



УДК 547.392.52.057

АРАХИДОНОИЛХОЛИН И *N,N*-ДИМЕТИЛАМИНОЭТИЛАРАХИДОНАТ – НОВЫЕ ХОЛИНЭРГИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА

© 2001 г. В. В. Безуглов[#], Г. Н. Зинченко, Л. А. Никитина*, Г. А. Бузников*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Поступило в редакцию 13.12.2000 г. Принято к печати 11.01.2001 г.

Описан синтез холинового и *N,N*-диметиламиноэтилового эфиров арахидоновой и других жирных кислот. С использованием зародышей и личинок морских ежей в качестве объекта, чувствительно к холинэргическим соединениям, показано, что арахидоноилхолин обладает выраженной активностью холиномиметика, подобного никотину, тогда как *N,N*-диметиламиноэтиларахидонат действовал как антагонист ацетилхолина. Сходные свойства отмечены также и у соответствующих эфиров докозагексаеновой кислоты.

Ключевые слова: никотин; арахидоновая кислота; холиновые эфиры; морской еж.

С открытием эндоканнабиноидов – анандамида (этаноламид арахидоновой кислоты) и 2-арахидоноилглицерина, являющихся эффекторами каннабиноидной системы регуляции в организме [1, 2], – вновь повысился интерес к амидам и эфирам полиеновых жирных кислот. Действительно, *N*-арахидоноилные производные дофамина [3], серотонина [3], ванилиламина [4] и других биогенных аминов оказались высоко биологически активными соединениями (см. обзор [5]) и некоторые из них рассматриваются как возможные эндогенные регуляторы [6, 7].

Эфиры арахидоновой кислоты также биологически активны. Так, ее этиленгликолевый и нитроэтиленгликолевый эфиры обладают выраженной каннабимиметической активностью [8]. Докозагексаенат аскорбиновой кислоты стимулирует активность фосфатидилхолинспецифичной фосфолипазы С в клетках рака легких человека [9]. Докозагексаеноилхолин (DHA-Chol), испытанный в этом же тесте, также проявлял умеренную стимулирующую активность [9].

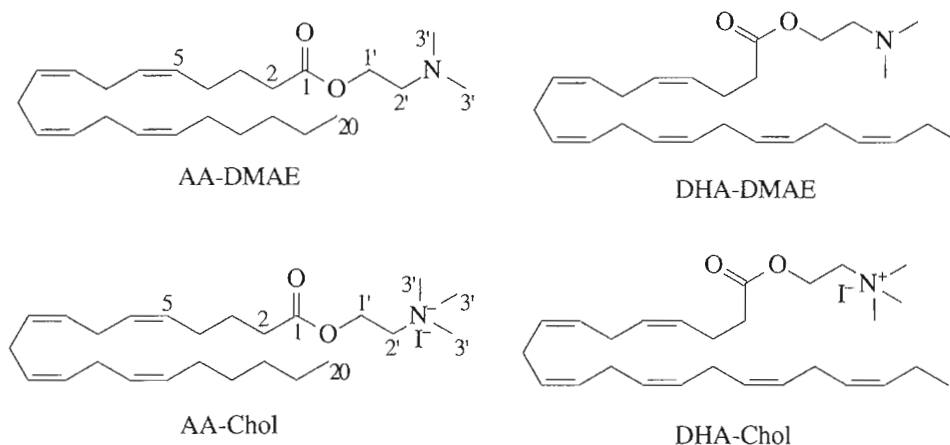
Несмотря на то что синтез DHA-Chol был описан в патентной литературе (Shasiiqua V.E. РСТ WO 99/26620), это производное использовалось лишь как растворимая форма докозагексаеновой

кислоты, а возможные холинэргические свойства DHA-Chol и холиновых эфиров других полиненасыщенных жирных кислот (в первую очередь арахидоновой кислоты) оставались вне зоны внимания исследователей. Чтобы заполнить этот пробел, мы синтезировали холиновые эфиры арахидоновой и докозагексаеновой кислот через соответствующие эфиры с *N,N*-диметиламиноэтанолом (DMAE-эфиры) и изучили возможное холинэргическое действие как холиновых, так и DMAE-эфиров. В качестве объекта для исследования мы использовали зародыши и личинки морского ежа, удобные тем, что, обладая функционально активной холинэргической системой, они отвечают разнообразными аномалиями развития на действие холинэргических веществ [10, 11].

