

## ІМУНОСУПРЕСИВНІ ВЛАСТИВОСТІ N-СТЕАРОЇЛЕТАНОЛАМІНУ – СТАБІЛЬНОЇ СПОЛУКИ З КАНАБІМІМЕТИЧНОЮ ДІЄЮ

Н. М. ГУЛА, А. А. ЧУМАК, О. Ф. МЕГЕДЬ, Т. М. ГОРІДЬКО,  
Н. Л. КІНДРУК, А. Г. БЕРДИШЕВ

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

*У роботі наведено результати вивчення біохімічних механізмів впливу N-стеароїлетаноламіну (NSE) на перебіг у тварин алергічної реакції негайного типу (анафілактичного шоку) та уповільненого (контактної гіперчутливості до 2,4-динітрохлорбензолу). NSE вводили морським свинкам per os протягом двох тижнів до провокації анафілаксії. Спостерігали, що ця сполука попереджає підвищення вмісту гістаміну і  $\text{NO}_2$  в серці, нирках та селезінці. Водночас, NSE запобігає також істотному зниженню кількості нітрит-аніона ( $\text{NO}_2^-$ ) в печінці і меншою мірою в легенях. При цьому він знижує у міокарді активність індукцйбельної і конститутивної NO-синтази, нормалізує вміст ТБК-активних сполук в серці та легенях і гальмує в серці та легенях падіння активностей глутатіонпероксидази, каталази та супероксиддисмутази. Ефект та ступінь впливу NSE на організм залежить від добової дози. Близько 70% тварин, що отримували NSE в дозі 65мг/кг маси тіла, виживали під час анафілактичного шоку.*

*Установлено також, що NSE пригнічує реакцію гіперчутливості уповільненого типу і нормалізує вміст  $\text{NO}_2^-$  у плазмі крові мишей, але лише в дозі 50 мг/кг маси тіла. В тимусі сенсibilізованих мишей NSE сприяє зниженню вмісту нітрит-аніона.*

*Таким чином, хоча NSE не виявляє спорідненості до специфічних канабіноїдних рецепторів – СВ-рецепторів (тобто не є типовим ендоканабіноїдом), – його здатність впливати на алергічні реакції негайного та уповільненого типів свідчить про перспективу створення на основі NSE нових лікарських засобів, які принципово відрізнятимуться від усіх відомих нині фармакологічних препаратів із протиалергічними та імунодепресивними властивостями.*

*Ключові слова: N-стеароїлетаноламін, анафілаксія, реакція гіперчутливості сповільненого типу, гістамін, оксид азоту, пероксидне окислення ліпідів.*

Останнім часом уявлення про фізіологічну роль канабіноїдів дуже швидко розвиваються, що дає змогу сформулювати уявлення стосовно значення ендоканабіноїдної системи в організмі. До неї належать два типи трансмембранних канабіноїдних рецепторів – СВ1 та СВ2 – і велика кількість ендогенних лігандів та ферментів їхнього метаболізму. Арахідоноїлетаноламід (анандамід) та 2-арахідоноїлгліцерол є основними ендоканабіноїдами. Ендоканабіноїдам притаманна висока біологічна і фармакологічна активність та здатність модулювати більшість функцій організму, зокрема впливати на імунні процеси у людей та тварин. Показано, що ендоканабіноїди модулюють розвиток Т-хелперних клітин, хемотаксис і розвиток пухлин. Агоністи канабіноїдних рецепторів затримують імунологічну активацію мастоцитів та дозозалежним шляхом інгібують індуквану капсіцином брон-

хоконстрикцію [1]. Вони індуюють міграцію кілерних клітин, впливаючи у такий спосіб на захисні механізми організму проти інфекцій, вірусів і клітин пухлини [2].

Периферичний рецептор СВ2 експресується переважно на імунних клітинах – макрофагах, дендритних клітинах та В-лімфоцитах. Ендоканабіноїди порушують їхню реактивність і продукування ними цитокінів [3]. Відповідно канабіноїдні агоністи істотно впливають на розвиток деяких мікробних інфекцій і атеросклерозу, а також застосовуються для імунотерапії раку. Нещодавно виявлено нову функцію ендоканабіноїдної системи. Було показано, що утворення субтипів В- та Т-клітин потребує наявності канабіноїдних рецепторів СВ2 [4]. На сьогодні відомо понад 20 ліпідних медіаторів, які регулюють імунну і репродуктивну функції організму, біль, енергетичний баланс тощо. Багато з цих сполук не здатні

до високоспорідненого зв'язування з СВ1- та СВ2-рецепторами, але виявляють канабіміметичні властивості. Було також показано, що деякі з них діють на такі відомі сигнальні молекули як рецептор, що активується проліфератором пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ , PPAR $\alpha$ ), або ванілоїдний рецептор TRPV1 (transient receptor potential type vanilloid 1) [5]. Найдетальніше серед ендоканабіноїдів вивчено анандамід та 2-арахідоноїлгліцерол, а також деякі канабіміметичні сполуки з ланцюгами ненасичених жирних кислот, які генеруються в організмі одночасно з анандамідом. До ендогенних C<sub>18</sub>-N-ацилетаноламінів (NAE) належать: NAE<sub>18:3</sub>, NAE<sub>18:2</sub> та NAE<sub>18:1</sub>. Всі ці речовини є слабкими лігандами рецепторів СВ1, однак вони здатні активувати TRPV1 і, отже, відігравати роль його ендогенних модуляторів. Насичений NAE<sub>18:0</sub> – стеароїлетаноламін (NSE), – на відміну від ненасичених, не активує TRPV1 за будь-яких експериментальних умов [6]. Проте вдалось установити, що NSE завжди посилює індуковану анандамідом кальцієву відповідь [7]. Цей факт можна пояснити гальмуванням активності амідогідролази жирних кислот у присутності NSE і, отже, потенціюванням дії анандаміду. Відомо, що NSE виявляє проапоптотичну активність стосовно деяких трансформованих клітин, регульованої NO, але способом, який протилежний регуляції анандамідом. Деяким ендоканабіноїдам, зокрема пальмітоїлетаноламіну, притаманна імуносупресивна активність. Однак така інформація щодо NSE практично відсутня, як і стосовно їхнього впливу на перебіг алергічних реакцій.

У роботі ми вивчали дію NSE на деякі біохімічні показники імунної відповіді негайного типу (анафілактичний шок) у морських свинок, а також на реакцію гіперчутливості сповільненого типу (РГСТ) у мишей. Обидва типи імунної відповіді супроводжуються продукцією активних метаболітів кисню (O<sub>2</sub><sup>\*</sup>), оксиду азоту NO, пероксидацією ліпідів і змінами активності антиоксидантних ензимів.

