

ШЛЯХИ ВПЛИВУ N-АЦИЛЕТАНОЛАМІНІВ НА ФУНКЦІЮ КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ У ЩУРІВ

Л.М.Сторожук*, О.Д.Жуков¹, М.В.Артамонов¹, Н.М.Гула¹,
О.С.Микоша

Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН
України, 04114 Київ; ¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України,
01601 Київ, Україна

Вивчали вплив N-ацилетаноламінів (NAE) на функцію кори надниркових залоз щурів. In vitro досліджено безпосередній вплив насиченого NAE N-стеароїлетаноламіна (NSE) та суміші ненасичених NAE на синтез 11-ОКС зрізами кори надниркових залоз. Присутність NAE не призводила до суттєвих змін стероїдогенезу. Внесення NAE сумісно з АКТГ викликало вірогідне зниження ефекту АКТГ. In vivo виявлено, що введення ненасичених NAE сумісно з АКТГ тваринам, в яких синтез власного АКТГ було заблоковано дексаметазоном, призводило до підвищення рівня 11-ОКС у плазмі крові. У тварин, підданих стресу, введення ненасичених NAE знижувало рівень 11-ОКС, а також АКТГ в крові, тобто зменшувало стресову реакцію. Зроблено висновок, що NAE можуть впливати на функціонування усіх ланок гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової вісі; ефекти NAE значною мірою залежать від умов та вихідного стану організму.

Ключові слова: N-ацилетаноламіни, гіпоталамо-гіпофізарно-адреналова вісь, стрес, кортикостероїди.

N-ацилетаноламіни (NAE), ацильовані похідні етаноламіну, викликають інтегративні як природні модулятори та регулятори клітинних і системних процесів. З'ясування їх біологічної ролі та розкриття механізмів здійснення ними регуляторних впливів є предметом активних пошуків. Відомо, що ендogenous NAE швидко з'являються та накопичуються в тканинах у відповідь на ураження [1, 2]. Їх розповсюджують у зонах інфаркту, ішемії, запалення. Один з представників NAE N-арахідоноїлетаноламін (анандамід) в тваринних організмах здатний зв'язуватись з центральними або периферичними канабіноїдними рецепторами CB1 та CB2, властивості та функції яких докладно наведені в огляді [3]. Анандамід впливає на функціонування ендокринної системи, підвищуючи рівень кортизолу в крові кастрованих бичків [4]. Встановлено, що в надниркових залозах наявні і периферичні, і центральні (або нейрональні) канабіноїдні рецептори, а також показано, що накопичення N-пальмітоїлетаноламіна корковою тканиною наднирників щурів на 1 г тканини значно перевищує вбирання міченої сполуки іншими органами і тканинами [5]. Все це свідчить про те, що надниркові залози є потенційною мішенню для дії N-ацилетаноламінів.

Є підстави вважати, що NAE відіграють важливу роль у роботі кори надниркових залоз. Попередніми дослідженнями у наших лабораторіях виявлено, що NAE, як насичені, так і ненасичені, мають властивість модулювати стероїдогенез у корі надниркових залоз [5, 6]. Проте отримані дані мали суперечливий вигляд і потребували подальшого з'ясування. За умов in vitro NAE викликали в одному випадку збільшення [6], а в іншому – зменшення синтезу 11-ОКС наднирковими залозам [7]. Відмінність відповідей кори надниркових залоз на NAE може бути пов'язана із вихідним станом залози та рівнем АКТГ в крові тварин

* Адреса для листування (Correspondence): Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка АМН України, вул. Вишгородська, 69, 04114 Київ, Україна; E-mail: endo@i.kiev.ua

перед забоєм. Було також встановлено активацію включення мітки ^3H -холестерину в присутності NAE [6]. *In vivo* виявлено, що введення NAE щурам перед стресом призводило до значного підвищення рівня кортикостероїдів у порівнянні із лише стресованими тваринами [7]. Метою цього дослідження було уточнення характеру впливу N-ацилетаноламінів безпосередньо на кору наднирників, а також з'ясування місць впливу NAE на функцію цих залоз.

