

УДК 577.35.352.26

ПАРАДОКСАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ N-ПАЛЬМИТОИЛЭТАНОЛАМИНА  
НА ТРАНСПОРТ КАТИОНОВ ЧЕРЕЗ  
БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

МЕЛЬНИК А. А., БАЛКОВ Д. И., ВОЛКОВ Г. Л., ГОВСЕЕВА И. Н., ГУЛАЯ Н. М.

Институт биохимии им. А. А. Палладина АН УССР, Киев

Исследование природных N-ацилэтанолламинов (NAE) началось в 50-е годы, когда они были обнаружены в ряде объектов растительного и животного происхождения. В частности, было показано наличие N-(2)-гидроксиэтилпальмитина в арахисовом масле [1], желтке яиц [2], лецитине сои [3]. Оказалось, что это соединение обладает высокой биологической активностью и способно влиять на интенсивность целого ряда воспалительных и иммунологических реакций, а также неспецифическую устойчивость к токсинам бактерий [4].

В последние годы, благодаря использованию высокочувствительных методов определения, NAE были обнаружены в различных тканях собак, крыс, морских свинок, рыб и др. [5—7]. Оказалось, что наибольшее их количество содержится в мозгу, наименьшее—в печени и лишь следовые количества—в мышцах исследованных животных [8]. Недавно NAE были обнаружены нами в клетках мышечной нейробластомы клона C1300 N18 [9]. Обнаружены и ферментативные системы биосинтеза и деградации NAE, максимальная активность которых выявляется в микросомах и митохондриях клеток мозга [10].

Длинноцепочечные NAE ингибируют увеличение проницаемости внутренней митохондриальной мембраны для  $Ca^{2+}$ , вызванное действием  $Ca^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ -освобождающих агентов [11]. Кроме того, ранее в нашей лаборатории было показано, что длинноцепочечные NAE способны уменьшать выход одновалентных катионов из клеток мышечной нейробластомы [12].

В экспериментах использовали дифференцированные клетки мышечной нейробластомы клона C1300 N18. Дифференцировку индуцировали добавлением в культуральную среду 5'-бромдезоксиуридина в конечной концентрации  $4 \cdot 10^{-5}$  моль/л.

Для определения входа одновалентных катионов в клетках нейробластомы под действием NAE, N-пальмитоилэтанолламина вносили во флаконы с клетками до конечной концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л и инкубировали в течение 30 мин при 37°. Среду сливали и во флаконы вносили по 5 мл среды ИГЛА, содержащей  $4 \cdot 10^6$  имп/мин  $^{86}Rb$  ( $14,6$  ГБк/г  $^{86}Rb^+$ ). Через фиксированные промежутки времени среду

сливали и флаконы трижды промывали 3 мл среды ИГЛА. Клетки лизировали 2 мл 10%-ного раствора NaOH и отбирали по 200 мкл аликвоты на счет. Уровень радиоактивности определяли на счетчике «Intertechnique SL-4000» (Франция). Белок определяли по методу Lowry и соавт. [13].

Липосомы получали из хроматографически чистого фосфатидилхолина из морских организмов и его смеси с N-пальмитонлэтаноламином (молярное соотношение 4:1) методом «обращенных фаз» [14] в буфере, содержащем 40 мМ трис-HCl, pH 7,4 и 100 мМ KCl. Внутренний объем полученных везикул определяли согласно Трикаш [15]. Полученное значение—10—12 мкл/мг липида—достаточно точно соответствовало цифрам, приводимым создателями метода.

При определении входа  $Ca^{2+}$  в липосомы, к суспензии везикул добавляли раствор  $^{45}Ca$  (8,3 ТБк/моль) до конечной активности  $15 \cdot 10^6$  имп/мин на 100 мкл суспензии. Конечная концентрация липосом в суспензии составляла 20 мг липида/мл. Препарат термостатировали при 37°. Через фиксированные промежутки времени отбирали аликвоту липосом (100 мкл) и отделяли от экстравезикулярного [ $^{45}Ca$ ] методом микроколоночной хроматографии на CM сефадексе G-25 [16]. В полученном препарате липосом измеряли уровень включившейся радиоактивной метки на сцинтилляционном счетчике «Trac DELTA 300» (США) в диоксановом сцинтилляторе ЖС-103.