### Матеріали та методи

У дослідах використовували самців морських свинок ( $n = 58$ ) та мишей ( $n = 41$ ), яких утримували у стандартних клітках. Воду та збалансований гранульований раціон тварини отримували *ad libitum*. Експеримент проводили відповідно до правил етичної комісії Інституту біохімії НАН України.

*Модель алергічної реакції негайного типу (анафілактичного шоку).* Морських свинок із

масою тіла 250–300 г сенсibiliзували одно-разовим підшкірним введенням 0,2 мл сироватки коней (ЗАТ «Біолік», Україна) у праву пахову ділянку. Після цього їх поділили на три групи: сенсibiliзований контроль ( $n = 15$ ) та тварин, які протягом двох тижнів щоденно отримували *per os* суспензію NSE: 0,65 ( $n = 10$ ) або 65 мг/кг маси тіла ( $n = 22$ ). Алергічну відповідь оцінювали за розвитком задишки, судом та летальністю тварин. Для біохімічних досліджень відбирали зразки серця, легень, печінки, селезінки та нирок. Морських свинок, які не загинули впродовж 20 хв, так само, як і інтактних тварин ( $n = 11$ ), піддавали дії повітряної емболії.

*Модель алергічної реакції сповільненого типу.* Статевозрілих самиць та самців мишей з масою тіла 15–20 г сенсibiliзували 2,4-динітрохлорбензолом (ДНХБ). Для цього 1 краплю 2%-го розчину ДНХБ в ацетоні наносили на шкіру абдомінальної зони. Щоденно упродовж 8 днів від дня сенсibiliзації мишам *per os* вводили суспензію NSE (0,5 або 50 мг/кг маси тіла). На 9-й день на шкіру правого вуха з обох боків наносили по одній краплі 0,5%-го розчину ДНХБ. Після декапітації тварин під ефірним наркозом визначали інтенсивність реакції гіперчутливості уповільненого типу за інтенсивністю набряку правого вуха (у відсотках) порівняно з інтактним лівим, зважуючи обидва вуха, які відділяли на межі волосяного покриву.

Кількість гістаміну в гомогенатах тканин тестували спектрофотометричним методом як описано у статті [8]; вміст стабільного метаболіту оксиду азоту нітрит-аніона (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) – спектрофотометрично методом L. C. Green et al. за допомогою реактиву Грисса [9]. Сумарну активність NO-синтази (КФ 1.14.13.39) – конститутивної cNOS та індукцйбельної iNOS – в гомогенатах серця морських свинок оцінювали за кількістю утвореного під час інкубації нітрит-аніона [10]. Інкубаційна суміш (об'єм 1 мл) містила: 50 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH = 7,0); 1 мМ MgCl<sub>2</sub>; 2 мМ CaCl<sub>2</sub>; 1 мМ NADPH; 2,2 мМ L-аргініну та 0,2 мл проби. В разі визначення активності iNOS до складу інкубаційної суміші для зв'язування ендогенного Ca<sup>2+</sup> замість CaCl<sub>2</sub> додавали EGTA (кінцева концентрація 4 мМ). Активність конститутивної NO-синтази (cNOS) обчислювали як різницю між активністю сумарної NOS та iNOS.

Активність каталази (КФ 1.11.1.6) в гомогенатах печінки визначали за швидкістю розщеплення пероксиду водню [11], активність глутатіонпероксидази (ГП, КФ 1.11.1.9) – за накопиченням окисленого глутатіону [12], су-

пероксиддисмутази (СОД, КФ 1.15.1.1) – за ступенем зниження відновлення нітросинього тетразолію у присутності NADH та феназин-метасульфату [13]. Інтенсивність процесів пероксидного окислення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за накопиченням ТБК-активних продуктів (малонового діальдегіду) як описано в роботі [14]. Вміст білка у тканинах тестували методом Бредфорд.

Статистичний аналіз здійснювали з використанням *t*-критерію Стьюдента. Вірогідними вважали дані, якщо  $P \leq 0,05$ .

### Результати та обговорення

Упродовж останніх років спостерігалось активне вивчення впливу ендоканабіноїдів на перебіг алергічних реакцій. Однак більшість опублікованих результатів стосується вивчення властивостей анандаміду,  $\Delta$ -тетрагідроканабінолу і деяких інших ендоканабіноїдів з ненасиченим жирнокислотним ланцюгом. У цій роботі вперше наведені дані, які свідчать, що NSE–сполука з насиченим жирнокислотним ланцюгом – здатен підвищувати тривалість виживання морських свинок під час анафілактичного шоку, а також гальмувати перебіг РГСТ у мишей.

Результати клінічної характеристики анафілактичного шоку в морських свинок наведені в табл. 1. Через декілька секунд після внутрішньочеревинної провокації його у сенсibilізованих тварин контрольної групи вже виявляються ознаки анафілактичного шоку: збудження, порушення дихання, сухе покаш-

лювання, почісування пилу, порушення координації рухів і, нарешті, судоми з летальним кінцем через 3–4 хв.

У морських свинок, що *per os* отримували 0,65 мг/кг NSE, виявляли подібні симптоми анафілактичного шоку, однак вони гинули вже через 8–10 хв. Тварини, що отримували більшу дозу NSE, реагували на провокацію анандамідом тільки короткотерміновим порушенням дихання (задишкою) та почісуванням пилу. Виразніші ознаки анафілактичного шоку і, врешті-решт, загибель морських свинок у цій групі ми спостерігали у 27,7% тварин (у 6 із 22).

Раніше у тканині легень було виявлено СВ1-рецептори, які локалізуються на аксонних терміналях нервових волокон у клітинах гладеньких м'язів бронхіол, а також встановлено здатність анандаміду синтезуватись у тканині легень, що свідчить про певну фізіологічну роль ендоканабіноїдної системи у їхньому функціонуванні. Після введення анандаміду тваринам із бронхоспазмом, індукованим капсіцином, він значно пригнічується, однак після усунення вагусного тонуусу цей ендоканабіноїд знову індукує його [1]. У наших експериментах дія NSE пом'якшувала вияв бронхоспазму в сенсibilізованих тварин, що отримали провокаційну дозу антигену (табл. 1). Одержані нами результати узгоджуються з отриманими раніше, в яких висвітлено бронходилатативний вплив канабіноїдів ( $\Delta$ -тетрагідроканабінолу), введених тваринам або *per os*, або у вигляді аерозоля при захворюванні на астму [15].

