



УДК 547.392.52.057

ИСКУССТВЕННО ФУНКЦИОНАЛИЗИРОВАННЫЕ ПОЛИЕНОВЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ – НОВЫЕ ЛИПИДНЫЕ БИОРЕГУЛЯТОРЫ

© 1997 г. В. В. Безуглов[#], Е. М. Маневич*, А. В. Арчаков, М. Ю. Бобров, Д. В. Куклев, Г. Н. Петрухина**, В. А. Макаров**, Г. А. Бузников***

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Макляя, 16/10;

* Отдел радиационной онкологии медицинского центра Пенсильванского университета,
Филадельфия, США;

** Гематологический научный центр РАМН, Москва;

*** Институт биологии развития РАН, Москва

Поступила в редакцию 07.10.96 г.

Описано ацилирование дофамина, гистамина, серотонина и его аналогов арахидоновой и эйкозапентаеновой кислотами. Полученные соединения отнесены нами к классу искусственно функционализированных жирных кислот (ИФЖК). Показано, что амиды арахидоновой кислоты с серотонином, дофамином и гистамином ингибируют агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную арахидоновой кислотой и адреналином, что амиды арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот с серотонином и дофамином обладают способностью защищать ранние эмбрионы морских ежей от цитотоксического действия антагонистов серотонина и дофамина. Наблюдаемые эффекты ИФЖК не связаны с их возможным гидролизом до составляющих их полиеновых жирных кислот и аминов. Показано, что дофаминамид арахидоновой кислоты является субстратом для 15-липоксигеназы соевых бобов, тогда как амиды арахидоновой кислоты с серотонином и его производными не окислялись липоксигеназой, причем серотонинамид арахидоновой кислоты оказался необратимым ингибитором этого фермента. Впервые установлено, что липоксигеназное окисление линолевой кислоты сопровождается образованием значительного количества гидроксильных радикалов (флуоресцентный анализ), а серотонинамид арахидоновой кислоты полностью блокирует этот процесс. Таким образом, ИФЖК обладают специфической для них биологической активностью и могут рассматриваться как новый класс липидных биорегуляторов.

Ключевые слова: полиеновые жирные кислоты; полиеновые жирные кислоты, амиды; арахидоновая кислота; эйкозапентаеновая кислота; биогенные амины; липидные биорегуляторы; липоксигеназа соевых бобов; тромбоциты человека; морской еж, эмбрионы.

Полиеновые жирные кислоты могут оказывать воздействие на систему регуляции в организме несколькими способами: а) действуя в составе молекул липидов различных классов; б) опосредованно – через превращение в каскаде ферментативных реакций в различные оксиллипиды; в) непосредственно участвуя в системе передачи сигнала и модулировании биохимических реакций внутри клеток. В последнее время активно изучается новый класс липидных биорегуляторов – амидные производные жирных кислот. Так, было показано,

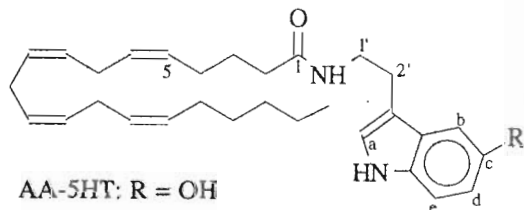
что некоторые амиды жирных кислот являются эффективными ингибиторами фосфолипазы A_2 из различных источников [1]. Из спинно-мозговой жидкости кошек был выделен амид олеиновой кислоты (названный олеамином), обладающий способностью вызывать сон [2]. Подобной активностью в различной степени обладали и некоторые синтетические аналоги олеамина [3]. Этаноламид арахидоновой кислоты (анандамид), действующий как эндогенный лиганд каннабиноидных рецепторов [4], равно как и этаноламиды других жирных кислот, включая насыщенные кислоты, например пальмитиновую [5, 6], также может быть отнесен к этому классу. На примере этаноламидов жирных кислот было показано, что клетки ряда органов, прежде всего мозга, содержат как системы синтеза этих соединений [7, 8], так и амидогидролазы, регенерирующие свободные жирные кислоты и этаноламин [9]. Были получены также синтетические жирнокислотные

Сокращения: РМА – форбол-12-миристал-13-ацетат, ИФЖК – искусственно функционализированные жирные кислоты, АА – арахидоновая кислота, ЕРА – эйкозапентаеновая кислота, 5HT – 5-гидрокситриптамин (серотонин), 5MT – 5-метокситриптамин, 5BT – 5-бромтриптамин, Т – триптамин, DA – 3-гидрокситирамин (дофамин), His – гистамин.

[#] Автор для переписки (факс: (095) 335-71-03; электронная почта: vvbez@ibch.siobc.ras.ru).

аналоги капсаицина*, обладающие высокой анальгезирующей и противовоспалительной активностью [10]. Таким образом, можно предположить, что амидирование природных жирных кислот амиаком и другими аминами является еще одним способом реализации биоэффекторных функций жирных кислот.

Недавно нами была предложена новая группа липидных биорегуляторов – искусственно функционализированные жирные кислоты (ИФЖК) – амиды ненасыщенных жирных кислот с биологически активными аминами, например серотонином [11, 12]. В настоящем сообщении мы описываем синтез и биологические свойства амидов арахидоновой кислоты с триптамином (AA-T), 5-гидрокситриптамином (AA-5HT), 5-бромтриптамином (AA-5BT), 3-гидрокситриптамином (AA-DA), гистамином (AA-Hia) и амида эйкозапентаеновой кислоты с 5-гидрокситриптамином (EPA-5HT).

