

Н. М. Гула, В. М. Маргітич, Т. М. Горідько, Н. М. Говсеєва,
Б. В. Пугач*, В. М. Клімашевський, В. В. Фролькіс*

ЗАХИСНИЙ ВПЛИВ N-ПАЛЬМІТОЇЛЕТАНОЛАМІНУ НА РОЗВИТОК ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ІШЕМІЇ СЕРЦЯ ЩУРІВ, ЩО ВИКЛИКАНА ВАЗОПРЕСИНОМ[#]

У досліджах на щурах вивчали протекторний вплив *N*-пальмітоїлетаноламіну /(*16:0*)-*NAE*/ (1 мкмоль) на коронарну недостатність та порушення серцевого ритму, а також зміни ліпідного складу міокарда, що викликані введенням вазопресину (1 мкг). Попереднє введення (*16:0*)-*NAE* гальмує або цілком усуває розвиток цих змін. Гостра вазопресинозна ішемія супроводжується триразовим підвищенням кількості лізофосфатидилхоліну (ЛФХ). Попереднє введення (*16:0*)-*NAE* запобігає змінам концентрації ЛФХ. Отримані дані свідчать про кардіопротекторні та антиаритмічні властивості (*16:0*)-*NAE*, які можуть опосередковуватися, принаймні частково, через модифікацію фосфоліпідного складу.

Ключові слова: *N*-ацилетаноламіни, *N*-пальмітоїлетаноламін, фосфоліпіди, холестерин, жирні кислоти, ішемія, вазопресин, серце.

N-ацилетаноламінові фосфоліпіди та їхні похідні — *N*-ацилетаноламіни (*NAE*), серед яких превалювали *N*-пальмітоїл- та *N*-стеароїлетаноламін, були знайдені групою *Schmid* в інфарктних зонах міокарда собак ще на початку 80-х років [8, 9]. Тоді ж автори висловили припущення, що ці сполуки продукуються як захисні агенти для зменшення ішемічних ушкоджень міокарда [8, 9, 18], хоча чітких доказів на той час отримано не було. Іншими дослідниками було наведено дані про порушення фосфоліпідного складу міокарда при його ішемічному ураженні [12], що могло бути зумовлено надмірною активацією вільно-радикального окислення ліпідів [14]. Майже через десятиліття групою *Schmid* було доведено, що *NAE* у концентрації біля 100 мкмоль/л пригнічує процеси перекисного окислення ліпідів у мітохонд-

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, 252030 Київ.

* Інститут геронгології АМН України, 254114 Київ.

[#] Роботу підтримано грантом ДКНТ України 01.03.00/001–95.

© Н. М. Гула — чл.-кор. НАН і АМН України, В. М. Маргітич — к.м.н., Т. М. Горідько — м.п.с., Н. М. Говсеєва — к.б.н., Б. В. Пугач — к.б.н., В. М. Клімашевський — к.б.н., В. В. Фролькіс — акад. НАН і АМН України, 1996.

ріях серця інтактних щурів [17]. Антиоксидантні властивості NAE були продемонстровані й нашими дослідженнями на інших біологічних об'єктах [3]. Проте даних літератури по впливу NAE на фосфоліпідний склад ураженого ішемією серця ми не знайшли.

В проведених нещодавно групою Н. М. Гулої дослідках на клітинних культурах було показано виразний вплив NAE на деякі мембранозв'язані транспортні процеси та ліпідний склад клітин [11]. Зокрема, ця сполука виявляла здатність пригнічувати генерацію лізо-форм фосфоліпідів [2], які, як добре встановлено, є важливими продуктами оксидативної декомпозиції фосфоліпідів. Зауважимо, що деякі автори показали прямий зв'язок між введенням екзогенного лізо-фосфатидилхоліну та виникненням аритмій [13]. Не виключено, що одним з важливих механізмів ефекту NAE при ішемічному ураженні міокарда є його вплив на ліпідний склад.

Патогномонічною моделлю для вивчення гострої коронарної недостатності є вазопресинова модель ішемії міокарда, при якій звичайно розвиваються аритмії по типу брадикардії, атріо-вентрикулярного блоку, екстрасистолії тощо [4].

