



ГУЛА Надія Максимівна

Доктор біологічних наук, професор.
Член-кореспондент АМН та НАН України.
Завідуюча відділом біохімії ліпідів Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна.
Голова Київського відділу Українського біохімічного товариства.
Член експертної ради Комітету з Державних премій у галузі науки та техніки.
Автор понад 250 наукових праць.



КОСЯКОВА Галина Василівна

Аспірантка відділу біохімії ліпідів Інституту біохімії ім. О.В.Палладіна.
Коло наукових інтересів: дослідження системи оксида азоту в нормі та за різних патологічних станів і взаємозв'язок між N-ацилетаноламінами та системою NO.
Автор 10 наукових праць.

N-АЦИЛЕТАНОЛАМІНИ (NAE): НОВІ АСПЕКТИ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ

Резюме: подано сучасні уявлення про біологічні ефекти NAE та можливості використання останніх як фармакологічних агентів.

Ключові слова: NAE, NPE, NSE, NO.

Останнім часом головну увагу в дослідженнях з біохімії ліпідів приділяють вивченню ролі ліпідів у регуляції внутрішньоклітинних процесів. Новий поштовх у цьому напрямку дало відкриття класу біологічно активних ліпідів – N-ацилетаноламінів (NAE), оскільки широкий спектр проявів біологічної активності останніх дає підставу вважати, що ці сполуки здатні чинити регуляторні впливи як у клітині, так і на рівні організму в цілому.

Так, на сьогоднішній день накопичено чимало даних щодо проявів біологічної активності та механізму дії ненасичених NAE, особливо такого представника останніх як анандамід (арахідоїлетаноламін), зокрема було встановлено, що він є ендogenousним лігандом канабіноїдних рецепторів. Протягом останніх років широко дискутується питання щодо механізму дії насичених NAE, які, не активуючи канабіноїдних рецепторів, здатні чинити в багатьох випадках синергічні з анандамідом біологічні ефекти.

Загальні відомості про NAE. Поширення NAE в природі.

Перші повідомлення про NAE з'явилися у 50-х роках минулого століття. NAE були виявлені в соєвому лецитині, арахісовій олії та яєчному жовтку.

На сьогоднішній день встановлено, що NAE є дуже поширеним у природі класом ліпідів. Так, N-ацильовані фосфоліпіди були знайдені в деяких штаммах анаеробних бактерій [12]. N-ацильовані гліцерофосфоліпіди були виявлені як мінольні компоненти у пшеничному борошні [18].

Інші представники NAE були виділені з насіння гороху, вівса та бобів сої.

Довголанцюжкові NAE (N-пальмітоїлетаноламін та анандамід) були виявлені у ліпідних екстрактах двостулкових моллюсків (*Mytilus edulis* L.) [55]. Інші представники цього класу ліпідів були виявлені в мозковій тканині риб.

Антиоксидантна дія

У дослідженнях з N-олеїлетаноламіном було показано, що його антиоксидантний ефект за гіпоксичних станів здійснюється за рахунок пригнічення Fe_2+ -залежного вільнорадикального окислення ліпідів, що супроводжується накопиченням малонового діальдегіду. Проте отримано докази, що настійні довголанцюжкові NAE не є сквенджерями вільних радикалів. Співробітниками нашого відділу в досліді на печінці щура, що підлягала консервуванню, було показано, що додавання N-пальмітоїлетаноламіну до розчину-консерванту стабілізувало вміст лінолевої кислоти, підвищувало рівень фосфатидилінозитолу, гальмувало накопичення лізофосфоліпідів у клітинах печінки [2]. Отже, антиоксидантна дія NAE реалізується на рівні модифікації ліпідного бішару мембран.

Модуляція процесів іонного транспорту

Дослідження щодо впливу NAE на процес транспорту кальцію були проведені на саркоплазматичних везикулах скелетного м'язу кроля. Ефекти N-олеїл- та N-лауроїлетаноламінів порівнювались із ефектами інших ліпофільних агентів: дибукаїну та пропранололу. Всі досліджувані сполуки стимулювали швидкість та тривалість входу Ca^{2+} , активність Ca^{2+} - Mg^{2+} -АТФази та час утримання везикулами Ca^{2+} при низьких концентраціях. Було відзначено, що NAE чинять більш тривалий ефект порівняно з іншими агентами та проявляють його при значно менших концентраціях [19].

Подальшими дослідженнями, які проводились у нашому відділі разом із відділом біохімії м'язів, було показано, що N-пальмітоїлетаноламін у концентрації 10 мкМ на 30-50% інгібував енергозалежну акумуляцію Ca^{2+} в ендоплазматичному ретикулумі та мітохондріях клітин міометрія, пермеабілізованих за допомогою обробки суспензії міоцитів дігітоніном. Встановлено, що N-пальмітоїлетаноламін за цієї концентрації модифікує ліпідний склад пермеабілізованих міоцитів, зумовлюючи збільшення кількості неорганічного фосфору загальних фосфоліпідів на 57% внаслідок накопичення фосфатидилхоліну, фосфатидилетаноламіну та сфінгомієліну. Було зроблено припущення, що вплив NAE на системи енергозалежного транспорту Ca^{2+} опосередковуються через модифікацію фосфоліпідного складу клітин [4].