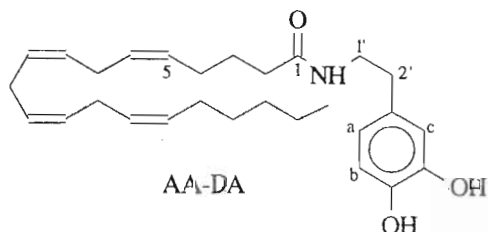


AA-5HT: R = OH

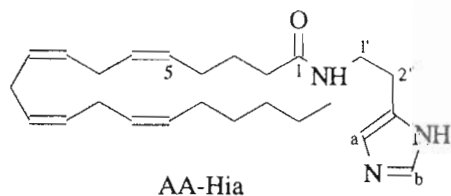
AA-5MT: R = OMe

AA-T: R = H

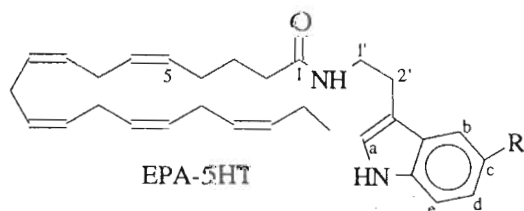
AA-5BT: R = Br



AA-DA



AA-Hia



EPA-5HT

Амиды арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот с биологически активными аминами получали либо по методу смешанных ангидридов с

* Капсаицин (ванилинамид 8-метил-6-ноненовой кислоты) – основное действующее начало жгучего вкуса перцев семейства *Capsicum*.

изобутиловым эфиром угольной кислоты, либо через промежуточный имидазолид, образующийся при действии карбонилдимидазола на полиеновую жирную кислоту. Оба метода дают удовлетворительные выходы целевых соединений (60–70%), их характеристики см. в табл. 1 и 2.

Биологические свойства синтезированных соединений были изучены на моделях, которые позволяли оценить эффекты как самих амидов жирных кислот, так и их отдельных компонентов (полиеновые жирные кислоты и биологически активные амины). Известно, что арахидоновая кислота является природным индуктором агрегации тромбоцитов [13]. Поэтому нам было важно выяснить, сохраняются ли проагрегационные свойства у амидов арахидоновой кислоты.

Было установлено, что амиды арахидоновой кислоты с серотонином, гистамином и дофамином не обладают способностью индуцировать агрегацию тромбоцитов человека до концентрации 2.5 мМ, тогда как свободная арахидоновая кислота при концентрации 1 мМ вызывает устойчивую агрегацию кровяных пластинок. Более того, указанные производные оказались ингибиторами агрегации тромбоцитов, вызываемой различными индукторами (табл. 3 и рис. 1, 2). Особенно заметен ингибирующий эффект AA-5HT, AA-DA и AA-Hia на агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой (рис. 2), AA-5HT и AA-DA в концентрации 2.5 мМ полностью ингибировали агрегационный ответ тромбоцитов.

Сравнивая результаты антиагрегационного действия исследуемых производных на образцы тромбоплазмы, взятые у различных доноров, мы обнаружили, что у одной группы людей тромбоциты оказались чрезвычайно чувствительны к действию AA-5HT и AA-DA и в меньшей степени к AA-Hia, тогда как тромбоциты другой группы обладали на порядок меньшей чувствительностью к этим амидам. Например, в присутствии 0.25 мМ эффекторов индуцируемое арахидоновой кислотой падение оптического поглощения суспензии тромбоцитов человека, вызываемое их агрегацией, в группе “чувствительных” клеток составило всего 2.5 ± 1.6 и $1.1 \pm 0.5\%$ для AA-5HT и AA-DA соответственно, т.е. агрегация подавлялась полностью, тогда как в группе “нечувствительных” клеток эти величины составили 51.3 ± 3.4 и $34.0 \pm 5.6\%$ соответственно, что в случае AA-5HT близко к значению в контроле с арахидоновой кислотой ($47.9 \pm 2.2\%$). В настоящее время мы не можем предложить объяснение наблюдаемых различий, так как другие характеристики “чувствительных” и “нечувствительных” тромбоцитов не определялись. Можно лишь отметить, что различия в ответе на AA-5HT и AA-DA тромбоцитов от различных доноров, по-видимому, не связаны со способностью этих клеток отвечать на индукторы

Таблица 1. Параметры ^1H -ЯМР-спектров производных полиеновых жирных кислот: хим. сдвиг, δ (м. д., мультиплетность, J , Гц)

Протон	AA-5HT	AA-5MT	AA-T	AA-BT	AA-DA	AA-Hia	EPA-5HT
2	2.14, т	2.13, т	2.12, т	2.14, т	2.17, т	2.19, т	2.14, т
3	1.69, м	1.69, м	1.69, м	1.69, м	1.7, м	1.7, м	1.69, м
4	2.07, м	2.07, м	2.07, м	2.08, м	2.08, м	2.07, м	2.08, м
5	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.37, м
6	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.37, м
7	2.81, м	2.82, м	2.81, м	2.81, м	2.82, м	2.82, м	2.82, м
8	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.37, м
9	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.37, м
10	2.81, м	2.82, м	2.81, м	2.81, м	2.82, м	2.82, м	2.82, м
11	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.37, м
12	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.37, м
13	2.81, м	2.82, м	2.81, м	2.81, м	2.82, м	2.82, м	2.82, м
14	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.37, м
15	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.36, м	5.37, м	5.37, м	5.37, м
16	2.07, м	2.07, м	2.07, м	2.08, м	2.08, м	2.07, м	2.82, м
17	1.36, м	1.36, м	1.36, м	1.35, м	1.36, м	1.36, м	5.37, м
18	1.3, м	1.3, м	1.3, м	1.3, м	1.3, м	1.3, м	5.37, м
19	1.3, м	1.3, м	1.3, м	1.3, м	1.3, м	1.3, м	2.08, м
20	0.9, т	0.9, т	0.9, т	0.9, т	0.9, т	0.9, т	0.98, т
NH	5.55, с	5.48, с	5.47, с	5.47, с	5.56, с	5.37, с	5.57, с
1'	3.58, кв	3.62, кв	3.63, кв	3.58, кв	3.5, кв	3.55, кв	3.58, кв
2'	2.91, т	2.95, т	2.97, т	2.93, т	2.71, т	2.84, т	2.91, т
NH аром.	7.94, с	7.95, с	8.07, с	8.1, с		6.37, с	7.95, с
a	7.00, с	7.02, с	7.07, с	7.05, с	6.82, д, J 8	6.83, с	6.99, с
b	7.03, д, J 2.5	7.05, д, J 2.5	7.38, 7.62, д, J 8	7.72, д, J 1.5	6.59, д, J 8	7.6, с	7.03, д, J 2
c			7.14, 7.22, д, J 8		6.75, с		
d	6.61, дд, J 9, J 2.5	6.89, дд, J 9, J 2.5	7.14, 7.22, д, J 8	7.3, дд, J 9, J 1.5			6.61, дд, J 9, J 2
e	7.22, д, J 9	7.27, д, J 9	7.38, 7.62, д, J 8	7.25, д, J 9			7.22, д, J 9
OMe		3.57, с					