AA-DMAE получали обработкой хлорангидрида арахидоновой кислоты [8] *N,N*-диметиламиноэтанолом (1 экв.) в бензоле в присутствии триэтиламина (2 экв.) при комнатной температуре (24 °C). После экстракции реакционной смеси этилацетатом и хроматографической очистки на силикагеле получали DMAE-эфир с выходом 60% в виде желтого вязкого масла. R_f 0.35 (бензол–ацетон, 5 : 1). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; δ , м.д., J, Гц) 0.87 (3H, т, J 6.8, H₂₀), 1.28 (4H, м, H₁₈; H₁₉), 1.33 (2H, м, H₁₇), 1.66 (2H, квинт, J 7.5, H₃), 2.01 (2H, дт, J 6.4; 7.6, H₁₆), 2.08 (2H, дт, J 6.5; 6.8, H₄), 2.21 (6H, с, H_{3'}), 2.26 (2H, т, J 7.4, H₂), 2.48 (2H, т, J 6.2, H_{2'}), 2.75 (6H, м, H₇; H₁₀; H₁₃), 4.09 (2H, т, J 6, H_{1'}), 5.29 (8H, м, H₅; H₆; H₈; H₉; H₁₁; H₁₂; H₁₄; H₁₅). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; δ , м.д.) 14.3 (C₂₀); 22.7 (C₁₉); 24.8, 25.7 (C₃); 26.7, 27.3, 29.4, 31.6 (C₃; C₄; C₇; C₁₀; C₁₃);

Сокращения: AA-DMAE – *N,N*-диметиламиноэтиларахидонат; DHA-DMAE – *N,N*-диметиламиноэтилдакозагексаенат; AA-Chol – арахидоноилхолин; DHA-Chol – докозагексаеноилхолин; DMAE-эфиры – эфиры с *N,N*-диметиламиноэтанолом.

[#]Автор для переписки (факс: 7 (095) 3357103; e-mail: vvbez@oxylin.ibch.ru).



C16; C17; C18); 33.5 (C2); 45.7 (C3'); 57.9 (C2'); 61.7 (C1'); 127.7, 127.9, 128.2, 128.6 (2C); 128.9, 129.0, 130.3 (C5; C6; C8; C9; C11; C12; C14; C15); 172.5 (C1).

Для получения AA-Chol раствор AA-DMAE (0.07 ммоль) в 1 мл ацетона обрабатывали йодистым метилом (0.48 ммоль) 2 ч при комнатной температуре, затем растворитель упаривали, остаток высушивали в вакууме масляного насоса. Получили AA-Chol (выход 96%) в виде твердого вещества бежевого цвета. R_f 0.28 (хлороформ–метанол, 5 : 1). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 ; δ , м.д., J, Гц) 0.84 (3H, т, J 6.7, H20), 1.25 (4H, м, H18; H19), 1.31 (2H, м, H17), 1.66 (2H, квинт, J 7.5, H3), 2.01 (2H, дт, J 7.0; 7.8, H16), 2.07 (2H, дт, J 6.8; 7.6, H4), 2.36 (2H, т, J 7.6, H2), 2.76 (6H, м, H7; H10; H13), 3.51 (9H, с, H3'), 4.07 (2H, м, H2'), 4.55 (2H, уш. т, H1'), 5.32 (8H, м, H5; H6; H8; H9; H11; H12; H14; H15). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 ; δ , м.д.) 14.0 (C20); 22.4 (C19); 24.4, 25.5 (3C); 26.3, 27.1, 29.2, 31.4 (C3; C4; C7; C10; C13; C16; C17; C18); 33.4 (C2); 54.7 (C3'); 57.7 (C2'); 65.2 (C1'); 127.4, 127.7, 127.9, 128.3, 128.5 (2C); 129.1, 130.4 (C5; C6; C8; C9; C11; C12; C14; C15); 172.4 (C1). Аналогично были синтезированы DHA-DMAE и DHA-Chol, физико-химические характеристики которых были близки описанным ранее.