Пізніше було показано, що N-пальмітоїл- та N-стеароїлетаноламіни інгібують іонний транспорт через вератридин-активовані швидкі натрієві канали [3]. З'ясувалося, що токсин вератридин не тільки впливає на функцію потенціалзалежних натрієвих каналів, а й суттєво змінює ліпідний склад мембран. Так, спостерігалось зниження кількості фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну за одночасного накопичення лізоформ цих фосфоліпідів, вільних жирних кислот та ефірів холестеролу. NAE проявляв превентивну дію, запобігаючи токсичній дії вератридину.

Отже, вплив NAE на процеси іонного транспорту опосередковані їхньою здатністю до модифікації ліпідного складу мембран.

Фармакологічні ефекти NAE

1) Протизапальна та антиалергічна дія.

Совіти із співр. повідомили, що яєчний жовток та спиртоворозчинна фракція яєчного жовтка, що надавалась як додаток до раціону поросяткам морської свинки, чинили протекторний ефект проти анафілактичного артриту, що було встановлено на підставі визначення величини набряку суглобу, вмісту дифеніламінореактивної субстанції сироватки та результатів гістологічного дослідження [14]. Long та Martin, фракціонуючи арахісову олію, встановили присутність речовини, яка в дозі $6 \cdot 10^{-8}$ г на кг ваги тіла максимально зменшувала чутливість до туберкуліну в чутливих до нього морських свинок. Цей антиалергічний чинник, знайдений у яєчному жовтку та "овочевому лецитині", був ідентифікований як N-пальмітоїлетаноламін [31]. Було показано, що N-пальмітоїлетаноламін здатний інгібувати звільнення гістаміну перитонеальними клітинами щура, індуковане Russell Viper venom [23]. Сучасними дослідженнями показано, що синтез N-пальмітоїлетаноламіну індукується LPS та тромбоцитарноактивуючим чинником макрофагів [16]. На сьогоднішній день N-пальмітоїлетаноламін та його похідні розглядають як новий клас антизапальних агентів [29].

2) Антивірусні та антибактеріальні ефекти.

Встановлено, що N-пальмітоїлетаноламін є потужним індуктором неспецифічної стійкості щодо вірусних та бактеріальних інфекцій. Введення per os цієї сполуки зменшувало смертність мишей, спричинену введенням ряду токсинів деяких мікроорганізмів, а також швидкість настання смерті внаслідок травматичного шоку [51]. Показано, що N-пальмітоїлетаноламін не стимулював синтезу інтерферону, проте викликав активацію макрофагів.

3) Вплив на агрегацію тромбоцитів.

Для N-олеїлетаноламіну була показана здатність до інгібування тромбін-індукованої агрегації тромбоцитів людини. Дослідження останніх років показали, що механізмом інгібування агрегації тромбоцитів за дії NAE може бути стимуляція синтезу оксиду азота [57].

4) Вплив на скорочення міокарду.

На м'язевих препаратах серця морської свинки показано, що довголанцюжкові NAE проявляють значний позитивний іотропний ефект [53]. Водночас у лабораторії нашого відділу на моделі ішемії/реперфузії міокарду щура було показано, що N-стеароїлетаноламін, при додаванні його до перфузійного розчину (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} М), викликав негативний іотропний ефект внаслідок стимуляції переходу Ca^{2+} з цитозолу до внутрішньоклітинних депо [1]. Як описано в літературі, на перших хвилинах реперфузії відбувається зростання концентрації Ca^{2+} в саркоплазмі внаслідок звільнення з внутрішньоклітинних депо, що викликає нарощування сили серцевих скорочень і негативно впливає на стан ушкодженого міокарду. Отже, негативний іотропний ефект, спричинений N-стеароїлетаноламіном, сприяв поліпшенню функціонального стану ішемізованої тканини серця за рахунок зменшення навантажень (зниження частоти серцевих скорочень), зумовлених реперфузією. Таким чином, залежно від функціонального стану міокарда, NAE здатні чинити як позитивний, так і негативний іотропний ефект.

5) Гіпотензивні ефекти NAE.

Дослідженнями останніх років було показано, що анандамід здатний викликати розслаблення гладеньких м'язів судин, що призводить до зниження артеріального тиску. Вирізняють декілька механізмів, за якими реалізується гіпотензивний ефект анандаміду. Один із них обумовлений інгібуванням симпатичної нервації периферійної судинної системи, внаслідок блокування звільнення норадrenalіну з симпатичних нервових терміналей, що опосередковується зв'язуванням анандаміду з канабіноїдними рецепторами СВ1 типу [47]. Інший механізм передбачає безпосередній вплив анандаміду на гладеньком'язеві клітини та

N-АЦИЛЕТАНОЛАМІНИ (NAE): НОВІ АСПЕКТИ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ

N-ацильовані гліцерофосфоліпіди ідентифікуються як мінорні складові клітин та тканин ссавців, проте вони здатні акумулюватися за патологічних станів. Vachur із співр. повідомили про присутність вільних NAE в деяких тканинах щура та морської свинки. У мозку, печінці та скелетних м'язах були виявлені головним чином N-пальмітоїлетаноламін [PEA] та N-стеароїлетаноламін [SEA], що становили 3-10% від загальної кількості амідів жирних кислот [8]. Високі рівні N-пальмітоїлетаноламіну були знайдені в мозку щура та морської свинки (35,7 та 45мкг/г сух. тканини) [8].