Таблица 2. Хроматографическая подвижность* и параметры УФ- и масс-спектров**ИФЖК

Соединение	R_f	λ_{max}	m/z	Предполагаемая структура иона
AA-5HT	0.30	277	463	$[M + H]^+$
AA-T	0.54	222, 281	447	$[M + H]^+$
AA-5MT	0.50	222, 278	477	$[M + H]^+$
AA-5BT	0.53	227, 289	525 ⁽⁶⁾	$[M]^+$
AA-DA	0.16	282	440	$[M + H]^+$
AA-Hia	0.85 ^(a)	—	398	$[M + H]^+$
EPA-5HT	0.30	277	460 ⁽⁶⁾	$[M]^+$

* ТСХ, бензол–ацетон, 5 : 1; (a) – хлороформ–метанол–вода, 65 : 25 : 4.

** Масс-спектрометрия с ионизацией быстрыми атомами, в отмеченных индексом (6) случаях – с плазменной десорбцией, индуцированной ^{252}Cf .

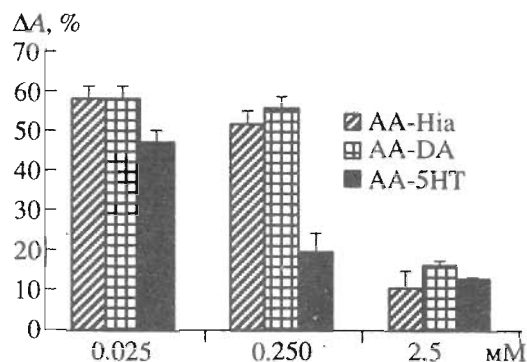


Рис. 1. Влияние производных полиненасыщенных жирных кислот на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную адреналином (2.5 мкг/мл, ΔA $56.9 \pm 7.5\%$), в зависимости от их концентрации.

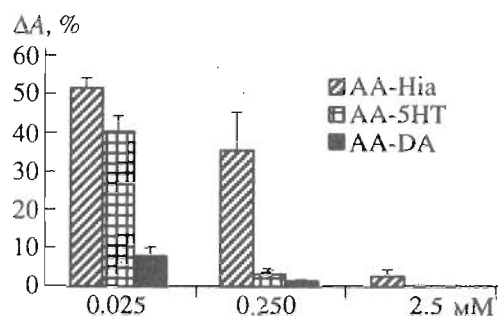


Рис. 2. Влияние производных полиненасыщенных жирных кислот на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную 1 мМ арахидоновой кислотой (ΔA $47.9 \pm 2\%$), в зависимости от их концентрации. Представлены данные для тромбоцитов доноров, чувствительных к тестируемым веществам.

агрегации, поскольку ни адреналин, ни арахидоновая кислота не приводили к дифференциации тромбоцитов доноров на “чувствительные” и “нечувствительные”.

Следует отметить, что ингибирование исследованными амидами агрегации тромбоцитов, индуцированной ADP (табл. 3), гораздо слабее, чем при индукции арахидоновой кислотой и адреналином (рис. 1, 2). Возможно, это связано с различным механизмом индуцирующего действия ADP, адреналина и арахидоновой кислоты. Индукция

агрегации тромбоцитов через α_2 -рецепторы, активируемые адреналином, опосредуется в значительной степени через усиление высвобождения эндогенной арахидоновой кислоты с последующим ее превращением в проагрегантные простагландин H_2 и тромбоксан A_2 [14]. Экзогенная арахидоновая кислота также увеличивает внутриклеточный пул свободного арахидоната в тромбоцитах. Напротив, проагрегационный эффект ADP в значительной степени связан с активацией рецепции фибриногена [15]. На основании этих данных можно предположить, что ангиагрегационная активность амидов арахидоновой кислоты связана с их воздействием на биохимические процессы в тромбоцитах, инициируемые арахидоновой кислотой.

Таблица 3. Влияние амидов арахидоновой кислоты на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную 10 мкМ ADP (изменение оптического поглощения, %)

Амид	Концентрация амида, мМ			
	0	2.5	0.25	0.025
AA-5HT	53.5 ± 1.6	35.5 ± 5.4	48.3 ± 1.1	51.3 ± 3.8
AA-DA	53.5 ± 1.6	45.2 ± 4.4	44.3 ± 4.9	46.7 ± 2.6
AA-Hia	53.5 ± 1.6	42.1 ± 3.9	53.5 ± 3.9	56.7 ± 2.2

Другим объектом изучения биологической активности ИФЖК были ранние эмбрионы морских ежей различных видов (*Lytechinus pictus*, *Sphaerechinus granularis* и *Paracentrotus lividus*), которые, как было показано ранее [16, 17], являются хорошей моделью для изучения действия до-нервных нейротрансмиттеров, таких, как серотонин, дофамин, ацетилхолин, адреналин, норадреналин. Результаты экспериментов на эмбрионах морских ежей различных видов были достаточно близки, и мы приводим данные типичных опытов.