Виходячи з наведених міркувань, метою нашої роботи було вивчити протекторний вплив *N*-пальмітоїлгаламоліну (16:0)-NAE/ на коронарну недостатність, порушення серцевого ритму, а також ліпідний склад міокарда щурів за умов гострої вазопресинової ішемії.

Матеріал та методи. Робота була проведена на 30 щурах-самцях віком 8–10 міс, масою 280–320 г. У піддослідних щурів, що знаходилися під нембуталовим наркозом (4 мг/кг), реєстрували ЕКГ на електрокардіографі „Елкар” у другому відведенні протягом 1 хв до введення через *v.jugularis* препаратів та через кожні 30 с після введення. Тварин декапітували через 10 хв після введення вазопресину, швидко препарували шлуночки серця, які вміщували у скраплений азот.

Тварин розподілили на три групи: I — контрольні тварини, яким вводили 0,5 мл 9,6 % етилового спирту на фізіологічному розчині; II — тварини, яким вводили 0,5 мл 9,6 % етилового спирту, а через 10 хв — 1 мкг вазопресину (*Sigma*, США); III — тварини, яким вводили (16:0)-NAE (1 мкмоль) в 0,5 мл 9,6 % етилового спирту на фізіологічному розчині, а через 10 хв — вазопресин.

Ліпіди екстрагували за методом *Bligh, Dyer* [6]. Розділення ліпідів проводили за методом двомірної тонкошарової хроматографії у системах розчинників: перший напрям — хлороформ:метанол:бензол:аміак (65:30:10: 6), другий напрям — хлороформ:метанол:бензол:ацетон:крижана оцтова кислота:вода (70:30:10:5:4:1) [20]. Якісний та кількісний аналіз фосфоліпідів проводили, як описано нами раніше [1].

Кількісний аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили за допомогою газо-рідинної хроматографії на хроматографі *Carlo Erba* (Італія) з

полум'яно-йонізаційним детектором на скляній колонці (довжина 2,5 м, внутрішній діаметр 3 мм), яка була заповнена 10 % фазою *SP-2300 (Silar 5CP)* на „*Chromosorb W/HP*” при програмованій температурі 140–175–225–250 °С (2 °С/хв).

Статистичний аналіз проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента; вірогідними вважали дані при $P < 0,05$.

Результати. Введення щурам I групи етилового спирту не впливало на показники ЕКГ та ліпідний склад серця. Введення щурам II групи вазопресину на фоні етилового спирту призводило до розвитку аритмій — з'являються брадикардія, атріо-вентрикулярний блок і майже у всіх випадках відмічаються екстрасистоли (рис. 1). Ці зміни найбільш виражені протягом перших трьох хвилин після введення вазопресину. Потім ці явища поступово стихають, хоча ще й на десятій хвилині реєструється брадикардія. Найбільш характерними проявами вазопресинової коронарної недостатності є двофазні зміни амплітуди зубця *T*, зміни положення сегменту *S–T* відносно ізолінії. Перша фаза цього процесу (до 2 хв) характеризується різким збільшенням амплітуди зубця *T* (через 1,5 хв амплітуда зубця *T* збільшена на 0,1 мВ), підняттям сегменту *S–T*. Під час другої фази відбувається зниження або інверсія зубця *T* (на 5 хв амплітуда зубця *T* зменшилася на 0,05 мВ), депресія сегменту *S–T*. Все це відбиває прояви субендокардіальної ішемії та пошкодження серцевого м'яза. Введення тільки (16:0)-*NAE* майже не впливає на ритм серця, проте ін'єкція (16:0)-*NAE* перед введенням вазопресину попереджає зміни частоти серцевих скорочень, розвитку аритмій та модифікації зубця *T* (див. рис. 1). Під впливом *NAE* зубець *T* після введення вазопресину збільшився лише на 0,06 мВ на 30 с, відмічено також менше зниження його у другу фазу — на 5 хв (рис. 2). Крім того, (16:0)-*NAE* запобігає виникненню вазопресинової брадикардії (рис. 3).