Матеріали і методи

Досліди in vitro. Вплив NAE *in vitro* на утворення 11-ОКС корою надниркових залоз вивчався на щурах-самцях лінії Вістар вагою 180-250 г. Тварин декапітували під етаміналовим наркозом (4 мг/100 г маси тіла), наднирники кожного з трьох щурів (6 залоз) нарізали на зрізи і розподіляли частини кожної залози у 6 інкубаційних пробірок, утворюючи 6 зразків однорідної тканини вагою 15-20 мг у кожній. Інкубаційне середовище складалось із 500 мкл живильного середовища 199 М (державний завод медичних препаратів, Україна) і містило 10 мМ HEPES (рН 7,4) ("Calbiochem", США). NAE вносили в концентраціях $10^{-6}, 10^{-5}, 10^{-4}$ М у вигляді спиртового розчину. Використовували N-стеароїлетаноламін (NSE) та суміш ненасичених N-ацилетаноламінів, отримані в Інституті біохімії НАН України. Контрольні проби містили розчинник у відповідній концентрації. АКТГ ("Sigma", США) в інкубаційне середовище вносили із розрахунку 2 Од/100 мг тканини. Проби інкубували при 37 °C та постійному струшуванні. З метою звільнення рецепторів АКТГ від ендогенного кортикотропіну застосовувалась попередня інкубація (із внесеним NAE) тривалістю 15 хв. Подальша інкубація (вносились NAE і АКТГ) тривала протягом 120 хв. Інкубацію припиняли, видаляючи зрізи із середовища. В інкубаційному середовищі визначали вміст 11-ОКС флюориметричним методом [8]. В кожному досліді на однотипній тканині вміст 11-ОКС в контрольній пробі (без NAE і АКТГ) приймали за 100 % і відносили до нього вміст 11-ОКС у пробах, що містили АКТГ і NAE. Дані кількох дослідів усереднювали і обробляли статистично.

Досліди in vivo. Ефекти АКТГ і NAE було досліджено на щурах-самцях лінії Вістар вагою 180-250 г. Тварин розподіляли на 6 експериментальних груп. Тривалість експерименту складала 4 год. Дексаметазон (дексаметазон фосфат "KRKA", Югославія) вводили за 3 год до введення АКТГ, внутрішньом'язово, із розрахунку 160 мкг/100 г маси тіла тварин. Через 2 год після введення дексаметазону, з метою усунення впливу подальших маніпуляцій, тварин усіх груп наркотизували введенням підшкірно барбамілу по 10 мг/100 г маси в 0,5 мл фізіологічного розчину. АКТГ вводили внутрішньом'язово в дозі 2 Од/100 г маси в 0,5 мл фізіологічного розчину. NAE, диспергований у воді за допомогою ультразвуку, вводили із розрахунку 500 мкг/100 г маси в об'ємі 1 мл внутрішньочеревно двічі: за одну годину до та відразу після введення АКТГ. Через 1 годину після ін'єкцій АКТГ тварин декапітували, кров збирали в пробірки з гепарином.

Для з'ясування впливу NAE на секрецію АКТГ було проведено експерименти на щурах-самцях лінії Вістар вагою 250-350 г. Тварин піддавали іммобілізаційному стресу (прив'язування на спині) протягом 45 хв. Дексаметазон вводили за 3 год до початку стресування, внутрішньом'язово, із розрахунку 160 мкг/100 г маси тіла тварин. NAE, диспергований у воді із розрахунку 1 мг/1 мл за допомогою ультразвуку, вводили по 500 мкг/100 г маси тіла внутрішньочеревно двічі: за 45 хв до та відразу після прив'язування. Використовуваний препарат NAE – суміш, головним чином, ненасичених N-ацилетаноламінів, синтезований в Інституті біохімії НАН України з рослинної сировини. Основними складниками цього препарату є похідні таких жирних кислот: 18:1 ω 9 (24,41 %), 18:2 ω 6 (25,13 %), 18:3 ω 3 (10,36 %), 20:1 ω 9 (10,08 %), 22:1 ω 9 (19,94 %). Вміст анандаміду в цьому препараті не перевищував 0,3 %. Через 45 хв від початку стресування тварин декапітували під етаміналовим наркозом (4 мг/100 г ваги тіла). Кров збирали в пробірки з 60 мкл 10 % розчину ЕДТА як антикоагулянта.

