

Н. М. ГУЛА¹, О. С. МІКОША², О. Д. ЖУКОВ¹, І. С. ЧЕЛНАКОВА¹

ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ N-АЦИЛЪТАНОЛАМІНІВ НА ФУНКЦІЮ КОРИ НАДНИРКОВИХ ЗАЛОЗ

Изучали возможность участия N-ацилэтаноламинов (NAE) в регуляции функции надпочечников. Показано, что двукратное внутривбрюшное введение N-стеароилэтанолamina (NAE 18:0) в дозе 5 мг/кг веса вдвое увеличивает содержание 11-оксикортикостероидов в крови у интактных крыс-самцов. На фоне иммобилизационного стресса N-стеароилэтанолamina вызывает повышение содержания гормонов в 4 раза. Очевидно, что усиление ответа на стресс под влиянием N-стеароилэтанолamina связано с активацией системы гипофиз – кора надпочечников. В условиях in vitro при инкубации срезов надпочечников NAE (10^{-6} M) снижают стероидогенез почти на 40%. Можно предположить, что это происходит за счет мембранотропных и канальных эффектов NAE.

Ключевые слова: кора надпочечников, N-ацилэтаноламины, стресс, стероидогенез.

Вперше увагу дослідників до N-ацилпохідних етаноламіну (NAE) привернули повідомлення про високу концентрацію цих біологічно активних ліпідів в інфарктній зоні міокарда. Цей інтерес до NAE значно посилюється після з'ясування в 1992 р. того факту, що N-арахідоноїлетаноламін (анандамід, АН) є ендogenousним лігандом канабіноїдних рецепторів мозку та відтворює численні ефекти канабіноїдів. Ці дані неодноразово аналізувались в оглядах [1–3]. Вивчення канабіноїдних рецепторів показало існування двох підтипів СВ1 та СВ2. СВ1 ідентифіковано в ЦНС та в деяких периферичних тканинах, зокрема в надниркових залозах [4] та сім'яниках [5]. За введення міченого АН мишам вже через 1 хв він виявляється у тканині надниркових залоз, причому його вміст у залозі майже в 10 разів перевищує його вміст у мозку та в 1,7–5 разів – вміст в усіх інших вивчених тканинах [6], що досліджувалися.

Цікаві результати отримано під час визначення різних NAE у сім'яниках щурів. Так, внаслідок введення CdCl_2 розвиваються запалення та дегенерація тканини і в ній різко зростає вміст різних NAE [7]. Через 9 годин після введення CdCl_2 вміст N-пальмітоїл- і N-стеароїлетаноламіну в тканині сім'яників зростає у 39 та 21 раз відповідно. Вміст N-арахідоноїлетаноламіну збільшувався за цей час у 5 разів.

Практично не досліджено роль NAE в ендокринних залозах. На зрізах надниркових залоз щурів-самок показано активацію включення мітки [³H]-холестеролу в альдостерон і кортикостерон за присутності 10^{-5} M N-стеароїлетаноламіну і етаноламіну, ацильованого сумішшю ненасичених жирних кислот [8]. In vivo анандамід знижував вміст пролактину та лютеїнізуючого гормону в сироватці крові щурів [9, 10]. Відмічено підвищення рівня кортикостероїдів у крові щурів під впливом канабіноїдів, що трактується авторами

як фармакологічний стрес [11]. Таким чином, ефекти NAE у корі надниркових залоз можуть виявлятися як безпосередньо внаслідок зв'язування з тканиною, так і опосередковано через зміну тропних ефектів гіпофіза. Завданням даної роботи було з'ясувати можливість участі NAE у регуляції функції надниркових залоз.

Матеріали і методи

Вплив N-ацилпохідних етаноламіну на утворення 11-оксикортикостероїдів (11-ОКС) досліджено на щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 150–200 г.

У дослідях in vivo тваринам вводили внутрішньоочеревинно розчин NAE (18:0) у суміші пропіленгліколь:етанол:фізіологічний розчин (1:1:1) у дозі 5 мг/кг. Контрольні тварини отримували розчинник у відповідному об'ємі. Щурів піддавали іммобілізаційному стресу (прив'язування на спині) протягом 45 хв. Проведено 2 серії дослідів. NAE вводили одноразово, одразу після прив'язування, чи дворазово: за 45 хв до іммобілізації та одразу після прив'язування. Тварин декапітували під ефірним наркозом та визначали вміст 11-ОКС у плазмі крові спектрофлуориметричним методом [12].