Таблиця 1. Вплив NSE на перебіг алергічної реакції негайного типу (анафілактичного шоку) у морських свинок

Ознаки анафілаксії	Інтактні тварини	Тварини у стані анафілаксії, спровокованою сироваткою коня		
		Без введення їм NSE	Введення NSE у дозі 0,65 мг/кг маси тіла	Введення NSE у дозі 65 мг/кг маси тіла
Неспокійна поведінка, почісування	0/11*	15/15	10/10	22/22
Утруднене дихання, кашель, чхання	0/11	15/15	10/10	9/22
Утрата рухливості, параліч кінцівок, судоми, смерть	0/11	15/15	10/10	6/22
Зникнення всіх негативних симптомів	0/11	0/15	0/10	16/22

Примітка: до косої лінії позначено кількість тварин з ознаками шоку, після косої – загальна кількість тварин у групі

Анафілактичний шок розвивається внаслідок взаємодії антигену з антитілами; він супроводжується дегрануляцією тучних клітин (mast cells) з вивільненням великої кількості біологічно активних метаболітів, у т.ч. гістаміну, цитокінів та NO, що відіграють провідну роль у розвитку цього патологічного стану [16]. Відомо, що гістамін збільшує проникність капілярів, індукує набряк тканин,

підвищує артеріальний тиск та спричинює надлишок шляхом індукції скорочення гладеньких м'язів бронхів.

За умов експерименту найвищий рівень гістаміну в інтактних тварин виявлено в нирках та легенях. Індукція анафілактичного шоку в сенсibilізованих морських свинок супроводжувалася значними змінами його вмісту у тканинах (рис. 1). Рівень гістаміну в

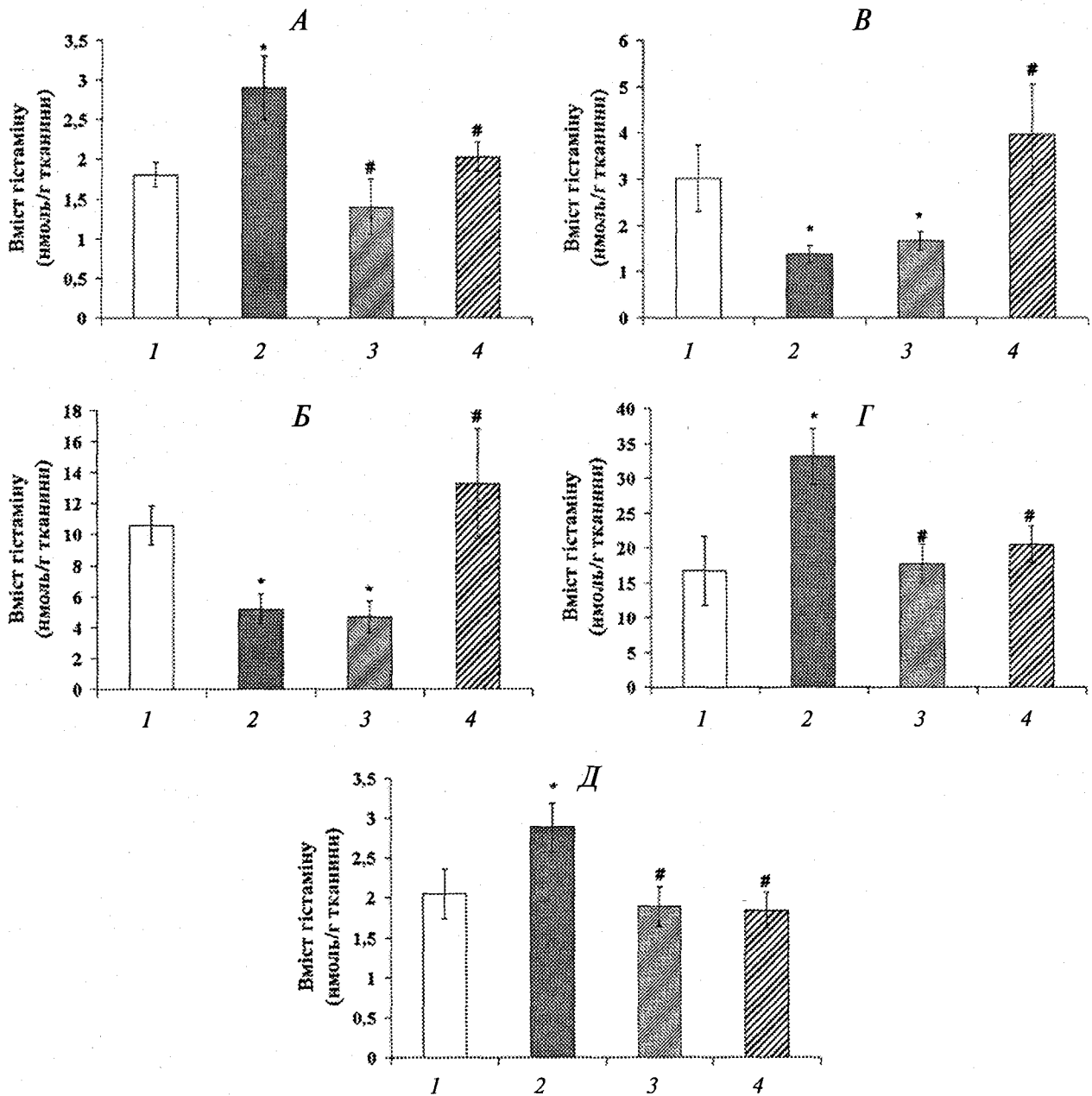


Рис. 1. Вплив NSE на вміст гістаміну в серці (А), легенях (Б), печінці (В), нирках (Г) та селезінці (Д) морських свинок під час анафілаксії; 1 – інтактні тварини; 2 – у стані анафілактичного шоку; 3, 4 – запобігання введення тваринам per os NSE в дозах 0,65 та 65 мг/кг маси тіла відповідно протягом 14 днів до анафілактичного шоку.

Примітка. Тут і в табл. 2–7: \*дані порівняно з інтактними тваринами вірогідні:  $P < 0,05$ ; # дані порівняно із тваринами у стані анафілактичного шоку вірогідні,  $P < 0,05$ .

серці (рис. 1, А), нирках (рис. 1, Г) та селезінці (рис. 1, Д) підвищувався порівняно з інтактними тваринами на тлі істотного зниження його в легенях (рис. 1, Б) та печінці (рис. 1, В). Введення сенсibilізованим тваринам per os NSE в обох дозах протягом двох тижнів запобігає зростанню рівня гістаміну в серці, нирках та селезінці. В легенях та печінці нормалізація вмісту гістаміну відбувається тільки у тих тварин, які щоденно отримували NSE в дозі 65 мг/кг маси тіла.

