

В. П. Федотов, Н. В. Садовникова, В. И. Гудошников, И. Н. Баранова, Л. Л. Васильева, К. К. Пивницкий

## БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЕПОКСИЛИНОВ

Лаборатории биологических исследований гормональных соединений (зав. — проф. В. П. Федотов) и химии стероидов и простагландинов (зав. — проф. К. К. Пивницкий) Института экспериментальной эндокринологии (дир. — акад. РАМН И. Г. Акмаев) Эндокринологического научного центра (дир. — акад. РАМН И. И. Дедов) РАМН. Москва

Гепоксислины являются продуктами метаболических превращений арахидоновой кислоты, которая чрезвычайно широко представлена в организме, и других, менее распространенных, полностью цис-полиненасыщенных жирных кислот с 20 углеродными атомами. Они входят в состав клеточных мембран и являются предшественниками целого семейства соединений, названного "эйкозаноиды", которые служат метаболическими регуляторами и медиаторами различных клеточных функций. Одним из типов эйкозаноидов являются гепоксислины.

Большая часть окислительного метаболизма арахидоновой кислоты в эйкозаноиды осуществляется циклооксигеназными и липоксигеназными ферментными системами. Циклооксигеназа катализирует превращение арахидоновой кислоты в простагландины, простациклины и тромбоксаны. Под влиянием липоксигеназ (ЛО) идет превращение арахидоновой кислоты в гидропероксиэйкозатетраеновые кислоты (НРЕТЕ) — короткоживущие метаболиты, которые затем катаболизируют в различные типы более стабильных эйкозаноидов (лейкотриены, липоксины и гепоксислины). Гепоксислины образуются под влиянием 12-ЛО, которая метаболизирует арахидоновую кислоту в 12-НРЕТЕ, а затем в гидроксиэпоксидные метаболиты, получившие название гепоксислинов  $A_3$  и  $B_3$  (рис. 1). Их структурные различия состоят в расположении гидроксильной группы соответственно при 8-м или 10-м атоме углерода и наличии 9, 10-транс-двойной связи в случае гепоксислина  $A_3$  и 8,9-цис-двойной связи в случае гепоксислина

$B_3$ . Каждый тип гепоксислинов представлен парой эимеров, различающихся конфигурацией гидроксильной группы.

Идентификация гепоксислинов как эндогенных биорегуляторов осуществлена в 1982 г. канадским ученым С. Раче-Асциак [14], который до сих пор остается ведущим биохимиком в исследовании гепоксислинов [7].

В 1983 г. американский химик, нобелевский лауреат Е. Согеу провел первый полный химический синтез гепоксислинов [6]. В России гепоксислины были синтезированы в Эндокринологическом научном центре РАМН. Здесь разработаны и осуществлены оригинальные методы синтеза гепоксислинов и их метаболитов — триоксислинов [2, 18, 23].

С 1988 г. начались усиленные исследования биологических свойств гепоксислинов. Показано, что они наряду с другими эйкозаноидами образуются во всех органах и тканях, где присутствуют ферменты 12-липоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты, а именно: в тромбоцитах, легочной и мозговой ткани, нейтрофилах, аорте, эпифизе и островках Лангерганса поджелудочной железы [16]. В ряду перечисленных тканей островки Лангерганса занимают особое положение — здесь гепоксислины являются основными метаболитами арахидоновой кислоты.

При изучении биологического влияния гепоксислинов на функцию островков Лангерганса показано, что гепоксислины стимулируют секрецию инсулина, усиливая действие глюкозы [11, 15]. Высокое содержание гепоксислинов в островках