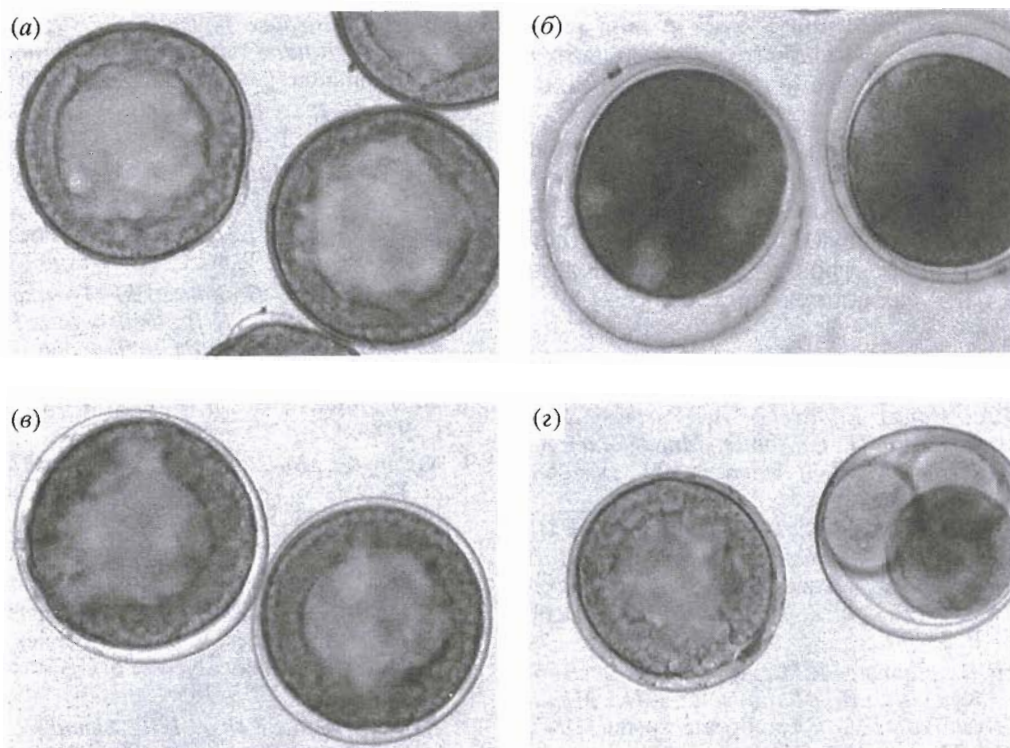
Холинэргические свойства синтезированных веществ изучали на зародышах и личинках морских ежей *Strongylocentrotus droebachiensis* и *S. purpuratus*, инкубируемых при 8°C в искусственной морской воде (445 мМ NaCl, 26.7 мМ MgCl_2 , 18 мМ MgSO_4 , 9.25 мМ KCl, 2.5 мМ NaHCO_3 , 12.9 мМ CaCl_2 , pH 7.4). Техника получения гамет и искусственного оплодотворения была стандартной [11].

Было найдено, что холиновые эфиры полиеновых жирных кислот, внесенные непосредственно после оплодотворения в концентрации 10–20 (AA-Chol) или 15–30 мкМ (DHA-Chol), оказывают сильное цитотоксическое действие, полностью блокируя деления дробления и вызывая лизис зародышей *S. droebachiensis*, инкубируемых в искус-

ственной морской воде полного состава (ср. рисунки а и б). Несколько более низкие концентрации AA-Chol (5–8 мкМ) или DHA-Chol (5–12 мкМ) останавливают развитие и вызывают лизис зародышей на 2–4-клеточной стадии. При концентрациях около 5 мкМ часть зародышей лизируется во время первых делений дробления, а часть развивается относительно нормально по крайней мере до завершения бластуляции (по принципу “все или ничего”). Для ранних зародышей *S. purpuratus* во всех сериях опытов чувствительность к цитотоксическому действию этих веществ была несколько выше, чем у *S. droebachiensis*.