Розроблені свого часу більш чутливі методи аналізу дозволили ідентифікувати наявність різних представників NAE в багатьох тканинах ссавців та людини. Наприкінці 70-х років були виявлені високі рівні NAE в інфарктному серці собаки [20]. Пізніше було показано, що значні кількості NAE з'являються за патологічних станів, причому в органах, у яких в нормі вони майже не ідентифікуються. Так, дослідженнями останніх років виявлена акумуляція NAE та їхніх попередників, N-ацилфосфатидилетаноламінів (NAPE), за ішемії та гіпоксії мозку різного генезу [41]. Відомо, що за гіпоксії/ішемії мозку відбувається накопичення глутамату, який, активуючи NMDA-рецептори, є одним із чинників розвитку нейродегенеративних процесів [24]. На культурі кортикальних нейронів миші показано, що саме глутамат є індуктором утворення NAPE та NAE шляхом активації NMDA рецепторів [25]. На мозку щура була досліджена здатність до акумуляції NAPE протягом постдекапітативної ішемії (тривалістю 6 годин) залежно від віку тварин. Виявилось, що найбільшу кількість NAPE акумулює мозок новонароджених тварин (до 1,5% від загальних фосфоліпідів), тоді як уже в постнатальний період тварини фактично втрачають цю здатність (у мозку тварин, віком 30 днів вміст NAPE перебуває на межі детекції – 0,09%) [42].

Метаболізм NAE.**Синтез.**

Перші припущення про можливість синтезу NAE в організмі ссавців були зроблені на початку 60-х років, коли групою американських дослідників було показано, що мікросоми печінки щура здатні каталізувати реакцію конденсації жирних кислот та етаноламіну з утворенням N-ацилетаноламінів [13]. Насичені та ненасичені жирні кислоти із зростаючою кількістю атомів вуглецю у ланцюгу від 10 до 24 брали участь у реакції синтезу NAE. Структурна подібність амідозв'язаних жирних кислот N-ацилетаноламінів (NAPE), за ішемії та гіпоксії мозку різного генезу [41]. Відомо, що за гіпоксії/ішемії мозку відбувається накопичення глутамату, який, активуючи NMDA-рецептори, є одним із чинників розвитку нейродегенеративних процесів [24]. На культурі кортикальних нейронів миші показано, що саме глутамат є індуктором утворення NAPE та NAE шляхом активації NMDA рецепторів [25]. На мозку щура була досліджена здатність до акумуляції NAPE протягом постдекапітативної ішемії (тривалістю 6 годин) залежно від віку тварин. Виявилось, що найбільшу кількість NAPE акумулює мозок новонароджених тварин (до 1,5% від загальних фосфоліпідів), тоді як уже в постнатальний період тварини фактично втрачають цю здатність (у мозку тварин, віком 30 днів вміст NAPE перебуває на межі детекції – 0,09%) [42].

Пізніше було встановлено, що реакція гідролізу відбувається за участі фосфодіестеразної активності фосфоліпази D [52]. В інших дослідженнях було показано, що мозок собаки проявляє фосфодіестеразну активність фосфоліпази D типу, специфічної для N-ацилетаноламінів [45].

Оцінюючи шлях синтезу NAE з NAPE, як правило, враховують інтенсивність синтезу самих NAPE за активністю N-ацилтрансферази. Цей фермент каталізує перенесення ацильної групи (sn-1 положення) гліцерофосфоліпідів до аміногрупи фосфатидилетаноламіну. Отже, на сьогоднішній день виділяють основний, так званий "N-ацилтрансферазно-фосфодіестеразний" шлях синтезу NAE, хоча для анандаміду не втрачає актуальності шлях безпосередньої конденсації арахідонової кислоти з етаноламіном за участі зворотної активності "анандамідамідогідролази" [58].

Деградація.

NAE, що звільняються з N-ацилетаноламінів фосфоліпідів під дією фосфоліпази D, у подальшому можуть бути метаболізовані за участю специфічної для NAE амідогідролази жирних кислот (FAAH), що присутня у багатьох тканинах тварин. Було показано, що активність цього ферменту висока в печінці, мозку, нирках, селезінці та легенях, проте дуже низька у серці тварин [52,45,46].

Дослідження можливої регуляції активності ферменту показали, що експресія FAAH у лімфоцитах людини активується прогестероном та цитокином Th2, проте інгібується гамма інтерфероном [38]. Експресія та активність FAAH матки ссавців та людини зменшується на початкових стадіях вагітності (відповідно на 40% та 10% вже на 5 день вагітності), що є наслідком гормональної регуляції, оскільки естроген та прогестерон знижують базальну активність ферменту [33]. Отже, цікавим є факт, що один і той же гормон, прогестерон, по-різному опосередковує регуляцію активності FAAH у різних тканинах. Мікромоліарні кількості N-пальмітоїлетаноламіну (1-5мкМ) здатні інгібувати експресію FAAH у ракових клітинах молочної залози людини [17].