Изучение механизма действия NAE было начато группой Schmid (США), которая установила, что NAE способны ингибировать  $Ca^{2+}$ -зависимую проницаемость внутренней митохондриальной мембраны. Оказалось, что инкубация митохондрий сердца собаки с длинноцепочечными NAE приводит к резкому уменьшению входа  $Ca^{2+}$ , если этот процесс индуцирован  $Ca^{2+}$  или  $Ca^{2+}$ -освобождающими агентами.

Кроме того, сотрудники нашей лаборатории обнаружили, что инкубация клеток нейробластомы клона C1300 N18 с NAE (14:0, 16:0, 18:0), предварительно обработанных активатором быстрых натриевых каналов—вератрином, приводит не только к полному устранению действия последнего на проницаемость клеточной мембраны, но и к ощутимому снижению «базальной» проницаемости мембраны для катионов.

При объяснении этих фактов и группой Schmid, и нами было высказано предположение, что NAE, кроме воздействия на ферментативные системы активного транспорта ионов, способны увеличивать плотность упаковки липидного бислоя клеточной (микросомной) мембраны, препятствуя таким образом току катионов. Принимая во внимание структурную формулу NAE, имеющих в своем составе насыщенные жирные кислоты, кажется логичным, что эти соединения должны способствовать упорядочению упаковки липидного бислоя биологических мембран.

Мы выражаем благодарность коллективу лаборатории сравнительной биохимии Института биологии моря ДВО АН СССР за любезно предоставленные N-ацилэтаноламины и высокоочищенный фосфатидилхолин.

Исходя из этого, мы рассчитывали, что вход  $\text{Ca}^{2+}$  в липосомы, содержащие NAE (16:0), будет меньше, чем в липосомы из чистого фосфатидилхолина. Однако из представленного на рис. 1 графика видно, что скорость включения  $^{45}\text{Ca}$  в липосомы с NAE (16:0) (кривая 2) была приблизительно в 1,5 раза выше по сравнению с контролем (кривая 1). Более того, исследования входа одновалентных катионов ( $\text{Rb}^+$ ) в клетки нейробластомы дали результаты почти аналогичные полученным на липосомах. Данные по входу меченых катионов в клетки мышинной нейробластомы представлены на рис. 2, из которого видно, что при использовании NAE (16:0) концентрации  $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л в среде инкубации наблюдается увеличение проницаемости мембраны клеток. Необходимо подчеркнуть, что в этом эксперименте при предварительной инкубации клеток нейробластомы с NAE в применяемой концентрации соотношение встроившегося в плазматическую мембрану NAE к фосфолипидам составляет 1:4, что приблизительно равно соотношению фосфатидилхолина и NAE в используемых нами липосомах.

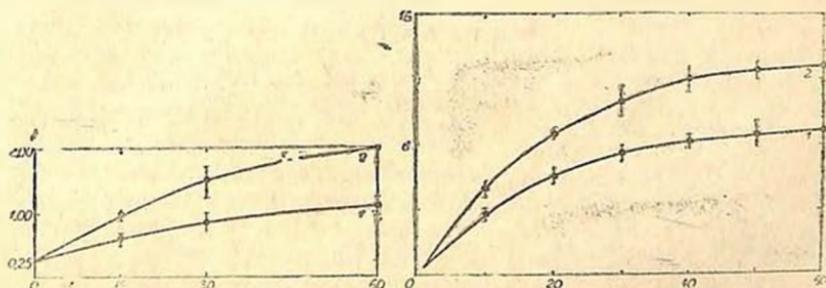


Рис. 1. Влияние N-пальмитоилэтанолamina (NAE 16:0) на вход  $^{45}\text{Ca}$  в фосфатидилхолиновые липосомы: 1—вход  $^{45}\text{Ca}$  в фосфатидилхолиновые липосомы, 2—вход  $^{45}\text{Ca}$  в фосфатидилхолиновые липосомы с NAE (16:0). По оси абсцисс—время в мин, по оси ординат—% накопления  $^{45}\text{Ca}$  в липосомах