При внесении рассматриваемых веществ (30–40 мкМ) на стадиях поздней бластулы–ранней гастрюлы личинки обездвиживались практически мгновенно и через 2–4 ч после этого начинался их лизис. Несколько более низкие концентрации холиновых эфиров (от 15 до 30 мкМ, в разных опытах по-разному) тормозили движения личинок и вызывали очень заметные аномалии их дальнейшего развития. В основе этих аномалий, по-видимому, лежит трансформация личиночных клеток различного происхождения с приобретением ими нового заведомо ненормального фенотипа, общего для всех этих клеток и пока детально не исследованного. Трансформированные клетки активно выселяются из личинки, образуя компактное экстраларвальное скопление у ее анимального полюса. Это скопление в итоге может включать до 90–95% всех клеток личинки. Судя по относительно нормальному размеру трансформированных клеток, их выселение не сопровождается существенным изменением темпов пролиферации. Насколько нам известно, подобная вызванная или спонтанная аномалия развития в литературе не описана.

DMAE-эфиры полиеновых жирных кислот в концентрациях до 100 мкМ не вызывали каких-либо нарушений развития ни во время делений дробления и бластуляции, ни на более поздних стадиях развития (по крайней мере вплоть до завершения гастрюляции). Более того, эти эфиры



Влияние арахидоноилхолина на деления дробления зародышей *S. droebachiensis*, инкубированных в искусственной морской воде. Исследуемые вещества вносили в инкубационную среду через 15–25 мин после оплодотворения. *a* – контроль без эффекторов; стадия средней бластулы 2; полые сферы, стенка которых представляет собой один слой морфологически одинаковых клеток; *б, в, г* – в присутствии 20 мкМ AA-Chol (*б* – блокада клеточных делений; одноклеточные многоядерные зародыши) с добавлением 20 мкМ AA-DMAE (*в* – полная нормализация развития, стадия средней бластулы 2) или 40 мкМ QX-222 (*г* – развитие нормализовано у ~50% зародышей; у остальных оно шло аномально и остановилось во время первых после оплодотворения клеточных делений). Увеличение в 200.

предотвращали или ослабляли как ранние (рисунок, *в*), так и поздние эффекты AA-Chol и DNA-Chol. При одновременном внесении AA-DMAE и AA-Chol или DNA-Chol исчезало цитотоксическое действие последних. Подопытные зародыши продолжали более или менее нормально делиться и завершали бластуляцию (дальнейшее развитие таких зародышей прослежено не было). Личинки морских ежей, обработанные AA-Chol или DNA-Chol, в присутствии AA-DMAE были способны к нормальной гастрюляции. Все эти защитные эффекты были концентрационно-зависимыми: действие AA-DMAE было наиболее выраженным при концентрации эквимолярной или несколько превышающей концентрацию холинового эфира. Защитное действие DNA-DMAE против AA-Chol или DNA-Chol было менее полным, чем у AA-DMAE, но также вполне достоверным и концентрационно-зависимым.

AA-DMAE и DNA-DMAE, как и исследованные ранее дофамиды и серотонинамиды полиненасыщенных жирных кислот [12, 7], хорошо защищали зародышей морских ежей также и от действия форбол-12-миристиат-13-ацетата (PMA), (Sigma, США) и тандема "PMA+никотин". AA-

DMAE и в этом случае оказался более активным, чем DNA-DMAE.

И ранние, и поздние эффекты холиновых эфиров полиеновых жирных кислот ослабляются или предотвращаются не только DMAE-эфирами, но и некоторыми другими веществами. В частности, вполне достоверное защитное действие оказывали Н-7 (RBI, США) – ингибитор протеинкиназы С и QX-222 (Astra Pharmaceuticals, США) – неконкурентный антагонист никотиновых холинорецепторов (рисунок, *г*). Конкурентный антагонист этих рецепторов имехин (а по предварительным данным и другой конкурентный антагонист – *d*-тубокурарин) не снижал чувствительность зародышей и личинок морских ежей к холиновым эфирам полиеновых жирных кислот (данные не приведены).

