

Л.М. Калинська,  
О.І. Ковзун,  
Н.І. Левчук

# Зміни активності ангіотензинперетворюючого ферменту в структурах гіпоталамо-гіпофізарно- адренортикальної системи та функції кори надниркових залоз щурів під дією метанандаміду

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

**Резюме. Мета роботи** — дослідити вплив метанандаміду — метаболічно стійкого похідного ендоканабіноїду N-арахідоноїлетаноламіну на активність ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) у центрах регуляції гіпоталамо-гіпофізарно-адренортикальної системи (ГГАС), а також на рівень кортикостероїдів у плазмі крові щурів. **Матеріал і методи.** Активність АПФ у гіпоталамусі, аденогіпофізі, надниркових залозах і плазмі крові щурів визначали за допомогою флуориметричного методу, використовуючи як субстрат Benzoyl-Gly-His-Leu (Sigma, США). Вміст 11-гідроксикортикостероїдів (11-ОКС) у плазмі крові щурів встановлювали із застосуванням флуориметричного мікрометоду. **Результати.** Через 1 годину після одноразового введення інтактним щурам метанандаміду в дозах 0,2 мг/кг і 0,02 мг/кг активність АПФ у центральних ланках ГГАС — гіпоталамусі та аденогіпофізі підвищувалася, активність АПФ у надниркових залозах та активність циркулюючого в крові ферменту знижувалися. Після одноразового введення інтактним щурам метанандаміду в дозі 0,2 мг/кг виявлено підвищення рівня 11-ОКС у плазмі крові щурів, введення метанандаміду в низькій дозі — 0,02 мг/кг не призводило до вірогідних змін рівня кортикостероїдів

\* Адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна. E-mail: Dr.Simonov84@gmail.com

© Л.М. Калинська, О.І. Ковзун, Н.І. Левчук

у крові тварин. **Висновки.** Екзогенні канабіноїди модулюють активність ангіотензинової системи в різних ланках ГГАС, стимулюючи активність АПФ у гіпоталамусі й аденогіпофізі та знижуючи активність ферменту в надниркових залозах і плазмі крові через 1 годину після одноразового введення метанандаміду інтактним щурам. Через кортикотропін-релізінг активність ангіотензину гіпоталамуса та аденогіпофіза підвищення активності АПФ у цих структурах може бути одним із важливих чинників активації ГГАС, зокрема синтезу кортикостероїдів, спричиненого одноразовим введенням метанандаміду у високих дозах.

**Ключові слова:** ангіотензинперетворюючий фермент, гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальна система, метанандамід, кортикостероїди.

Взаємодія основних агоністів, що регулюють стероїдогенез — АКТГ й ангіотензину II із численними модуляторами функції надниркових залоз, є однією з найважливіших проблем ендокринної регуляції. У переліку модуляторів адренкортикальної функції важливе місце посідають ендогенні канабіноїди, вплив яких на функцію кори надниркових залоз може бути як безпосереднім, так і опосередкованим гормонами гіпоталамо-гіпофізарної системи (ГГС) [1-5]. Ендогенні канабіноїди модулюють гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальну систему (ГГАС) і залучаються в центральні механізми секреції АКТГ і кортикотропін-релізінг гормону (КРГ), діючи на нейромедіаторні та нейропептидні системи головного мозку. На мишах із нокаутом СВ1-канабіноїдних рецепторів продемонстровано необхідність ендоканабіноїдів для функціонування ГГАС [6-8].

Показано, що в мультифакторній регуляції функції ГГАС ангіотензину II взаємодіє з різними сигнальними сполуками, зокрема АКТГ, іонами  $K^+$ , пролактином, статевими гормонами, мелатоніном, лейцин-енкефаліном, іонами  $Li^+$ , а також N-ацилетаноламіном. Значна частина цих взаємодій реалізується на рівні ферменту синтезу ангіотензину II — ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) [9-14]. Питання залучення АПФ до складної мережі міжгормональних взаємодій є важливим аспектом вивчення функції ферменту в ГГАС. Це пов'язано з дослідженнями інгібіторів АПФ, які здатні нормалізувати як системну, так і локальні РАС для запобігання патологічним процесам, які запускаються за участю АПФ й ангіотензину II.