Гістамін та вазоактивні продукти арахідонового каскаду, що вивільнюються з тучних клітин та базофілів, спричинюють специфічні зміни в серцевому м'язі – серцеву анафілаксію. При цьому ключову роль у процесі відіграє гістамін. У серці активація тучних клітин та викид гістаміну контролюються багатьма ендогенними механізмами, до яких належить адренергічний контроль; залежний від гістаміну негативний оборотний механізм, що реалізується через гістамінові рецептори типу 2, а також ендогенна генерація NO та CO. При введенні сенсibilізованим морським свинкам 65 мг/кг NSE концентрація гістаміну в усіх досліджених органах за анафілаксії залишається на рівні інтактних тварин (рис. 1).

Відомо, що алергічна відповідь та запалення супроводжуються активацією NOS, унаслідок чого у клітинах серця і селезінки накопичується велика кількість NO, яка значно перевищує його фізіологічний рівень. NO є медіатором низки фізіологічних процесів, у т.ч. і тих, що супроводжуються алергічною відповіддю. Недостатня продукція його в легенях морських свинок за анафілактичного шоку потенціює гіпоксичний стан, який виникає через бронхоконстрикцію, прискорюючи летальний кінець тварин.

Під час анафілактичного шоку вміст нітрит-аніона знижується майже вдвічі як у легенях, так і печінці сенсibilізованих тварин (рис. 2; Б, В) на тлі значного підвищення його в серці та селезінці (рис. 2; А, Г). У нирках (рис. 2, Д) спостерігається лише тенденція до підвищення вмісту нітрит-аніона порівняно з інтактними тваринами. Запобіжне введення морським свинкам NSE перед індукцією анафілаксії попереджає зміни у вмісті NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (рис. 2). При цьому не відбувається зниження нітрит-аніона в легенях (рис. 2, Б) і печінці (рис. 2, В), а також гальмується його підвищення в серці (рис. 2, А) та селезінці (рис. 2, Г). У нирках (рис. 2, Д) вірогідних змін концентрації нітрит-аніона не виявлено. Реакція судинної системи печінки на анафілаксію реа-

лізується як гіперемія та уповільнення кровообігу через констрикцію постсинусоїдальних вен. Однією із причин цього явища може бути зниження синтезу NO. Нами було показано (рис. 2, В), що за анафілактичного шоку в печінці морських свинок, які отримували NSE, вміст нітрит-аніона не змінюється порівняно з інтактними. Це свідчить про здатність NSE в разі анафілаксії запобігати зниженню рівня NO, який і спричинював в печінці вазодилаторний ефект та зменшення гіперемії. У тканині серця (рис. 2, А), селезінки (рис. 2, Г) і нирок (рис. 2, Д) ця сполука запобігає гіперпродукції NO у тварин з анафілактичним шоком. Здатність деяких NAE з ненасиченими ланцюгами активувати cNOS та гальмувати iNOS було виявлено при вивченні механізму їхньої гіпотензивної та антизапальної дії [17]. Відомо також, що деякі насичені NAE, зокрема пальмітоїлетаноламін, у стані гострого запалення інгібують у шурів утворення оксиду азоту та активність циклооксигенази.

Після індукції анафілактичного шоку в серці сенсibilізованих тварин підвищується активність як cNOS, так і iNOS (рис. 3). Введення їм NSE запобігає підвищенню активності обох ізоформ ензиму. Статистично значуща дія NSE спостерігається в дозі 65 мг/кг.

Роль NO та різних NOS, що беруть участь у механізмі розвитку бронхоспазму та гіпотензії, відомі досить давно. Зокрема, було з'ясовано, що більша частина надлишку NO при різних запальних процесах та септичному шоці генерується за участю iNOS. Однак нещодавно [18] було показано, що анафілактичний шок у мишей опосередковується сигнальним шляхом за участю фосфатидилінозитол-3-кінази (PI3K), а надпродукція NO відбувається за участю eNOS, але не “запальної” iNOS. Раніше висловлювали лише припущення щодо ролі cNOS в розвитку анафілактичного шоку, оскільки активація та експресія iNOS потребує досить довгого періоду – від 6–8 до 24 год.

Водночас слід відзначити гальмівний вплив NSE на активність NOS, який виявлено у клітинах гліоми С6 мозку шура [19]. З огляду на це, одержані нами результати стосовно активності iNOS та cNOS в серці морських свинок (рис. 3) свідчать, що при анафілаксії активність cNOS підвищується, внаслідок чого генерується надлишок NO. За дії iNOS за анафілактичного шоку кількість нітрит-аніона збільшується від 0,5 до 8 пмоль/хв на 1 мг білка, в той час як за участю cNOS генерація NO<sub>2</sub><sup>-</sup> перевищує 130 пмоль/хв на 1 мг білка (рис. 3, А).