Специфічна до NAE амідогідролаза відіграє важливу роль в утилізації NAE, оскільки показано, що останні в концентрації 10-20мкМ здатні чинити токсичний вплив, який полягає у блокуванні енергетичного метаболізму мітохондрій [9].

Біологічна активність NAE.

Поштовхом до вивчення біологічних властивостей NAE послугували відомості про акумуляцію останніх у деяких органах за патологічних станів.

Мембранопротекторна дія.

Відомо, що процес відновлення клітини після ішемічного ушкодження залежить від цілісності мембранного апарату мітохондрій, оскільки це визначає здатність останніх до виконання функцій енергетичного забезпечення. Накопичення довголанцюжкових NAE під час ішемії та за патологічних станів, що супроводжується ішемізацією клітин, наводить на думку про можливу мембраностабілізуючу дію цих сполук. Дослідження, проведені в лабораторії Pfeiffer, показали, що NAE здатні інгібувати розвиток пермеабілізації мітохондріальних мембран серця та печінки щура, викликану сумісною дією Ca^{2+} та Ca^{2+} -звільняючих агентів, таких, як оксалоацетат та пальмітоїл-коензим A [21]. Результати досліджень показали, що найбільш ефективним у попередженні пермеабілізації мембран виявився N-олеїлетаноламін. У подальшому було виявлено, що в основі мембранопротекторної дії NAE лежить їхня антиоксидантна дія.

N-АЦИЛЛЕТАНОЛАМИНИ (NAE): НОВІ АСПЕКТИ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ

ендотелії судин. Так, було показано, що анандамід активує калієві канали гладеньком'язевих клітин, що викликає їх гіперполяризацію і, як наслідок, розслаблення [49]. Таким чином, не виключена можливість того, що саме анандамід може бути так званим "ендотеліальним гіперполяризуючим чинником" (endothelium-derived hyperpolarizing factor EDHF), хімічна природа якого досі не з'ясована. Крім того, відкриття канабіноїдних рецепторів (CB1) в ендотелії судин [30] передбачає можливість викликати вазодилатацію через їхню активацію [59]. Відомо, що оксид азоту (NO), який синтезується ендотеліальними клітинами судин, здійснює гіпотензивний ефект внаслідок активації розчинної гуанілатциклази гладеньком'язевих клітин. Показано, що анандамід активує синтез NO в ендотеліальних клітинах ниркової артерії щура [15]. Отже, гіпотензивний ефект анандаміду може бути реалізований через активацію синтезу інших вазоактивних сполук клітинами ендотелію.

б) Протипухлинна дія NAE.

Для багатьох ліній ракових клітин показаний антипроліферативний ефект анандаміду. Так, у пролактин-чутливих клітинах раку молочної залози анандамід інгібував експресію рецептора пролактину, подібна дія анандаміду спостерігалась і на інших культурах пролактин-чутливих клітин, зокрема на лінії раку простати DU-145. Цитостатичну дію анандаміду пов'язують також із ініціацією останнім апоптозу в неопластичних клітинах, що відбувається шляхом зв'язування його з ванілоїдним рецептором (VR1) [48]. Показано, що антипроліферативний ефект N-пальмітоїлетаноламіну на культурі клітин раку молочної залози людини реалізується через збільшення вмісту анандаміду шляхом інгібування специфічної до NAE амідогідролази жирних кислот [17], безпосередня ж протипухлинна дія для насичених NAE не виявлена, хоча вона й не виключена.

Участь NAE в розвитку адаптивних реакцій організму

Відомо, що в розвитку стрес-реакцій організму головна роль належить гормонам, зокрема стероїдним гормонам наднирникових залоз. Припущення щодо можливої участі NAE в розвитку адаптивних реакцій організму до дії стресу виникло на підставі результатів дослідів з розподілу екзогенного NAE в організмі тварин [5]. Виявилось, що в разі внутрішньочеревинного введення радіоактивного NAE велика його частина акумулювалась у наднирникових залозах. Враховуючи, що головна функція кори наднирників – синтез кортикостероїдів, було вивчено вплив на стероїдогенез довголанцюжкових NAE з насиченими та ненасиченими ацильними ланцюгами [6]. За присутності допаміну (10^{-6} М) вивільнення 11-гідроксикортикостероїдів та альдостерону, міченого за ^3H -холестеролом як попередником, підвищувалось на 20%. За сумісної дії N-стеароїлетаноламіну та допаміну синтез гормонів не змінювався, тоді як допамін та суміш NAE з ненасиченими ацильними ланцюгами збільшували вихід 11-гідроксикортикостероїдів на 33%. Цікаво, що ефекти NAE *in vitro* та *in vivo* трохи відрізнялись. Так, вивчалася можливість участі NAE в регуляції функції наднирникових залоз в умовах *in vivo* за іммобілізаційного стресу та *in vitro* на зрізах адренкортикальної тканини щурів-самців [40]. Було показано, що дворазове введення N-стеароїлетаноламіну в дозі 5 мг/кг маси тіла вдвічі збільшує вміст 11-оксикортикостероїдів у інтактних щурів. На фоні стресу N-стеароїлетаноламін викликає збільшення вмісту гормонів у четверо. Імовірно, посилення відповіді на стрес під впливом NAE в умовах *in vivo* обумовлюється активацією системи гіпофіз-кора наднирникових залоз. В умовах *in vitro* NAE знижував стероїдогенез на 40%. Було зроблено припущення, що це відбувається за рахунок мембранотропних та каналних ефектів NAE [40].