Кількісний вміст 11-ОКС в плазмі визначали спектрофлюориметричним методом [8]. АКТГ в плазмі визначали імунорадіометричним методом за допомогою набору Immunotech "Wescan coulter company" (Франція).

Статистична обробка даних здійснена із застосуванням t-критерію Стьюдента, критерію знаків для парних порівнянь [9] та непараметричного критерію U Уїлкоксона-Манна-Уїтні [10].

Результати та їх обговорення

Результати дослідження впливу NSE та ненасичених NAE на ефект АКТГ *in vitro* наведено в табл. 1 та 2. Отримані дані свідчать, що внесення цих NAE в інкубаційне середовище в досліджуваних концентраціях призводило до неве-

ликих коливань синтезу 11-ОКС, здебільшого в сторону його підвищення, але статистично незначущих. Кортикотропін *in vitro*, як добре відомо, суттєво збільшував утворення гормонів.

Таблиця 1. Вміст 11-ОКС в інкубаційному середовищі при інкубації тканини з додаванням NSE та АКТГ (% до контролю без NSE)

| Група | Без NSE | NSE 10^{-6} М | NSE 10^{-5} М | NSE 10^{-4} М |
|----------|---------------------|---------------------|------------------------|----------------------|
| Контроль | 100 n=12 | 96,96±7,36 n=6 | 128,8±9,31 n=12 | 124,79±13 n=6 |
| АКТГ | 265,62±26,3 n=12 | 262,91±38,75 n=6 | 233,57±31,62 § n=12 | 216,28±55,32* n=6 |

Примітки. У табл. 1 і 2:

1. * – $P < 0,05$ для груп АКТГ–АКТГ+NAE за критерієм Стьюдента для парних порівнянь;
2. § – $P = 0,05$ для груп АКТГ–АКТГ+NAE за критерієм знаків для парних порівнянь.

Таблиця 2. Вміст 11-ОКС в інкубаційному середовищі при інкубації тканин з додаванням суміші ненасичених NAE та АКТГ (% до контролю без NAE)

| Група | Без NAE | NAE 10^{-6} М | NAE 10^{-5} М | NAE 10^{-4} М |
|----------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| Контроль | 100±0 n=6 | 113,76±7,15 n=6 | 120,22±8,56 n=6 | 106,91±8,24 n=6 |
| АКТГ | 185,52±14,58 n=6 | 149,22±10,36* n=6 | 180,57±11,49 n=6 | 161,29±10,18 n=6 |

При додаванні NAE у проби сумісно з АКТГ виявлено вірогідне зниження кількості 11-ОКС в інкубаційному середовищі при концентрації 10^{-6} М для ненасичених NAE, та в концентрації 10^{-5} М і 10^{-4} М – для насиченого NSE. Насичений NSE, доданий у концентрації 10^{-6} М сумісно з АКТГ, а також ненасичені NAE в концентрації 10^{-4} М та 10^{-5} М сумісно з АКТГ, не викликали суттєвих змін рівня синтезованих 11-ОКС.

