

УДК 615.03:577.115

©Коллектив авторов

КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА ПРИ АНАФИЛАКТИЧЕСКОМ ШОКЕ У МОРСКИХ СВИНОК

Н.М. Гулая, А.Г. Бердышев, А.А. Чумак, Е.Ф. Мегедь, Н.Л. Киндрук, Т.Н. Горидько*

Институт биохимии им. А.В.Палладина Национальной Академии наук Украины,
ул. Леонтовича 9, 01601, Киев; тел.: (044) 234-82-29;
эл. почта: ngula@biochem.kiev.ua

На модели аллергической реакции немедленного типа (анафилактический шок у морских свинок) впервые показано, что эндогенный каннабимиметик N-стеароилэтаноламин (NSE), вводимый животным в дозе 65 мг/кг массы тела на протяжении 14 дней до анафилаксии, обладает кардиопротекторными свойствами. Он способен нормализовать в кардиомиоцитах содержание гистамина и оксида азота, а также снижать активность индуцибельной и конститутивной NO-синтазы. NSE при анафилаксии также способствовал устранению дисбаланса прооксидант-антиоксидант системы клеток сердца, уменьшая содержание в них ТБК-реагирующих продуктов и повышая сниженную при анафилактическом шоке активность каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. В результате этого при анафилактическом шоке выживало около 70% животных, которые получали NSE.

Полученные результаты позволяют заключить, что NSE способен влиять на протекание аллергических реакций немедленного типа и может оказаться полезным при создании антиаллергических лекарственных препаратов нового типа, а также препаратов с кардиопротекторным действием.

Ключевые слова: N-стеароилэтаноламин, анафилаксия, гистамин, оксид азота, перекисное окисление липидов.

ВВЕДЕНИЕ. В последние десятилетия во всем мире большое внимание уделялось исследованиям физиологической роли различных каннабиноидов, что привело к открытию каннабиноидной системы человека и животных. Эта система состоит из трансмембранных СВ1 и СВ2 рецепторов и многочисленных эндогенных лигандов, а также ферментов их метаболизма. Особенную роль в этой системе играют арахидоноилэтаноламид (анандамид) и 2-арахидоноилглицерол. Эндоканнабиноиды обладают высокой биологической и фармакологической активностью и могут модулировать многие биохимические процессы в организме. Так, показано их участие в регуляции иммунной системы человека и животных, в частности, влияние на развитие Т-хелперов, хемотаксис и рост злокачественных опухолей [1]. Эндогенные агонисты каннабиноидных рецепторов ингибируют активность мастоцитов [2], а также индуцированную капсаицином бронхоконстрикцию [3]. Они стимулируют миграцию естественных киллеров, тем самым мобилизуя защитные силы организма против инфекций, вирусов и раковых клеток [4]. Периферические каннабиноидные рецепторы экспрессируются на иммунных клетках многих типов (макрофагах, дендритных клетках, В-лимфоцитах и т.д.) и фармакологически модулируют их реактивность и продуцирование ими цитокинов [5, 6]. Соответственно каннабиноиды способны влиять на чувствительность организма к иммунотерапии инфекций, атеросклероза и рака. Недавно были получены новые данные, доказавшие необходимость экспрессии СВ2-рецепторов для формирования Т- и В-лимфоцитов [7]. В настоящее время известно более 20 липидных медиаторов, большинство из которых непосредственно не связываются с СВ1 и СВ2-рецепторами, но могут