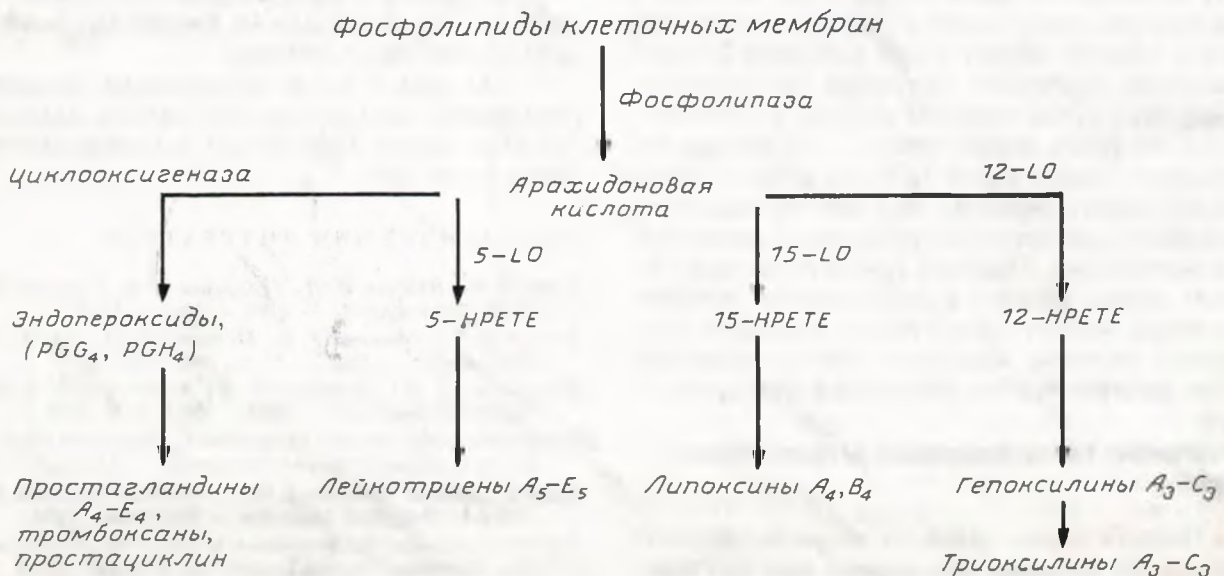


Рис. 1. Метаболизм арахидоновой кислоты

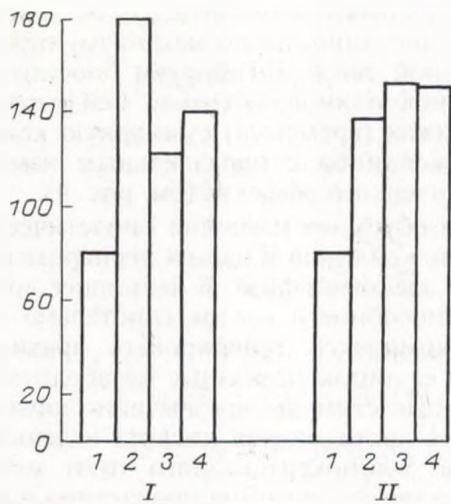


Рис. 2. Влияние 10-эпимеров гепоксалина В<sub>3</sub> на секрецию инсулина культурой островковых клеток (длительность инкубации 30 мин).

По оси ординат — концентрация инсулина в среде (в мкЕД/мл). Здесь и на рис. 3 и 5 I — гепоксалин 10R-В<sub>3</sub>, II — гепоксалин 10S-В<sub>3</sub>. Концентрация гепоксалинов в среде: 1 — 0; 2 — 0,2 мкМ; 3 — 1 мкМ; 4 — 5 мкМ.

Лангерганса и их участие в регуляции секреции инсулина нашло отражение в названии этих соединений. Оно является аббревиатурой фразы "Hydroxy Epoxide Insulin Release". Первая половина этой фразы характеризует химическую структуру соединения, вторая — его функцию. Дальнейшее изучение биологических свойств гепоксалинов позволило выявить, помимо регуляции секреции инсулина, широкий спектр других биологических эффектов этих соединений и показать их участие в регуляции важнейших клеточных функций, таких как контроль проницаемости сосудистой стенки, обмен электролитов, передача нервного импульса и других реакций [17], активность калиевых каналов [10], освобождение ионов кальция из внутриклеточных депо [8], обмен диацилглицеридов [13] и цАМФ [20].