Синтез кортикостероїдів in vitro оцінювали, інкубуючи зрізи адренкортикальної тканини (10–15 мг) у живильному середовищі (500 мкл) із гідролізагом лактальбуміну (0,5%) у розчині Хенкса (Московський завод бактеріальних препаратів, Росія). Інкубаційне середовище містило 10 мМ НЕРЕС, рН 7,4 («Calbiochem», США), N-стеароїлетаноламін – NAE (18:0) – або суміш N-ацилетаноламінів у кінцевій концентрації 10^{-6} M. Суміш NAE отримано з рослинної сировини. Вона на 85% складається з N-ацилпохідних ненасичених жирних кислот: 18:1 ω9; 18:2 ω6; 18:3 ω3; 20:1 ω9; 22:1 ω9. Проби інкубували протягом 120 хв при 37 °C та постійному струшуванні.

Після інкубації визначали вміст сумарних 11-ОКС спектрофлуориметричним методом [12].

Реакції транспортування електронів електронтранспортними системами мітохондрій та мікросом вивчали на тканині надниркових залоз новонароджених поросят. Готували 10%-й гомогенат тканини в 0,25 М розчині сахарози, який містив 0,1 М трис-НСІ буфер (рН 7,4). Ядра та клітинний дебрис осаджували центрифугуванням (5 хв, 3000 g). Мітохондрії осаджували з післяядерного гомогенату центрифугуванням при 12 000 g протягом 10 хв. Мікросоми одержували центрифугуванням при 105 000 g протягом 1 год. Для ресуспендування мітохондрій та мікросом застосували забуферений розчин сахарози.

Спиртові розчини N-стеароїлетаноламіну або суміші N-ацилетаноламінів додавали до препаратів мітохондрій та мікросом за 18 год до вивчення електронного транспорту. Концентрація NAE у суспензії складала 10^{-6} М. До контрольних зразків мітохондрій та мікросом додавали рівні об'єми етанолу (кінцева концентрація 1%). Контрольні та дослідні зразки ставили в холодильник.

Електронний транспорт оцінювали, використовуючи штучні акцептори електронів: цитохром c та 2,6-дихлорфеноліндофенол (ДХФІФ). Відновлення цитохрому c визначали в інкубаційній суміші, яка містила 100 мкМ NADPH та 50 мкМ цитохрому c («Reanal», Угорщина), 330 мкМ NaCN, 100 мМ трис-НСІ буфера, рН 7,4. Інкубаційна суміш, яка використовувалась для відновлення ДХФІФ, складалась із 100 мкМ NADPH, 40 мкМ ДХФІФ, 100 мМ трис-НСІ буфера, рН 7,4 [13]. Вміст білка в суспензії мітохондрій дорівнював ~ 200 мкг, мікросом — 100 мкг. Загальний об'єм інкубаційної суміші складав 3,1 мл. Контрольна кювета спектрофотометра містила всі компоненти інкубаційної суміші за виключенням акцептора електронів. Оптичну густина визначали на спектрофотометрі СФ-46 протягом 5 хв при 550 нм для цитохрому c і 600 нм для ДХФІФ. Вміст білка визначали за Bradford [14].

Статистична обробка даних проводилась із використанням t-критерію Стьюдента та непараметричного U-тесту Вілкоксона-Манна-Уїтні.

Результати та обговорення

Попередні досліді проведено з одноразовим введенням N-стеароїлетаноламіну щурам одночасно з іммобілізацією. Стрес протягом 45 хв викликав майже двократне підвищення вмісту 11-ОКС у крові щурів (рис. 1). Введення NAE (18:0) одночасно з фіксацією тварин не впливало на рівень кортикостероїдів у крові.

Зовсім інші результати отримано за умов

двократного введення NAE (18:0). Двократне введення NAE інтактним щурам викликало підвищення вмісту 11-ОКС влічі ($p < 0.001$) (рис. 2). Внаслідок стресу, як такого, рівень стероїдів зростав майже в 2,5 раза. Стрес на фоні NAE викликав підвищення вмісту гормонів майже у чотири рази (рис. 2). Отже, підвищення рівня кортикостероїдів, пов'язане зі стресом та двократним введенням NAE (18:0), є результатом дії двох чинників.