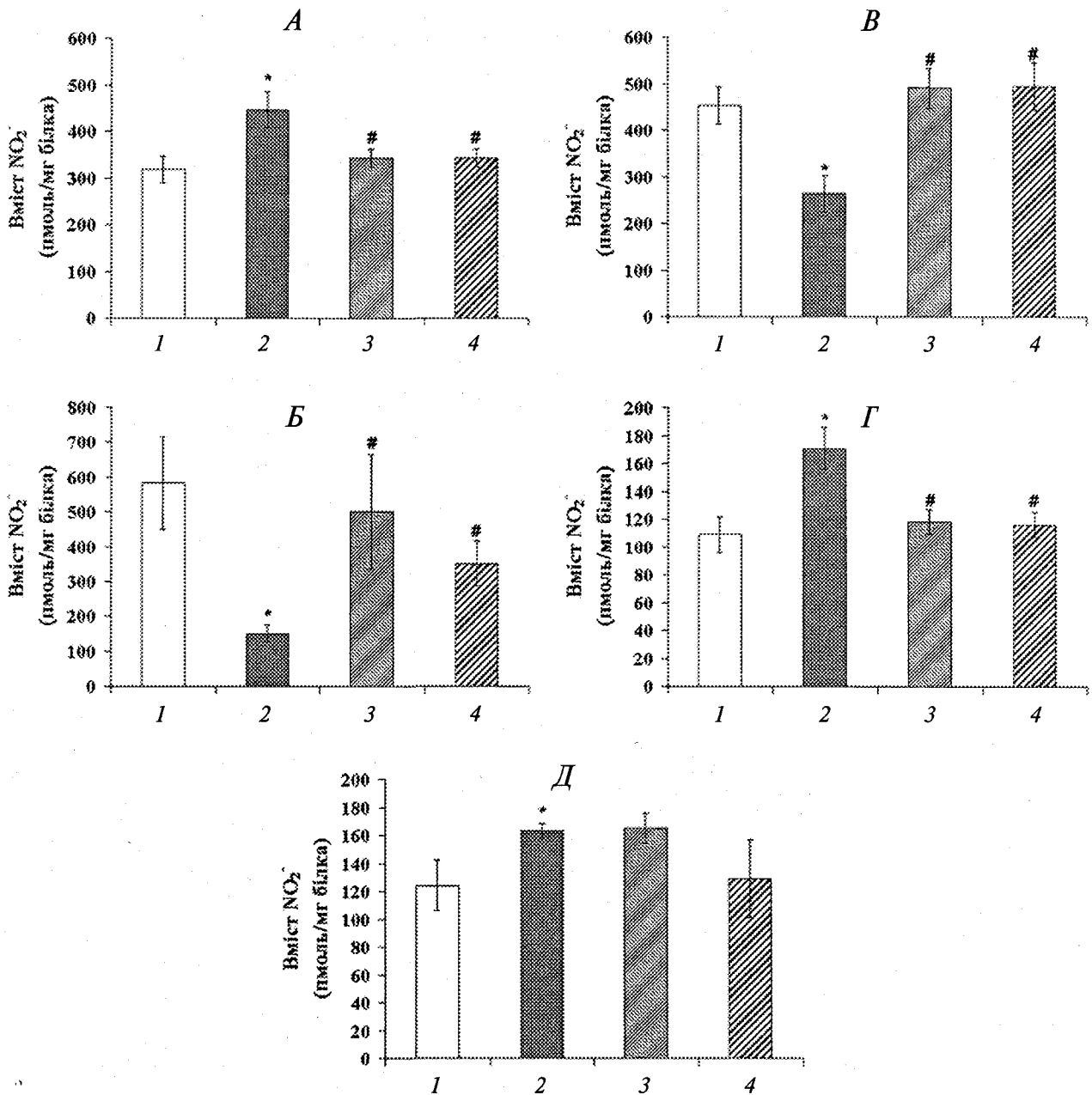


Рис. 2. Вплив NSE на вміст нітрит-аніона в серці (А), легенях (Б), печінці (В), селезінці (Г) та нирках (Д) морських свинок при анафілаксії: 1 – інтактні тварини; 2 – у стані анафілактичного шоку; 3, 4 – запобіжне введення тваринам *per os* NSE у дозах 0,65 та 65 мг/кг маси тіла відповідно протягом 14 днів до анафілактичного шоку

Введення тваринам NSE в дозі 65 мг/кг перед провокацією анафілактичного шоку гальмує в серці морських свинок надмірну активацію обох типів NOS (але переважно cNOS), що приводить до зниження кількості NO в міоцитах (рис. 3, А) і, відповідно, до гальмування вияву анафілактичного шоку.

Унаслідок розвитку анафілактичного шоку у тканинах серця (рис. 4, А) і легень (рис. 4, Б)

морських свинок накопичуються ТБК-активні продукти. Але якщо їм до індукції анафілактичного шоку вводили *per os* NSE, то кількість живих тварин залишалась на рівні у інтактних. Максимальний позитивний ефект NSE відзначено у дозі 65 мг/кг маси тіла.

Підвищення рівня продуктів ПОЛ за анафілаксії у контрольних тварин супроводжується зниженням активності ензимів антиокси-

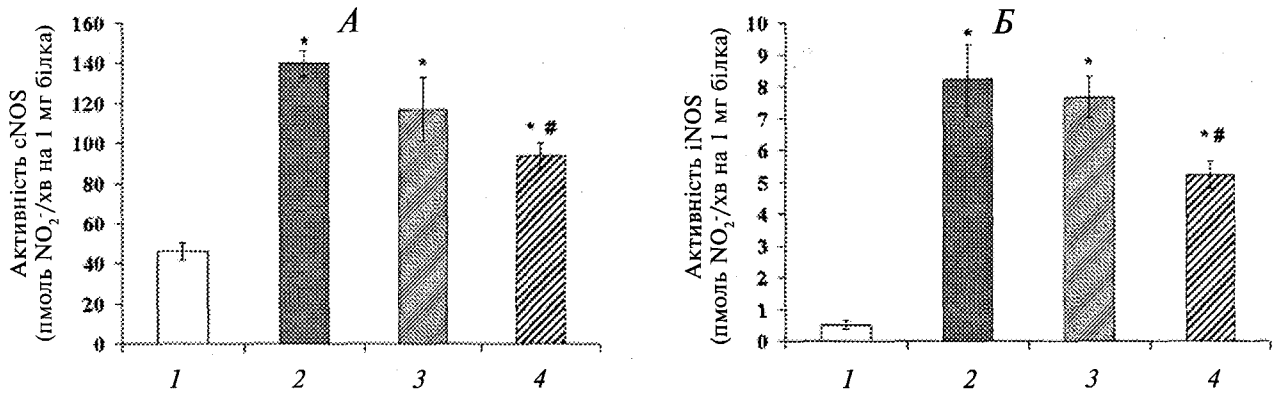


Рис. 3. Вплив NSE на активність sNOS та iNOS в серці морських свинок при анафілаксії: 1 – інтактні тварини; 2 – у стані анафілактичного шоку; 3, 4 – запобіжне введення тваринам *per os* NSE у дозах 0,65 та 65 мг/кг маси тіла відповідно протягом 14 днів до анафілактичного шоку

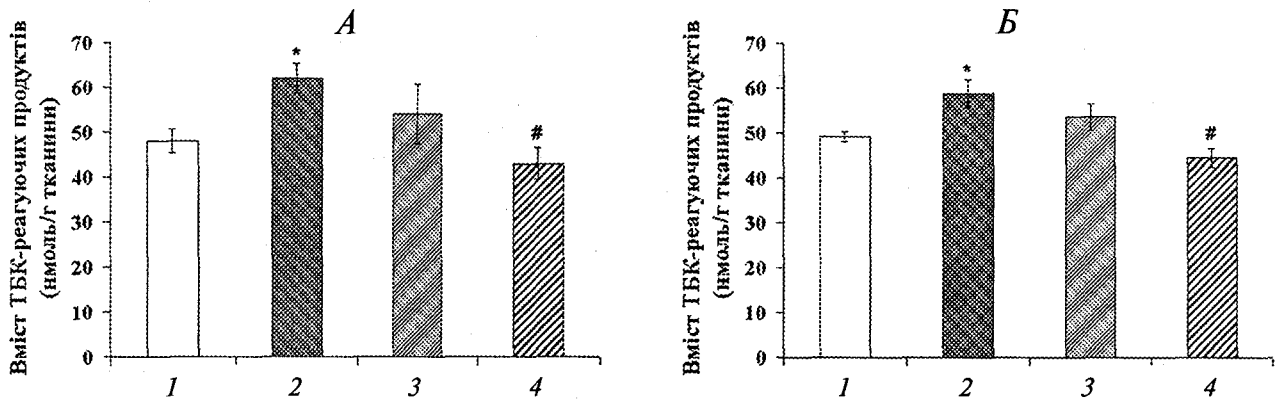


Рис. 4. Вплив NSE на вміст ТБК-активних продуктів в серці (А) і легенях (Б) морських свинок за анафілаксії: 1 – інтактні тварини; 2 – у стані анафілактичного шоку; 3, 4 – запобіжне введення тваринам *per os* NSE у дозах 0,65 та 65 мг/кг маси тіла відповідно протягом 14 днів до анафілактичного шоку