Імунотропний ефект NAE.

Як показали результати досліджень, анандамід та N-пальмітоїлетаноламін негативно впливають на різні показники імунної відповіді. Так, доведена їхня інгібуюча дія на фагоцитоз, активність цитотоксичних клітин, тобто природних кілерів та лімфокін-активованих кілерів [28]. Одним із запропонованих механізмів імносупресивної дії NAE вважається інгібування ними cAMP-сигнальної системи імунокомпетентних клітин, що опосередковується через активацію канабіноїдних рецепторів [27]. Останні, як відомо, експресуються майже всіма клітинами імунної системи. Крім того, дискутується можливість прямої безрецепторної дії, особливо для N-пальмітоїлетаноламіну. Результати досліджень показали, що введення N-стеароїлетаноламіну суттєво зменшувало рівні циркулюючих імунних комплексів у крові тварин за умов гострого опромінення, а також спостерігалась тенденція до менш вираженої гранулоцитопенії [7].

Вплив NAE на репродуктивні функції організму та розвиток зародка

На спеціально розробленій унікальній моделі, з використанням сперми морського їжака, було показано, що анандамід знижує фертильність сперми шляхом інгібування акросомної реакції. Акросоми – це спеціалізовані секреторні гранули сперми нормального функціонування яких підтримує запліднюючу здатність сперми [54].

Виявлені високі рівні анандаміду в матці ссавців спонукали проведення досліджень щодо впливу NAE на розвиток зародку. Виявилось, що анандамід (та інші ендоканабіноїди) бере участь у процесі імунологічної адаптації, яка відбувається на ранніх стадіях вагітності [34]. Вміст NAE підлягає гормональному контролю шляхом регуляції естрогенами активності специфічної до NAE амідогідролази (FAAH). Встановлено, що низька активність FAAH та відповідно високі рівні анандаміду можуть використовуватись як ранній діагностичний маркер (<8 тижнів вагітності) спонтанного абортівання [34].

Участь NAE в ініціації апоптозу

Сучасна біологія розглядає два напрямки, за якими здійснюється загибель клітин: апоптоз (запрограмована загибель клітин) та некроз. Перший є природним процесом, внаслідок якого клітина в нормі завершує свій життєвий цикл. У процесі реалізації апоптозу вміст клітини поступово вакуюлізується з утворенням так званих апоптотичних тіл. На сьогоднішній день накопичено чимало даних щодо чинників, які викликають апоптоз, та механізмів, за допомогою яких реалізується апоптотичний сигнал. Серед останніх найбільш дослідженими є система каспаз (так званий каспазний каскад) [56], що активується за допомогою цитохрому c, який виходить у цитозоль з мітохондрій через відкриття специфічної мітохондріальної пори; система MAP-кіназ (мітогенактивованих протеїнкіназ) та фосфоліпази 3-кіназа [26]. Встановлено, що апоптотичний сигнал може бути реалізований і через арахідоновий каскад [36].

Уперше апоптоз-індукуюча здатність була показана для представника ненасичених NAE – анандаміду на клітинах лінії PC-12 та клітинах людського організму [35]. Анандамід ініціював апоптоз шляхом зв'язування з ванілоїдним рецептором з подальшою активацією каспази-3.

Здатність до індукції апоптозу насичених NAE була досліджена на прикладі N-стеароїлетаноламіну (SEA) на клітинах гліоми C6 [37]. Було показано, що апоптоз-індукуюча здатність останнього залежить від тривалості інкубації. Максимум ефекту (чотириразове зростання порівняно з контролем) спостерігався при тривалості інкубації 48 годин.

Цей часовий період був використаний для подальших досліджень, внаслідок яких виявлено, що індуковане SEA-формування апоптотичних тіл має концентраційну залежність. Так, початок апоптозу ідентифікувався при концентрації SEA 0,1мкМ та набував максимальної інтенсивності в присутності 1мкМ SEA. Слід зазначити, що використані концентрації SEA перебувають у межах фізіологічних. Дослідження механізмів проапоптотичного ефекту N-стеароїлетаноламіну показали, що під час його реалізації не відбувається активації ні фосфоінозитид 3-кінази, ні MAP-кіназної системи, тоді як активується арахідоновий каскад. Отже, різні представники насичених і ненасичених NAE опосередковують свою здатність до індукції апоптозу, використовуючи різні механізми.