Таблица 4. Ингибирование деления дробления зародышей морского ежа *Lytechinus pictus* (% к максимальному эффекту), вызываемое антагонистом серотонина—инмекарбом, без эффекторов и в присутствии 50 мкМ ИФЖК

[Инмекарб], мкМ	Без эффекторов	5HT	AA-5HT	AA-T	AA-5MT
10	0	0	0	0	0
15	5	0	0	0	0
20	70	30	0	20	0
25	100	63	15	85	60
30	100	93	75	100	90
40	100	100	99	100	100

Было установлено, что AA-5HT, EPA-5HT и AA-DA в концентрации до 0.2 мМ не влияли на нормальное развитие эмбрионов морского ежа в некоторых случаях вплоть до формирования первых нейронов (стадия поздней гаструлы). В то же время эти амиды эффективно защищали эмбрионы от цитостатических агентов. Так, амиды серотонина с арахидоновой и эйкозапентаеновой кислотами защищали эмбрионы морских ежей от ингибирующего развитие действия антагонистов серотонина – инмекарба (табл. 4, 5) и ритансерина [16]. Более того, жирнокислотные производные серотонина оказались более эффективными блокаторами действия антагонистов серотонина,

чем сам серотонин (рис. 3). Можно предположить, что более липофильные АА-5НТ и ЕРА-5НТ легче, чем серотонин, проникают в цитоплазму, где и находится основная мишень их действия, тем более что гидрофильный кватернизированный аналог серотонина – 5НТQ, не проникающий через мембрану, не защищал клетки от действия антисеротониновых агентов (табл. 5). Подобная зависимость между липофильностью и защитным действием была ранее описана и для других классов цитостатических антагонистов нейротрансмиттеров [17]. Таким образом, мы получили дополнительное подтверждение внутриклеточной локализации рецепторов (или функционально активных мест связывания) до-нервных нейротрансмиттеров, участвующих в регулировании деления дробления*.

По результатам опытов были получены такие последовательности в порядке уменьшения активности ИФЖК:

действие против антисеротониновых препаратов (инмекарб и ритансерин)

АА-5НТ = ЕРА-5НТ > АА-ДА > АА-5МТ > АА-Т;

действие против антидофаминовых препаратов (галоперидол, спиперон, пимозид)

АА-ДА > АА-5НТ = ЕРА-5НТ.

Видно, что наибольшей защитной активностью в каждой группе обладают жирнокислотные аналоги того агониста, против которого направлено действие антагонистов, использованных для выявления этих закономерностей, т.е. аналоги серотонина (АА-5НТ и ЕРА-5НТ) более активны против антисеротониновых препаратов, а аналог дофамина (АА-ДА) – против антидофаминовых препаратов. При этом, однако, указанные амиды обладали способностью защищать эмбрионы морских ежей от действия антагонистов другого типа (серотониновые амиды защищали от дофаминолитиков, и наоборот), хотя и с меньшей активностью.

Синтезированные нами ИФЖК наряду с повышенной способностью проникать через клеточную мембрану в ряде случаев были более стабильны, чем соответствующие амины, что позволило провести исследования внутриклеточной локализации мишеней для нейротрансмиттеров. Так, эксперименты по защите АА-ДА эмбрионов морских ежей от цитостатического действия антагонистов дофамина (галоперидола, спиперона и пимозид) показали с большой долей вероятности существование внутриклеточных функционально активных мест связывания дофамина, существенных для процессов нормального развития эмбрионов морских ежей. Используемые

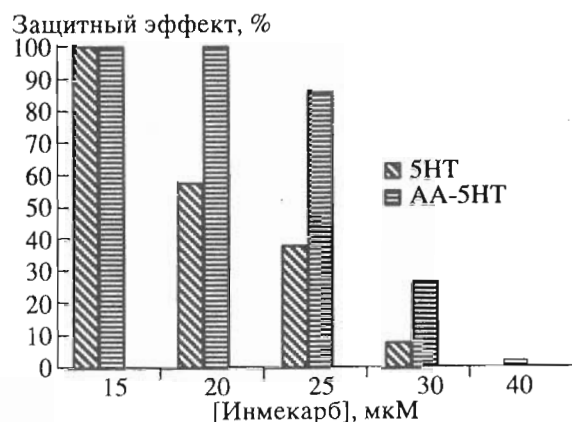


Рис. 3. Защитное действие серотонина (5НТ, 50 мкМ) и его арахидоноильного производного (АА-5НТ, 50 мкМ) на ооциты морского ежа против блокатора деления дробления – инмекарба.

нами антагонисты дофамина эффективно блокировали эмбриональное развитие морских ежей на первой стадии (см. также [17]), тогда как добавление АА-ДА снимало этот эффект и восстанавливало нормальное развитие клеток (данные не приведены). Подобные эксперименты со свободным дофамином были невозможны из-за чрезвычайной нестабильности экзогенного дофамина в инкубационной среде.

Наблюдаемые нами эффекты ИФЖК являются свойствами этих новых молекул, а не обусловлены их гидролизом с последующим действием составных частей. Это следует из различий (в ряде случаев до противоположности) эффектов составных частей и результирующей молекулы. Так, арахидоновая кислота – индуктор агрегации тромбоцитов, а ее амиды с серотонином и дофамином – ингибиторы этого процесса. В опытах на ооцитах

Таблица 5. Ингибирование деления дробления зародышей морского ежа *Lytechinus pictus* (% к максимальному эффекту), вызываемое антагонистом серотонина – инмекарбом, без эффекторов и в присутствии 50 мкМ серотонина (5-НТ), его кватернизированного (5НТQ) и жирнокислотного (АА-5НТ) аналогов

[Инмекарб], мкМ	Без эффекторов	5НТ	5НТQ	АА-5НТ
10	7	0*	9	0*
15	27	0*	30	0*
20	50	7	49	0*
25	62	48	79	36
30	100	89	100	80
40	100	100	100	97

* Деление дробления – первое после оплодотворения клеточное деление.

* Некоторые делящиеся эмбрионы достигали стадии ранней бластулы.

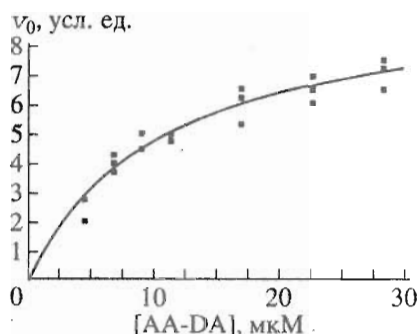


Рис. 4. Концентрационная зависимость начальной скорости окисления дофаминида арахидоновой кислоты липоксигеназой соевых бобов (тип I). Кривая представляет собой аппроксимацию экспериментальных данных по уравнению Михаэлиса-Ментен.