* - адресат для переписки

оказывать каннабимиметический эффект и играют важную роль в регуляции иммунной системы, репродукции, энергетического баланса и т.п. Последние исследования свидетельствуют о том, что некоторые из этих веществ действуют как сигнальные молекулы, связываясь с так называемыми PPAR α -рецепторами (peroxisome proliferator-activated receptor α) и ванилоидными TRPV1-рецепторами (transient receptor potential type vanilloid 1 receptor) [8]. Большинство исследований касается анандамида и 2-арахидоноилглицерола, которые относятся к каннабиноидам, и некоторых других ненасыщенных соединений, синтезирующихся в организме вместе с анандамидом "on demand". Эндогенные C₁₈-N-ацилэтанолламины (NAE) представлены NAE_{18:3}, NAE_{18:2}, NAE_{18:1} и NAE_{18:0}. N-стеароилэтанолламин (C_{18:0} NAE) не связывается с CB1-рецепторами, но может активировать ванилоидные TRPV1-рецепторы и тем самым выступать в качестве их эндогенного модулятора. Показано, что NSE в тетраде тестов (уменьшение двигательной активности, катаlepsия, анальгезия, снижение температуры тела) оказывает такое же действие, как и анандамид, что свидетельствует о каннабимиметических свойствах NSE [9].

Эндоканнабиноиды могут проявлять и иммуносупрессивную активность. Но сведения о влиянии насыщенных эндоканнабиноидов на иммунную систему ограничены главным образом противовоспалительным действием пальмитоилэтанолламина (PEA). Было показано, что PEA повышает неспецифическую устойчивость к различным бактериальным токсинам и травматическому шоку, а также снижает интенсивность воспалительных и иммунных процессов [10]. Практически ничего не известно о влиянии NSE на аллергические реакции.

В последние пять лет особое внимание исследователей направлено на исследование влияния экзогенных и эндогенных каннабиноидов на сердечно-сосудистую систему человека и животных [11]. В попытках применить каннабиноиды для лечения дисфункций сердечно-сосудистой системы было установлено, что прямые и косвенные эффекты каннабиноидов на сердце и кровеносные сосуды человека и животных зависят от экспериментальных условий (*in vivo* и *in vitro*), видовой принадлежности, физиологического состояния организма и др. Так, эндоканнабиноид анандамид снижал кровяное давление у спонтанно гипертензивных крыс, влияя на частоту сердечных сокращений, в то же время не влиял на релаксацию коронарных сосудов свиньи и артерий миометрия человека. Применение высокоактивного селективного лиганда CB1-рецепторов римонабанта приводило к повышению кровяного давления у спонтанно гипертензивных крыс и, наоборот, к снижению АД у пациентов с избыточной массой тела.

Так как сердце, наряду с легкими и печенью является одним из критических органов при анафилактическом шоке, целью нашей работы явилось исследование влияния NSE на содержание гистамина, оксида азота, образование продуктов перекисного окисления липидов и активность некоторых основных ферментов антиоксидантной защиты — каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы в сердце морских свинок при анафилактическом шоке.

МЕТОДИКА. Влияние NSE на аллергическую реакцию немедленного типа (анафилактический шок) изучали на морских свинках-самцах весом 250-300 г, которых разделили на 4 группы: интактные (11 животных), контроль (сенсibilизированные, n=15) и две группы сенсibilизированных животных, которые получали *per os* по 1 мл суспензии NSE в дозе 0,65 мг/кг (n=10) и 65 мг/кг (n=22) массы тела на протяжении 14 дней после сенсibilизации. Сенсibilизацию животных проводили однократным введением 0,2 мл конской сыворотки (производство "Биолик ЛТД") подкожно в правый паховый участок. Провокацию аллергической реакции осуществляли на 15-й день путем внутрибрюшинного введения 1 мл конской сыворотки. Выживших и интактных животных убивали методом воздушной эмболии.

Содержание гистамина в гомогенате сердечной ткани определяли общепринятым методом с использованием глутарового альдегида [12]. Содержание нитрит-аниона определяли спектрофотометрически с помощью реактива Гриса [13]. Суммарную активность NO-синтаз (конститутивной – cNOS и индуцибельной – iNOS) [КФ 1.14.13.39] в гомогенате сердца определяли по количеству образованного после инкубации стабильного метаболита оксида азота – нитрит-аниона (NO_2^-) [14]. Инкубационная среда объёмом 1 мл, содержала 50 мМ KH_2PO_4 (pH=7,0), 1 мМ MgCl_2 , 2 мМ CaCl_2 , 1 мМ NADPH, 2,2 мМ L-аргинин и 0,2 мл гомогената сердечной ткани. Для определения активности iNOS в инкубационной среде вместо CaCl_2 для связывания эндогенного Ca^{2+} добавляли EGTA до конечной концентрации 4 мМ. Активность cNOS рассчитывали как разницу суммарной активности NOS и активности индуцибельной NO-синтазы.