**Мета роботи** — дослідити вплив метанандаміду — метаболічно стійкого похідного ендоканабіноїду арахідоноїлетаноламіну на активність ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ) у центрах регуляції ГГАС (гіпоталамусі, аденогіпофізі, надниркових залозах), а також на рівень кортикостероїдів у плазмі крові щурів.

**Матеріал і методи**

Досліди проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар із масою тіла 210-320 г. Під час проведення досліджень на тваринах дотримували принципів біоетики, законодавчих норм і вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних і наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальноетичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим Національним конгресом із біоетики (Київ, 2001). На проведення досліджень одержано дозвіл від комісії Інституту з питань біоетики. Експериментальним тваринам внутрішньочеревно вводили розчин R(+)-метанандаміду (синтетичний аналог ендогенного канабіноїду анандаміду, Sigma, США) у дозах 0,2 мг/кг і 0,02 мг/кг маси щурів. До першої контрольної групи увійшли інтактні щури; до другої контрольної групи — тварини, яким вводили розчинник метанандаміду (суміш пропіленгліколю, етилового спирту та фізіологічного розчину в співвідношенні 1:1:2).

Тварин декапітували під ефірним наркозом через 1 годину після введення метанандаміду. Після декапітації у тварин швидко вилучали гіпоталамус, аденогіпофіз і надниркові залози, які очищали на льоду від жирової та сполучної тканини.

Активність АПФ у гомогенатах гіпоталамуса, аденогіпофіза та надниркових залоз ви-

## Оригінальні дослідження

значали за допомогою флуориметричного методу, використовуючи як субстрат N-Benzoyl-Gly-His-Leu (Sigma, США) [15]. Активність ферменту виражали в нмоль His-Leu, який відщепився за 1 хв. інкубації, у розрахунку на 1 мг білка. Активність АПФ у плазмі крові визначали за методом Павліхіної Л.В. [16]. Концентрацію 11-гидроксикортикостероїдів (11-ОКС) у плазмі крові щурів визначали із застосуванням флуориметричного методу De Mooge в модифікації Ю.Г. Балашова [17]. Вміст білка визначали за Лоурі [18]. Результати досліджень опрацьовували статистично, використовуючи t-критерій Стьюдента.

## Результати та обговорення

Показано, що через 1 годину після введення розчинника метанандаміду щурам контрольної групи активність АПФ підвищувалась у гіпоталамусі, що, очевидно, пов'язано з дією гострого ін'єкційного стресу. Активність ферменту в аденогіпофізі, надниркових залозах і плазмі крові не змінювалася (таблиця).

Дослідження впливу метанандаміду на центральні ланки ГГАС показали, що одноразове введення інтактним щурам суспензії метанандаміду в дозі 0,2 мг/кг маси тварини призводить до підвищення активності АПФ у гіпоталамусі й аденогіпофізі. Підвищення активності АПФ у цих структурах спостерігали також за умов системного внутрішньочеревного введення метанандаміду в меншій дозі — 0,02 мг/кг. Зміни активності АПФ у гіпоталамусі та аденогіпофізі внаслідок введення щурам обох доз метанандаміду були значущими порівняно з показниками інтактних щурів і контрольних тварин, яким вводили розчинник метанандаміду (таблиця).

На відміну від центральних ланок ГГАС, у надниркових залозах щурів виявлено зниження активності АПФ після одноразового введення метанандаміду. Зниження активності АПФ у надниркових залозах спостерігали за умов системного внутрішньочеревного введення метанандаміду в обох дозах — 0,2 мг/кг і 0,02 мг/кг. Зміни активності АПФ у надниркових залозах були вірогідними порівняно з показниками інтактних щурів і контрольних тварин, яким вводили розчинник метанандаміду (таблиця). Вірогідне зниження активнос-

ті АПФ встановлено також у плазмі крові після одноразового введення щурам метанандаміду в обох дозах — 0,2 мг/кг і 0,02 мг/кг маси тварин (таблиця).

Отже, результати досліджень впливу метанандаміду на центральні ланки ГГАС свідчать про активацію АПФ у гіпоталамусі й аденогіпофізі. На відміну від цього, локальна активність АПФ у надниркових залозах та активність циркулюючого в крові ферменту знижуються. Неоднотипні зміни активності АПФ, локалізованого в різних структурах ГГАС, свідчать про можливість прямої дії метанандаміду як на центральні ланки ГГАС — гіпоталамус й аденогіпофіз, так і на надниркові залози.