Механізми біологічних ефектів NAE

Останнім часом розглядають два можливих механізми, за якими реалізуються біологічні ефекти NAE: безрецепторний та рецепторний. Перший обумовлений безпосереднім вбудовуванням NAE у мембрану. За таким механізмом реалізується мембраностабілізуюча, антиоксидантна дія високих доз представників цього класу ліпідів, а також їхній вплив на іоно-транспортні процеси в клітині.

Рецепторний механізм передбачає зв'язування низьких доз NAE із специфічним рецептором плазматичної мембрани, завдяки чому відбувається проведення сигналу всередину клітини.

Вперше рецепторний механізм дії був показаний для ненасичених NAE, коли було встановлено, що анандамід є ендogenousним лігандом канабіноїдних рецепторів [22]. Канабіноїдний рецептор (CB1) уперше було охарактеризовано в клітинах нервової системи [39]. Кількома роками пізніше було показано існування в клітинах імунної системи іншого типу канабіноїдного рецептора (CB2). Згодом була показана експресія CB2 для багатьох інших клітин організму ссавців. Цей тип CB-рецепторів представлений інтегральними мембранними білками, що функціонально зв'язані з G(i/o)-білками, стимуляція яких викликає подальшу активацію відповідних протеїнкіназ (ERK), мітоген-активованих протеїнкіназ (MAPK), стимуляцію синтази оксиду азоту (NOS), інгібування проведення cAMP-залежного сигналу [10] та виникнення комплексних змін в експресії ряду генів.

Після зв'язування з рецептором, анандамід підлягає транспортуванню всередину клітин, де відбувається його гідроліз за допомогою FAAH. Дослідженнями останніх років доведено існування високоафінного транспортера, який опосередковує транспорт анандаміду через плазматичну мембрану клітини [50]. Крім того, анандамід може потрапляти всередину клітини внаслідок дифузії, цей процес є температурно-залежним. Отже, на сьогоднішній день вирізняють окрему канабіноїдну сигнальну систему. Встановлено, що канабіміметичні властивості мають і насичені NAE, проте вони не активують канабіноїдних рецепторів. Враховуючи той факт, що на частку анандаміду для більшості клітин припадає лише від 1% до 5% від загальної кількості NAE, вбачається можливим існування для насичених NAE окремих місць зв'язування на плазматичній мембрані. На клітинах C6 гліоми щура були проведені дослідження щодо зв'язування N-стеароїлетаноламіну (SEA) з плазматичними мембранами клітин [37]. Дослідження проводились у присутності синтетичних лігандів канабіноїдних та ванілоїдного рецепторів. Було встановлено, що насичені NAE теж мають свої специфічні місця зв'язування на плазматичній мембрані клітин. У цій же серії досліджень вивчався вплив NAE на активність NO-синтази та вміст cAMP. Встановлено, що N-стеароїлетаноламін інгібує активність NOS і не впливає на вміст cAMP. Було зроблено висновок, що зв'язування SEA із специфічним сайтом можливого рецептора викликає інгібування NOS-опосередкованого сигнального шляху та не впливає на сигнальну трансдукцію, опосередковану cAMP.

Таким чином, показано існування рецепторного механізму дії, за допомогою якого опосередковуються швидкі (сигнальні) ефекти як для ненасичених, так і для насичених NAE. Останнім часом дискутується питання про можливість існування на плазматичній мембрані специфічних рецепторів для різних представників насичених NAE.

NAE та NO: взаємодія та кооперація в регуляції біологічних процесів

З літератури відомо, що значна кількість проявів біологічної активності NAE реалізується на рівні регуляції останніми внутрішньоклітинного вмісту оксиду азоту (NO). Так, доведено, що ендogenousні та синтетичні канабіноїди беруть участь у модуляції відповіді на запалення, індукованого LPS шляхом інгібування активності індукцибельної ізоформи NO-синтази (iNOS) [43]. Відзначається, що здатність ендоканабіоїдів до регуляції синтезу оксиду азоту має важливе значення для функціонування нервової системи, оскільки відомо, що активовані клітини мікроглії мозку звільняють медіатор запалення -NO, який відіграє важливу роль у нервовій системі, проявляючи антибактеріальні, антивірусні та антиканцерогенні властивості, але надлишкові кількості цієї речовини, утворення яких опосередковується активацією саме iNOS, можуть ініціювати імунно-опосередкований нейродегенеративний запальний процес [11]. В інших дослідженнях було показано, що анандамід (10нМ), зв'язуючись із CB2-рецептором, викликає звільнення NO з перфузованого артеріального сегменту нирки шляхом активації конститутивної ізоформи NO-синтази, що викликає його розслаблення. [15]. В цьому випадку проявляється кооперація дії NAE та NO, оскільки відомо, що й сам анандамід є потужним вазоділятатором. Здатність NAE до регуляції внутрішньоклітинного вмісту NO шляхом модуляції активності різних ізоформ ферменту його синтезу має важливе значення і, можливо, знайде застосування при лікуванні хвороб (таких, як легенева гіпертензія тощо), що супроводжуються дисбалансом активностей конститутивних та індукцибельної ізоформ NO-синтази.