Рис. 2. Влияние N-пальмитоилэтанолamina на вход рубидия-86 в клетки нейробластомы C1300N18: 1—базальный вход, 2—вход рубидия под действием NAE (16:0). По оси абсцисс—время в мин, по оси ординат—срт.  $10^3/\text{мг}$  белка

Таким образом, наши данные представляют о NAE как о липиде, способном при встраивании в плазматическую мембрану увеличивать плотность упаковки липидного бислоя, оказались несколько упрощенными. По-видимому, вход одновалентных катионов в клетки нейробластомы, также как и проницаемость липосом для  $\text{Ca}^{2+}$ , определяется непосредственным воздействием NAE на липидный бислой мембраны. Причина же увеличения проницаемости мембраны в этом случае пока не ясна. Выход катионов из клеток нейробластомы под действием NAE имеет, вероятно, более сложную систему регуляции, связанную с ферментативной системой, липид-белковыми взаимодействиями и другими факторами.

# THE EFFECT OF N-PALMITOYL ETHANOLAMINE ON TRANSPORT OF CATIONS THROUGH BIOLOGICAL MEMBRANES

MEL'NIK A. A., BALKOV D. I., VOLKOV G. L., GOVSEVA N. N.,  
GULAYA N. M.

Palladin Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR,  
Kiev

We studied the effect of N-palmitoyl ethanolamine (NEA 16:0) on the permeability of liposome membranes for  $^{45}\text{Ca}$  ions and the uptake of  $^{86}\text{Rb}$  ions by neuroblastoma cells. We found that NEA (16:1) increases the permeability of liposome and neuroblastoma cell membranes for mono- and divalent cations. This effect appears to be due to the direct action of NEA (16:0) on the membrane lipid bilayer. The efflux of these cations from neuroblastoma cells is regulated by a more complex system involving enzymatic mechanisms and lipid-protein interactions.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Long D. A., Miles A. A. *Lancet*, № 6603, p. 492-494, 1950.
2. Long D. A., Martin A. J. *Lancet*, № 6921, p. 464-466, 1956.
3. Ganley O. H., Graessle O. E., Robinson H. N. *J. Lab. and Clin. Med.*, v. 51, № 5, p. 709-714, 1958.
4. Ganley O. H., Robinson H. N. *Allergy*, v. 30, № 5, p. 415-419, 1959.
5. Epps D. E., Schmid P. C., Natarajan V., Schmid H. H. O. *BBRC*, v. 90, № 2, p. 628-638, 1979.
6. Epps D. E., Grupp J. L., Grupp G., Scharz A. *IRCS-Bioch.*, v. 11, № 10, p. 899-900, 1983.
7. Natarajan V., Schmid P. C., Reddy P. V. *Biochim et biophys. acta*, v. 835, № 3, p. 426-433, 1985.
8. Bachur N. R., Masek K., Melmon K. L., Udenfiend S. *J. Biol. Chem.*, v. 240, № 3, p. 1019-1024, 1965.
9. Гулая Н. М., Васюковский В. Е. и др. *Укр. биохим. журн.*, т. 60, № 5, с. 58-63, 1988.
10. Natarajan V., Schmid H., Reddy P. J. *Neurochem.*, v. 6, p. 1613-1619, 1984.
11. Epps D. E., Palmer J. W., Schmid H. H. O., Pfeiffer D. R. *J. Biol. Chem.*, v. 257, № 3, p. 1383-1391, 1982.
12. Мельник А. А., Говсева Н. Н., Волков Г. Л., Гулая Н. М. *Докл. АН УССР*, № 5, с. 69-72, 1989.
13. Lowry O. H., Rosebrough M. J., Farr A., Randal R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
14. Szoka E., Papahadjopoulos O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 79, № 9, p. 4194-4198, 1978.
15. Трикаш И. О. «Изучение взаимодействия  $\alpha$ -латротоксина с липосомами», канд. дис., Киев, 1987.
16. Лось Г. В., Стефанов А. В., Лишко В. К. *Укр. биохим. журн.*, т. 57, № 4, с. 3-10, 1985.

Поступила 26. III. 1990