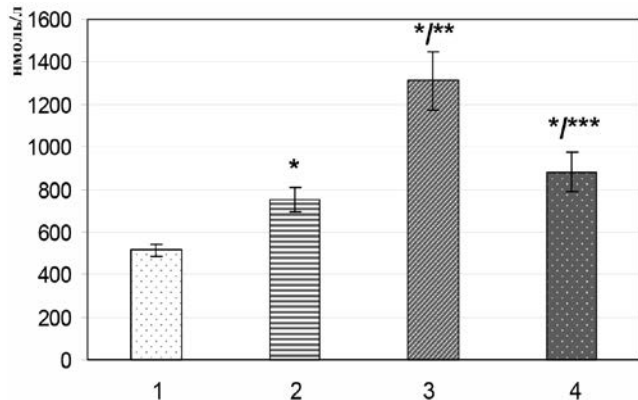
Неоднотипні зміни активності АПФ у центральних ланках ГГАС і надниркових залозах після введення метанандаміду, а також унаслідок дії ін'єкційного стресу, імовірно, пов'язано з тим, що на відміну від ангіотензинової системи надниркових залоз, основною функцією якої є регуляція синтезу альдостерону, ангіотензином аденогіпофіза та гіпоталамуса притаманна рилізінг активність щодо АКТГ і кортиколіберину [19, 20]. Підвищення активності АПФ у гіпоталамусі через 1 годину після введення контрольним щурам розчинника метанандаміду, очевидно, пов'язано з дією гострого

**Таблиця.** Активність ангіотензинперетворюючого ферменту в структурах ГГАС і плазмі крові щурів після одноразового введення різних доз метанандаміду ( $M \pm m$ ) ( $n=5-8$ )

Об'єкт дослідження	Інтактний контроль	Контроль-не введення розчинника метанандаміду	Метанандамід 0,2 мг	Метанандамід 0,02 мг
Гіпоталамус, нмоль гіс-лей/ (мг білка·хв)	0,317±0,014	0,389±0,009 $p_1 < 0,001$	0,460±0,011 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	0,447±0,008 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$
Аденогіпофіз, нмоль гіс-лей/ (мг білка·хв)	0,748±0,051	0,757±0,031 $p_1 > 0,5$	1,144±0,106 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$	1,250±0,205 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
Надниркові залози, нмоль гіс-лей/ (мг білка·хв)	0,243±0,006	0,231±0,011 $p_1 > 0,5$	0,192±0,002 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$	0,188±0,009 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,02$
Плазма крові, нмоль гіс-лей/ (мл·хв)	8,51±0,580	8,66±0,791 $p_1 > 0,5$	6,06±0,580 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,02$	6,48±0,411 $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,02$

Примітка:  $p_1$  — вірогідність різниці з показником інтактних тварин;  $p_2$  — вірогідність різниці з показником контрольних тварин, яким вводили розчинник метанандаміду.

стресу, що супроводжується зазвичай фазовим підвищенням рівня гормонів ГГАС. У наших експериментах показано, що рівень 11-ОКС у плазмі крові щурів підвищувався понад контрольний на 45,8% через 1 годину після внутрішньочеревного введення розчинника метанандаміду (рисунок).



**Рис.** Вплив одноразового введення різних доз метанандаміду на рівень 11-ОКС у плазмі крові щурів (нмоль/л; n=6): 1 — інтактний контроль; 2 — контроль на введення розчинника метанандаміду; 3 — введення метанандаміду в дозі 0,2 мг/кг; 4 — введення метанандаміду в дозі 0,02 мг/кг; \* —  $p < 0,01$  порівняно з інтактним контролем, \*\* —  $p < 0,01$  порівняно з контролем на введення розчинника метанандаміду, \*\*\* —  $p < 0,05$  порівняно з введенням метанандаміду в дозі 0,2 мг/кг.

Згідно з отриманими раніше даними, АПФ відіграє важливу роль у реакції ангіотензинової системи на стрес. Підвищення активності АПФ у гіпоталамусі й аденгіпофізі щурів після гострого іммобілізаційного стресу та вплив передстресового введення інгібіторів АПФ на секрецію гормонів ГГАС свідчать, що в певні фази стресу ангіотензин II та АПФ гіпоталамуса та гіпофіза є важливими чинниками активації секреції АКТГ і кортикостероїдів [20, 21].