Интенсивность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах сердца оценивали по содержанию ТБК-реагирующих продуктов, которые определяли спектрофотометрически по методу Владимирова и Арчакова в нашей модификации [15, 16]. Содержание малонового диальдегида рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Активность супероксиддисмутазы (СОД) [КФ 1.15.1.1] в гомогенатах сердца определяли по степени снижения восстановления нитросинего тетразолия в присутствии NADH и феназинметасульфата по методу [17], активность каталазы [КФ 1.11.1.6] определяли по скорости распада перекиси водорода [18], активность глутатионпероксидазы [КФ 1.11.1.9] определяли по методу, основанному на измерении скорости окисления NADPH в реакции с H_2O_2 в присутствии восстановленного глутатиона [19]. Содержание белка в гомогенатах сердца определяли по методу Брэдфорд. Статистический анализ результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. У сенсibilизированных животных контрольной группы спустя несколько секунд после повторного введения антигена наблюдались характерные проявления анафилактической реакции: беспокойное поведение, почесывание мордочки лапками, затрудненное дыхание, кашель, нарушение координации движения, судороги. Смерть наступала спустя 3-4 мин. У животных, получавших NSE в дозе 0,65 мг/кг массы тела в течение 14 дней до провокации анафилаксии, наблюдались те же характерные для анафилактического шока симптомы после повторного введения антигена, однако погибали они спустя 8-10 мин. В то же время, большинство сенсibilизированных животных, получавших NSE в дозе 65 мг/кг, реагировали на повторное введение антигена лишь кратковременным почесыванием мордочки, чиханием, кашлем (16 из 22 животных этой группы выжило, а 6 погибло через 15-20 минут).

Анафилактический шок – результат реакции антиген-антитело, который с первых секунд сопровождается дегрануляцией эффекторных клеток – базофилов и мастоцитов, занимающих стратегическое положение внутри и вокруг кровеносных сосудов, в том числе и коронарных. Дегрануляция влечет за собой стремительное высвобождение биологически активных соединений, среди которых важную роль играют гистамин и оксид азота. Эти медиаторы аллергических реакций оказывают влияние на проницаемость капилляров, артериальное давление, сократимость гладкой мускулатуры, частоту сердечных сокращений. В условиях нашего эксперимента (табл. 1) в сердце морских свинок контрольной группы в момент анафилактического шока содержание гистамина и стабильного метаболита оксида азота – нитрит-аниона – достоверно увеличивалось по сравнению с таковым в сердце интактных животных, что согласуется с литературными данными [20]. Предварительное введение NSE в течение 14 дней до провокации анафилактического шока, независимо от дозы, способствовало сохранению содержания гистамина и нитрит-аниона в сердце морских свинок в пределах такового у интактных животных.

КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА

Таблица 1. Влияние NSE на содержание гистамина и активность NO-синтазной системы в сердце морских свинок при анафилактическом шоке.

| Параметр | Группы животных | | | |
|--|---------------------|---------------------------------------|---|---|
| | Интактные (n=11) | Контроль (+анафилактика) (n=15) | NSE 0,65 мг/кг +анафилактика (n=10) | NSE 65 мг/кг +анафилактика (n=22) |
| Содержание гистамина (нмоль/г ткани) | 1,80±0,16 | 2,90±0,34* | 1,40±0,35 [#] | 2,03±0,18 [#] |
| Содержание NO ₂ ⁻ (пмоль/мг белка) | 318,12±28,02 | 446,69±39,36* | 342,12±19,11 [#] | 343,22±19,37 [#] |
| Активность cNOS (пмоль·мин ⁻¹ ·мг белка ⁻¹) | 46,35±4,50 | 140,31±6,26* | 117,28±16,20* [#] | 94,23±6,31* [#] |
| Активность iNOS (пмоль·мин ⁻¹ ·мг белка ⁻¹) | 0,5±0,12 | 8,21±1,12* | 7,66±0,65* | 5,21±0,43* [#] |

Примечание. Здесь и в таблице 2: * - статистически значимые различия с интактной группой, p<0,05; # - статистически значимые различия с контрольной группой, p<0,05. Представлены средние арифметические ± ошибки средней.