Розвиток експериментальної ішемії супроводжувався певними змінами ліпідного складу міокарда. Ін'єкція вазопресину або (16:0)-*NAE* істотно не впливає на вміст неорганічного фосфору загальних фосфоліпідів та холестерина (табл. 1). Проте за умов гострої коронарної недостатності виявлено істотні зміни у вмісті окремих фосфоліпідів. Хоча рівень фосфатидилхоліну (ФХ) практично не змінюється, кількість його похідного — лізо-фосфатидилхоліну (ЛФХ) — зростає втричі. Відповідно змінюється й відсоткове співвідношення окремих фосфоліпідів. Зокрема, відсотковий вміст ЛФХ збільшується у три рази при введенні вазопресину (табл. 2). Попередня ін'єкція щурам (16:0)-*NAE* запобігає змінам вмісту ЛФХ (див. табл. 1, 2). Зауважимо, що під впливом *NAE* вірогідно зменшується кількість фосфатидилсерину (ФС) на фоні зростання відсоткового вмісту фосфатидилетаноламіну (ФЕ). При цьому змін у розподілі діацильної та алкіл-алкесильної (плазмалогенної) форм головних фосфоліпідів за умов гострої вазопресинової ішемії виявлено не було (табл. 3).

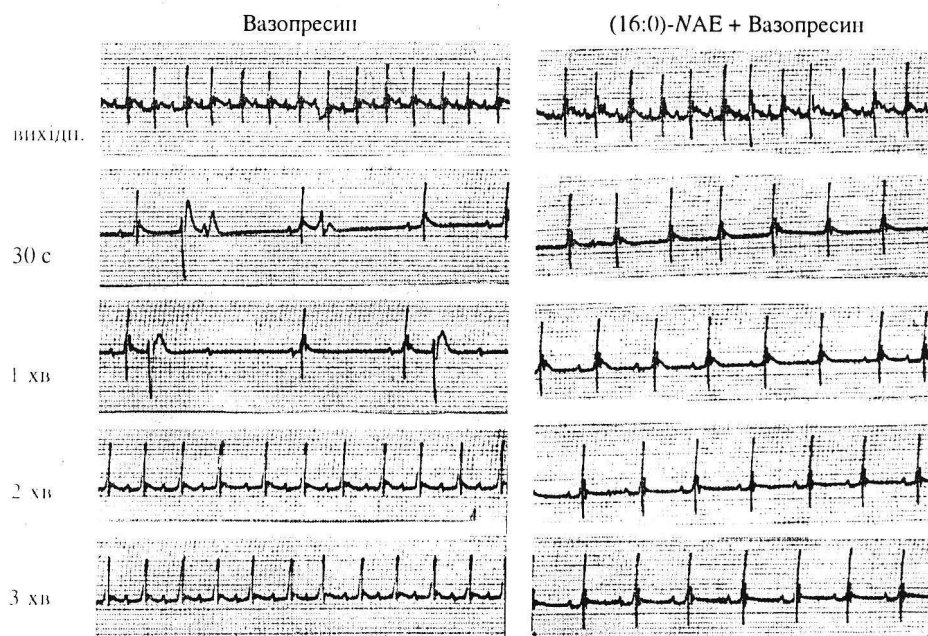


Рис. 1. Вплив (16:0)-*NAE* на перебіг ішемії міокарда, що викликана вазопресинном.

