьомий тиждень морфінної залежності).

хоча б частково здійснюється внаслідок перенесення ацильного залишку NAE на деякі фосфоліпиди тканини мозку, внаслідок чого забезпечується ремоделювання фосфоліпідного складу. Нормалізація ліпідного складу тканини головного мозку спряжена з добровільним та істотним зменшенням споживання морфіну щурами з експериментальною опійною залежністю, механізм якого потребує подальшого вивчення.

На основі одержаних даних оформлено заявку за №20031213067, Україна, 7 МПК А61К 9/90, 31/00, 31/20 “Спосіб застосування та одержання N-ацилетаноламінів, як лікарських засобів для захисту клітин від ушкоджень”. Заявлено 30 грудня 2003 року.

**NEUROPROTECTIVE EFFECT
OF N-ACYLETHANOLAMINES UNDER
CHRONIC MORPHINE DEPENDENCE.
I. RAT BRAIN PHOSPHOLIPIDS
AS A RATIONAL TARGET OF THEIR
ACTION**

*N. M. Gula, V. M. Margitich,
M. V. Artamonov, O. D. Zhukov,
T. M. Goridko, V. M. Klimashevsky*

Palladin Institute of Biochemistry, National Academy
of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: ngula@biochem.kiev.ua

S u m m a r y

The influence of saturated and unsaturated N-acylethanolamines (NAEs) mixture on the rat brain lipid composition under the chronic morphine dependence was studied. It was shown that the long-term administration of NAE to rats with experimental morphine dependence restored the morphine-induced alterations of the brain phospholipid composition. This effect can probably be explained by a fatty acyl transfer from NAE to sn-1 position of some brain glycerophospholipids. Another reason of NAE beneficial effect could be due to its antioxidative property, thus providing the remodelling of phospholipid composition. The restoration of the brain essential phospholipids is associated with the decline in morphine consumption in rats with experimental morphine dependence. The mechanism of this phenomenon requires further investigations.

К е у w o r d s: N-acylethanolamines, phospholipids, morphine dependence, brain.

1. *Piomelli D., Giuffrida A., Calignano A. et al. // Trends Pharmacol. Sci. 2000. 21, N 6. P. 218–224.*
2. *Hillard C. J., Campbell W. B. // J. Lipid. Res. 1997. 38, N 12. P. 383–398.*

3. *Di Marzo V., Breivogel C., Bisogno T. et al. // Eur. J. Pharmacol. 2000. 406, N 3. P. 363–374.*
4. *Welch S. P., Eads M. // Brain Res. 1999. 848, N 1–2. P. 183–190.*
5. *Stefano G. B., Hartman A., Bilfinger T. V. et al. // J. Biol. Chem. 1995. 270, N 51. P. 30290–30293.*
6. *Magazine H. I., Liu Y., Bilfinger T. V. et al. // J. of Immunology. 1996. 156. P. 4845–4850.*
7. *Liu Y., Shenouda D., Bilfinger T. V. et al. // Brain Research. 1996. 722. P. 125–131.*
8. *Childers S. R., Fleming L., Kodkoy C. et al. // Annals New York Acad. Sci. 1992. 654. P. 33–51.*
9. *Schmid P. C., Schwindenhammer D., Krebsbach R. J., Schmid H. H. // Chem. Phys. Lipids. 1998. 92, N 1. P. 27–35.*
10. *Parinandi N. L., Schmid H. H. // FEBS Lett. 1988. 237, N 1–2. P. 49–452.*
11. *Gulaya N. M., Kuzmenko A. I., Margitich V.M. et al. // Chem. Phys. Lipids. 1998. 97, N 1. P. 49–54.*
12. *Гулая Н. М., Говсеева Н. Н., Климашевский В. М. и др. // Укр. біохім. журн. 1997. 69, № 5–6. С. 64–74.*
13. *Гулая Н. М., Бабич Л. Г., Шликов С. Г. и др. // Там само. С. 75–84.*
14. *Skaper S. D., Buriani A., Dal Toso R. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. 93, N 9. P. 3984–3989.*
15. *Nestler E. J., Berhow M. T., Brodtkin E. S. // Mol. Psychiatry. 1996. 1, N 3. P. 190–199.*
16. *Гула Н. М., Маргітич В. М., Говсеева Н. М. та ін. // Укр. біохім. журн. 1998. 70, № 2. С. 98–105.*
17. *Natsuki R. // Arukoru Kenkyuto Yakubutsu Ison. 1992. 27, N 1. P. 57–70.*
18. *Barg J., Belcheva M. M., Zimlichman R. et al. // J. Neurosci. 1994. 14, N 10. P. 5858–5864.*
19. *Hansen H. S., Lauritzen L., Moesgaard B. et al. // Biochem. Pharmacol. 1998. 55, N 6. P. 719–725.*
20. *Bligh E. G., Dyer W. I. // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. 37. P. 911–917.*
21. *Маргітич В. М., Жуков О. Д., Артамонов М. В., Гула Н. М. // Укр. біохім. журн. 1999. 71, № 6. С. 108–110.*
22. *Мельничук С. Д., Кузьменко А. И., Маргітич В. М. и др. // Там само. 1998. 70, № 1. С. 87–94.*
23. *Rueda D., Galve-Roperh I., Haro A., Guzman M. // Mol. Pharmacol. 2000. 58, N 4. P. 814–820.*
24. *Schmid P. C., Schmid H. H. // Biochim. Biophys. Acta. 1987. 922, N3. P. 398–400.*
25. *Reddy P. V., Schmid P. C., Natarajan V., Schmid H. H. // Ibid. 1983. 751, N 2. P. 241–246.*
26. *Gulaya N. M., Melnik A. A., Balkov D. I., Volkov G. V., Vysotskiy M. V. and Vaskovsky V. E. // Ibid. 1993. 1152, N 2. P. 280–288.*

27. *Stenvinkel P., Diczfalusi U., Heimbürger O.* // Nephrol. Dial. Transplant. 2004. **19**. P. 972–976.
28. *Engelmann B., Brautigam C., Thiery J.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. **15**. P. 1235–1242.
29. *Ford D. A., Hale C. C.* // FEBS Lett. 1996. **394**. P. 99–102.
30. *Stenvinkel P., Holmberg I., Heimbürger O., Diczfalusi U.* // Nephrol. Dial. Transplant. 1998. **13**. P. 2594–2600.
31. *Patel J., Manjappa N., Bhat R. et al.* // Amer. J. Physiol. Renal. Physiol. 2003. **285**, N 5. P. F861–869.
32. *Fimiani C., Mattocks D., Cavani F.* // Cell Signal. 1999. **11**, N 3. P. 189–193.
33. *Aceto M. D., Scates S. M., Razdan R. K., Martin B. R.* // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1998. **287**, N 2. P. 598–605.

Отримано 23.04.2004