Отмеченные нами особенности изменения содержания NO₂⁻ в сердце морских свинок при анафилактическом шоке и на фоне введения NSE, по-видимому, были обусловлены его влиянием на активность NO-синтаз. Как следует из данных таблицы 1, активность обеих изоформ NO-синтазы при анафилактическом шоке увеличена, причем в большей степени это выражено для конститутивной NO-синтазы. Введение животным NSE до провокации анафилактического шока препятствовало повышению активности обеих изоформ фермента, однако различие статистически достоверно для дозы 65 мг/кг.

Способность некоторых представителей ненасыщенных NAE ингибировать индуцибельную NOS и активировать конститутивную изоформы NO-синтазы показана при исследовании механизмов их гипотензивного [21] и противовоспалительного действия [22]. Такой же эффект оказывал и пальмитоилэтанолламин (NPE) в случае острого воспаления. Кроме того, и стеароилэтанолламин проявлял ингибирующее действие на NO-синтазу в клетках глиомы С6 мозга крыс [23]. Как известно, при разных воспалительных состояниях, а также при септическом шоке ведущая роль в гиперпродукции NO принадлежит индуцибельной изоформе NOS. Однако, недавно было установлено [24], что развитие анафилактического шока может быть обусловлено избыточной продукцией оксида азота эндотелиальной NO-синтазой, а не “воспалительной” индуцибельной NOS. Это показано у мышей, дефицитных по ферменту iNOS, у которых проявление анафилактического шока устранялось ингибированием фосфатидилинозитол-3-киназы и протеинкиназы В, участвующих в посттрансляционной активации cNOS. Эти и другие исследования указывают на ведущую роль cNOS в развитии анафилактического шока, поскольку для экспрессии и активации iNOS, как правило, требуется более длительный период времени – от 1 ч и больше. С вышеизложенным хорошо согласуются наши

данные о том, что в сердце морских свинок при анафилаксии гиперпродукция NO обусловлена активацией cNOS (прирост содержания нитрит-аниона по сравнению с интактными животными составил $94,96 \pm 1,02$, а в случае iNOS – $7,71 \pm 0,57$ пмоль/мин/мг белка), а введение животным NSE в дозе 65 мг/кг предотвращало чрезмерную активацию cNOS, в результате чего содержание оксида азота сохранялось практически на уровне нормы (см. табл. 1). Это, в свою очередь, препятствовало развитию анафилактического шока и способствовало выживанию животных.

Чрезмерное количество оксида азота, образующееся при анафилактическом шоке, вовлекается в каскад свободнорадикальных реакций. Взаимодействие NO с супероксид анионом ведет к образованию чрезвычайно реакционноспособного соединения – пероксинитрита, оказывающего повреждающее действие на различные клеточные системы. Известно, что интенсификация свободнорадикального окисления липидов, происходящее при этом накопление конечных токсических продуктов оказывает повреждающее действие на органы-мишени при развитии анафилактического шока. Изучение биологических эффектов NAE убедительно показало, что эта группа биологически активных соединений способна снижать интенсивность липидной перекисидации, модулируя липидный состав клеточной мембраны клеток [25]. Нами показано (табл. 2), что в сердце морских свинок, получавших NSE в дозе 65 мг/кг до провокации анафилактического шока, содержание продуктов перекисного окисления липидов (ТБК-реагирующих продуктов) было на уровне нормы. Кроме того, мы наблюдали, что введение NSE в дозе 65 мг/кг на протяжении 14 дней до развития анафилаксии предотвращает снижение активности ферментов антиоксидантной защиты – каталазы, глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы, которое наблюдается у животных контрольной группы (табл. 2).