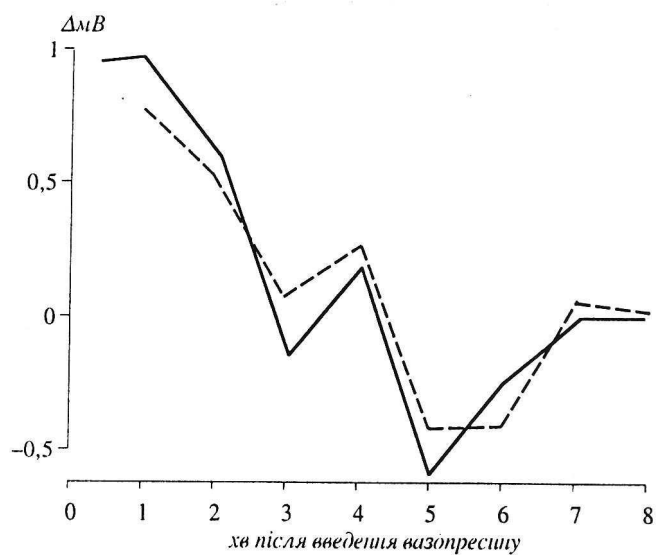


Рис. 2. Вплив (16:0)-*NAE* на зміни амплітуди зубця *T* після введення вазопресину: суцільна лінія — вазопресин, штрихова — (16:0)-*NAE* + вазопресин.

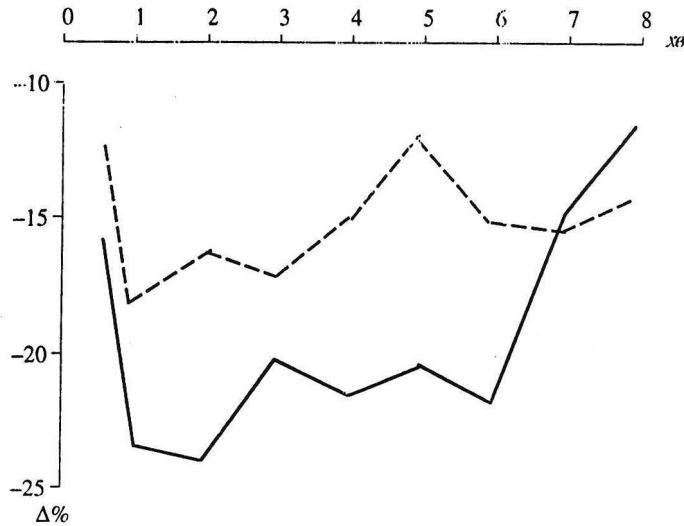


Рис. 3. Вплив (16:0)-NAE на зміни частоти серцевих скорочень після введення вазопресину: суцільна лінія — вазопресин, штрихова — (16:0)-NAE + вазопресин.

Таблиця 1

Вплив (16:0)NAE на рівень холестерину, неорганічного фосфору фосфоліпідів в міокарді при вазопресинній ішемії серця щурів, мкг P_i /г тканини

Ліпіди	Контроль	Вазопресин	(16:0)NAE + вазопресин
Холестерин, мкмоль/г тканини	11,6 ± 0,7	11,8 ± 0,7	11,6 ± 0,5
Загальні фосфоліпіди	602,0 ± 24,0	580,0 ± 36,0	580,0 ± 27,0
Фосфатидилхолін	253,1 ± 7,6	232,9 ± 9,2	242,6 ± 12,3
Лізофосфатидилхолін	3,9 ± 0,6	13,6 ± 2,0*	5,4 ± 1,6#
Фосфатидилетаноламін	205,4 ± 8,0	193,8 ± 8,5	217,4 ± 10,4
Дифосфатидилгліцерол	79,8 ± 5,7	75,5 ± 5,4	81,0 ± 4,9
Сфінгомієлін	17,3 ± 0,7	24,8 ± 8,0	15,1 ± 1,3
Фосфатидилінозитол	13,7 ± 0,7	18,6 ± 3,8	11,5 ± 1,3
Фосфатидилсерин	9,6 ± 0,7	14,8 ± 0,3	5,5 ± 1,2*#
Стартова зона	1,5 ± 0,7	7,3 ± 3,4	8,4 ± 5,8

Примітки: * — $P < 0,05$ відносно контролю; # — $P < 0,05$ відносно вазопресину.

