



УДК 547.392.52.057

АРАХИДОНОИЛЭТИЛЕНГЛИКОЛЬ И ЕГО НИТРОЭФИР – НОВЫЕ КАННАБИМИМЕТИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ: ОКИСЛЕНИЕ 15-ЛИПОКСИГЕНАЗОЙ И ГИДРОЛИЗ ГИДРОЛАЗОЙ АМИДОВ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

© 1998 г. В. В. Безуглов[#], М. Ю. Бобров, Н. М. Грецакая, А. В. Арчаков, И. В. Серков*,
А. П. Феденюк, Е. Ю. Веревокина, Г. С. Когтева, О. Ю. Титова, Д. М. Марванов,
Л. Де Петроцелье**, Т. Бизоньо***, В. Ди Марцо***, Е. Маневич****

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

*Институт физиологически активных веществ РАН, Чернозловка Московской обл.;

**Институт кибернетики, ЦНИ, Неаполь, Италия;

***Институт химии биологически важных молекул, ЦНИ, Неаполь, Италия;

****Отдел радиационной онкологии медицинского факультета, Университет Пенсильвании, США

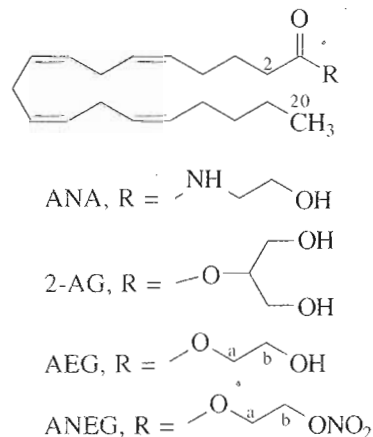
Поступило в редакцию 19.08.98 г. Принято к печати 25.08.98 г.

Описан синтез арахидоноилэтиленгликоля (AEG) и 1-О-арахидоноил-2-О-нитроэтиленгликоля (ANEG). Предварительное испытание обоих соединений в тетраде каннабимиметических тестов *in vivo* показало их сильное каннабиноидподобное действие. AEG образует под действием 15-липоксигеназы продукты одинарной и двойной липоксигенации, тогда как ANEG – плохой субстрат этого фермента. AEG претерпевает гидролиз анандамидамидогидролазой в клетках мышечной нейробластомы N18TG2 и ингибирует соответствующий гидролиз анандамида. Предполагается, что AEG может являться новым природным членом семейства эндоканнабиноидов.

Ключевые слова: эндоканнабиноиды; анандамид; 2-арахидоноилглицерин; арахидоноилэтиленгликоль; окись азота; липоксигеназа соевых бобов; гидролаза амидов жирных кислот.

Эндоканнабиноиды – недавно открытый новый тип липидных биоэффекторов [1, 2]. Они представлены главным образом анандамидом (этаноламид арахидоновой кислоты) – первичным эндогенным лигандом центрального каннабиноидного (CB1) рецептора и 2-арахидоноилглицерином – лигандом для каннабиноидных рецепторов обоих подтипов (CB2 и CB1) (см. обзоры [3, 4]). Совмещение структур ANA и AG приводит к молекуле арахидоноилэтиленгликоля, в которой амидная функция ANA замещена сложноэфирной, а одна гидроксиметиленовая группа AG замещена водородом. При очевидных сходствах с эндоканнабиноидами AEG изучен весьма слабо. В литературе есть лишь указание, что “арахидоноилэтиленгликоль имеет подобную 2-арахидоноилглицерину связывающую активность” в тесте на ингибирование специфического связывания радиоактивного агониста ANA (³H)CP55940) с синаптосомаль-

ными мембранами [5], но подробности химического синтеза или фармакологии AEG не были опубликованы. Мы синтезировали AEG, а также его нитроэфир и определили их активность в тетраде тестов на животных, широко используемых для характеристики каннабимиметического потенциала химических соединений [6]. ANEG может ферментативно расщепляться в организме с высвобождением AEG и, подобно другим органическим нитратам [7], – окиси азота (NO).