В дослідженнях *in vivo* (табл. 3) було виявлено, що введення як насичених, так і ненасичених NAE при попередньому гальмуванні секреції АКТГ застосуванням дексаметазону не призводило до змін рівня 11-ОКС в плазмі крові у порівнянні із тваринами, що отримали лише дексаметазон. Це свідчить, що самі по собі NAE не змінюють секреції кортикостероїдів в організмі, якщо секрецію кортикотропіну загальмовано дексаметазоном. При застосуванні NAE у тварин, яким після пригнічення дексаметазоном синтезу власного АКТГ вводили екзогенний АКТГ, спостерігалось підвищення кількості 11-ОКС у плазмі крові, для ненасичених NAE вірогідне. Це спостереження узгоджується з результатами попередніх досліджень [7], якими було виявлено, що введення NAE *in vivo* при стресуванні тварин призводило до збільшення рівня 11-ОКС в крові більш ніж у 1,5 рази порівняно із лише стресуванням. В даному дослідженні при сумісному застосуванні АКТГ і NAE підвищення 11-ОКС становить 1,69 рази. Це може свідчити про те, що модулювання дії АКТГ це, певно не єдина, але вагома точка впливу NAE на функціонування гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової вісі.

Звертає увагу також той факт, що в дослідях *in vitro* біологічно активною для ненасичених NAE була концентрація 10^{-6} М, в той час, як для N-стеароїл-таноламіну більш висока – 10^{-5} М та 10^{-4} М. З цим збігаються і результати

Таблиця 3. Вміст 11-ОКС у плазмі крові щурів (мкг/л)

| № | Група тварин | Експеримент з NSE | Експеримент з ненасиченими NAE |
|---|-----------------------|---|---|
| 1 | Контроль | 109,57±28,65 | 101,45±11,26 |
| 2 | Дексаметазон | 31,06±5,48* P _{1,2} <0,05 | 50,89±1,93* P _{1,2} <0,01 |
| 3 | Дексаметазон+NAE | 25,04±3,21 | 54,79±9,59 |
| 4 | Дексаметазон+АКТГ | 114,08±25,04* P _{2,4} <0,01 | 93,92±15,48* P _{2,4} <0,05 |
| 5 | Дексаметазон+АКТГ+NAE | 133,67±16,15 | 159,03±23,51* P _{4,5} <0,05 |

Примітка. * – вірогідність відмінностей визначена за критерієм t Стьюдента;

експериментів *in vivo*, де вплив ненасичених NAE, на відміну від N-стеароїлетаноламіну, був вірогідним. Можливо, це свідчить про потужнішу біологічну активність ненасичених N-ацилетаноламінів, або про відмінний механізм їхньої дії. Тому дослідження впливу NAE на рівень АКТГ було проведено тільки з ненасиченими NAE.

Наявність канабіноїдних рецепторів в деяких ядрах гіпоталамуса та факт надходження міченого NAE до мозку [5, 11] вказує на можливість змінення секреції АКТГ під впливом NAE. Ця можливість вивчена нами у спеціальних дослідженнях з визначенням АКТГ в крові щурів.

Результати досліджень, в яких визначали вплив NAE на рівень АКТГ в крові за умов стресу і гальмування адренкортикальної функції гіпофіза представлені в табл. 4. Стрес викликав майже 5-кратне збільшення 11-ОКС та близько 50-кратне збільшення АКТГ. У тварин, що отримали тільки NAE, спостерігалось підвищення рівня 11-ОКС, як це вже було зазначено нами при введенні N-стеароїлетаноламіну [7]. Рівень АКТГ при цьому не змінювався. Введення NAE тваринам, що піддавалися стресу, в даному дослідженні призводило до паралельного зниження рівнів АКТГ та 11-ОКС. У щурів, що отримали дексаметазон із наступним стресуванням, NAE не викликав змін у рівні даних гормонів. Отже, в даному експерименті спостерігається здатність ненасичених NAE зменшувати стресову реакцію організму. Цей результат є протилежним

Таблиця 4. Рівні 11-ОКС (мкг/л) та АКТГ (пг/л) в плазмі крові щурів

| № | Група тварин | 11-ОКС (n=14) | АКТГ (n=6-7) |
|---|------------------------|--|---|
| 1 | Контроль | 119,31±17,36 | 11,53±4,33 |
| 2 | NAE | 174,69±19,71 P _{1,2} <0,05* | 9,26±4,81 |
| 3 | Стрес | 482,29±28,72 P _{1,3} <0,001* | 493,45±153,41 P _{1,3} <0,001* |
| 4 | Стрес + NAE | 406,93±16,57 P _{3,4} <0,05* | 132,90±77,21 P _{3,4} =0,05§ |
| 5 | Дексаметазон+стрес | 182,27±30,18 P _{3,5} <0,001* | 50,99±23,06 P _{3,5} <0,01* |
| 6 | Дексаметазон+стрес+NAE | 182,74±21,88 | 43,81±13,47 |