Що стосується вмісту головних складових ліпідів — жирних кислот — то їх склад у перші хвилини гострої модельної коронарної недостатності не

Таблиця 2

Вплив (16:0)-NAE на розподіл фосфоліпідів при вазопресинівій ішемії серця щурів, %

Фосфоліпід	Контроль	Вазопресин	(16:0)-NAE + вазопресин
Фосфатидилхолін	43,2 ± 0,5	40,3 ± 1,2	41,9 ± 0,6
Лізофосфатидилхолін	0,7 ± 0,1	2,3 ± 0,3*	0,9 ± 0,3#
Фосфатидилетаноламін	34,3 ± 1,9	33,4 ± 0,8	37,4 ± 0,6#
Дифосфатидилгліцерол	13,3 ± 0,4	12,9 ± 0,4	13,9 ± 0,5
Сфінгомієлін	2,9 ± 0,05	4,1 ± 1,1	2,6 ± 0,2
Фосфатидилінозитол	2,3 ± 0,1	3,1 ± 0,5	2,0 ± 0,2
Фосфатидилсерин	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,5	0,9 ± 0,2*#
Стартова зона	0,3 ± 0,1	1,2 ± 0,6	1,8 ± 1,4

Примітки: * — $P < 0,05$ відносно контролю; # — $P < 0,05$ відносно вазопресину.

Таблиця 3

Вплив (16:0)-NAE на розподіл плазмалогенних форм фосфоліпідів в міокарді при вазопресинівій ішемії серця щурів, %

Фосфоліпід	Контроль	Вазопресин	(16:0)-NAE + вазопресин
Фосфатидилхолін	94,4 ± 1,4	94,0 ± 2,0	94,4 ± 0,8
Фосфатидилхолін-плазмалоген	5,6 ± 1,4	5,9 ± 2,0	5,6 ± 0,8
Фосфатидилетаноламін	69,9 ± 2,4	70,8 ± 0,7	71,8 ± 0,5
Фосфатидилетаноламін-плазмалоген	30,1 ± 2,4	29,2 ± 0,7	28,2 ± 0,5

зазнає істотних змін (табл. 4). В 1,75 рази знижується рівень пальмітоолеїнової (C 16:1) кислоти й з'являється нехарактерна для контрольних тварин нонадецилова (C 19:0) кислота. Введення (16:0)-NAE запобігає зниженню рівня C 16:1, але не впливає на вміст C 19:0, яка з'являється під дією вазопресину. Під впливом NAE по відношенню до групи „вазопресинових” щурів нормалізується рівень олеїнової (C 18:1) кислоти, а також дещо збільшується рівень C 15:0 та C 17:0 жирних кислот при збереженні балансу насичені/ненасичені жирні кислоти.

Обговорення. Як відомо, при хронічній ішемічній хворобі серця (ХІХС), особливо при больовому нападі [4], значно зростає концентрація вазопресину в крові. Цікаво, що найбільш високі рівні вазопресину в крові, до-

статні для проявлення коронароконстрикторного ефекту, зареєстровані у молодих людей 30–39 років з ХІХС. Це дозволяє вважати вазопресинову модель вдалою для вивчення впливів *NAE*.

Таблиця 4
Вплив (16:0)-*NAE* на розподіл жирних кислот в міокарді при вазопресиновій ішемії серця щурів, %