Під час інкубації зрізів надниркових залоз щурів за присутності двох різних NAE утворення 11-ОКС знижується (рис. 3). Зниження стероїдогенезу є подібним для обох препаратів NAE і складає близько 40%. Таким чином, ефекти, викликані NAE *in vivo* та *in vitro*, мають протилежний характер. Припускаючи, що вплив NAE *in vitro* може бути пов'язаний із прямою дією на стероїдогенез, ми провели серію досліджень зі штучними акцепторами електронів. Перенос електронів від відновленого NADP на цитохром P450_{sc} та інші цитохроми P450, забезпечує перетворення холестеролу в кортикостероїдні гормони. Результати цих експериментів представлено в таблиці. Прослідковано перенос електронів у мітохондріальній та мікросомальній фракціях на цитохром c та дихлорфеноліндофенол. Обробка субклітинних фракцій N-стеароїлетаноламіном або етаноламіном, N-ацильованим сумішшю ненасичених жирних кислот, не викликає статистично значущих змін транспортування електронів.

Основне питання, яке виникає під час аналізу отриманих даних — з чим пов'язана різниця реакції надниркових залоз на NAE *in vivo* та *in*

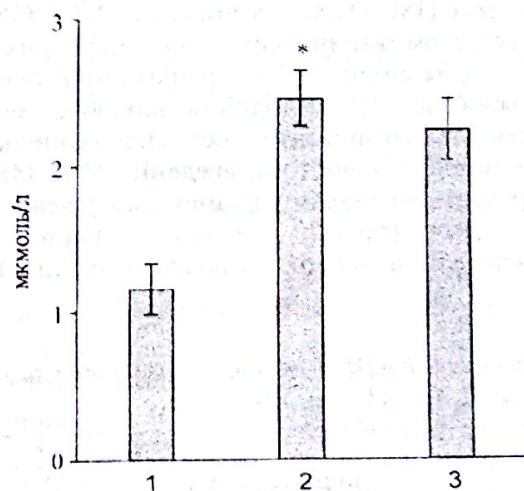


Рис. 1. Вміст 11-ОКС у плазмі крові щурів під час стресу та за одноразового введення N-стеароїлетаноламіну. 1 — інтактні тварини, 2 — стрес + розчинник, 3 — стрес + NAE (18:0), $n=8$; $*p < 0.001$.

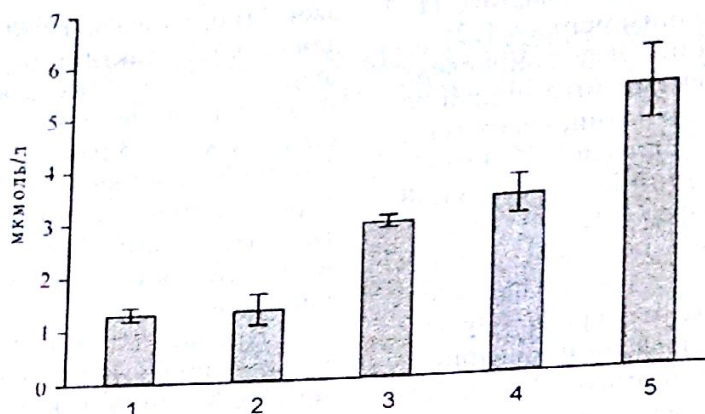


Рис. 2. Вплив стресу та дворазового введення NAE (18:0) на вміст 11-ОКС у плазмі крові щурів. 1 – інтактні тварини (12), 2 – інтактні тварини + розчинник (4), 3 – інтактні тварини + NAE (18:0) (8), 4 – стрес + розчинник (8), 5 – стрес + NAE (18:0) (8), в дужках – кількість тварин. $p_{1,2} > 0,5$; $p_{2,3} < 0,001$; $p_{4,5} < 0,01$; $p_{2,4} < 0,001$; $p_{3,5} < 0,01$.

in vitro. Подібність відповідей надниркових залоз на введення стеароїлетаноламіну та N-ацилетаноламіну, який містить ненасичені жирні кислоти, робить маловірогідною участь СВ1 та СВ2 рецепторів у реалізації ефектів NAE.