Судя по результатам опытов с защитным действием QX-222 и DMAE-эфиров против исследованных холиновых эфиров, как ранние, так и поздние эффекты последних в какой-то степени обусловлены нарушениями донервных функций ацетилхолина. Иными словами, эти эффекты AA-Chol и DNA-Chol, хотя бы отчасти, можно охарактеризовать как холинэргические. А сходство защитного действия QX-222 и DMAE-эфи-

ров позволяет распространить этот вывод и на ДМАЕ-эфиры. Этот вывод, безусловно, является главным результатом рассмотренных фармакологических опытов.

Работа частично поддержана грантом РФФИ (№ 99-04-48514) и грантами Grass Foundation 1998/1999 и 1999/2000 г. Авторы выражают благодарность Э.Н. Бочарову (ИБХ РАН) за помощь в получении ЯМР-спектров и Дэйву МакКлэю (ун-т Дьюка, США) за ценную дискуссию.

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., Маневич Е.М., Арчаков А.В., Бобров М.Ю., Куклев Д.В., Петрухина Г.Н., Макаров В.А., Бузников Г.А. // *Биоорганическая химия*. 1997. Т. 23. С. 215–224.
4. Melck D., Bisogno T., De Petrocellis L., Chuang H.-h., Julius D., Bifulco M., Di Marzo V. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. V. 262. P. 275–284.
5. Безуглов В.В., Бобров М.Ю., Арчаков А.В. // *Биохимия*. 1998. Т. 63. С. 27–37.
6. Pokorsky M., Matysiak Z. // *Medical Hypothesis*. 1998. V. 50. P. 131–133.
7. Бузников Г.А., Безуглов В.В. // *Российский физиологический журнал*. 2000. Т. 86. С. 1093–1108.
8. Безуглов В.В., Бобров М.Ю., Грецакая Н.М., Арчаков А.В., Серков И.В., Феденюк А.П., Веревоичка Е.Ю., Когтева Г.С., Титова О.Ю., Марванов Д.М., Де Петроцельс Л., Бизоньо Т., Ди Марцо В., Маневич Е. // *Биоорганическая химия*. 1998. Т. 24. С. 938–942.
9. Nishio K., Morikage T., Ohmori T., Kubota N., Takeda Y., Ohta S., Yazawa K., Saijo N. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1993. V. 203. P. 200–208.
10. Buznikov G.A. *Neurotransmitters in Embryogenesis*. Chur: Harwood Academic Press, 1990.
11. Buznikov G.A., Podmarev V.I. / *Animal Species for Developmental Studies*. V. 1. Invertebrates / Eds T.A. Detlaf, S.G. Vassetzky. New York: Consultants Bureau, 1990. Ch.10. P. 253–285.
12. Buznikov G.A., Koikov L.N., Shmukler Yu.B., Whitaker M.J. // *Gen. Pharmacol.* 1997. V. 29. P. 49–53.

Arachidonoylcholine and *N,N*-Dimethylaminoethyl Arachidonate, New Cholinergic Compounds

V. V. Bezuglov*, G. N. Zinchenko*, L. A. Nikitina**, and G. A. Buznikov**

e-mail: vvbez@oxylipin.ibch.ru.

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

**Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 117808 Russia

Choline and *N,N*-dimethylaminoethyl esters of arachidonic and some other fatty acids were synthesized. Experiments on the embryos and larvae of sea urchins, sensitive to cholinergic compounds, showed that arachidonoylcholine exhibited cholinomimetic activity similar to that of nicotine whereas *N,N*-dimethylaminoethyl arachidonate acted as an acetylcholine antagonist. The corresponding esters of docosahexaenoic acid displayed similar biological properties. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 3; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: arachidonic acid, nicotine, choline esters, sea urchin