Мы исследовали прямое влияние гепоксалинов на изолированные клетки, используя для этого первичные культуры островковых клеток поджелудочной железы, культуры клеток аденогипофиза и гепатоцитов крысы. Содержание инсулина, пролактина и альбумина в инкубационной среде определяли радиоиммунологическим методом на основе разработанных в нашей лаборатории гомологичных систем для определения уровня пролактина и альбумина у крыс [1, 3].

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения биологических эффектов 10R- и 10S-эпимеров гепоксалина В<sub>3</sub>. На рис. 2. показано влияние гепоксалинов на секрецию инсулина в культивируемых островках Лангерганса. Оба эпимера гепоксалина В<sub>3</sub> примерно в равной степени стимулируют секрецию инсулина. В случае 10R-эпимера наибольший биологический эффект отмечался при использовании дозы 0,2 мкМ, а в случае 10S-эпимера все 3 используемые концентрации препарата давали примерно равный стимулирующий эффект (см. рис. 2).

Поскольку среда, в которой культивировались клетки, содержит глюкозу в концентрации 5,5 мМ, результаты этого эксперимента не позволяют ответить на вопрос, присуще ли инсулино-

тропное действие самому гепоксалину или оно опосредуется глюкозой, усиливая ее эффект. Чтобы ответить на этот вопрос, мы исследовали действие гепоксалинов на секрецию инсулина при различных концентрациях глюкозы в среде (от 5,5 до 20 мМ), в также в среде, не содержащей глюкозы (рис. 3). Видно, что инсулинстимулирующее действие гепоксалинов было максимальным при концентрации глюкозы 5,5 мМ. С увеличением концентрации глюкозы в среде до 11 мМ стимуляция секреции инсулина гепоксалинами ослабевает и даже исчезает, если содержание глюкозы в среде возрастает до 20 мМ.

Наиболее интересным представляется фрагмент этого эксперимента, где инкубацию островковых клеток с гепоксалинами проводили в растворе, не содержащем глюкозы. При этом на фоне ослабленной секреции инсулина в контроле отмечено выраженное инсулинстимулирующее действие гепоксалинов, особенно заметное у 10S-эпимера. Секреция инсулина в этом случае на 79—93 % превышала секрецию в контроле.

Из представленных результатов следует вывод, что гепоксалины обладают свойством самостоятельно стимулировать секрецию инсулина, поскольку их эффект может проявляться и в отсутствие глюкозы. В то же время гепоксалины нельзя считать полностью независимыми от глюкозы стимуляторами секреции инсулина, поскольку известно, что глюкоза увеличивает в островках Лангерганса синтез эндогенных гепоксалинов [11, 12]. Исходя из этого, мы можем предположить 2 механизма участия гепоксалинов в регуляции секреции инсулина: 1) гепоксалины опосредуют инсулинотропное действие глюкозы, являясь его ме-

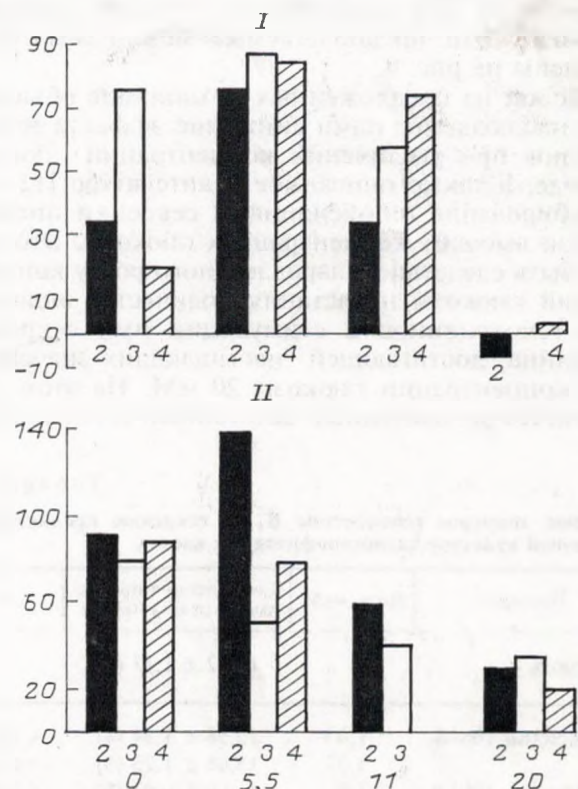


Рис. 3. Влияние гепоксалина В<sub>3</sub> на секрецию инсулина в присутствии и в отсутствие глюкозы в культуральной среде.