Сокращения: AA – арахидоновая кислота; AEG – арахидоноилэтиленгликоль; AG – 2-арахидоноилглицерин; ANA – анандамид; ANEG – 1-О-арахидоноил-2-О-нитроэтиленгликоль; FAAH – гидролаза амидов жирных кислот.

[#] Автор для переписки (факс: 7(095)335-71-03; e-mail: vvbez@oxylipin.siobc.ras.ru).

Результаты испытаний AEG и ANEG в тестах “каннабиноидной тетрады”*

Тест	Контроль	Соединение	
		AEG (I)	ANEG (II)
“Горячая пластинка” (время задержки болевой реакции), %	100	148 ± 26	159 ± 26
“Открытое поле” (число секторов, пересеченных с 3-й по 15-ю мин после инъекции)	57.6 ± 11.5 (I) 34.6 ± 8.3 (II)	2.4 ± 1.8	4.6 ± 1.5
“Кольцо” (время в неподвижности в течение 5 мин наблюдения), с	29.5 ± 7.5	210.6 ± 33.6	185.5 ± 15.4
Падение ректальной температуры через 10 мин после инъекции (относительно исходных значений), °C	-	-2.5 ± 0.58	-2.62 ± 0.5

* Использовали самок мышей (СВА, вес 18–25 г, 4–5 на группу), адаптированных в течение 24 ч к условиям лабораторного помещения. Соединения (0.1% в смеси Твин 20 – физраствор, 1 : 19) вводили внутривенно одной дозой (10 мг/кг) по 100 мкл на 10 г веса тела.

Синтез АЕГ осуществлен через фторангидрид (метод А) или хлорангидрид (метод Б). Согласно методу А арахидоновую кислоту (Fluka, Швейцария) обрабатывали избытком цианурфторида (ацетонитрил, пиридин, 23°C, 1 ч) и далее – избытком этиленгликоля (ацетонитрил, пиридин, 23°C, 12 ч) в присутствии 1 экв. диметиламинопиридина. Продукт выделяли колоночной хроматографией на Kieselgel 60 (Fluka) в градиентной системе: бензол–этилацетат, что давало чистый АЕГ (вязкое бесцветное масло, выход 60%), R_f 0.44 (бензол–этилацетат, 4 : 1). Масс-спектр (электронный удар), m/z : 348 (M^+ , 26%). ¹H-ЯМР (CDCl₃; δ, м.д., J, Гц) 0.9 (3H, т, $J_{20,19}$ 7, H₂₀), 1.30 (4H, м, H₁₈, H₁₉), 1.36 (2H, м, H₁₇), 1.69 (2H, м, H₃), 2.07 (4H, м, H₄, H₁₆), 2.34 (2H, т, $J_{2,3}$ 8, H₂), 2.81 (6H, м, H₇, H₁₀, H₁₃), 3.85 (2H, т, $J_{b,a}$ 5, H_b), 4.23 (2H, т, $J_{a,b}$ 5, H_a), 5.36 (8H, м, H₅, H₆, H₈, H₉, H₁₁, H₁₂, H₁₄, H₁₅). По методу Б арахидоновую кислоту превращали в хлорангидрид (SOCl₂ и бензол, 23°C, 2 ч), который реакцией с этиленгликолем (2 экв.) и NEt₃ (2.2 экв.) (THF, 23°C, 12 ч) давал АЕГ (выход 74% после хроматографии).

ANEG синтезировали из арахидоновой кислоты и мононитрата этиленгликоля по методу Б с заменой THF на бензол с выходом 86% (после хроматографии); бесцветное вязкое масло, R_f 0.62 (гексан–эфир, 4:1). Масс-спектр, m/z : 393 (M^+ , 2%). ¹H-ЯМР аналогичен спектру АЕГ, за исключением сигналов H_a- и H_b-протонов [соответственно 4.37 (2H, т, $J_{a,b}$ 5, H_a), 4.67 (2H, т, $J_{b,a}$ 5, H_b)].