Дослідженнями встановлено, що NO, в свою чергу, впливає на процес транспорту NAE через плазматичну мембрану клітин, регулюючи активність їхніх мембранних транспортерів [32]. На жаль, поки що відсутні літературні дані щодо безпосереднього впливу NO на активність синтезу NAE, можливо, це буде реалізовано в подальших дослідженнях.

N-АЦИЛЭТАНОЛАМИНИ (NAE): НОВІ АСПЕКТИ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ

Висновки.

N-ацилэтаноламіни є широкопредставленим у природі класом мінорних ліпідів, що відіграють неабияку роль у функціонуванні живого організму. Зокрема важливе значення вони мають за утворення патологічних станів, проявляючи мембраностабілізуючі, антиоксидантні та інші властивості, що допомагає організму витримати та швидше позбутися наслідків, викликаних патологією. Нині активно вивчаються механізми, якими опосередковується біологічна дія цих сполук. Беручи до уваги особливості біологічних ефектів NAE, значна кількість яких є фармакологічними, можна прогнозувати створення на основі NAE нових лікарських засобів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Артамонов М. В. – Дис. канд. біол. наук. – К. 2002.
2. Гордисько Т. М., Гула Н. М., Маргітич В. М., Говсеєва Н. М., Клімашевський В. М., Шарідулін М. Ю. // Укр. біохім. журн. 2001. 73, № 1. С. 82-87.
3. Гула Н. М., Васильовський В. Е., Высотский М. В., Волков Г. Л., Говсеєва Н. Н., Артеменко И. П. // Укр. біохім. журн. 1988. 60. С. 58-63.
4. Гула Н. М., Говсеєва Н. Н., Клімашевський В. М., Шишлова О. П., Слинченко Н. М., Маргітич В. М., Костерин С. А. // Укр. біохім. журн. 1997. 69, № 5-6. С. 64-74.
5. Жуков О. Д. // Укр. біохім. журн. 1999. 71., № 4. С. 124-125.
6. Жуков О. Д., Артамонов М. В., Клімашевський В. М., Говсеєва Н. М., Маргітич В. М., Гула Н. М. // Там само. 2000. 72. № 2.
7. Кіндрюк Н. Л., Артамонов М. В., Гула Н. М., Чумак А. А. // Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2002. 2(41). С. 33-39.
8. Bachur N. R., Masek K., Melmon K. and Udenfriend S. // J. Biol. Chem. 1965. 240. P.1019-1024. Bomstein R. A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1965. 21. P.49-54.
9. Berdyshev E., Schmid P. C., Krebsbach R. // Biochem J. 2001. 360. P. 67-75.
10. Berdyshev E. V., Schmid P. C., Krebsbach R. J., Hillard C. J., Huang C., Chen N., Dong Z., Schmid H. H. O. // Biochem J. 2001. 360. 15. P. 67-75.
11. Cabral G. A., Harmon K. N., Carlisle S. J. // Adv. Exp. Med. Biol. 2001. 493. P. 207-214.
12. Clarke N. G., Hazrlwood, G. P. and Dawson, R. M. C. // Chem. Phys. Lipids. 1976. 17. P.222-232.
13. Colodzin M., Bachur N. R., Weissbach H. and Udenfriend S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1963. 10. P.165-170.
14. Coburn A. F., Graham C. E. and Haninger J. // J. Exp. Med. 1954. 100. P.425-435. Deutsch D., Goligorsky M., Schmid P., et al. // J. Clin. Invest. 1997. 100. P. 1538-1546.
15. Deutsch D., Goligorsky M., Schmid P., et al. // J. Clin. Invest. 1997. 100. P. 1538-1546.
16. Di Marzo V., Melck D., De Petrocellis L., Bisogno T. // Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2000. 61(1-2). P. 43-61.
17. Di Marzo V., Melck D., Orlando P., Bisogno T., et al. // Biochem J. 2001. 358. P. 249-255.
18. Ellingson J. S. // Biochim. Biophys. Acta 1974. 337. P.60-67.
19. Epps D. E., Mandel F. and Schwartz A. // Cell Calcium 1982. 3. P. 531-543.
20. Epps D. E., Natarajan V., Schmid P. C. and Schmid H. H. O. // Biochim. Biophys. Acta 1980. 618. P. 420-430.
21. Epps D. E., Palmer J. W., Schmid H. H. O. and Pfeiffer D. R. // J. Biol. Chem. 1982. 257. P. 1383-1391.
22. Filder Ch., Briley E. V., Axelrod J. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. 90. P. 7656-7660.
23. Goth A. and Knoohuizen M. // Life Sci. 1962. 1. P. 459-465.
24. Hansen H. H., Ikonomidou C., Bittigau P., Hansen S. H., Hansen H. S. // J. Neurochem. 2001. 76. P. 39-46.
25. Hansen H. S., Moesgaard B., Hansen H. H., Schousboe A., Petersen G. // Lipids 1999. 34(Suppl). P. 327-330.
26. Hengartner M. O. // Nature. 2000. 407. P. 770-776.
27. Kaminsky N. // Toxicol Lett. 1998. 102-103. P. 59-63.