Дослідження впливу канабіноїдів на рівень кортикостероїдів показали, що після одноразового введення метанандаміду підвищення активності АПФ у гіпоталамусі й аденгіпофізі супроводжується підвищенням рівня 11-ОКС у плазмі крові щурів. Причому рівень кортикостероїдів у крові підслідних тварин суттєво підвищувався після введення метанандаміду у високій дозі — 0,2 мг/кг (на 74,5% порівняно з контролем на введення розчинника метанандаміду, рисунок). З огляду на кортикотропін-релізінг активність ангіотензинів гіпоталамуса та аденгіпофізів, підвищення

активності АПФ у цих структурах може бути одним із важливих чинників активації ГГАС, зокрема синтезу кортикостероїдів, спричиненого метанандамідом. Важливо підкреслити, що ефект введення метанандаміду на рівень кортикостероїдів залежить від дози введеного канабіноїду. На відміну від дії високої дози, ін'єкції метанандаміду щурам у низькій дозі — 0,02 мг/кг не призводили до вірогідних змін рівня кортикостероїдів у плазмі крові щурів (рисунок).

За отриманими раніше даними, зміни активності АПФ у структурах ГГАС відбуваються також після введення експериментальним тваринам NAE, що містить насичений жирнокислотний ацил-N-стеароїлетаноламін (NSE). Після багаторазового 10-денного введення NSE щурам-самцям активність АПФ у центральних ланках ГГАС — аденгіпофізі та гіпокампі знижувалась, на відміну від дії метанандаміду. Водночас у гіпоталамусі щурів активність АПФ не відрізнялась від такої в контролі. Крім того, слід зазначити, що 10-денне введення N-стеароїлетаноламіну зумовлювало зниження активності АПФ в аденгіпофізі та плазмі крові щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом [13].

Отже, за результатами цієї роботи та отриманими раніше даними [13], N-ацилетаноламіни справляють модулюючий вплив на активність АПФ у структурах ГГАС, причому характер змін АПФ залежить від локалізації ферменту та умов експерименту (одно- та багаторазове введення ненасичених і насичених NAE — N-арахідоноїлетаноламіну та N-стеароїлетаноламіну). Наші результати узгоджуються з даними літератури щодо здатності канабіноїдів за різних умов експерименту справляти протилежні ефекти на ГГАС, зокрема на рівень АКТГ і кортикостероїдів — посилювати або пригнічувати реакцію організму на дію стресу. Відмінність відповіді ГГАС на дію NAE може бути пов'язаною з вихідним станом організму (інтактні, стресовані тварини та тварини, що отримували гормони) та умовами експерименту (одно-, дворазове та багаторазове введення NAE та застосування різних концентрацій канабіноїдів у дослідах *in vivo* та *in vitro*) [1, 22-24].

Важливо також підкреслити, що властивості NAE, які містять насичені та ненасичені

## Оригінальні дослідження

жирні кислоти, істотно різняться [2, 3]. Тому можуть обговорюватись різні механізми дії насичених і ненасичених НАЕ на компоненти ангіотензинової системи в гіпоталамусі та гіпофізі, де експресуються СВ1 канабіноїдні рецептори [4, 25]. Відмінність реакції АПФ гіпоталамуса та аденогіпофіза на дію ненасичених і насичених НАЕ може бути пов'язаною з тим, що біологічна дія N-арахідоноїлетаноламіну — природного ліганду канабіноїдних рецепторів СВ1 типу в структурах мозку реалізується переважно шляхом взаємодії з канабіноїдними рецепторами, а N-стеароїлетаноламіну — здійснюється за позарецепторним механізмом [26]. Водночас з'ясування механізму дії ендоканабіноїдів у тканинах ускладнюється тим, що ненасичені та насичені НАЕ мають високу мембранотропну активність, легко вбудовуються в мембрани клітин, де можуть діяти безпосередньо, без опосередкування рецепторами, проявляючи так звані позарецепторні ефекти. Певні позарецепторні ефекти відомі також для метанандаміду [2]. Отже, виявлені в експерименті зміни активності АПФ у структурах ГГАС можуть бути пов'язаними зі здатністю метанандаміду до модуляції ліпідного профілю клітинних мембран, адже найбільша концентрація АПФ у тканинах перебуває в мембранозв'язаному стані [27-29].