морских ежей AA-5HT, AA-DA и EPA-5HT являлись антагонистами действия форболового эфира (PMA), активирующего протеинкиназу C [18], тогда как арахидоновая кислота [19] и особенно эйкозапентаеновая кислота в концентрации 25–50 мкМ оказывали PMA-подобное действие (данные не приведены). Еще одно подтверждение обусловленности наблюдаемых эффектов действием цельной молекулы ИФЖК, а не ее составных частей было получено нами в экспериментах по изучению действия амида арахидоновой кислоты с 5BT на развитие зародышей морского ежа в присутствии антагонистов серотонина (табл. 6). Сам 5BT действует на эмбрионы морских ежей как цитостатический антагонист серотонина и в концентрации 40 мкМ полностью блокирует де-

Таблица 6. Ингибирование деления дробления зародышей морского ежа *Lytechinus pictus* (% к максимальному эффекту), вызываемое антагонистами серотонина, без эффектов и в присутствии 50 мкМ AA-5BT

[Имекарб], мкМ	Без эффектора	AA-5BT	[Ритансерин], мкМ	Без эффектора	AA-5BT
10	0*	0**	10	8*	0**
15	0*	0**	20	90	0**
20	26	0	30	95	0
30	100	20	40	98	8
40	100	28	50	100	57
50	100	66	60	100	59

* Полное блокирование развития на стадии 2–4 клеток с последующим лизисом клеток.

** Нормальное развитие вплоть до начала гаструляции.

ление, а в концентрации 1–2 мкМ угнетает развитие и останавливает гаструляцию. В то же время AA-5BT в концентрации 50–100 мкМ не только не влияет на нормальное развитие эмбрионов морского ежа, но и эффективно защищает клетки от цитотоксических антагонистов серотонина (табл. 6).

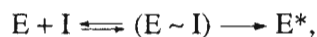
Превращение полиненасыщенных жирных кислот в окисленные производные – оксипирины под действием оксигеназ – наиболее распространенный путь их метаболических превращений в большинстве органов и тканей. Производные полиненасыщенных жирных кислот по карбоксильной группе также могут быть субстратами липоксигеназного окисления. Так, было показано, что анандамид (этаноламид арахидоновой кислоты) является субстратом липоксигеназ из растений и млекопитающих [20–22]. Поэтому мы считали важным изучить липоксигеназное окисление синтезированных ИФЖК. В качестве первого фермента для такого изучения мы выбрали 15-липоксигеназу соевых бобов.

Амид арахидоновой кислоты с дофамином (AA-DA) оказался субстратом 15-липоксигеназы. При инкубации AA-DA с ферментом наблюдали отчетливое увеличение поглощения при 234–237 нм, обусловленного образованием диенового хромофора, тогда как в других районах УФ-спектра не было отмечено изменений. Константа Михаэлиса (K_m) для липоксигеназного окисления AA-DA составила 10.4 мкМ (рис. 4).

Амиды арахидоновой кислоты с триптамином и его производными тоже первоначально рассматривались как субстраты для 15-липоксигеназы. Однако нами было установлено, что ни один из них не образует продуктов окисления при инкубации с 15-липоксигеназой, а AA-5HT оказался необратимым ингибитором этого фермента [21].

Для подтверждения этого вывода мы провели эксперимент по измерению поглощения кислорода в липоксигеназной реакции в присутствии AA-5HT. Добавление 15-липоксигеназы к раствору AA-5HT в буфере вызывало постепенное снижение концентрации кислорода в инкубационной среде с 0.22 до 0.196 мМ, значение которой стабилизировалось к 7-й мин (рис. 5). При этом поглощение кислорода составило приблизительно 1 моль на 2 моль AA-5HT, а липоксигеназа, находившаяся в инкубационной среде, была практически полностью инактивирована. Это следовало из весьма незначительного уменьшения концентрации кислорода в среде после добавления большого избытка линолевой кислоты, которая, однако, быстро окислялась свежей порцией фермента (рис. 5).

Для описания возможного механизма инактивирующего действия AA-5HT на 15-липоксигеназу нами была предложена модель двустадийного процесса:



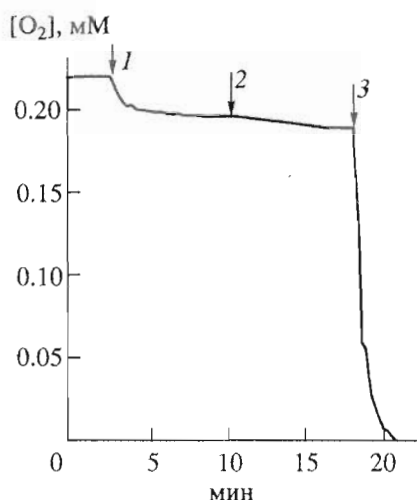


Рис. 5. Влияние серотонинамида арахидоновой кислоты на концентрацию кислорода в инкубационной смеси в присутствии 15-липоксигеназы соевых бобов (тип V, 10 000 ед. акт.). В момент времени 1 к раствору фермента добавлен АА-5НТ (конечная концентрация 10 мкМ), в момент времени 2 к образцу добавлена линолевая кислота (конечная концентрация 180 мкМ), в момент времени 3 к образцу добавлена новая порция (10000 ед. акт.) фермента.