По оси ординат — прирост концентрации инсулина (в % к контролю); по оси абсцисс — концентрация глюкозы в среде (в мМ).

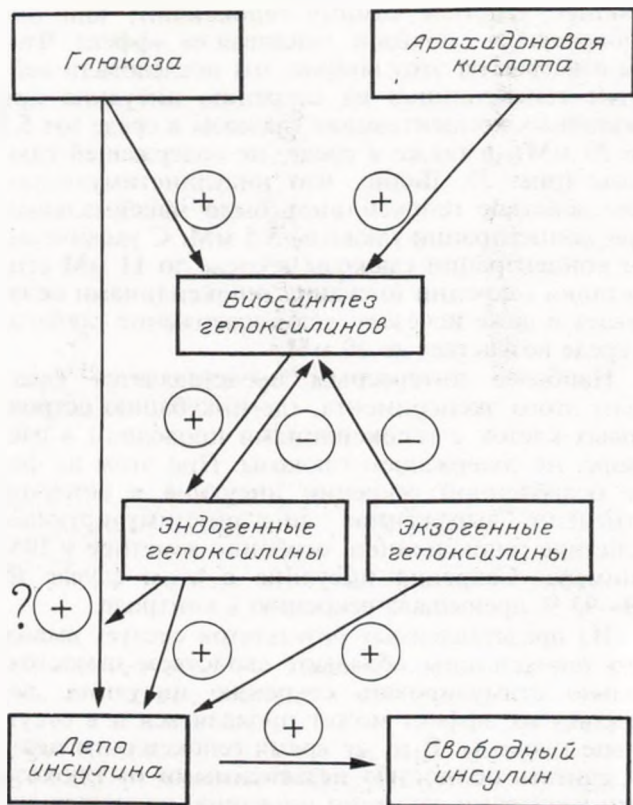


Рис. 4. Гипотеза механизма участия гепоксидинов в регуляции секреции инсулина. + — стимулирующий (потенцирующий), — — ингибирующий эффект.

диаторами; 2) гепоксидины параллельно с глюкозой стимулируют секрецию инсулина, возможно, потенцируя при этом инсулиотропное действие глюкозы. Эти предполагаемые механизмы представлены на рис. 4.

Любой из предложенных механизмов объясняет и наблюдаемое нами снижение эффекта гепоксидинов при увеличении концентрации глюкозы в среде, а также описанное в литературе [12, 22] ингибирование гепоксидинами секреции инсулина при высоких концентрациях глюкозы. Это может быть следствием параллельного роста концентраций глюкозы нарастания количества эндогенных гепоксидинов и стимуляции ими секреции инсулина, достигающей "насыщающих значений" при концентрации глюкозы 20 мМ. На этом фоне системно введенные экзогенные гепоксидины

Таблица 1

Влияние эпимеров гепоксидина В<sub>3</sub> на секрецию пролактина в первичной культуре аденогипофизарных клеток

Препарат	Доза, мкМ	Концентрация пролактина в среде, мкг/мл	p
Контроль		17,82 ± 1,13 (15)	
Гепоксидин 10S-В <sub>3</sub>	1,0	12,56 ± 1,34 (8)	< 0,01
	5,0	15,68 ± 1,25 (8)	> 0,05
Гепоксидин 10R-В <sub>3</sub>	1,0	11,68 ± 0,93 (8)	< 0,001
	5,0	13,46 ± 1,46 (8)	< 0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3 в скобках — число культур. p дано в сравнении с контролем.

Таблица 2

Влияние эпимеров гепоксидина В<sub>3</sub> (1 мкМ) на продукцию альбумина в культуре гепатоцитов крысы (4 ч культивирования)

Препарат	Концентрация альбумина в среде, нг/мл		
	опыт 1	опыт 2	опыт 3
Контроль	419,0 ± 37,0 (5)	344,0 ± 8,6 (5)	607,0 ± 39,7 (4)
Гепоксидин 10S-В <sub>3</sub>	595,0 ± 70,0* (5)	475,0 ± 47,3* (5)	—
Гепоксидин 10R-В <sub>3</sub>	569,0 ± 38,0* (4)	—	825,0 ± 60,7* (5)

Примечание. \* — достоверность различий с контролем (p < 0,05).