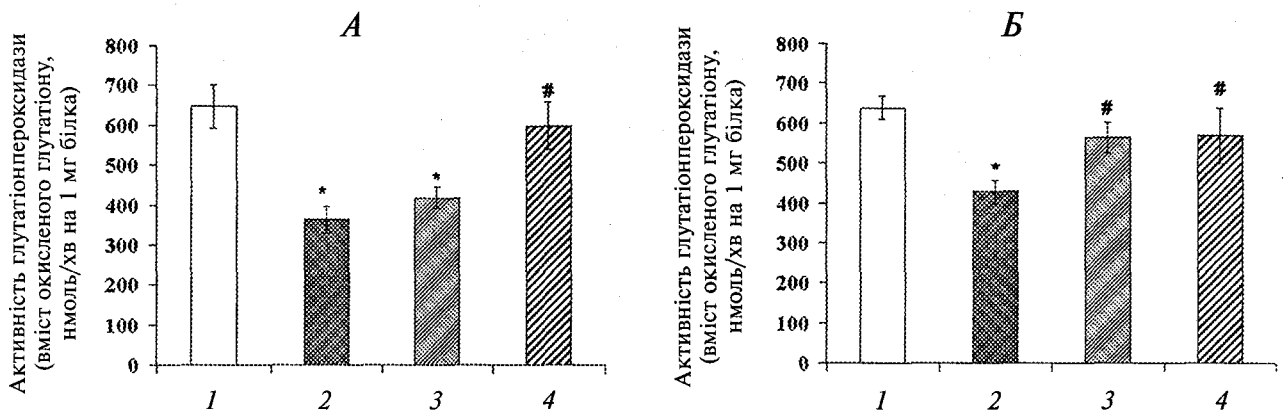


Рис. 5. Вплив NSE на активність глутатіонпероксидази в серці (А) та легенях (Б) морських свинок за анафілаксії: 1 – інтактні тварини; 2 – у стані анафілактичного шоку; 3, 4 – запобіжне введення тваринам *per os* NSE у дозах 0,65 та 65 мг/кг маси тіла відповідно протягом 14 днів до анафілактичного шоку

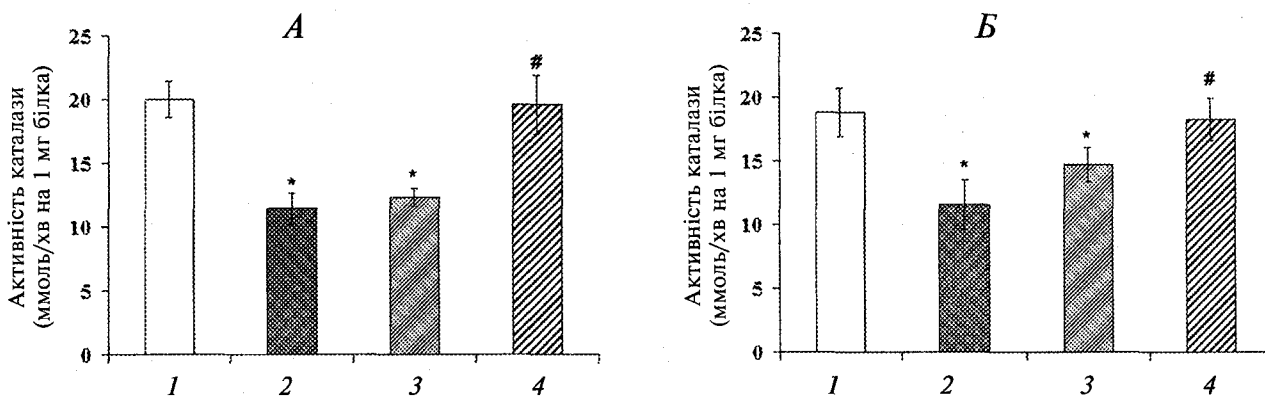


Рис. 6. Вплив NSE на активність каталази в серці (А) та легенях (Б) морських свинок за анафілаксії. 1 – інтактні тварини; 2 – у стані анафілактичного шоку; 3, 4 – запобіжне введення тваринам per os NSE у дозах 0,65 та 65 мг/кг маси тіла відповідно протягом 14 днів до анафілактичного шоку

дантного захисту як у серці (рис. 5–7, А), так і в легенях (рис. 5–7, Б).

Введення сенсibilізованим тваринам NSE запобігає зниженню активності глутатіон-пероксидази (рис. 5), супероксиддисмутази (рис. 6) та каталази (рис. 7) в серці та легенях: активність цих ензимів антиоксидантного захисту за анафілаксії не змінюється порівняно з інтактними тваринами при введенні їм NSE у добовій дозі 65 мг/кг маси тіла.

Раніше нами було показано [19, 20], що N-пальмітоїлетаноламін та NSE здатні гальмувати in vitro неензиматичне, індуковане Fe<sup>2+</sup>, вільнорадикальне окислення ліпідів у мітохондріях печінки щурів із гіпоксичною гіпоксією. NSE, молекули яких мають довший вуглецевий ланцюг, ніж N-пальмітоїлетаноламін, найістотніше пригнічують низку кінетичних показників індукованої Fe<sup>2+</sup> хемілюмінісценції. Це дало змогу припустити, що антиоксидантні

властивості NSE залежать, передусім, від довжини вуглецевого ланцюга, через що молекула здатна глибше проникати крізь мембрани клітин.

Результати дослідження впливу NSE на перебіг РГСТ у мишей, які наведені в табл. 2, свідчать про істотне пригнічення її цим ендоканабіноїдом, особливо в дозі 50 мг/кг маси тіла.

Гіперчутливість уповільненого типу як на мікробний антиген, так і простий за хімічною структурою гаптен, зокрема ДНХБ, пов'язана з активацією макрофагів інтерфероном IFN $\gamma$  та фактором некрозу пухлини TNF $\alpha$ . TNF $\alpha$  запускає продукцію NO, а IFN $\gamma$  інтенсифікує цей процес.