Накопичення канабіноїдів у тканині надниркових залоз вже описано [5,15], але характер зв'язування та наступні зміни у клітинах практично не досліджено. Найбільш вивченим механізмом переносу сигналу від СВ1 (та, меншою мірою, від СВ2) є пригнічення активності аденілатциклази [16,17]. Цей фермент відіграє ключову роль у переносі сигналу кортикотропіну в адренкортикоцитах [18]. Однак за введення NAE (18:0) перед стресом тварин, відповідь надниркових залоз у них на ендогенний кортикотропін підсилюється (рис. 2), що повністю виключає можливість гальмування активності аденілатциклази за цих умов. Більше того, введення NAE (18:0) нестресованим щурам підвищувало рівень 11-ОКС у крові (рис. 2, стовпчик 3). Раніше ми спостерігали активацію включення мітки [³H]-

холестеролу в кортикостерон та альдостерон під час інкубації зрізів із додаванням у середовище 10⁻⁵ М NAE [8]. Цікаво, що кількісне утворення 11-ОКС наднирковими залозами щурів-самок за присутності 10⁻⁶ М NAE (18:0) дещо зростало [8], у той самий час як надниркові залози самців продукували за таких умов менше 11-ОКС (рис. 3). Раніше статеві відмінності щільності місць зв'язування канабіноїдів знаходили у деяких структурах мозку та визначали зміни їхнього зв'язування під впливом статевих гормонів, але функціональну вагомість цих відмінностей не досліджено [19]. Через те, що секреція кортикотропіну зростає під впливом канабіноїдів [11], підвищення рівня 11-ОКС у крові після введення NAE (18:0) та підсилення відповіді на стрес легко пояснити активацією під впливом NAE системи гіпофіза – кора надниркових залоз.

В експериментах in vitro, очевидно, виникає можливість гальмування аденілатциклази за дії 10⁻⁶ М NAE. Це призводить до зниження синтезу 11-ОКС (рис. 3), але перенесення елект-

Активність NADPH-залежних редуктаз за присутності N-ацилетаноламінів (мкмоль акцептора/хв на 1 мг білка; M ± m, n=5)

Субстрат	Мітохондрії			Мікросоми		
	Спирт етиловий	NAE 18:0	NAE суміш	Спирт етиловий	NAE 18:0	NAE суміш
Цитохром c	12,7±2,3	12,1±2,2	13,6±2,9	16,0±2,1	15,3±1,7	16,5±1,8
ДХФІФ	7,3±1,6	7,6±1,6	7,9*±2,0	7,6±1,5	8,5±1,7	9,3±1,8

Примітка: *n=4

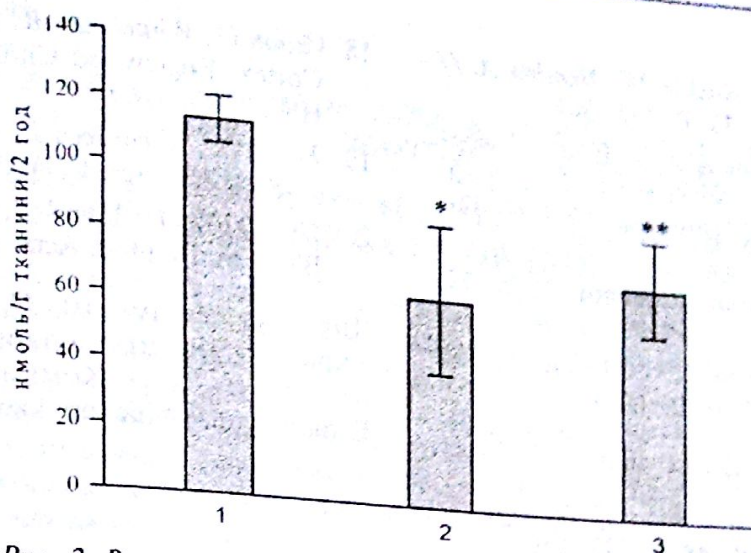


Рис. 3. Вплив *N*-ацилпохідних етаноламіну (10^5 М) на утворення 11-ОКС зрізами надниркових залоз щурів (нмоль на 1 г тканини за 2 години) 1 – контроль (8), 2 – *N*-стеароїлетаноламін (4), 3 – суміш NAE (5); * $p < 0,05$ – *U*-критерій; ** $p < 0,02$. В дужках – кількість спостережень.