уже не оказывают дополнительного действия на секрецию инсулина, но по механизму отрицательной обратной связи ингибируют биосинтез эндогенных гепоксидинов, сохраняя неизменным или даже понижая (временно) суммарную концентрацию гепоксидинов с параллельным изменением их биологического эффекта (см. рис. 4).

Другим объектом изучения биологических эффектов гепоксидинов в наших экспериментах были клетки аденогипофиза. В настоящее время сведения о способности клеток гипоталамо-гипофизарного комплекса генерировать арахидоновую кислоту и ее липоксигеназные метаболиты в ответ на различные стимулы чрезвычайно скудны. Показано, что арахидоновая кислота и лейкотриены (продукты 5-липоксигеназного пути метаболизма) стимулируют секрецию пролактина в культуре GН<sub>3</sub> клеточной линии аденогипофизарных клеток [9]. Однако в литературе отсутствуют какие-либо данные о влиянии на секрецию пролактина продуктов 12-липоксигеназного метаболизма арахидоновой кислоты. В наших экспериментах (табл. 1) оба эпимера гепоксидина В<sub>3</sub> дали четкий биологический эффект, достоверно ингибируя секрецию пролактина. Результат несколько неожиданный и в настоящее время труднообъяснимый, однако демонстрирующий участие гепоксидинов в регуляции функциональной активности пролактинсекретирующих клеток аденогипофиза.

Для изучения влияния гепоксидинов на функцию гормончувствительных клеток периферических органов были выбраны гепатоциты. По данным литературы, 12-LO присутствует в печени [5], а это предполагает наличие в гепатоцитах эндогенных гепоксидинов. С другой стороны, гепатоциты, не являясь элементами эндокринной системы, осуществляют секреторные функции, поставляя в кровоток сывороточный альбумин.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что добавление эпимеров гепоксидина В<sub>3</sub> в среду инкубации гепатоцитов сопровождается изменением их функциональной активности, в результате чего в среде возрастает накопление альбумина (рис. 5, табл. 2).

Рассмотренные выше биологические эффекты в отношении секреции инсулина, пролактина и альбумина позволяют сделать заключение о том, что гепоксидины контролируют секреторные про-

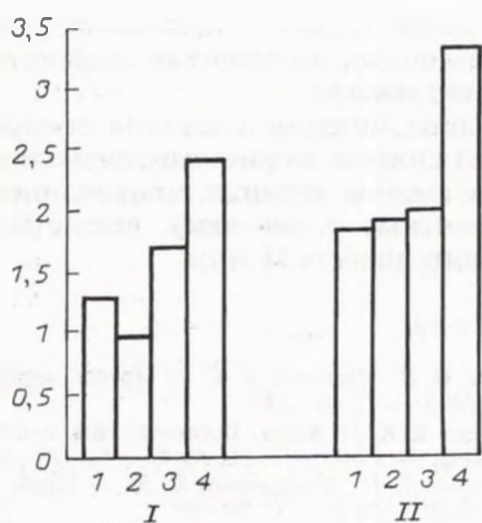


Рис. 5. Влияние эпимеров гепоксалина В<sub>3</sub> на продукцию альбумина культурой гепатоцитов (20 ч культивирования).

По оси ординат — концентрация альбумина в среде (в нг/мл · 10<sup>3</sup>).

цессы в клетках различной тканевой и органной принадлежности.

В последующих экспериментах мы попытались установить способность гепоксалинов оказывать действие на секрецию инсулина у крыс *in vivo*. Для этого животным в подключичную вену вводили гепоксалин 10R-B<sub>3</sub> из расчета 50 мкг на 1 кг массы тела. Учитывая скоротечность метаболических превращений гепоксалинов в организме, кровь собирали через 2 и 5 мин после введения препарата (табл. 3). Как свидетельствуют полученные результаты, после введения гепоксалина секреция инсулина у крыс достоверно возросла. Инсулинстимулирующее действие экзогенного гепоксалина было непродолжительным: уже через 5 мин стимуляция секреции инсулина не достигала статистической значимости.

