

О. Д. ЖУКОВ, М. В. АРТАМОНОВ, В. М. КЛИМАСHEВСЬКИЙ,
Н. М. ГОВСЕЄВА, В. М. МАРГІТИЧ, Н. М. ГУЛА

N-АЦИЛЕТАНОЛАМИНИ — НОВИЙ КЛАС ПРИРОДНИХ АДРЕНОТРОПНИХ МОДУЛЯТОРІВ

Установлено, що надпочечники являються головною мішенню включення N-([1-¹⁴C]-пальмітоїл)етаноламіна (NAE). Експерименти по изучению влияния различных NAE на стероидогенез в коре надпочечников показали, что эти соединения как насыщенные, так и полиненасыщенные, способны стимулировать стероидогенез. На модели бычьего сывороточного альбумина установлено высокое сродство насыщенных NAE к гидрофобным доменам белков. Сделан вывод о том, что насыщенные и полиненасыщенные NAE влияют на стероидогенез по внецепторному механизму.

К л ю ч е в ы е с л о в а: N-ацилетаноламины, изотопная метка, кора надпочечников, каннабиноидные рецепторы, кортикостероиды, анандамид.

Довголанцюжкові N-ацилетанолами́ни (NAE) є представниками нового класу біологічно активних сполук [1, 2]. Досліджено, що поліненасичені NAE, — N-арахідонолетаноламін (анандамід) та інші — є ендogenousними лігандами для канабіноїдних рецепторів [3, 4]. За нормальних умов насичені NAE утворюються в дуже малих кількостях (нг/г сирової тканини) разом з анандамідом [5] за N-ацилфосфодіестеразним шляхом в мозку та деяких інших тканинах [6]. Надзвичайно високі рівні (0,5 мкмоль/г сирової тканини) вільних насичених NAE, зокрема N-пальмітоїл- та N-стеароїлетаноламіну, визначено в інфарктній зоні міокарда собаки [7, 8]. На відміну від поліненасичених NAE, біологічну роль насичених NAE дотепер не з'ясовано. Установлено, що канабіноїдні рецептори (CB) містяться практично у всіх тканинах організму. У мозку знайдені рецептори CB-1, а в інших органах — CB-2.

Відомо, що головною функцією надниркових залоз є синтез стероїдів, який перебуває під контролем відповідних гормонів. Не виключено, що NAE можуть модулювати синтез стероїдів, принаймні за двома можливими механізмами: 1) зв'язуючись з рецепторами CB-2 та 2) внаслідок позарецепторної дії. У той самий час, NAE є ліпотропними сполуками й тому добре поглинаються збагаченими на ліпіди тканинами, у тому числі наднирковими залозами.

Зауважимо, що в літературі немає робіт, які стосуються вивченню дії довголанцюжкових NAE на функцію надниркових залоз. Відомо, що надниркові залози мають специфічні рецептори CB-2 для анандаміду та декотрих інших поліненасичених NAE. При цьому насичені NAE не мають специфічної спорідненості до канабіноїдних рецепторів [4], але у деяких випадках виявляють

подібну до анандаміду дію. Разом з тим, нещодавно було встановлено, що й анандамід здатний проявляти ряд ефектів, що не опосередковуються залежним від G-білка механізмом. Зокрема анандамід, але не інші канабіноїдні агоністи, здатен гальмувати проникливість міжклітинних контактів в астроцитах мозку [9].

Враховуючи, що надниркові залози у шурів є багатими на ліпіди, а також те, що головна функція їхньої кори — це синтез кортикостероїдів, за мету даної роботи покладено вивчення розподілу N-(1-¹⁴C-пальмітоїл)етаноламіну між органами і тканинами шурів, а також впливу різних NAE на стероїдогенез у корі надниркових залоз. Для того, щоб з'ясувати механізм дії NAE на стероїдогенез, нами використано суміш поліненасичених NAE, що зв'язуються з канабіноїдними рецепторами, та насичені NAE, які не мають таких властивостей.

Матеріали і методи

Розподіл міченого NAE між органами і тканинами вивчали за допомогою внутрішньоочеревинного введення шурам-самцям розчину хроматографічно чистого N-(1-¹⁴C)-пальмітоїл)етаноламіну з активністю 100 мкКі у кількості 15 мг на кожного шура.