С целью выявить сходство в биологической активности с анандамидом синтезированные соединения были испытаны в тетраде тестов *in vivo*, включающих: а) ингибирование локомоторной активности в тесте “открытое поле” [8], б) индукцию каталепсии, измеряемую с помощью кольца [9],

в) индукцию ректальной гипотермии [10] и г) изменение антиноцицептивной активности на “горячей пластинке” [11], выполненных согласно описанным методикам с небольшими изменениями.

Оба изученных соединения показали выраженное, сходное с ANA каннабиноидподобное действие во всех тестах, вызывая анальгезию (тест “горячая пластинка”), каталепсию (тест с кольцом), гипотермию и резко снижая локомоторную активность (тест “открытое поле”) (см. таблицу). Эффекты АЕГ и ANEG были дозозависимы. Например, в тесте “горячая пластинка” относительное время задержки болевой реакции в 112 ± 8.1, 148 ± 5.2 и 164 ± 2.6% (от контроля) было получено при дозах 2.5, 5 и 20 мг/кг АЕГ соответственно. Положительный ответ АЕГ и ANEG во всех четырех тестах “каннабиноидной тетрады” [6] позволил нам заключить, что оба соединения обладают истинной каннабимиметической активностью.

Недавно было показано, что ANA может вовлекаться в окислительный метаболизм под действием различных типов липоксигеназ с образованием оксилипиноподобных продуктов [12, 13]. Некоторые из образующихся при этом этаноламидов оксилипинов отличаются по биологической активности от ANA [12]. Липоксигеназное окисление ANA можно рассматривать как важную метаболическую связь между оксилипинами и эндоканнабиоидами. Мы изучили возможность вовлечения АЕГ и его нитроэфира в окислительный метаболизм и нашли, что АЕГ легко окисляется 15-липоксигеназой *soi* в условиях, описанных ранее [13, 14], образуя 2 основных продукта, которые могут быть разделены с помощью оФВЭЖХ (рис. 1а). Продукт из фракции 2 имел характерный для моногидрокси-оксилипинов УФ-спектр (λ_{max} 237 нм). Основываясь на хроматографических и спектральных параметрах продукта фракции 2, мы приписали ему

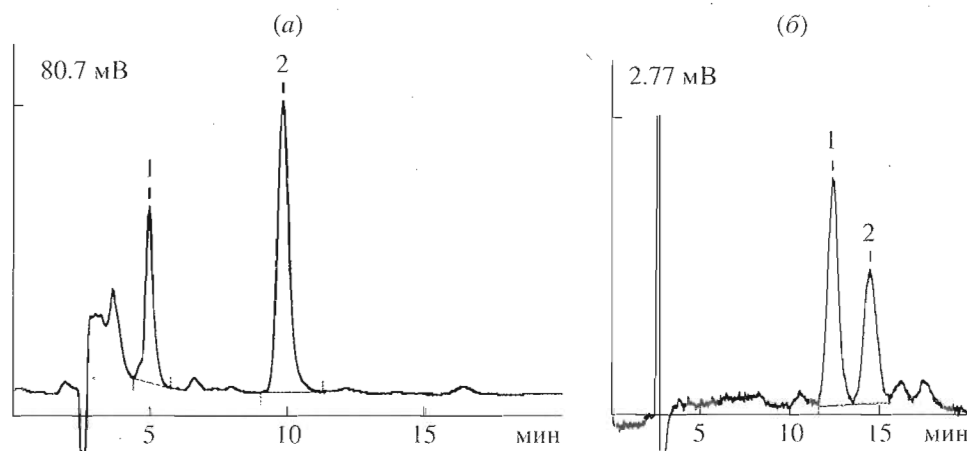


Рис. 1. офВЭЖХ реакционной смеси после 45 мин инкубации АЕГ (24 мкг/мл) с 4 мкг/мл соевой липоксигеназы (тип I, Sigma, США, pH 9.0, 23°C) (а) и рехроматография фракции 1 рисунок а (б). Колонка – Ultrapak ODS 10.0 мкм (4.0 × 250 мм); элюент – MeOH–вода–CH₃COOH, 70:30:0.02 (а) и 60:40:0.02 (б), скорость элюции 1 мл/мин; детектор – 235 нм (а) и 270 нм (б).