У наших експериментах перебіг РГСТ у відповідь на індукцію її ДНХБ супроводжувався значним підвищенням вмісту нітрит-аніона у плазмі крові (рис. 8, А) та тимусі (рис 8, Б).

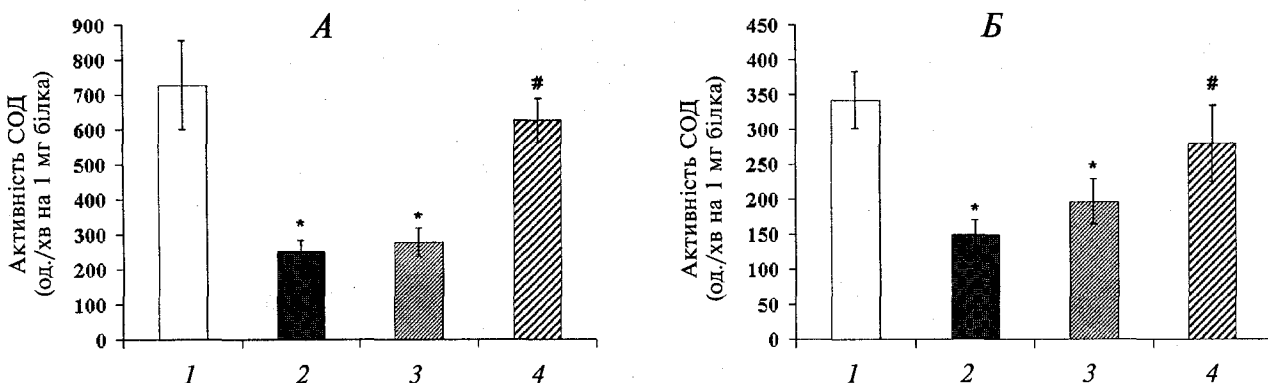


Рис. 7. Вплив NSE на активність супероксиддисмутази в серці (А) та легенях (Б) морських свинок за анафілаксії: 1 – інтактні тварини; 2 – у стані анафілактичного шоку; 3, 4 – запобіжне введення тваринам per os NSE у дозах 0,65 та 65 мг/кг маси тіла відповідно протягом 14 днів до анафілактичного шоку



Таблиця 2. Вплив NSE на перебіг алергічної РГСТ у мишей

Показник	Інтактні тварини (n = 16)	Тварини у стані РГСТ, спровокованої ДНХБ		
		Без введення NSE (n = 7)	Введення NSE в дозі 0,5 мг/кг (n = 11)	Введення NSE в дозі 50 мг/кг (n = 7)
Інтенсивність РГСТ, %	0	43,80 ± 5,66	24,94 ± 4,47 (P < 0,05)	4,32 ± 1,24 (P < 0,001)

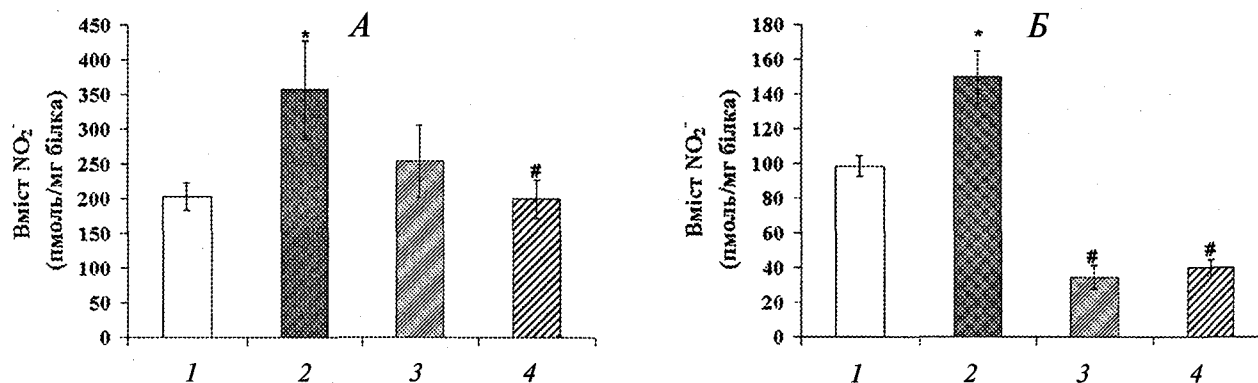


Рис. 8. Зміни вмісту  $NO_2$  у плазмі крові (А) та тимусі (Б) мишей залежно від введення їм *per os* NSE і сенсibilізації ДНХБ: 1 – інтактні тварини; 2 – миші, сенсibilізовані ДНХБ (контроль); 3, 4 – за-побіжне введення тваринам упродовж 14 днів *per os* NSE у дозах 0,5 та 50 мг/кг маси тіла відповідно. \*Дані порівняно з інтактними тваринами вірогідні,  $P < 0,05$ ; # дані порівняно з контрольними тваринами вірогідні,  $P < 0,05$

Введення тваринам NSE в дозі 50 мг/кг маси сприяло нормалізації вмісту нітрит-аніона у плазмі крові мишей, у той час як у тимусі сенсibilізованих тварин вона пригнічується за обох доз препарату.

Підсумовуючи результати досліджень, можна дійти висновку, що реалізація анти-алергічного ефекту NSE на моделях гіперчут-

ливості негайного і уповільненого типів відбувається шляхом впливу на вміст гістаміну, на генерацію вільних радикалів, оксиду азота та антиоксидантну систему клітин в органах-мішенях і тканинах тварин.

Базуючись на результатах досліджень, нами було розроблено препарат з антизапальним та антиалергічним ефектом [21].

**ИММУНОСУПРЕССИВНЫЕ  
СВОЙСТВА  
N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА –  
СТАБИЛЬНОГО СОЕДИНЕНИЯ  
С КАНАБИМИМЕТИЧЕСКИМИ  
СВОЙСТВАМИ**

*Н. М. Гулая, А. А. Чумак, Е. Ф. Мегедь,  
Т. Н. Горидько, Н. Л. Киндрук, А. Г. Бердышев*

Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев;  
e-mail ngula@biochem.kiev.ua

В статье представлены результаты исследования биохимических механизмов влияния N-стеароилэтанолamina (NSE) на протекание аллергической реакции немедленного и замедленного типов (анафилактический шок у морских свинок и контактная гиперчувствительность к 2,4-динитрохлорбензолу у мышей). При анафилактическом шоке NSE препятствует увеличению содержания гистамина в сердце, почках и селезенке, а также тормозит повышение уровня стабильного метаболита оксида азота – нитрит-аниона ( $\text{NO}_2^-$ ) в изучаемых органах и способствует его нормализации. Применение NSE препятствует снижению концентрации  $\text{NO}_2^-$  в печени и, в меньшей мере, в легких, а также повышает активность индуцибельной и конститутивной NO-синтазы. NSE нормализует содержание ТБК-активных соединений в легких и снижает в сердце, одновременно препятствуя уменьшению активности глутатионпероксидазы, каталазы и супероксиддисмутазы. Эффект NSE и степень выраженности его действия зависит от суточной дозы. Около 70% животных, которые получали *per os* 65 мг/кг массы тела NSE, выживали при анафилактическом шоке.