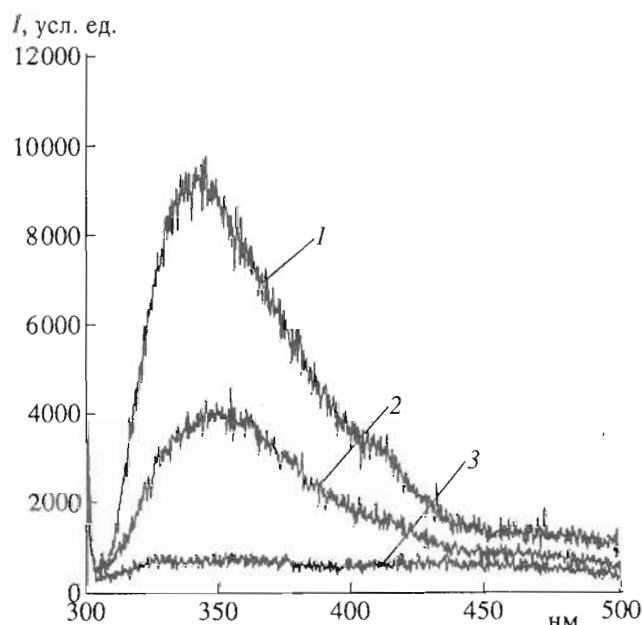


Рис. 6. Спектры флуоресценции АА-5НТ (1), смеси АА-5НТ и 15-липоксигеназы (тип V) (2) и 15-липоксигеназы (3) в 30 мМ боратном буфере, рН 9.0. [АА-5НТ] 10 мкМ, [Е] 2000 ед. акт./мл. Длина волны возбуждения 295 нм.

в котором первая стадия представляет собой обратимую ассоциацию ингибитора (I) и фермента (E), а вторая — необратимую инактивацию фермента (E*) связанным ингибитором (E ~ I) [21].

По-видимому, для протекания первой (обратимой) стадии связывания амидов арахидоновой кислоты с 15-липоксигеназой наличие и характер заместителей в индольном кольце молекулы не являются критическими факторами, поскольку амиды арахидоновой кислоты с 5НТ и Т оказались обратимыми ингибиторами 15-липоксигеназы с $K_i \approx 20$ мкМ [21]. Вторая же стадия процесса — необратимое ингибирование — происходит только с серотонинамидом арахидоновой кислоты, т.е. требует для своего осуществления наличия гидроксильной группы в индольном кольце. Существование взаимодействия молекулы белка и индольного фрагмента молекулы АА-5НТ следует из данных измерения флуоресценции АА-5НТ в растворе без добавления липоксигеназы и в ее присутствии (рис. 6). Благодаря наличию остатка серотонина молекула АА-5НТ обладает собственной флуоресценцией с максимумом при 345 нм (в боратном буфере). Добавление 15-липоксигеназы к раствору АА-5НТ в буфере приводит к значительному уменьшению интенсивности флуоресценции АА-5НТ. Механизм такого тушения флуоресценции пока не вполне ясен, но можно предположить, что частично этот эффект связан с окислением индольного фрагмента АА-5НТ реакционноспособными кислородными радикалами

с образованием ковалентных сшивок с ферментом, что было отмечено ранее для необратимого связывания серотонина с актином скелетных мышц в присутствии Fe^{2+} [23].

Чтобы проверить это предположение, мы определили образование гидроксильных радикалов в инкубационной среде, содержащей 15-липоксигеназу и АА-5НТ или линолевую кислоту. Для этой цели был использован метод детектирования гидроксильных радикалов по интенсивности флуоресценции 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты — продукта их взаимодействия с 3-карбоксихумарином [24, 25]. При инкубации 15-липоксигеназы с линолевой кислотой в присутствии 3-карбоксихумарина был отмечен значительный рост флуоресценции 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты (рис. 7), свидетельствующий об активном образовании гидроксильных радикалов при липоксигеназной реакции, тогда как при инкубации АА-5НТ с 15-липоксигеназой флуоресценция 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты отсутствовала (рис. 7). При этом добавление линолевой кислоты к полученной реакционной смеси не вызывало образования гидроксильных радикалов, тогда как последующее прибавление новой порции фермента вновь приводило к значительному росту интенсивности флуоресценции (данные не иллюстрированы). На основании этих результатов можно сделать следующие выводы:

1) липоксигеназа соевых бобов при окислении субстратов (например, линолевой кислоты) катализирует образование большого количества

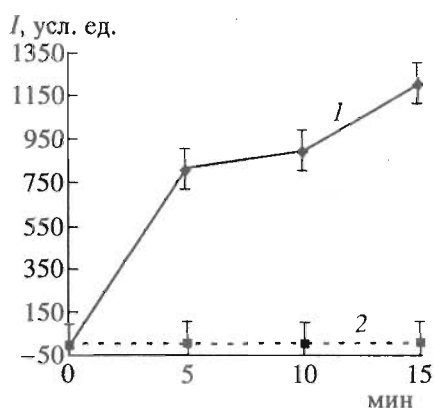


Рис. 7. Кинетика образования 7-гидроксикумарин-3-карбоновой кислоты в среде, содержащей 3-карбоксихумарин (1 мМ), липоксигеназу соевых бобов (тип V, 2000 ед. акт./мл) и линолевую кислоту (360 мкМ) (1) или AA-5НТ (100 мкМ) (2). Длина волны возбуждения 395 нм, испускания — 450 нм.

гидроксильных радикалов. Следует отметить, что прямыми измерениями это показано нами впервые;

2) AA-5НТ образует небольшое количество (по сравнению с линолевой кислотой) гидроксильных радикалов, после чего полностью дезактивирует фермент.

Таким образом, нами показано, что ИФЖК обладают специфической для них биологической активностью, отличной от биологических эффектов составляющих их компонентов, и могут рассматриваться как новый класс липидных биорегуляторов. Возможно, что биологическое действие ИФЖК связано с их взаимодействием с рецепторами как на поверхности, так и внутри клетки, а также с модулированием активности липоксигеназы через обратимое или необратимое их ингибирование.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе были использованы арахидоновая кислота, карбонилдиимидазол и изобутилхлорформат фирмы Fluka (Швейцария), 15-липоксигеназы соевых бобов (КФ 1.13.11.12), тип I, 130000 ед. акт./мг белка, и тип V*, 630000 ед. акт./мг (Sigma, США), а также ацетонитрил, метанол, триэтиламин, этилацетат, очищенные по стандартным методикам. 5,8,11,14,17-Эйкозапентаеновая кислота предоставлена лабораторией липидов (ТИНРО, Владивосток).