Отже, аналізуючи вплив N-ацилетаноламінів, що містять насичені та ненасичені жирнокислотні ацили, на функцію ГГАС, необхідно враховувати дію канабіноїдів на ангіотензини, локалізовані в цій системі, зокрема на активність АПФ — ферменту синтезу ангіотензину II. Активація АПФ та утворення ангіотензину II в гіпоталамусі й аденогіпофізі після короткочасної дії фармакологічних доз метанандаміду може відігравати важливу роль в індукованій ангіотензином II активації клітин, які секретують АКТГ в аденогіпофізі, а також у потенціюванні ангіотензином II кортикотропін-релізінг гормону (КРГ) у гіпоталамусі. З літератури відомо, що фармакологічні дози канабіноїдів та їх похідних, зокрема метанандаміду та тетрагідроканабінолу, стимулюють секрецію АКТГ і кортикостерону [30-33] та впливають на рівень КРГ у median eminence гіпоталамуса [6].

Водночас важливо підкреслити, що, на думку дослідників, ендогенні канабіноїди знижу-

ють активність ГГАС [7, 8, 22]. Визначення рівня ендогенних канабіноїдів у гіпоталамусі та застосування антагоністів рецепторів СВ1 дозволило встановити існування негативного зворотного зв'язку між ендоканабіноїдною системою та ГГАС [7, 8]. Усе це є підставою для подальшого вивчення механізмів взаємодії ендоканабіноїдів та ангіотензинів, що є важливим етапом розвитку уявлень про фізіологічну та патологічну значущість цих регуляторних систем з огляду на їх здатність регулювати адренкортикальну функцію та їх зв'язок із патологічними станами, пов'язаними зі стресом (депресія, ожиріння, стан тривоги).

**Висновки**

1. Через 1 годину після одноразового введення інтактним щурам метанандаміду в дозах 0,2 мг/кг і 0,02 мг/кг активність АПФ у центральних ланках ГГАС — гіпоталамусі та аденогіпофізі підвищується, активність АПФ у надниркових залозах та активність циркулюючого в крові ферменту знижуються.
2. Після одноразового введення інтактним щурам метанандаміду в дозі 0,2 мг/кг виявлено підвищення рівня 11-ОКС у плазмі крові щурів, введення метанандаміду в низькій дозі — 0,02 мг/кг не призводило до вірогідних змін рівня кортикостероїдів у крові тварин.

**Список використаної літератури**

1. Гула НМ, Микоша ОС, Жуков ОД, Челнакова ІС. Дія N-ацилетаноламінів на функцію кори надниркових залоз. *Укр. біохім. журн.* 2000;72 (3):82-6. (Gula NM, Mikosha OS, Zhukov OD, Chelnakova IS. Effect of N-acylethanolamines on the function of the adrenal cortex. *Ukr Biokhim zhurn.* 2000;72 (3):82-6).
2. Гула НМ, Маргітич ВМ. Жирні кислоти та їх похідні при патологічних станах. Київ: Наук. думка; 2009. 334 с. (Gula NM, Margitich V. Fatty acids and their derivatives in pathological conditions. Kyiv: Nauk. Dumka; Opinion, 2009:334 p.).
3. Тронько МД, Микоша ОС, Ковзун ОІ, Пушкар'єв ВМ. Регулятори функції кори надниркових залоз. Київ: ТОВ «Доктор-Медіа»; 2009:244 с. (Tron'ko MD, Mykosha OS, Kovzun OI, Pushkar'ev VM. Adrenal cortex regulators. Kyiv: TOV «Doctor-Media»; 2009:244 p.).
4. Pagotto U, Marsicano G, Cota D, Lutz B, Pasquali R. The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy. *Endocrine Rev.* 2006;27(1):73-100.
5. O'Hare JD, Zielinski E, Cheng B, Scherer T, Buettner C. Central endocannabinoid signaling regulates hepatic glucose production and systemic lipolysis. *Diabetes.* 2011;60(4):1055-62.
6. Weidenfeld J, Feldman S, Mechoulam R. Effect of the brain constituent anandamide, a cannabinoid receptor agonist, on the

- hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroendocrinol.* 1994;59(2):110-2.
7. Patel S, Roelke CT, Rademacher DR. Endocannabinoid signaling negatively modulates stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology.* 2004;145(12):5431-8.
  8. Cota D. The role of the endocannabinoids system in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J. Neuroendocrinol.* 2008;20 (Suppl 1):35-8.
  9. Калинин ЛН, Кононенко ВЯ. Взаимодействие ренин-ангиотензиновой и энкефалинергической системы мозга и гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса. *Физиол журнал им ИМ Сеченова.* 1996;82(4):60-4. (Kalinskaya LN, Kononenko VYa. The interaction of renin-angiotensin and enkephalergic system of the rat brain and pituitary in normal and experimental pathology of the hypothalamic-pituitary-adrenal complex. *Fiziol zhurnal im IM Sechenova.* 1996;82(4):60-4).
  10. Калинин ЛМ. Вплив мелатоніну та іммобілізаційного стресу на процеси синтезу ангіотензину ІІ в структурах гіпоталамо-гіпофізарно-адренортикальної системи щурів. *Буківинський медич. вісник.* 2003;7(1-2):56-8. (Kalynska LM. Effect of melatonin and immobilization stress on the processes of angiotensin II synthesis in structures of rat hypothalamo-pituitary-adrenal system. *Bukovinsky medych visnyk.* 2003;7(1-2):56-8).
  11. Калинин ЛМ, Микоша ОС. Зміни активності ангіотензинперетворюючого ферменту в структурах гіпоталамо-гіпофізарно-адренортикальної системи щурів-самців при дії естрадіолу. *Ендокринологія.* 2006;11(1):48-54. (Kalynska LM, Mykoshka OS. Changes in angiotensin-converting enzyme activity in structures of hypothalamo-adrenocortical system of male rats under estradiol effect. *Endokrynolohiya.* 2006;11(1):48-54).
  12. Корпачева-Зінич ОВ, Калинин ЛМ. Активність сироваткового ангіотензин-перетворювального ферменту у хворих на цукровий діабет 2 типу залежно від статі та андрогенного забезпечення. *Укр терапевт журн.* 2009;(1):68-75. (Korpacheva-Zynych OV, Kalynska LM. The activity of serum angiotensin-converting enzyme in patients with type 2 diabetes mellitus depending on gender and androgen supply. *Ukr therapevt zhurn.* 2009;(1):68-75).
  13. Калинин ЛМ, Косякова ГВ, Гула НМ. Вплив N-стеароїл-етаноламіну на активність ангіотензинперетворюючого ензиму у структурах мозку та плазмі крові щурів за стрептозототиніндукованого діабету. *Укр біохім журн.* 2012;84(2):89-92. (Kalynska LM, Kosiakova HV, Gula NM. Effect of N-stearoyl ethanolamine on activity of angiotensin-converting enzyme in the brain structures and blood plasma of rats with streptozotocine-induced diabetes. *Ukr Biokhim zhurn.* 2012;84(2):89-92).
  14. Калинин ЛМ. Ангіотензинперетворюючий фермент, його роль у міжгормональних взаємодіях. *Ендокринологія.* 2014;19(4):299-300. (Kalynska LM. Angiotensin-converting enzyme, its role in intergormonal interference. *Endokrynolohiya.* 2014;19(4):299-300).
  15. Yang H, Neff N. Distribution and properties of angiotensin converting enzyme of rat brain. *J Neurochem.* 1972;19:2443-50.
  16. Павлихина ЛВ, Елисеєва ЮЕ, Поздnev ВФ, Орехович ВН. Определение активности карбоксикапепсина в сыворотке крови человека. *Вопр мед химии.* 1975;21(1):54-9. (Pavlikhina LV, Yeliseyeva YuYe, Pozdnev VF, Orekhovich VN. Determination of carboxylatepsin activity in human serum. *Vopr med khimii.* 1975;21(1):54-9).
  17. Балашов ЮГ. Флуориметрический микрометод определения кортикостероидов: сравнение с другими методами. *Физиол. журнал СССР.* 1990;76(2): 280-3. (Balashov YuG. Fluorimetric micromethod for the determination of corticosteroids: comparison with other methods. *Physiol. zhurn.* 1990;76(2):280-3).
  18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