структуру этиленгликолевого эфира 15-гидрокси-5,8,11,13-эйкозатетраеновой кислоты. Фракция 1 оказалась не гомогенной и при хроматографии в менее полярной ВЭЖХ-системе (рис. 1б) была разделена на 2 компонента, имеющих поглощение в УФ-области, характерное для 8,15- (пик 1) и 5,15-дигидроксиэйкозатетраеновой (пик 2) кислот или их производных, содержащих сопряженный триеновый (λ_{\max} 280 нм) и дисеновый хромофор (λ_{\max} 240 нм) соответственно. Мы предположили для соединений, соответствующих пикам 1 и 2 (рис. 1б), структуры этиленгликолевых эфиров 8,15-дигидрокси-5,9,11,13-эйкозатетраеновой и 5,15-дигидрокси-6,8,11,13-эйкозатетраеновой кислот.

Образование дигидроксипродуктов в ходе липоксигеназной реакции ранее было отмечено для

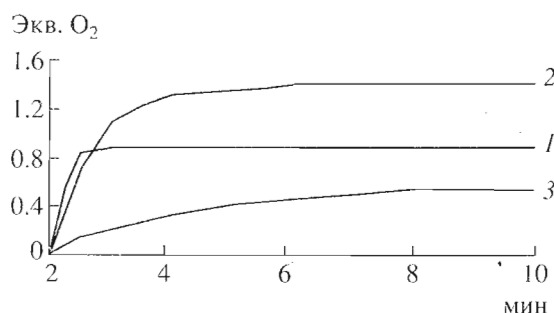


Рис. 2. Поглощение O₂ при окислении линолевой кислоты (1), АЕГ (2) и АНЕГ (3) 15-липосигеназой из соевых бобов (10000 ед. акт., Sigma, США, pH 9.0, 37°C). Субстрат вводили в этанольном растворе до конечной концентрации 72, 56 и 50 мкМ для случаев 1, 2 и 3 соответственно; концентрация спирта в среде ≤ 0.4%. Графики скорректированы на дрейф базовой линии.

АА [15] и АНА [13] при молярном соотношении субстрат–фермент ≤ 500 [13]. Мы нашли, что в случае АЕГ образуется более 50% дигидроксипроизводных даже при использовании 1000-кратного молярного избытка субстрата, тогда как АА в этих условиях их практически не дает. Образование дигидроксипродуктов из АА под действием липоксигеназы, если и происходит, то протекает относительно медленно (менее 1% за 30 мин), тогда как двойная липоксигенация АЕГ с тем же самым ферментом осуществляется уже при смешении реагентов.

Начальный наклон кинетических кривых для липоксигеназного окисления линолевой кислоты (природного субстрата соевой 15-липосигеназы) и АЕГ (измерение по поглощению O₂ по методике [14], рис. 2) были очень близки, однако общий расход O₂ для реакции с АЕГ был в 1.6 раз выше. Кинетика ферментативного окисления аналога АЕГ – АНЕГ была, напротив, атипична для субстратов липоксигеназ; общее поглощение O₂ при этом составляло только половину значения для линолевой кислоты (рис. 2). ВЭЖХ-анализ инкубационной смеси липоксигеназного окисления АНЕГ не показал наличия продуктов, соответствующих по количеству поглощенному кислороду. В настоящее время у нас нет объяснений причин этого явления. Следует подчеркнуть, что резко увеличенное по сравнению с АА количество дигидроксипродуктов наряду с высокой скоростью их образования, отмеченные нами при 15-липосигенажном окислении АЕГ, не были описаны до сих пор в литературе ни для одного из изученных субстратов этого фермента.

Отчетливые каннабимиметические свойства АЕГ позволили предположить, что это соединение, имеющее строение, промежуточное между

структурами ANA и AG, может претерпевать гидролиз под действием FAAH, инактивирующей как ANA [1], так и AG [16]. В качестве источника FAAH мы использовали мембранные препараты из клеток мышины нейробластомы N18TG2, выделенные как описано ранее [17, 18]. Мы показали, что при инкубации AEG с мембранным препаратом до 15% AEG гидролизовалось за 30 мин с образованием свободной AA (ТСХ-анализ, Kieselgel 60, Merck, Германия, система хлороформ–MeOH–аммиак, 85 : 15 : 1, R_f 0.72 и 0.15 для AEG и AA соответственно).