Дальнейшее изучение биологических свойств гепоксалинов *in vivo* проводили на крысах с диабетом II типа. Повреждение поджелудочной железы достигалось внутрибрюшинным введением стрептозотоцина (60 мг/кг) крысам 5-дневного возраста. Через 6—8 нед у животных развивается

Таблица 3

Изменение содержания инсулина в крови у крыс под влиянием внутривенного введения экзогенного гепоксалина 10R-B<sub>3</sub> (50 мкг/кг)

Препарат	Время, мин	Концентрация инсулина в крови, мкЕД/мл	p
Контроль	2	6.1 ± 0.5 (4)	
Гепоксалин 10R-B <sub>3</sub>	2	10.5 ± 0.8 (4)	< 0.001
Гепоксалин 10R -B <sub>3</sub>	5	8.3 ± 1.4 (4)	> 0.05

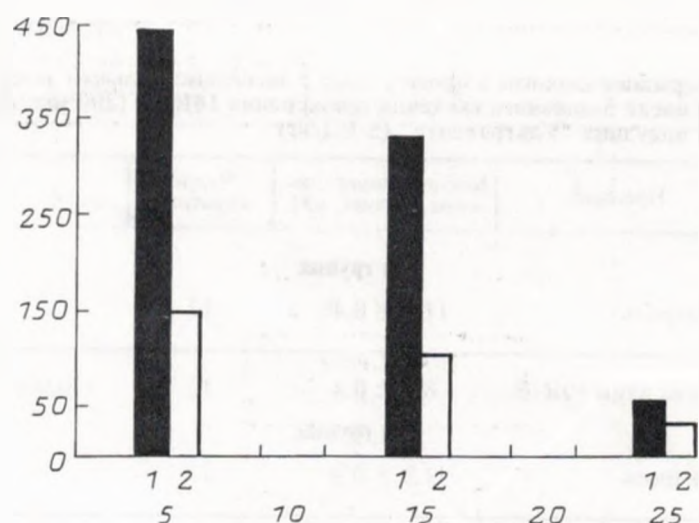


Рис. 6. Секреция инсулина в ответ на глюкозную нагрузку у интактных крыс и крыс с диабетом II типа после 5-дневного введения гепоксалина 10R-B<sub>3</sub> (200 мкг на 1 кг массы тела).

По оси ординат — прирост содержания инсулина в крови (в % от исходного уровня); по оси абсцисс — дни после начала введения гепоксалина. 1 — интактные крысы, 2 — крысы с диабетом II типа.

симптомокомплекс, близкий к клиническим проявлениям инсулиннезависимого сахарного диабета [19].

По нашим данным, у этих животных после введения стрептозотоцина отмечается стойкая гипергликемия, которая держится на протяжении 4 мес наблюдения. Уровень инсулина в крови животных нормальный или даже выше, чем в контроле, однако при этом резко снижается чувствительность инсулярного аппарата к действию глюкозы. Это выявляется при проведении внутривенной глюкозной нагрузки (500 мг/кг), когда становится видно, что β-клетки диабетических крыс практически не реагируют на глюкозу выбросом инсулина в кровь (табл. 4).

На крысах с развившимся диабетом II типа мы проследили особенности действия вводимого в течение 5 дней гепоксалина на уровень гликемии и функцию поджелудочной железы. Условия депонирования экзогенных гепоксалинов достигались подкожным введением гепоксалина 10R-B<sub>3</sub> 2 раза в день в течение 5 дней из расчета 200 мкг на 1 кг массы тела. Изменение показателей гликемии у крыс в этом эксперименте отражено в табл. 5. Здесь же в сравнительном плане представлена группа животных, которым в тех же условиях вводили инсулин "Ультраленте". Как видно из табл. 5, длительное введение гепоксалина оказывает положительное влияние на уровень гликемии у крыс с диабетом, приводя к достоверному уменьшению содержания глюкозы в крови.