N-(1-¹⁴C)-пальмітоїл)етаноламін синтезували з [1-¹⁴C]-пальмітинової кислоти та 98% етаноламіну («Sigma», США) [10].

Органи і тканини забирали на шостій хвилині експозиції після декапітації шурів на тлі ефірного наркозу. Мозок, серце, печінку, надниркові залози, нирки, діафрагму, гонади, селезінку, легені негайно занурювали у скраплений азот. Також забирали кров, яку потім розділяли на плазму та еритроцити. Ліпідні екстракти одер-

жували за методом [11]. Радіоактивність проб вимірювали на лічильнику SL-3000.

З надниркових залоз щурів відпрепарували коркову частину та готували з неї зрізи завтовшки 0,5 мм, які вміщували у пробірки та промивали розчином Хенкса, який містив 0,5 % лактальбуміну при 0°C. Потім додавали свіжу порцію цього самого розчину, але з 10 мМ HEPES (рН 7,4). До зрізів додавали аліквоту N-стеароїлетаноламіну та поліненасичених NAE у кінцевих концентраціях 10^{-7} , 10^{-6} та 10^{-5} М, а також – ^3H -холестерол (20 мкКі/мл). Як джерело поліненасичених NAE використовували препарат, синтезований із суміші жирних кислот морських організмів, яка на 85 % складалася з поліненасичених жирних кислот. Всі зразки струшували на шейкері при 37 °С протягом 2 год. Через 2 год інкубацію зупиняли шляхом занурення пробірок у льодову баню. Зрізи гомогенізували у хлороформі двічі, а об'єднані хлороформні екстракти випаровували. Для оцінки включення мітки ^3H з холестеролу в кортикостерон та альдостерон ці стероїди було поділено методом двовимірної тонкошарової хроматографії на силікагелі у системах хлороформ : етанол (96 : 4) (перший напрям) та бензол : ацетон (60 : 40) (другий напрям). Для візуалізації гормонів на хроматограмах до зразків додавали немічені речовини. Після зняття плям з платівок вимірювали їхню радіоактивність.

Для вивчення афінності NAE до гідрофоб-

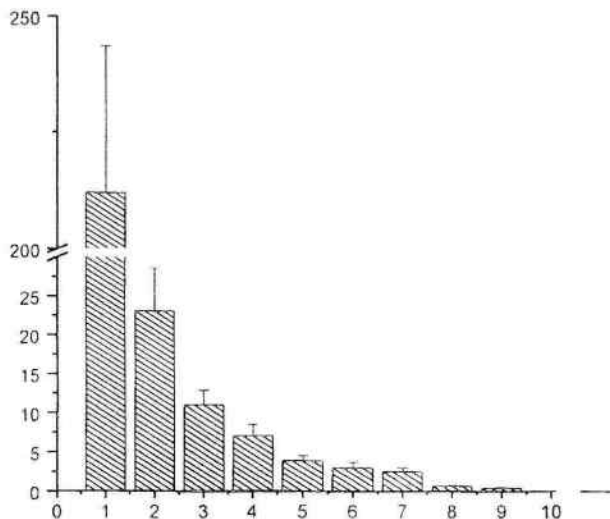


Рис. 1. Включення N-([1- ^{14}C]-пальмітоїл)етаноламіну в органи і тканини щурів.

Органи і тканини: 1 – надниркові залози; 2 – діафрагма; 3 – селезінка; 4 – нирки; 5 – гонади; 6 – легені; 7 – печінка; 8 – серце; 9 – мозок.



Рис. 2. Вплив поліненасичених NAE на включення мітки ^3H -холестеролу в кортикостерон та альдостерон (% від контролю)

них доменів білка було використано графічний метод визначення константи спорідненості ліганда до рецептора. Як модель взято водний розчин бичачого сироваткового альбуміну в концентрації 1 мг/мл, до якого додали N-стеароїлетаноламін активністю 1 мкКі та інкубували 2 год. З розчину відбирали аліквоти, котрі було розведено відповідно у 2; 2,5; 3,3; 5; 6,7; 10 та 20 разів. З кожної розведеної аліквоти шляхом додавання 5%-го розчину хлорної кислоти було осаджено білок, який відцентрифугували та висушили. NAE, який зв'язався з білком, було розчинено у сцинтиляційній рідині CP-8 і виміряно радіоактивність кожної проби. Одержані результати оброблено за методом С. А. Бобровника [12]. Для цього побудували графік залежності $1/c \cdot d_i$ від d_i , де d_i – коефіцієнт розведення вихідного розчину, c_i – концентрація NAE, який зв'язався з БСА, виражена за його радіоактивністю. З графіка знайдено константу спорідненості NAE до БСА.