Жирні кислоти	Контроль	Вазопресин	(16:0)- <i>NAE</i> + вазопресин
14:0	0,17 ± 0,05	0,11 ± 0,01	0,15 ± 0,02
15:0	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,01 [#]
<i>iso</i> 16:0	0,07 ± 0,01	0,17 ± 0,05	0,09 ± 0,005
16:0	11,96 ± 0,40	11,73 ± 0,25	11,70 ± 0,13
16:1	0,98 ± 0,14	0,56 ± 0,04 [*]	0,84 ± 0,08 [#]
17:0	0,37 ± 0,06	0,52 ± 0,04	0,64 ± 0,02 ^{*#}
17:1	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,13 ± 0,04
18:0	22,45 ± 0,94	23,83 ± 0,49	20,88 ± 0,99 [#]
18:1	10,66 ± 0,92	9,08 ± 0,32	10,56 ± 0,31 [#]
18:2	23,75 ± 0,95	23,62 ± 0,60	24,48 ± 0,44
19:0	–	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,004
20:0	0,43 ± 0,01	0,39 ± 0,03	0,40 ± 0,01
20:1	0,30 ± 0,04	0,32 ± 0,02	0,34 ± 0,01
21:0	0,45 ± 0,02	0,39 ± 0,02 [*]	0,40 ± 0,02
20:3	0,63 ± 0,02	0,56 ± 0,01	0,57 ± 0,02
20:4	25,63 ± 1,34	26,05 ± 0,95	25,10 ± 1,09
22:0	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,04	0,50 ± 0,31
22:2	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,07	0,21 ± 0,09
22:5	0,88 ± 0,13	1,04 ± 0,06	0,53 ± 0,44
22:6	0,68 ± 0,16	0,90 ± 0,11	1,28 ± 0,49
Насичені	36,32 ± 0,92	37,53 ± 0,58	34,91 ± 0,83
Ненасичені	63,66 ± 0,84	62,42 ± 0,62	64,38 ± 0,78
Відношення насичені/ненасичені	0,57 ± 0,02	0,60 ± 0,02	0,54 ± 0,02

Примітки: * — $P < 0,05$ відносно контролю;

— $P < 0,05$ відносно вазопресину.

Отримані нами результати засвідчують, що (16:0)-*NAE* в дозі 1 мкмоль виявляє виражені кардіопротекторний та антиаритмічний ефекти. Здається, ці ефекти можуть, хоча б частково, бути пояснені мембранотропними властивостями сполук класу *NAE* [11], що довго зберігаються в тканині серця у зв'язку з відсутністю у серці ферменту амідази, який інактивує цю спо-

луку через її гідроліз до етаноламіну та жирної кислоти [19]. Кардіопротекторний ефект підтверджується також фактом, що *NAE* може стабілізувати мітохондріальну мембрану, попереджуючи вихід кальцію під впливом деяких кальцій-релізінг агентів [7]. Методами рентгенівської дифракції та флюоресцентної спектроскопії нещодавно показано, що *NAE* може компенсувати дестабілізацію ламелярної структури біологічної мембрани й запобігати утворенню гексагональної H_{II} фази, що індуюються стресорними чинниками, зокрема підвищенням вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} , некрозу клітини тощо [5]. Зауважимо, що вазопресин, зв'язуючись із відповідним рецептором плазматичної мембрани, спричинює активацію специфічної до ФХ фосфоліпази *C*, що призводить до деградації цього фосфоліпіда та утворення вторинних месенджерів [10]. Крім того, при ішемії активується фосфоліпаза A_2 , що викликає утворення ЛФХ та вільної жирної кислоти, яка є сильним фузогеном, і може спричинити порушення мембранних структур клітини [15]. На думку інших авторів, вільні жирні кислоти типу лінолеату та інших есенційних жирних кислот сприяють зростанню спорідненості аденілат-циклази з катехоламін-зв'язаним β -адренергічним рецептором [16], що в умовах ішемії може мати несприятливі наслідки. Як показали наші дослідження, попереднє введення (16:0)-*NAE* повністю усуває накопичення ЛФХ під впливом вазопресину і тим самим стабілізує клітинну мембрану. Можливо, що зміни жирнокислотного складу, які також спостерігалися в наших дослідженнях, мали компенсаторний характер.

Отримані факти дають змогу зробити висновок, що кардіопротекторні та антиаритмічні властивості (16:0)-*NAE* можуть опосередковуватися, принаймні частково, через модифікацію фосфоліпідного складу мембрани. З'ясування молекулярних механізмів модифікуючого впливу (16:0)-*NAE* на ліпідний склад міокарда в умовах ішемії потребує додаткових досліджень.