Заслуживает внимания также тот факт, что после описанного выше длительного подкожного введения гепоксалина островковые клетки, не

Таблица 4

Секреция инсулина в ответ на внутривенную глюкозную нагрузку (500 мг/кг) у интактных крыс с диабетом II типа

Группа животных	Концентрация глюкозы в крови, мМ	Концентрация инсулина после введения глюкозы, мкЕД/мл			
		0 мин	5 мин	15 мин	25 мин
Интактные крысы	5,4 ± 0,4	10,0 ± 0,8	55,8 ± 4,8	43,2 ± 6,2	15,0 ± 1,8
Крысы с диабетом II типа	11,9 ± 1,0	24,3 ± 3,8	23,5 ± 1,8	18,3 ± 2,9	—

Таблица 5

Содержание глюкозы в крови у крыс с экспериментальным диабетом после 5-дневного введения гепоксисилина 10R-B<sub>3</sub> (200 мкг/кг) или инсулина "Ультраленте" (5 ЕД/кг)

Препарат	Концентрация глюкозы в крови, мМ	Число животных	p
<b>1-я группа</b>			
Контроль	11,3 ± 0,48	12	
<b>2-я группа</b>			
Гепоксисилин 10R-B <sub>3</sub>	8,8 ± 0,4	12	< 0,001
Контроль	11,9 ± 0,9	13	
Инсулин	5,8 ± 0,6	12	< 0,001

способные ранее реагировать на глюкозу, частично восстанавливают эту функцию и отвечают выбросом инсулина в кровь (рис. 6). Частичное восстановление чувствительности инсулярного аппарата к глюкозе может быть одним из возможных механизмов наблюдаемого гипогликемического действия гепоксисилинов. Последнее может быть связано также с изменением глюкозотолерантности периферических тканей, обычно сниженной при диабете II типа. Такой эффект вполне вероятно, учитывая широкий диапазон мембранных и внутриклеточных эффектов гепоксисилинов, однако это предположение требует экспериментального подтверждения. Несомненным остается тот факт, что гепоксисилины вовлекаются в регуляцию секреции инсулина при экспериментальной модели сахарного диабета II типа. Отсюда следует, что любой дефект, обусловленный нарушением синтеза гепоксисилинов, их метаболизма или гормонрецепторного взаимодействия в островках Лангерганса, может быть одним из патогенетических звеньев развития этого заболевания.

На сегодняшний день большинством исследователей принята концепция, в соответствии с которой метаболиты арахидоновой кислоты—гепоксисилины — рассматриваются как вторичные посредники в передаче гормонального импульса или как факторы, взаимодействующие с ним [4, 13]. Поскольку гепоксисилины образуются внутриклеточно, а также способны проникать через клеточную мембрану, они, вероятно, опосредуют эффекты многих регуляторных факторов.

Реализация инсулинстимулирующего действия гепоксисилинов может обеспечиваться как вне-, так и внутриклеточными механизмами. Наличие рецепторов к гепоксисилинам установлено в нейтрофилах человека [21]. На основе этого можно предположить существование рецепторов к гепоксисилинам и в островковых клетках. Это позволяет рассматривать гепоксисилины как универсальные регуляторы, которые используют единый механизм передачи внеклеточного сигнала для многих типов клеток.

В заключение хотелось бы выделить наиболее перспективные направления дальнейшей работы.

1. Изучение уровней эндогенных гепоксисилинов при различных нарушениях секреции инсулина и обмена глюкозы.

2. Создание методов и агентов стимуляции (и ингибции) синтеза эндогенных гепоксисилинов.