ронів на акцептори (таблиця) при цьому не змінюється, тому що cAMP не бере безпосередньої участі в регуляції транспортування електронів.

Раніше ми не відмічали зміни включення [3 H]-холестеролу в альдостерон та кортикостерон за присутності 10^{-6} М препаратів NAE [8], а при концентрації 10^{-5} М виявлялося збільшення кількості мічених кортикостероїдів. За цієї концентрації NAE основну роль у реалізації їхньої дії можливо відіграють мембранотропні та канальні ефекти [20].

N. M. Gulaya¹, A. S. Mikosha²,
A. D. Zhukov¹, I. S. Chelnakova²

INVESTIGATION OF N-ACYLETHANOLAMINES EFFECTS ON THE ADRENAL CORTEX FUNCTION

Summary

The possibility of NAE to take part in the regulation of the function of adrenal glands was studied. It was shown that two times NAE (18:0) injection in a dose 5 mg/kg of weight increased the content of 11-hydroxysteroids in blood of intact male rats. NAE caused the raise of the blood hormone content in 4 fold under the immobilization stress.

It is apparent that augment of stress response under the influence of NAE in vivo is explained by the activation of hypophysis-adrenal cortex system.

In vitro NAE lowered steroidogenesis by near 40%. One can suggest that this decrease is caused by membranotropic properties of NAE.

Key words: adrenal cortex, N-acylethanolamines, stress, steroidogenesis.

¹Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine; ²Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of Academy of Medical Sciences of Ukraine;
E-mail: ngula@biochem.kiev.ua

1. Schmid H.H.O., Schmid P. C., Natarajan V. // Prog. Lipid Res. 1990. 29. P. 1–43.
2. Berdyshev E., Boichot E., Lagente V. // J. Lipid Mediat. Cell Signal. 1996. 15. P. 49–67.
3. Howlett A. C. // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1995. 35. P. 607–634.
4. Galiegue S., Mary S., Marchand J. et al. // Eur. J. Biochem. 1995. 232. P. 54–61.
5. Gerard C. M., Mollereau C., Vassart G., Parmentier M. // Biochem. J. 1991. 279. P. 129–134.
6. Willoughby K., Moore S., Martin B., Ellis E. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997. 282. P. 243–247.
7. Kondo S., Sugiura T., Kodaka T. et al. // Arch. Biochem. Biophys. 1998. 354. P. 303–310.
8. Mikosha A., Kovzun O., Zhukov A., Gulaya N. // Med. Sci. Res. 1998. 26. P. 85–88.
9. Wenger T., Toth B. E., Martin B. R. // Life Sci. 1995. 56. P. 23–24.
10. Giannikou P., Yiannakakis N., Fragkakis G. et al. // Neuroendocrinol. Lett. 1995. 17. P. 281–287.
11. Kokka N., Garcia Y. F. // Life Sci. 1974. 15. P. 329–338.

12. Moor de P., Steeno O., Raskin M., Hendrix A. // Acta Endocrinol. 1960. 33. P. 297–307.
13. Карузина И. И., Арчаков А. И. // В кн.: Современные методы в биохимии. Под ред. В.Н. Ореховича. М.: Медицина. 1977. С. 49–62.
14. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. 72. P. 248–254.
15. Lynn A. B., Herkenham M. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1994. 268. P. 1612–1623.
16. Bayewitch M., Avidorreiss T., Levy R. et al. // FEBS Lett. 1995. 375. P. 143–147.
17. Felder C. C., Joyce K. E., Briley E. M. et al. // Molec. Pharmacol. 1995. 48. P. 443–450.
18. Vinson G., Whitehouse B., Hinson J. // The Adrenal Cortex. Englewood Cliffs, New Jersey. Prentice Hall. 1992. 316 p.
19. Rodriguez de Fonseca F., Cebeira M., Ramos J. A. et al. // Life Sci. 1994. 54. P. 159–170.
20. Gulaya N. M., Melnik A. A., Balkov D. I. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1993. 1152. P. 280–288.

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України; ²Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка АМН України; E-mail: ngula@biochem.kiev.ua

Одержано 15.05.2000