Примітки:

* – вірогідність відмінностей визначена за критерієм t Стьюдента;

§ – вірогідність відмінностей визначена за критерієм U Уїлкоксона-Манна-Уїтні.

отриманому раніше, коли стеароїлетаноламін підвищував зростання 11-ОКС при стресі [7], а також отриманому нами в попередньому експерименті (табл. 3).

Зіставлення і аналіз даних про вплив NAE на утворення кортикостероїдів, отриманих за різних умов, в даних дослідженнях показали, що ефекти NAE значною мірою залежать від умов та вихідного стану організму. Очевидно, що NAE можуть впливати на функцію кори надниркових залоз як безпосередньо, так і опосередковано через вплив на функцію гіпоталамо-гіпофізарної системи.

При додаванні NSE і ненасичених NAE в середовище інкубації (табл. 1 і 2) не відмічено значущих змін в контрольних умовах. Однак якщо стероїдогенез активувався АКТГ, то NSE в концентрації 10^{-5} М та 10^{-4} М гальмував утворення 11-ОКС. Схоже гальмування відмічено при додаванні ненасичених NAE (10^{-6} М). Раніше ми також спостерігали пригнічення стероїдогенезу *in vitro* у присутності NAE [7].

Можливість опосередкування ефектів NAE гіпоталамо-гіпофізарною системою оцінена в дослідях *in vivo*. Стрес (прив'язування) в 4 рази збільшував вміст 11-ОКС в крові і ще більш виражено підвищував вміст АКТГ. Двократне введення ненасичених NAE суттєво знижувало рівень АКТГ в крові і відповідно кортикостероїдів. Гальмування гіпоталамо-гіпофізарної системи дексаметазоном різко пригнічувало відповідь на стрес при оцінці як рівня АКТГ, так і рівня 11-ОКС. NAE за цих умов був неефективним. Цей факт не узгоджується на перший погляд із посиленням ненасиченими NAE відповіді надниркових залоз на АКТГ, що вводився на тлі дексаметазону (табл. 3, групи 4 та 6). Однак це протиріччя легко пояснити подовженням часу існування АКТГ, що вводився, у крові тварин, які отримували NAE.

Стрес, викликаний на мишах знерухомлюванням, також викликав підвищення рівня АКТГ в крові [12]. При цьому відмічено зниження вмісту в гіпоталамусі 2-арахідоноілгліцеролу і тенденцію до зниження вмісту анандаміду – ендогенних канабіноїдів. Автори вважають, що ендогенні канабіноїди знижують активність гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової системи. Схожий висновок дозволяють зробити результати наших досліджень.

Робота була частково підтримана грантом Міністерства Освіти і Науки України № 05.07/00017.

Література

1. Schmid H.H.O., Schmid P.C., Natarajan V. N-acylated glycerophospholipids and their derivatives // *Progr. Lipid Res.* 1990, 29, 1-43.
2. De Petrocellis L., Cascio M.G., Di Marzo V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions // *Br. J. Pharmacol.* 2004, 143, N 2, 251-256.
3. Felder C.C., Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1998, 38, 179-200.
4. Zenor B.N., Weesner G.D., Malven P.V. Endocrine and other responses to acute administrations of cannabinoid compounds to non-stressed male calves // *Life Sci.* 1999, 65, N 2, 125-133.
5. Жуков О.Д., Артамонов М.В., Клімашевський В.М. та ін. N-ацилетаноламіни – новий клас природних адренотропних модуляторів // *Укр. біохім. журн.* 2000, 72, № 2, 24-27.
6. Mikosha A., Kovzun O., Zhukov A., Gulaya N. Effect of dopamine and long-chain N-acylethanolamines on steroidogenesis in rat adrenal gland *in vitro* // *Medical Science Researchs.* 1998, 26, 85-88.
7. Гула Н.М., Мікоша О.С., Жуков О.Д., Челнакова І.С. Дія N-ацилетаноламінів на функцію кори надниркових залоз // *Укр. біохім. журн.* 2000, 72, № 3, 82-86.
8. Балашов Ю.Г. Флюориметрический микрометод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами // *Физиол. журн. СССР.* 1990, 76, № 2, 280-283.

9. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск: Высшая школа, 1973. 318 с.
10. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение критериев непараметрической статистики для оценки различий двух групп наблюдений в медико-биологических исследованиях. М.: Медицина, 1969. 30 с.
11. Willoughby K.A., Moor S.F., Martin B.R., Ellis E.F. The biodisposition and metabolism of anandamide in mice // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997, **282**, N 1, 243-247.
12. Patel S., Roelke C.T., Rademacher D.J. et al. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis // *Endocrinology.* 2004, **145**, N 12, 5431-5438.

Пути влияния N-ацилэтанололаминов на функцию коры надпочечных желез у крыс
 Л.М. Сторожук, А.Д. Жуков¹, М.В. Артамонов¹, Н.М. Гуляя¹, А.С. Микоша
Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко АМН Украины, 04114 Киев; ¹Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, 01601 Киев, Украина

Изучали влияние N-ацилэтанололаминов (NAE) на функцию коры надпочечных желез крыс. *In vitro* исследовано непосредственное влияние насыщенного NAE N-стеароилэтанололамина (NSE) и смеси ненасыщенных NAE на синтез 11-ОКС срезами коры надпочечных желез. Присутствие NAE не приводило к существенным изменениям стероидогенеза. Внесение NAE совместно с АКТГ вызывало достоверное снижение эффекта АКТГ. *In vivo* выявлено, что введение ненасыщенных NAE совместно с АКТГ животным, у которых синтез собственного АКТГ был заблокирован дексаметазоном, приводило к повышению уровня 11-ОКС в плазме крови. У животных, подвергшихся стрессу, введение ненасыщенных NAE снижало уровень 11-ОКС, а также АКТГ в крови, то есть уменьшало стрессовую реакцию. Сделан вывод, что NAE могут влиять на функционирование всех звеньев гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси; эффекты NAE в значительной мере зависят от условий и исходного состояния организма.

Ключевые слова: N-ацилэтанололамины, гипоталамо-гипофизарно-адrenalовая ось, стресс, кортикостероиды.

Pathways of N-acylethanolamine action on the rat adrenal cortex function.
 L.M. Storozhuk, O.D. Zhukov¹, M.N. Artamonov¹, N.M. Gula¹, O.S. Mikosha
V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of AMS, 04114 Kyiv; ¹O.V. Palladin Institute of Biochemistry of NAS, 01601 Kyiv, Ukraine

The N-acylethanolamine (NAE) action on the rat adrenal cortex function was studied. Direct influence of one of the saturated NAE N-stearoylethanolamine (NSE) and the mixture of unsaturated NAE on the rat adrenal tissue was investigated *in vitro*. The presence of NAE did not change the steroidogenesis. The adding of NAE simultaneously with adrenocorticotrophic hormone (ACTH) led to the reducing of its effect. It was established *in vivo* that the injection of the unsaturated NAE raised 11-hydroxycorticosteroids (11-HCS) level in the blood of animals whose hypophysis had been previously blocked by dexamethasone. But administration of a mixture of unsaturated NAE to animals which were under immobilization stress reduced 11-HCS level as well as that of ACTH. So, it led to decreasing of the stress reaction. As a conclusion we suggested that NAE can affect every link of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and their effects depend on conditions and initial state of the organism.

Key words: N-acylethanolamine, hypothalamo-pituitary-adrenal axis, stress, corticosteroids.

(Надійшла 9.02.2005)