ТСХ выполняли на пластинках Silufol UV-254 (Kavalier, Чехия) и DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия). Для обнаружения использована

* Липоксигеназа типа V представляет собой очищенный аффинной хроматографией образец липоксигеназы типа I.

ли 10% раствор фосфорномолибденовой кислоты в этаноле. Растворы упаривали с помощью роторного испарителя при температуре бани не выше 25°C с последующим удалением остатка растворителя при 1–10 Па. Измерение оптического поглощения осуществляли на спектрофотометре Ultraspec II (ЛКВ, Швеция). Масс-спектры регистрировали на приборах МСБХ (Сумы, Украина) с плазменной десорбцией ускоренными продуктами распада ²⁵²Cf и MS 50 TC (Kratos, Великобритания) с ионизацией атомами ксенона (матрица — нитробензиловый спирт). ¹H-ЯМР-спектры записывали на приборе Bruker WM-500 (Германия) с рабочей частотой 500 МГц.

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Hitachi F-2000 (Япония). Все измерения проведены при 23°C, значения флуоресценции буфера и других компонентов исследуемых смесей были вычтены из результирующих спектров, которые были откорректированы.

Поглощение кислорода при липоксигеназной реакции определяли с помощью электрода Кларка в закрытой термостатируемой ячейке объемом 5 мл (YSI Co., Yellow Spring, США) при 37°C. В кювету помещали 30 мМ боратный буфер, рН 9.0, прибавляли раствор линолевой кислоты или AA-5НТ в этаноле (содержание этанола в конечном растворе не превышало 1.5 объемных %) и выдерживали в закрытом состоянии до стабилизации концентрации кислорода (0.22 мМ). Затем через мембрану прибавляли раствор 15-липоксигеназы соевых бобов (тип V) в буфере и регистрировали изменение концентрации кислорода.

Для определения кинетических параметров липоксигеназного окисления дофаминамида арахидоновой кислоты 1.5 мл раствора AA-DA (1–20 мкМ) в боратном буфере (0.2 М, рН 9.0) смешивали с 0.5 мл раствора фермента (тип I) концентрации 4 мкг/мл (примерно 47 нМ) в том же буфере и фиксировали оптическое поглощение с интервалом 2 с при длине волны 234 нм (поглощение диенового хромофора моногидроксипроизводных).

Агрегацию тромбоцитов, полученных из крови здоровых доноров, под действием испытуемых веществ или стандартных агонистов оценивали, как описано в [26], по максимальной величине падения оптического поглощения (ΔA , %) после окончания реакции агрегации по сравнению со значениями оптического поглощения в исходной плазме. За 100% принято изменение оптического поглощения, соответствующее полной агрегации.

Эксперименты на ранних зародышах морских ежей *Lytechinus pictus*, *Sphaerechinus granularis* и *Paracentrotus lividus* были выполнены по методике, описанной ранее [27], в искусственной морской воде. Реактивы добавляли в среду через 5 мин после оплодотворения. Результаты экспериментов определяли визуально и фиксировали с помощью

микрофотографии. В этих экспериментах использовали реактивы: серотонина гидрохлорид, форбол-12-миристенат-13-ацетат (Sigma, США), 5HTQ (N,N-диметилсеротонина иодметилат), ритансерин, галоперидол, спиперон, пимозид и пропранолола гидрохлорид (RBI, США). Инмекарб и 5-бромотриптамин (в виде гидрохлоридов) предоставлены проф. В.А. Загоревским и проф. Н.Н. Суворовым соответственно.

Общая методика синтеза ИФЖК по методу смешанных ангидридов с изобутиловым эфиром угольной кислоты. К раствору 0.16 ммоль арахидоновой кислоты в 2.5 мл ацетонитрила при перемешивании в атмосфере аргона прибавляли 30 мкл триэтиламина, охлаждали до -30°C и прибавляли 30 мкл изобутилхлорформиата. Примерно через 1.5 мин наблюдали образование белого осадка. Реакционную смесь перемешивали при охлаждении ($0-4^{\circ}\text{C}$) 20 мин и прибавляли раствор 1.2 эквивалента соответствующего амина в виде гидрохлорида в смеси этанол-вода-триэтиламин, 10 : 1 : 1. Гомогенную смесь перемешивали 30 мин и разбавляли 5 объемами этилацетата. Органический слой отделяли, промывали водой и насыщенным NaCl, сушили Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали. Остаток очищали хроматографией на силикагеле Kieselgel G 60 (Merck, Германия) в хлороформе или смеси хлороформ-ацетон.

Общая методика синтеза ИФЖК через имидазолиды. К раствору 0.29 ммоль эйкозапентаеновой кислоты в 3 мл хлороформа при перемешивании в атмосфере аргона при комнатной температуре прибавляли 0.32 ммоль карбонилдиимидазола одной порцией. Наблюдали выделение газа, которое заканчивалось через 30 мин. К полученному раствору имидазолида эйкозапентаеновой кислоты прибавляли раствор амина и обрабатывали полученную реакционную смесь как описано выше. Характеристики полученных по приведенным выше методикам соединений представлены в табл. 1 и 2.