3. Исследование влияния гепоксисилинов на ткани, резистентные к инсулину, вследствие развития сахарного диабета II типа.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамова В. В., Федотов В. П. // Пробл. эндокринологии. — 1982. — № 2. — С. 68—73.
2. Пивницкий К. К. // Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. — 1991. — Т. 36. № 4. — С. 418—422.
3. Плужникова Г. Н., Кондратьев Я. Ю. // Пробл. эндокринологии. — 1985. — № 2. — С. 58—63.
4. Bevan S., Wood J. N. // Nature. — 1987. — Vol. 328. — P. 20.
5. Capdevila J., Parkhill L., Chacos N. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1981. — Vol. 101. — P. 1357—1363.
6. Corey E. J., Kang J., Laguzza B. C. et al. // Tetrahedron. — 1983. — Vol. 24. — P. 4913—4916.
7. Demin P. M., Reynaud D., Pace-Asciak C. R. // J. Lipid Mediators Cell Signalling — 1996. — Vol. 13. — P. 63—72.
8. Dho S., Grinstein S., Corey E. J. et al. // Biochem. J. — 1990. — Vol. 266. — P. 63—68.
9. Keisel L., Przylipek A., Rabe T. et al. // Hum. Reprod. — 1987. — Vol. 2. — P. 281.
10. Margalit A., Sofer J., Grossman S. et al. // Proc. natl. Acad. Sci. USA. — 1993. — Vol. 90. — P. 2589—2592.
11. Metz S. // Ibid. — 1985. — Vol. 82. — P. 198—202.
12. Nathan M. N., Pek S. B. // Prostagland. Leukotr., Essent. Fatty Acids. — 1990. — Vol. 40. — P. 21—25.
13. Nigam S., Nades S., Cichon G. et al. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1990. — Vol. 171. — P. 944—948.
14. Pace-Asciak C. R., Granstrom E., Samuelsson B. // J. Biol. Chem. — 1983. — Vol. 258. — P. 6835—6840.
15. Pace-Asciak C. R., Martin J. M. // Prostagland. Leukotr. Med. — 1984. — Vol. 16. — P. 173—180.
16. Pace-Asciak C. R., Asotra S. // Free Radical Biol. Med. — 1989. — Vol. 7. — P. 409—433.
17. Pace-Asciak C. R. // Biochim. biophys. Acta. — 1994. — Vol. 1215. — P. 1—8.
18. Pivnitsky K. K., Vasiljeva L. L., Melnikova V. I. // American Chemical Society. National Meeting, 207-th: Book of Abstracts. — San Diego, 1994. — N 84.
19. Portha B., Blondel O., Serdadas P. et al. // Diabet. Metab. (Paris). — 1989. — Vol. 15. — P. 61—75.
20. Reynaud D., Delton I., Gharib A. et al. // J. Neurochem. — 1994. — Vol. 62. — P. 126—133.
21. Reunaud D., Demin P., Pace-Asciak C. R. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1995. — Vol. 207. — P. 191—194.
22. Turk J., Colca J. R., McDaniel M. L. // Biochim. biophys. Acta. — 1985. — Vol. 834. — P. 23—36.
23. Vasiljeva L. L., Manukina T. A., Demin P. M. et al. // Tetrahedron. — 1993. — Vol. 49. — P. 4099—4106.

Поступила 05.12.96

V. P. Fedotov, N. V. Sadovnikova, V. I. Gudoshnikov, I. N. Baranova, L. L. Vasilyeva, K. K. Pivnitsky — BIOLOGICAL PROPERTIES OF HEPOXYLINES

**Summary.** Hepoxylines, arachidonic acid metabolites, are present in many tissues of the body and regulate various cell functions. We investigated the biological effects of hepoxylines B<sub>3</sub> (10R and 10S epimers) on the secretory processes using primary cultures of rat pancreatic islet cells, adenohypophyseal cells, and hepatocytes. Hepoxylines added to culture medium boosted the secretion of insulin and serum albumin and inhibited prolactin secretion. Hepoxylines effect on insulin secretion did not depend on the presence of glucose in the medium. Experiments on a model of type II diabetes showed that exogenous hepoxylines partially repair the islet cell sensitivity to glucose. Impaired synthesis of hepoxylines and their metabolism or receptor interactions with pancreatic β-cells may be one pathogenetic factor in the development of non-insulin-dependent diabetes mellitus. In order to verify this hypothesis, methods and agents boosting and inhibiting the production of endogenous hepoxylines are needed and the effects of hepoxylines on tissues resistant to insulin because of type II diabetes are to be studied.