Результати та обговорення

Результати визначення включення міченого N-([1- ^{14}C]-пальмітоїл)етаноламіну наведено на рис 1. З діаграми видно, що найбільша кількість мітки включається в надниркові залози. Це може свідчити про те, що ці залози є важливою мішенню дії NAE. Оскільки стероїдогенез є головною їхньою функцією, було вивчено дію NAE на цей процес. При цьому виходили з позиції, що за опосередкованого впливу NAE на стероїдогенез через рецептори СВ-2, активними будуть тільки поліненасичені NAE. Оскільки, як відомо з літератури, насичені NAE не зв'язуються з рецепторами СВ-2, то вони і не повинні виявляти ефект. У випадку, якщо NAE діють за позарецепторним механізмом, то насичені і ненасичені NAE мають виявляти вплив на стероїдогенез. Одержані результати включення ^3H з холестеролу в альдостерон та кортикостерон наведено на рис. 2 і 3



Рис. 3. Вплив N-стеароїлетаноламіну на включення мітки ³H-холестеролу в кортикостерон та альдостерон (% від контролю)

відповідно. Так, суміш ненасичених NAE у концентрації 10⁻⁷ та 10⁻⁶ М не впливає на включення мітки в гормони, а при концентрації 10⁻⁵ М достовірно підвищується включення мітки як в альдостерон (на 70%), так і в кортикостерон (на 20%) порівняно з контролем. Схожа картина спостерігається і за дії N-стеароїлетаноламіну. При концентраціях 10⁻⁷ та 10⁻⁶ М він практично не впливає на включення ³H з холестеролу в гормони, але при концентрації 10⁻⁵ М виявляється достовірне підвищення радіоактивності кортикостерону та тенденція до достовірного підвищення радіоактивності альдостерону. Аналізуючи ці

дані, можна побачити однакову спрямованість впливу насичених та ненасичених NAE на стероїдогенез. На підставі отриманих даних можна зробити припущення про позарецепторний механізм дії N-ацилетаноламінів на стероїдогенез у корі надниркових залоз. Згідно з графічним методом С.О. Бобровника визначення константи спорідненості ліганда до акцептора [12], NAE посідає високу спорідненість до гідрофобних доменів БСА ($K=2,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), (рис. 4). Це може вказувати на принципову можливість NAE зв'язуватися з іншими білками, у тому числі регуляторними, алостерично модулюючи їхню функцію, і тим самим впливати на стероїдогенез. Оскільки синтез стероїдних гормонів знаходиться під впливом регуляторних факторів (гормонів, ферментів), можливим механізмом дії NAE може бути зв'язування його з гідрофобними доменами регуляторних білків. Це, у свою чергу, може призвести до конформаційних змін цих білків, а звідси і до зміни їхньої активності. Але це питання ще потребує подальшого дослідження.

Таким чином, проведеними дослідженнями встановлено, що кора надниркових залоз є важливою мішенню дії екзогенно введених NAE. При цьому як поліненасичені, так і насичені NAE здатні стимулювати синтез стероїдних гормонів (гліко- та мінералокортикоїдів) за позарецепторним механізмом.

Висловлюємо щирю подяку д.м.н. О.С.Мікошкі та д.б.н. С.О.Бобровнику за цінні поради.