  19. Gupta P, Francosaens R, Mulrov P. Locally generated angiotensin II in the adrenal gland regulates basal, corticotropin and potassium-stimulated aldosterone secretion. *Hypertension.* 1995;25(3):443-8.
  20. Тронько НД, Калинин ЛН. Роль ангиотензиновой системы мозга в регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренортикальной системы при действии активирующих стимулов. *Нейроэндокринология: труды Всероссийской конференции с международным участием.* Санкт-Петербург; 2003:72-4. (Tronko ND, Kalinskaya LN. The role of the angiotensin system of the brain in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system under the action of activating stimuli. *Neuroendokrinologiya: trudy Vserossiyskoy konferentsii s mezhdunarodnim uchastiyem.* Sankt-Peterburg; 2003:72-4).
  21. Калинин ЛМ, Кононенко ВЯ. Участь компонентів ангіотензинової системи в розвитку стрес-реакції. *Ендокринологія.* 2001;6(1):60-6. (Kalynska LM, Kononenko VYa. Involvement of components of angiotensin system in the development of stress reaction. *Endokrynolohiya.* 2001;6(1):60-6).
  22. Сторожук ЛМ, Жуков ОД, Артамонов МВ, Гула НМ, Микоша ОС. Шляхи впливу N-ацетилетаноламінів на функцію кори надиркових залоз у щурів. *Ендокринологія.* 2005;10(1):63-8. (Storozhuk LM, Zhukov OD, Artamonov MV, Gula NM, Mykoshka OS. Pathways of N-acylethanolamine action on the rat adrenal cortex function. *Endokrynolohiya.* 2005;10(1):63-8).
  23. Ковзун ОІ, Левчук НІ, Гула НМ, Микоша ОС. Участь циклічних нуклеотидів, протеїнкіназ А та С у реалізації дії N-ацетилетаноламінів в адренортикальних клітинах людини. *Укр біохім журн.* 2007;79(5):133-9. (Kovzun OI, Levchuk NI, Gula NM, Mykoshka OS. Participation of cyclic nucleotides, protein kinases A and C in realization of N-acylethanolamines action in human adrenocortical cells. *Ukr Biokhim zhurn.* 2007;79(5):133-9).
  24. Левчук НІ. Вплив метанандаміду на стероїдогенез в адренортикоцитах щурів *in vitro.* *Укр біохім журн.* 2013;85(4):90-3. (Levchuk NI. Influence of metanandamide on steroidogenesis in rat adrenocortical cells *in vitro.* *Ukr Biokhim zhurn.* 2013;85(4):90-3).
  25. Felder CC, Glass M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:179-200.
  26. Pellegrini-Giampietro DE, Mannaioni G, Bagetta G. Post-ischemic brain damage: the endocannabinoid system in the mechanisms of neuronal death. *FEBS J.* 2009;276(1):2-12.
  27. Correa F, Guilhaume S, Saavedra J. Comparative quantification of rat brain and pituitary angiotensin converting enzyme with autoradiographic and enzymatic methods. *Brain Res.* 1991; 515:215-22.
  28. Hooper N. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions. *J Biochem.* 1991;23(7-8):641-7.
  29. Вернигора АН, Генгин МТ. Протеолитические ферменты: субклеточная локализация, свойства и участие в обмене нейротептидов. *Биохимия.* 1996; 61(5):771-85. (Vernigora AN, Gengin MT. Proteolytic enzymes: subcellular localization, properties and participation in the metabolism of neuropeptides. *Biokhimiya.* 1996;61(5):771-85).
  30. Murphy LL, Muñoz RM, Adrian BA, Villanúa MA. Function of cannabinoid receptors in the neuroendocrine regulation of hormone secretion. *Neurobiol Dis.* 1998;5(6):432-46.
  31. Manzanares J, Corchero J, Fuentes JA. Opioid and cannabinoid receptor-mediated regulation of the increase in adrenocorticotropin hormone and corticosterone plasma concentrations induced by central administration of delta(9)-tetrahydrocannabinol in rats. *Brain Res.* 1999;839(1):173-9.
  32. Wenger T, Toth BE, Martin BR. Effects of anandamide (endogenous cannabinoid) on anterior pituitary hormone secretion in adult ovariectomized rats. *Life Sci.* 1995; 56(23-24):2057-63.
  33. Zenor BN, Weesner GD, Malven PV. Endocrine and other responses to acute administrations of cannabinoid compounds to non-stressed male calves. *Life Sci.* 1999;65(2):125-33.