Таблица 2. Влияние NSE на некоторые параметры антиоксидантной системы сердца морских свинок при анафилактическом шоке.

| Параметр | Группы животных | | | |
|--|---------------------|--------------------------------------|--|--|
| | Интактные (n=11) | Контроль (+анафилаксия) (n=15) | NSE 0,65 мг/кг (+анафилаксия) (n=10) | NSE 65 мг/кг (+анафилаксия) (n=22) |
| Содержание ТБК-активных продуктов (нмоль/г ткани) | 48,14±2,71 | 62,58±3,42* | 54,66±6,71 | 43,02±3,34 [#] |
| Активность глутатион- пероксидазы (нмоль окисленного глутатиона/ мг белка) | 647,25±55,19 | 353,75±33,09* | 417,38±27,38* | 598,62±59,21 [#] |
| Активность каталазы (мкмоль мин ⁻¹ . мг белка ⁻¹) | 20,36±1,46 | 11,49±1,22* | 12,37±0,73* | 19,61±2,32 [#] |
| Активность СОД (ед мин ⁻¹ мг белка ⁻¹) | 342,11±41,33 | 149,18±21,82* | 196,29±32,41* | 279,7±54,08 [#] |

КАРДИОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ N-СТЕАРОИЛЭТАНОЛАМИНА

Накопление токсических продуктов ПОЛ можно расценивать как следствие недостаточной активности ключевых ферментов антиоксидантной защиты. Предварительное введение морским свинкам NSE позволило сохранить активность каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы на уровне, который наблюдался у интактных животных, что способствовало устранению дисбаланса между процессами ПОЛ и активностью антиоксидантных ферментов в сердце морских свинок при анафилаксии.

Ранее нами в опытах *in vitro* было продемонстрировано ингибирующее влияние NPE и NSE на неферментативное Fe²⁺-зависимое свободнорадикальное окисление липидов в митохондриях печени крыс с гипоксической гипоксией. Причем ингибирующее влияние NSE было более выражено по сравнению с NPE. Одним из возможных объяснений является то, что NSE обладает более длинной углеводородной цепью, что позволяет глубже проникать в мембрану, тем самым более существенно модифицируя ее структуру и свойства. Наши результаты хорошо согласуются с этими данными и позволяют предположить, что благоприятный эффект NSE на выживаемость морских свинок при анафилаксии в некоторой степени может быть обусловлен ингибирующим действием на процессы ПОЛ и этот антиоксидантный эффект является одним из проявлений мембранопротекторных свойств NSE. Однако мы не исключаем возможность связывания NSE с неоткрытыми еще рецепторами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, нами впервые показана способность N-стеароилэтанолamina подавлять системную реакцию анафилаксии у морских свинок и способствовать их выживанию. Это обусловлено способностью NSE препятствовать избыточной генерации медиаторов анафилаксии – гистамина и оксида азота, - а также устранять дисбаланс между накоплением продуктов перекисного окисления липидов и активностью антиоксидантных ферментов в сердце морских свинок при анафилактическом шоке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Klein T.W., Newton C., Larsen K., Lu L., Perkins I., Nong L., Friedman H. (2003) J. Leukoc. Biol., **74**, 486-496.
2. Vannacci A., Giannini L., Passani M.B., Di Felice A., Pierpaoli S., Zagli G., Fantappiu O., Mazzanti R., Masini E., Mannaioni P.F. (2004) J. Pharmacol. Exp. Ther., **311**, 256-264.
3. Yoshihara S., Morimoto H., Ohori M., Yamada Y, Abe T, Arisaka O. (2005) Int. Arch. Allergy. Immunol., **138**, 80-87.
4. Kishimoto S., Muramatsu M., Gokoh M., Oka S., Waku K., Sugiura T. (2005) J. Biochem. (Tokyo), **137**, 217-223.
5. Ihenetu K., Molleman A., Parsons M., Whelan C. (2003) Eur. J. Pharmacol., **464**, 207-215.
6. Isachenko E.G., Vitkina T.I., Berdyshev E.V. (2004) Eksp. Klin. Farmakol., **67**, 49-50.
7. Ziring D., Wei B., Velazquez P., Schrage M., Buckley N.E., Braun J. (2006) Immunogenetics, **58**, 714-725.
8. Bradshaw H.B., Walker J.M. (2005) Br. J. Pharmacol., **144**, 459-465.
9. Maccarrone M., Cartoni A., Parolaro D., Margonelli A., Massi P., Bari M., Battista N., Finazzi-Agrò A. (2002) Mol. Cell. Neurosci., **21**, 126-140.
10. Masek K., Perlik F., Klima J., Kahlich R. (1974) Eur. J. Clin. Pharmacol., **7**, 415-419.
11. Sarzani R. (2008) J. Neuroendocrinol., **20**, 58-62.
12. Прошина Л.Я. (1981) Лаб. дело, №2, 90-93.
13. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. (1982) Anal. Biochem., **126**(1), 131-138.