Література

1. Горідько Т. М., Маргітич В. М., Клімашевський В. М. та ін. Фосфоліпідний склад серця шурів за гострої ішемії міокарда, змодельованої вазопресином // Укр. биохим. журн. – 1996. – 68, № 2. – С. 99–102.
2. Гула Н. М., Волков Г. В., Говсеєва Н. М. та ін. Вплив вератрину на ліпідний склад клітин нейробластоми С 1300 // Доп. АН УРСР. – 1987. – № 10. – С. 67–69.
3. Гулая Н. М., Смирнов И. М., Шмалько Ю. П. и др. Влияние *N*-пальмитоил- и *N*-стеароилэтанолламинов при метастазировании карциномы Льюис // Укр. биохим. журн. – 1993. – 65, № 6. – С. 96–101.
4. Фролькис В. В., Головченко С. Ф., Медведь В. И. Вазопресин и сердечно-сосудистая система // Успехи физиол. наук. – 1983. – 14, № 2. – С. 56–81.
5. Ambrosini A., Bertoli E., Mariani P. et al. N-Acylethanolamines as membrane topological stress compromising agents // Biochim. Biophys. Acta. – 1993. – 1148. – P. 351–355.

6. *Bligh E. G., Dyer W. I.* A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* – 1959. – **37**, № 8. – P. 911–917.
7. *Epps D. E., Palmer J. W., Schmid H. H. O., Pfeiffer D. R.* Inhibition of permeability-dependent Ca^{2+} release from mitochondria by N-acylethanolamines, a class of lipids synthesized in ischemic heart tissue // *J. Biol. Chem.* – 1982. – **257**. – P. 1383–1391.
8. *Epps D. E., Schmid P. C., Natarajan V., Schmid H. H. O.* Accumulation of N-acylethanolamine glycerophospholipids in infarcted myocardium // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1980. – **618**, № 3. – P. 420–430.
9. *Epps D. E., Schmid P. C., Natarajan V., Schmid H. H. O.* N-acylethanolamine accumulation in infarct myocardium // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* – 1979. – **90**. – P. 628–633.
10. *Exton J. H., Taylor S. J., Augert G., Bocckino S. B.* Cell signalling through phospholipid breakdown // *Molecular and Cellular Biochemistry.* – 1991. – **104**. – P. 81–86.
11. *Gulaya N. M., Melnik A. A., Balkov D. I. et al.* The effect of long chain N-acylethanolamines on some membrane-associated functions of neuroblastoma C1300 N18 cells // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1993. – **1152**. – P. 280–288.
12. *Kinnaird A. A. A., Choy P. C., Man R. Y. K.* Lysophosphatidylcholine accumulation in the ischemic canine heart // *Lipids.* – 1988. – **23**. – P. 32–35.
13. *Man R. Y. K.* Lysophosphatidylcholine induced arrhythmias and its accumulation in the rat perfused heart // *Br. J. Pharmacol.* – 1988. – **93**. – P. 412–416.
14. *McCord J. M.* Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury // *N. Engl. J. Med.* – 1985. – **312**. – P. 159–163.
15. *Meizel S., Turner K. O.* Stimulation of an exocytotic event of the hamster sperm acrosome reaction by cis-unsaturated fatty acids // *FEBS Letters.* – 1983. – **161**. – P. 315–318.
16. *Orly J., Schramm M.* Fatty acids as modulators of membrane functions: Catecholamine-activated adenylate cyclase of turkey erythrocyte // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1975. – **72**. – P. 3433–3437.
17. *Parinandi N. L., Schmid H. H. O.* Effect of long-chain N-acylethanolamines on lipid peroxidation in cardiac mitochondria // *FEBS Letters.* – 1988. – **237**, № 1, 2. – P. 49–52.
18. *Schmid H. H. O., Schmid P. C., Natarajan V.* N-acylated glycerophospholipids and their derivatives // *Prog. Lipid Res.* – 1990. – **29**, № 1. – P. 1–49.
19. *Schmid P. C., Zuzarte-Augustin M. L., Schmid H. H. O.* Properties of rat liver N-acylethanolamine amidohydrolase // *J. Biol. Chem.* – 1985. – **260**, № 26. – P. 14145–14149.
20. *Vaskovsky V. E., Terekhova T. A.* HPTLC of phospholipid mixtures containing phosphatidylglycerol // *J. High Resol. Chromatogr. & C.C.* – 1979. – **2**. – P. 671–672.