Исходя из этих данных, не было неожиданным обнаружение способности AEG ингибировать гидролиз ANA и AG в клетках N18TG2, что было определено согласно [18]. В присутствии 50 мкМ AEG степень гидролиза [^{14}C]ANA и [^3H]AG препаратом FAAH из клеток N18TG2 снижалась до 22.5 ± 0.3 и $68.3 \pm 6.4\%$ соответственно. Мы также нашли, что ингибирующее действие AEG в этом эксперименте падает вплоть до нуля при добавлении [^{14}C]ANA в возрастающих концентрациях, что указывает на конкурентный характер ингибирования. Кажущаяся константа Михаэлиса (K_m) для [^{14}C]ANA при этом увеличивалась без изменения значений кажущейся максимальной скорости (V_{\max}) (более подробно см. [19]).

Ранее было описано, что в различных природных источниках содержатся в определяемых количествах диольные липиды с этиленгликолем вместо глицерина в качестве полиатомного спирта [20, 21]. Однако до настоящего времени нет данных о нахождении AEG в живых организмах. Принимая во внимание каннабимиметические свойства AEG, его способность связываться с СВ1-рецептором [5], его гидролиз специфическим ферментом дезактивации ANA, а также свойства AEG как конкурентного ингибитора этого фермента и, наконец, легкость окисления AEG липоксигеназой, мы предполагаем, что AEG может присутствовать в некоторых организмах и выполнять функции лиганда каннабиноидных рецепторов, будучи более стабильным к гидролитической инактивации, чем ANA. Результаты настоящего исследования показывают также, что этерификация AEG азотной кислотой (ANEG) резко снижает его способность окисляться 15-липксигеназой, существенно не влияя на его каннабимиметические свойства. По всей видимости, AEG является удобным шаблоном в синтезе новых аналогов эндоканнабиноидов для их использования при изучении отношений структура–активность.

Работа частично поддержана грантами INTAS (№ 96-0987), РФФИ (№ 96-0449191) и Human Frontier Science Program (RG 26/95 для ВДМ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Mechoulam R., Ben-Shabat S., Hanuš L., Ligumsky M., Kaminski N.E., Schatz A.R., Gopher A., Almog S., Martin B.R., Compton D.R., Pertwee R.G., Griffin G., Bayewitch M., Barg J., Vogel Z. // *Biochem. Pharmacol.* 1995. V. 50. P. 83–90.
3. Безуглов В.В., Бобров М.Ю., Арчаков А.В. // *Биохимия*. 1998. Т. 63. С. 27–37.
4. Ду Марцо В. // *Биохимия*. 1998. Т. 63. С. 16–26.
5. Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A., Nakane S., Shinoda A., Itoh K., Yamashita A., Waku K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 512. P. 89–97.
6. Martin B.R., Compton D.R., Thomas B.F., Prescott W.R., Little P.J., Razdan R.K., Johnson M.R., Melvin L.S., Mechoulam R., Ward S.J. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991. V. 40. P. 471–478.
7. Feelisch M. // *Clinical Relevance of Nitric Oxide in the Cardiovascular System* / Eds S. Moncada, E.A. Higgs, J.R. Berrazuela. Madrid: Edicomplet, S.A. 1991. P. 29–43.
8. Romero J., Garsia L., Cebeira M., Zadrozny D., Fernandez-Ruiz J., Ramos J. // *Life Sciences*. 1995. V. 56. P. 2033–2040.
9. Pertwee R.G. // *Br. J. Pharmacol.* 1972. V. 46. P. 753–763.
10. Seltzman H.H., Fleming D.N., Thomas B.F., Gilliam A.F., McCallion D.S., Pertwee R.G., Compton D.R., Martin B.R. // *J. Med. Chem.* 1997. V. 40. P. 3626–3634.
11. Janusz J.M., Buckwalter B.L., Young P.A., LaHann T.R., Farmer R.W., Kasting G.B., Loomans M.E., Kerck-aert G.A., Maddin C.S., Berman E.F., Bohne R.L., Cupps T.L., Milstein J.R. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. P. 2595–2604.
12. Ueda N., Yamamoto K., Yamamoto S., Tokunaga T., Shirakawa E., Shinkai H., Ogawa M., Sato T., Kudo I., Inoue K. et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1995. V. 1254. P. 127–134.
13. Бобров М.Ю., Арчаков А.В., Козмева Г.С., Фомина-Агеева Е.В., Зинченко Г.Н., Грецкая Н.М., Куклев Д.В., Безуглов В.В. // *Биоорганическая химия*. 1996. Т. 22. С. 875–877.
14. Безуглов В.В., Маневич Е., Арчаков А.В., Бобров М.Ю., Куклев Д.В., Петрухина Г.Н., Макаров В.А., Бузников Г.А. // *Биоорганическая химия*. 1997. Т. 23. С. 211–220.
15. Van Os C.P.A., Rijke-Schilder G.P.M., Halbeek H., Verhagen J., Vliegthart J.F.G. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1981. V. 663. P. 177–193.
16. Goparaju S.K., Ueda N., Yamaguchi H., Yamamoto S. // *FEBS Lett.* 1998. V. 422. P. 69–73.
17. Maurelli S., Bisogno T., De Petrocellis L., Di Luccia A., Marino G., Di Marzo V. // *FEBS Lett.* 1995. V. 377. P. 82–86.
18. Bisogno T., Maurelli S., Melck D., De Petrocellis L., Di Marzo V. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 3315–3323.