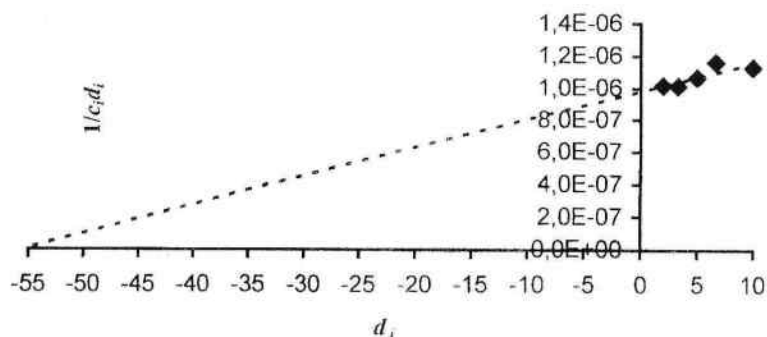


Рис. 4. Графік для обчислення константи спорідненості NAE до БСА

O. D. Zhukov, M. V. Artamonov,
V. M. Klimashevsky, N. M. Govseeva,
V. M. Margitich, N. M. Gulaya

N-ACYLETHANOLAMINES – THE NEW CLASS OF NATURALLY OCCURRING ADRENAL MODULATORS.

Summary

N-acylethanolamines (NAE) belong to the new class of naturally occurring biologically active regulators. Anandamide – a well known representative of NAEs – is an agonist of central (CB1) and peripheral (CB2) cannabinoid receptors. Adrenal cortex contains the CB2 receptor. The aim of present work is to investigate the influence of saturated and polyunsaturated NAEs on the corticosteroid synthesis in adrenal gland in vitro.

It was shown that the rat adrenal gland is the main target of N-([1-¹⁴C]palmitoyl)ethanolamine incorporation. Saturated NAE enhanced the incorporation of [³H]-cholesterol into the aldosterone by 25% (p<0.06) and corticosterone by 17% (p<0.05) of rat adrenal slices in vitro. Mixture of polyunsaturated NAEs containing mainly 18:1w9, 18:2w6, 18:3w3, 20:1w9, 22:1w9 increased the labeling of aldosterone by 70% (p<0.05) and corticosterone by 20% (p<0.05). Thus, the saturated NAEs as well as polyunsaturated analogs, act by the similar manner on the corticosteroid synthesis. The fact that saturated NAEs possess poor affinity to CB receptors provides us opportunity to suggest the non-receptor mechanism of NAEs adrenotropic action. Further we used the purified bovine serum albumin to test the binding kinetic of N-([1-¹⁴C]palmitoyl)ethanolamine with its hydrophobic domains. It was found that NAEs have high affinity to hydrophobic domains of protein with $K=2.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. This finding could support the idea of the existence of putative allosteric modulation of regulatory protein function.

It was concluded that NAEs exert a stimulatory effect on the corticosteroid synthesis in rat adrenal gland in vitro and this action do not mediated through cannabinoid receptor.

Key words: N-acylethanolamines, corticosteroids, adrenal cortex, cannabinoid receptors, anandamide, isotopic label.

The O.V.Palladin Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci. of Ukraine

1. Epps D. E., Mandel F., Schwartz A. // Cell calcium. 1982. 3. P.531–543.
2. N. M. Gulaya, A. A. Melnik, D. I. Balkov, et al. // Biochim. Biophys. Acta. 993. 1152. P. 280–288.
3. Devane W. A., Hanus, L., Breuer, A., et al. // Science 1992. 258. P. 1946–1949.
4. Felder, C., Briley, E. M., Axelrod, J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. 90. P. 7656–7660.
5. Schmid, H. H. O., Schmid P. C., Natarajan V., et al. // Chem.Phys.Lipids. 1996. 80. P. 133–142.
6. Epps D. E., Schmid P. C., Natarajan, V. and Schmid, H. H. O., // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1979. 90. P. 628–633.
7. D. E. Epps, P. C. Schmid, V. Natarajan and H. H. O. Schmid // Biochim. Biophys. Acta 1980. 618. P. 420–430.
8. L. Hanus, A. Gopher, S. Almog and R. Mechoulam // J. Med. Chem. 1993. 36. P.3032–3034.
9. Venance L., Piomelli D., Glovinski J., Giaume C. // Nature. –1995. 376 P. 590–594.
10. В. М. Маргітич, О. Д. Жуков, М. В. Артамонов, Н. М. Гула // Укр. біохім. журн. 1999. 71. № 6. С. 108–110.
11. Bligh E. G., Dyer W. I. // Can. J. Biochem. Physiol. 1959. 37. P. 911–917.
12. Бобровник С. А. // Укр. біохім. журн. 1998. 70. N 6. С. 144–146.

Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна, Київ, Україна

Одержано 03.06.99.