14. *Selter M., Knowles R.G., Monceda S.* (1991) FEBS Lett., **291**, 145-149.
15. *Владимиров Ю.А., Арчаков А.И.* (1972) Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, Наука, М.
16. *Gulaya N.M., Kuzmenko A.I., Margitich V.M., Govseeva N.M., Melnichuk S.D., Goridko T.M., Zhukov A.D.* (1998) Chem. Phys. of Lipids, **97**, 49-54.
17. *Чевари С., Андял Т., Штрэнгер Я.* (1991) Лаб. дело, №10, 9-13.
18. *Королюк М.А., Иванова И.Г., Майорова И.Г., Токарев В.Е.* (1988) Лаб. дело, №1, 16-18.
19. *Переслегина И.А.* (1989) Лаб. дело, №11, 20-23.
20. *Costa B., Conti S., Giagnoni G., Colleoni M.* (2002) Br. J. Pharmacol., **137**, 413-420.
21. *Molina-Holgado F., Molina-Holgado E., Guaza C., Rothwell N.J.* (2002) J. Neurosci. Res., **67**, 829-836.
22. *Stefano G., Esch T., Cadet P., Zhu W., Mantione K., Benson H.* (2003) Med. Sci. Monit., **9**(4), 83-95.
23. *Maccarrone M., Pauselli R., Di Rienzo M., Finazzi-Agro A.* (2002) Biochem. J., **366**, 137-144.
24. *Cauweis A., Janssen B., Buys E., Sips P., Brouckaert P.* (2006) J. Clin. Invest., **116**, 2244-2251.
25. *Артамонов М.В., Гула Н.М., Клімашевський В.М., Жуков О.Д., Маргітич В.М., Фролькіс В.В.* (2001). Укр. біохім. журн., **73**(1), 101-109.

Поступила: 24. 06. 2008.

CARDIOPROTECTIVE EFFECT OF N-STEAROYLETHANOLAMINE UNDER THE ANAPHYLACTIC SHOCK IN GUINEA PIGS

N.M. Hula, A.H. Berdyshev, A.A. Chumak, E.F. Meged', N.L. Kindruk, T.M. Goridko

Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Science of Ukraine, Leontovich str., 9, Kyiv, Ukraine, tel.: +38044 234 82 29, e-mail: ngula@biochem.kiev.ua

It was shown for the first time that endogenous cannabimimetic compound N-stearoylethanolamine (NSE) administered at the dose 65 mg/kg of body weight during two weeks before anaphylaxis had cardioprotective properties on the model of anaphylactic shock in the guinea pigs. NSE reliably normalized the content of histamine and nitric oxide, decreased the activity both inducible and constitutive NO-synthases, prevented accumulation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and normalized the activity of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase in cardiomyocytes of animals under anaphylaxis. About of 70% of the NSE-treated animals survived under the anaphylactic shock.

The present work indicates that NSE may influence the allergic reaction of immediate type and can possibly be used for design of a new type of antiallergic preparations and cardioprotective preparations as well.

Key words: N-stearoylethanolamine, anaphylaxis, histamine, nitric oxide, lipids peroxidation.