28. Klein T., Newton C., Friedman H. // Immunol. Today 1998. 19. P. 373-381.
29. Lambert D., Vandevooede S., Jonsson K., Fowler C. // Curr. Med. Chem. 2002. 9(6). P.663-674.
30. Liu J., Gao B., Mirshahi F., et al. // Biochem. J. 2000. 346. P. 835-840.
31. Long D. A. and Martin A. J. P. // Lancet. 1956. 1. P. 464-466.
32. Maccarrone M., Bari M., Lorenzon T., Bisogno T., Di Marzo V., Finazzi-Agro A. // J. Biol. Chem. 2000. 275(18). P. 13484-13492.
33. Maccarrone M., De Felici M., Bari M., et al. // Eur. J. Biochem. 2000. 267. P. 2991-2997.
34. Maccarrone M., Falciglia K., Di Rienzo M., Finazzi-Agro A. // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 2002. 66. P. 309-317.
35. Maccarrone M., Lorenzon T., Bari M., Melino G., Finazzi-Agro A. // J. Biol. Chem. 2000. 275. P. 31938-31945.
36. Maccarrone M., Melino G., Finazzi-Agro A. // Cell Death Differ. 2001. 8. P.776-784.
37. Maccarrone M., Pauselli R., Di Rienzo M., Finazzi-Agro A. // Biochem. J. 2002. Pt [epub ahead of print].
38. Maccarrone M., Valensise H., Bari M., Lazzarin N., Romanini C., Finazzi-Agro A. // J. Immunol. 2001. 166(12). P. 7183-7189.
39. Matsuda L., Lolait S., Brownstein M., Young A., Bonner T. // Nature 1990. 346. P. 561-564.
40. Mikosha A., Kovzun O., Zhukov A., Gulaya N. // Med. Sci. Res. 1998. 26. P. 85-88.
41. Moesgaard B., Jaroszewski J. W., Hansen H. S. // J. Lipid Res. 1999. 40. P. 515-521.
42. Moesgaard B., Petersen G., Jaroszewski J. W., Hansen H. S. // J. Lipid Res. 2000. 41. P. 985-990.
43. Molina-Holgado F., Molina-Holgado E., Guaza C., Rothwell N. J. // J. Neurosci. Res. 2002. 67(6). P. 829-836.
44. Natarajan V., Reddy P. V., Schmid P. C. and Schmid H. H. O. // Biochim. Biophys. Acta 1981. 664. P.445-448.
45. Natarajan V., Schmid P. C., Reddy P. V. and Schmid H. H. O. // J. Neurochem. 1984. 42. P. 1613-1619.
46. Natarajan V., Schmid P. C. and Schmid H. H. O. // Biochim. Biophys. Acta 1986. 878. P. 32-41.
47. Niederhoffer N., Szabo B. // Br. J. Pharmacol. 1999. 126. P. 457-466.
48. Parolaro D., Massi P., Rubino T., Monti E. // Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 2002. 66(2-3). P. 319-332.
49. Plane F., Holland M., Waldron G., Garland C., Boyle J. // Br. J. Pharmacol. 1997. 121. P. 1509-1511.
50. Piomelli D., Beltramo M., Glasnapp S., et al., // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999. 96(10). P. 5802-5807.
51. Raskova H., Masek K., Linep O. // Toxicol 1972. 10. P. 485-490.
52. Schmid P. C., Reddy P. V., Natarajan V. and Schmid H. H. O. // J. Biol. Chem. 1983. 258. P.9302-9306.
53. Schmid H. H. O., Schmid P. C., Natarajan V. // Prog. Lipid. Res. 1990. 29. P. 1-43.
54. Schuel H., Goldstein E., Mechoulam R., Zimmerman A., Zimmerman S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994. 91. P. 7678-7682.
55. Sepe N., De Petrocellis L., Montanaro F., Cimino G., Di Marzo V. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. 1389. P. 101-111.
56. Stefanelli C., Bonavita F., Stanic I., Mignani M., Facchini A., Pignatti C., Flamingi F., Calderara C. M. // FEBS Letter 1999. 451. P.95-98.
57. Stefano G. // J. Neuroimmunol. 1998. 83(1-2). P. 70-76.
58. Sugiura T., Kobayashi Y., Oka S., Waku K. // Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 2002. 66(2-3). P. 173-192.
59. Wagner J., Varga K., Kunos G. // J. Mol. Med. 1998. 76. P. 824-836.

N-ацилэтаноламіни (NAE):
нові аспекти біологічного діяння.
Гула Н.М., Косякова Г.В.

Інститут біохімії ім. А.В. Палладина НАН України, Київ
Резюме: поданы современные представления о биологических эффектах NAE и возможностях использования последних в качестве фармакологических агентов.
Ключевые слова: NAE, NPE, NSE, NO.

N-acylethanolamines (NAE):
new aspects of biological action.

Nadezhda M. Gulaya, Galina V. Kosyakova.

Palladin's Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kiev

Summary: there are presented the modern ideas about biological effects of NAE and the possibility of usage of the last as pharmacological agents.

Key-words: NAE, NPE, NSE, NO.