(Надійшла до редакції 23.08.2019 р.)

Оригінальні дослідження

## Изменения активности ангиотензинпревращающего фермента в структурах гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы и функции коры надпочечников крыс под действием метанандамида

Л.Н. Калинская, Е.И. Ковзун, Н.И. Левчук

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

**Резюме. Цель работы** — изучить влияние метанандамида — метаболически стойкого производного эндоканнабиноида N-арахидоноилетаноламина на активность ангиотензинпревращающего фермента (АПФ) в центрах регуляции гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системы (ГГАС), а также на уровень кортикостероидов в плазме крови крыс. **Материал и методы.** Активность АПФ в гипоталамусе, аденогипофизе, надпочечниках и плазме крови крыс определяли с помощью флуориметрического метода, используя как субстрат Benzoyl-Gly-His-Leu (Sigma, США). Содержание 11-гидроксикортикостероидов (11-ОКС) в плазме крови крыс устанавливали с применением флуориметрического микрометода. **Результаты.** Через 1 час после однократного введения интактным крысам метанандамида в дозах 0,2 мг/кг и 0,02 мг/кг активность АПФ в центральных звеньях ГГАС — гипоталамусе и аденогипофизе повышалась, активность АПФ в надпочечниках и активность циркулирующего в крови фермента снижалась. После однократного введения интактным крысам метанандамида в дозе 0,2 мг/кг обнаружено повышение уровня 11-ОКС в плазме крови крыс, введение метанандамида в низкой дозе — 0,02 мг/кг не приводило к достоверным изменениям уровня кортикостероидов в крови животных. **Выводы.** Экзогенные каннабиноиды модулируют активность ангиотензиновой системы в различных звеньях ГГАС, стимулируя активность АПФ в гипоталамусе и аденогипофизе, а также снижая активность фермента в надпочечниках и плазме крови через 1 час после однократного введения метанандамида интактным крысам. Из-за присущей ангиотензинам гипоталамуса и аденогипофиза кортикотропин-рилизинг активности повышение активности АПФ в этих структурах может быть одним из важных факторов активации ГГАС, в частности синтеза кортикостероидов, вызванного однократным введением метанандамида в высоких дозах. **Ключевые слова:** ангиотензинпревращающий фермент, гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система, метанандамид, кортикостероиды.

## Changes in the activity of angiotensin-converting enzyme in the structures of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system and the function of the adrenal cortex of rats under the conditions of methanandamide action

L.M. Kalyns'ka, O.I. Kovzun, N.I. Levchuk

State Institution «V.P. Komisarenko Institute of Endocrinology and Metabolism of National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

**Abstract. Aim** was to investigate the influence of methanandamide — a metabolically stable derivative of endocannabinoid N-arachidonoyletanolamine on the activity of angiotensin-converting enzyme (ACE), an enzyme for the synthesis of angiotensin II in the centers for regulating the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system (HPAS), in blood plasma of rats. **Material and methods.** The ACE activity in the hypothalamus, the adenohypophysis, the adrenal glands and blood plasma of rats was determined with a fluorometric method using Benzoyl-Gly-His-Leu (Sigma, USA) as substrate. The content of 11-hydroxycorticosteroids (11-HCS) in rat blood plasma was determined using a fluorometric micro-method. **Results.** The activity of ACE in the central links of HPAS — the hypothalamus and the adenohypophysis was increased in one hour after a single administration of methanandamide at doses of 0.2 and 0.02 mg/kg to intact rats; ACE activity in the adrenal glands and the efficacy of circulating enzyme in the blood were reduced. Increased levels of 11-HCS in rat plasma blood were revealed under the conditions of single administration of methanandamide in a dose of 0.2 mg/kg to intact rats; administration of low dose of methanandamide — 0.02 mg/kg did not lead to a significant change in the corticosteroid level in the blood of animals. **Conclusion.** Exogenous cannabinoids modulate the activity of the angiotensin system at various links of HPAS, stimulating the ACE activity in the hypothalamus and the adenohypophysis, and reducing the enzyme activity in the adrenal glands and blood plasma in 1 hour after administration of a single dose of methanandamide to intact rats. Due to corticotropin-releasing activity of hypothalamus and adenohypophysis angiotensines, increased ACE activity in these structures may be one of the important factors in the HPAS activation, in particular, corticosteroid synthesis, caused by a single administration of high doses of methanandamide. **Keywords:** angiotensin-converting enzyme, hypothalamic-pituitary-adrenocortical system, methanandamide, corticosteroids.