У мышей NSE угнетает реакцию гиперчувствительности замедленного типа и нормализует содержание  $\text{NO}_2^-$  в плазме крови и уменьшает в тимусе.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что NSE, который не является типичным эндоканнабиноидом, так как не имеет сродства к специфичным СВ-рецепторам, способен подобно другим эндоканнабиноидам влиять на протекание аллергических реакций немедленного и замедленного типов и может быть использован при создании антиаллергических и иммуносупрессивных лекарственных препаратов нового типа.

**Ключевые слова:** N-стеароилэтаноламин, анафилаксия, реакция гиперчувствительности замедленного типа, оксид азота, пероксидное окисление липидов.

**IMMUNOSUPPRESSIVE PROPERTIES  
OF N-STEAROYLETHANOLAMINE  
A STABLE COMPOUND WITH  
CANNABIMIMETIC PROPERTIES  
CHARACTERISTICS**

*N. M. Gula, A. A. Chumak, E. F. Meged,  
T. M. Goridko, N. L. Kindruk,  
A. G. Berdyshev*

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

**S u m m a r y**

Results of investigation of biochemical mechanisms of N-stearoylethanolamine (NSE) influence on the processes of allergic responses of immediate and delayed type (anaphylactic shock in guinea pigs and contact hypersensitivity to 2,4-dinitrochlorobenzene in mice) are presented in the paper. NSE was given *per os* during two weeks. It was found that in anaphylactic animals, NSE prevented the growth of histamine levels in the heart, kidneys and spleen, suppressed  $\text{NO}_2^-$  level increase in these organs and promoted its normalization. At the same time NSE prevented the decrease of the level of stable metabolite of nitrogen oxide – nitrite anion ( $\text{NO}_2^-$ ) in the liver and to a lesser degree in the lungs, and also decreased the activity both inducible and constitutive NO-synthases. NSE normalized the content of TBA-reactive products in the lungs and decreased it in the heart, diminished the decline of activity of glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase. Effects of NSE depended on its daily dose. About 70% of animals which received NSE in a dose 65 mg/kg of body weight had no fatal outcome after the induction of anaphylactic shock. NSE suppressed the delayed type hypersensitivity response and normalized  $\text{NO}_2^-$  content in the blood plasma of mice but only at the dose of 50 mg/kg of weight. In the thymus of sensitized mice NSE diminished the content of  $\text{NO}_2^-$ .

Thus, though NSE has no affinity for specific CB receptors, in other words, it is not a typical endocannabinoid, its ability to influence the immediate and delayed type allergic reactions opens a perspective for creation of new medications which differ principally from existing pharmacological drugs with anti-allergic and immunosuppressive properties.

**Key words:** N-stearoylethanolamine, anaphylaxis, delayed-type hypersensitivity reaction, nitric oxide, lipids peroxidation.

1. *Yoshihara S., Morimoto H., Ohori M. et al.* // *Int. Arch. Allergy. Immunol.* – 2005. – **138**. – P. 80–87.
2. *Kishimoto S., Muramatsu M., Gokoh M. et al.* // *J. Biochem. (Tokyo).* – 2005. – **137**. – P. 217–223.
3. *Исаченко Е. Г., Виткина Т. И., Бердышев Е. В.* // *Эксперим. клин. фармакол.* – 2004. – **67**. – С. 49–50.
4. *Ziring D., Wei B., Velazquez P. et al.* // *Immunogenetics.* – 2006. – **58**. – P. 714–725.
5. *Bradshaw H. B., Walker J. M.* // *Br. J. Pharmacol.* – 2005. – **144**. – P. 459–465.
6. *Movashed P., Junsson B. A. G., Birnir B. et al.* // *J. Biol. Chem.* – 2005. – **280**. – P. 38496–38504.
7. *Smart D., Jonsson K. O., Vandervoode S. et al.* // *Br. J. Pharmacol.* – 2002. – **136**. – P. 452–458.
8. *Прошина Л. Я.* // *Лаб. дело.* – 1981. – № 2. – С. 90–93.
9. *Green L. C., David A. W., Glogowski J. et al.* // *Anal. Biochem.* – 1982. – **126**, N 1. – P. 131–138.
10. *Selter M., Knowles R. G., Moncada S.* // *FEBS Lett.* – 1999. – **291**. – P. 145–149.
11. *Королюк М. А., Иванова И. Г., Майорова И. Г., Токарев В. Е.* // *Лаб. дело.* – 1988. – № 1. – С. 16–18.
12. *Переслегина И. А.* // Там же. – 1989. – № 11. – С. 20–23.
13. *Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я.* // Там же. – 1991. – № 10. – С. 9–13.
14. *Владимиров Ю. А., Арчаков А. И.* / *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.* – М.: Наука, 1972. – 252 с.
15. *Hartley J. P., Nogrady S. G., Seaton A.* // *Br. J. Clin. Pharm.* – 1978. – **5**. – P. 523–525.
16. *Baeza M. L., Zubeldia J. M.* // *Curr. Allergy. Asthma. Rep.* – 2007. – **7**, N 1. – P. 49–55.
17. *Klein T. W.* // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – **5**, N 5. – P. 400–411.
18. *Cauweis A., Janssen B., Buys E. et al.* // *J. Clin. Invest.* – 2006. – **116**, N 8. – P. 2244–2251.
19. *Maccarone M., Pauselli R., Rienzo M. et al.* // *Biochem. J.* – 2002. – **366**. – P. 137–144.
20. *Gulaya N. M., Kuzmenko A. I., Margitich V. M. et al.* // *Chem. and Physics Lipids.* – 1998. – **97**. – P. 49–54.
21. *Пат. 77278 UA 6МПК А61К 31/13.* Препарат для пригнічення алергічних реакцій та неспецифічного запалення, спосіб його одержання і спосіб його використання / Гула Н. М., Комісаренко С. В., Чумак А. А. та ін. / Опубл. 15.11.2006. Бюл. № 11.

Отримано 19.12.2007