19. Bisogno T., Melck D., De Petrocellis L., Bobrov M.Yu., Greetskaya N.M., Bezuglov V.V., Sitachitta N., Gerwick W.H., Di Marzo V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 248. P. 515–522.
20. Bergelson L.D. // *Fette Seifen Anstrichm.* 1973. V. 75. P. 89–96.
21. Baumann W.G., Schupp E., Lin J.-T. // *Biochemistry.* 1975. V. 14. P. 841–847.

Arachidonylethylene glycol and its Nitroester as New Cannabimimetics: Oxidation by 15-Lipoxygenase and Hydrolysis by Fatty Acid Amide Hydrolase

V. V. Bezuglov[#], M. Yu. Bobrov^{*}, N. M. Greetskaya^{*}, A. V. Archakov^{*}, I. V. Serkov^{**}, A. P. Fedenyuk^{*}, E. Yu. Verevokhina^{*}, G. S. Kogteva^{*}, O. Yu. Titova^{*}, D. M. Marvanov^{*}, L. De Petrocellis^{***}, T. Bisogno^{****}, V. Di Marzo^{****}, and Y. Manevich^{*****}

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

^{**}Institute of Physiologically Active Substances, Russian Academy of Sciences, Russia

^{***}Istituto di Cibernetica, C. N. R., Napoli, Italy

^{****}Istituto per la Chimica di Molecole di Interesse Biologico, C. N. R., Napoli, Italy

^{*****}Department of Radiation Oncology, Medical School, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA

Arachidonylethylene glycol (AEG) and 1-*O*-arachidonoyl-2-*O*-nitroethylene glycol (ANEG) were synthesized. Both compounds were preliminarily tested *in vivo* in the tetrad of cannabimimetic tests and showed strong cannabimimetic activities. 15-Lipoxygenase converted AEG into single and double lipoxygenation products, whereas ANEG turned out to be a poor substrate for this enzyme. AEG was capable of hydrolysis by anandamide amidohydrolase in mouse neuroblastoma N18TG2 cells and of the inhibition of corresponding anandamide hydrolysis. It is suggested that AEG may be a new natural endocannabinoid.

Key words: endocannabinoids, anandamide, 2-arachidonoylglycerol, arachidonylethylene glycol, nitric oxide, soybean lipoxygenase, fatty acid amide hydrolase

[#] To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 335-7103; e-mail: vvbez@oxylipin.siohc.ras.ru.