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 0449191).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jain M.K., Ghomashchi F., Yu B.Z., Bayburt T., Murphy D., Houck D., Brownell J., Reid J.C., Solowiej J.E., Wong S.M., Mocek U., Jarrell R., Sasser M., Gelb M.H. // *J. Med. Chem.* 1992. V. 35. P. 3584–3586.
- Cravatt B.F., Prospero-Garcia O., Siuzdak G., Gilula N.B., Henriksen S.J., Boger D.L., Lerner R.A. // *Science.* 1995. V. 268. P. 1506–1509.
- Cravatt B.F., Lerner R.A., Boger D.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. P. 580–590.
- Devane W.A., Hanuš L., Breuer A., Pertwee R.G., Stevenson L.A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A.,

- Etinger A., Mechoulam R. // *Science.* 1992. V. 258. P. 1946–1949.
- Raskova H., Masek K. // *Therapie.* 1967. V. 22. P. 1241–1246.
- Raskova H., Masek K., Linet O. // *Toxicol.* 1972. V. 10. P. 485–490.
- Kruszhka K.K., Gross R.W. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 14345–14348.
- Devane W.A., Axelrod J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 6698–6701.
- Deutsch D.G., Chin S.A. // *Biochem. Pharmacol.* 1993. V. 46. P. 791–796.
- Janusz J.M., Buckwalter B.L., Young P.A., LaHann T.R., Farmer R.W., Kasting G.B., Loomans M.F., Kerckhaert G.A., Maddin C.S., Berman E.F., Bohne R.L., Cupps T.L., Millstein J.R. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 35. P. 2595–2606.
- Bezuglov V.V. // IUPAC Third International Symposium on Bioorganic Chemistry. Dagomys, Russia, 1995. Abstracts. P. 25.
- Безуглов В.В., Арчаков А.В., Бобров М.Ю., Козмева Г.С., Маневич Е.М. // *Биоорган. химия.* 1996. Т. 22. С. 883–885.
- Dratewka-Kos E., Kindl B., Tinker D.O., Hsia J.C. // *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 1985. V. 63. P. 792–802.
- Brass L.W. // *Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry, and Pathology* / Ed. G.A. Jamieson. N.Y.: A.R. Liss, Inc. 1988. P. 441–492.
- Colman R.W., Puri R.N., Zhou F., Colman R.F. // *Platelet Membrane Receptors: Molecular Biology, Immunology, Biochemistry, and Pathology* / Ed. G.A. Jamieson. N.Y.: A.R. Liss, Inc. 1988. P. 263–277.
- Бузников Г.А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. М.: Наука, 1967. 265 с.
- Buznikov G.A. *Neurotransmitters in Embryogenesis.* Chur.: Harwood Acad. Publ., 1990. 526 p.
- Olds J.L., Favit A., Nelson T., Ascoli G., Gerstein A., Cameron M., Cameron L., Lester D.S., Rakow T., Debarry J., Yoshioka T., Freyberg Z., Baru J., Alkon D.L. // *Devel. Biol.* 1995. V. 172. P. 675–682.
- Khan W.A., Blobe G.C., Hannun Y.A. // *Cell. Signalling.* 1995. V. 7. P. 171–184.
- Ueda N., Yamamoto K., Yamamoto S., Tokunaga T., Shirakawa W., Shinkai H., Ogawa M., Sato T., Kudo I., Inoue K., Takizawa H., Nagano T., Hirobe M., Matsuki N., Saito H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1254. P. 127–134.
- Бобров М.Ю., Арчаков А.В., Козмева Г.С., Фомина-Агеева Е.В., Зинченко Г.Н., Грецкая Н.М., Кузнецов Д.В., Безуглов В.В. // *Биоорган. химия.* 1996. Т. 22. С. 880–882.
- Hampson A.J., Hill W.A., Zan-Phillips M., Makriyanis A., Leung E., Eglen R.M., Bornheim L.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1259. P. 173–179.
- Velez Pardo C., Jimenez del Rio M., Pinxteren J., De Potter W., Ebinger G., Vauquelin G. // *Eur. J. Pharmacol.* 1995. V. 288. P. 209–218.

24. Kennedy S.H., Manevich Y., Biaglow J.E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 212. P. 118–125.
25. Biaglow J.E., Held K.D., Manevich Y., Kachur A., Tuttle S., Uckun F. // *Radiat. Res.* 1996. V. 145. P. 554–562.
26. Лакин К.М., Макаров В.А., Ковалев С.Г., Петрухина Г.Н., Серков И.В., Голованова Н.К., Безуглов В.В. // *Эксперим. и клин. фармакол.* 1994. Т. 57. С. 39–41.
27. Buznikov G.A., Podmarev V.G. // *Animals Species for Developmental Studies*. V. 1 Invertebrates, ch. 10 // Eds T.A. Detlaf, S.G. Vassetzky. N.Y.: Consultants Bureau, 1990. P. 253–285.

Artificially Functionalized Polyenoic Fatty Acids as New Lipid Bioregulators

V. V. Bezuglov*, Y. Manevich**, A. V. Archakov*, M. Yu. Bobrov*, D. V. Kuklev*, G. N. Petrukhina***, V. A. Makarov***, and G. A. Buznikov****

* *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

** *Radiation Oncology Department, Medical School, University of Pennsylvania, USA*

*** *Hematology Scientific Center, Russian Academy of Medical Sciences*

**** *Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences*

Abstract—Dopamine, histamine, serotonin, and serotonin analogs were acylated with arachidonic and eicosapentaenoic acids, and the reaction products were named as artificially functionalized fatty acids (AFFA). The amides of arachidonic acid with serotonin, dopamine, and histamine were found to inhibit human platelet aggregation induced by ADP, arachidonic acid and adrenaline. Amides of arachidonic and eicosapentaenoic acids with serotonin and dopamine protect sea urchin early embryos against cytotoxic action of serotonin and histamine antagonists. These effects are not connected with the possible hydrolytic cleavage of AFFA to their constituent polyenoic fatty acids and amines. Arachidonic acid dopaminamide was shown to be a substrate of soybean 15-lipoxygenase, whereas the arachidonic acid amides with serotonin and its derivatives were resistant to this enzyme. Moreover, arachidonic acid serotoninamide turned out to be an irreversible lipoxygenase inhibitor. Considerable amount of hydroxyl radicals (fluorescent assay) were found for the first time to accompany lipoxygenase oxidation of linoleic acid; arachidonic acid serotoninamide blocked this process completely. Therefore, it was concluded that AFFA possess specific biological activity and can be considered as a novel group of lipid bioregulators.

Key words: polyenoic fatty acids, amides; arachidonic acid; eicosapentaenoic acid; biogenic amines; lipid bioregulators; soybean lipoxygenase; human platelets; sea urchin embryos.