



УДК 547.392.52.057

ФЛУОРЕСЦЕНТНОМЕЧЕННЫЕ ЛИПОФИЛЬНЫЕ АНАЛОГИ СЕРОТОНИНА, ДОФАМИНА И АЦЕТИЛХОЛИНА: СИНТЕЗ, МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2004 г. В. В. Безуглов^{*,#}, Н. М. Грецкая^{*}, С. Е. Есипов^{*}, Н. Б. Поляков^{*}, Л. А. Никитина^{**}, Г. А. Бузников^{**}, ^{***}, Дж. Лаудер^{**}

^{*} Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

^{**} Университет Северной Каролины, Чэпел Хилл, США;

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

Поступила в редакцию 22.10.2003 г. Принята к печати 05.11.2003 г.

Описаны синтезы 4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3 α ,4 α -диаза-*s*-индацен-3-додеканоилсеротонина, дофамина, холина и *N,N*-диметиламиноэтанола с максимумом флуоресценции 512 нм ($\lambda_{\text{возб}}$ 470) и 4,4-дифтор-5,7-дифенил-4-бора-3 α ,4 α -диаза-*s*-индацен-3-додеканоилхолина и *N,N*-диметиламиноэтанола с максимумом флуоресценции 554 нм ($\lambda_{\text{возб}}$ 470). В масс-спектрах ионизации при атмосферном давлении распылением в электрическом поле все соединения дают протонированный молекулярный ион 100%-ной интенсивности. Основным процессом фрагментации молекулярного иона при вторичной масс-спектрометрии было отщепление фрагментов молекул фтористого водорода от флуоресцентного ядра молекулы. В опытах на зародышах и личинках морского ежа *Lytechinus variegatus* показано, что эти вещества хорошо проникают в клетки, аккумулируясь в цитоплазме, и по своей биологической активности не отличаются от соответствующих производных арахидоновой кислоты, описанных нами ранее и являющихся агонистами серотонина или ацетилхолина или антагонистами никотиновых холинорецепторов.

Ключевые слова: никотин; холиновые эфиры; серотонин; дофамин; ацилированные нейротрансмиттеры; морской еж; BODIPY.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение биологических свойств нейротрансмиттеров, ацилированных насыщенными, диеновыми [1, 2] или высшими полиеновыми [3–5] жирными кислотами, показало, что по характеру воздействия на регуляторные системы организма эти вещества значительно отличаются от составляющих их компонентов – жирных кислот и нейротрансмиттеров. Это наблюдение позволило нам сформулировать гипотезу о существовании эндогенных ацилнейротрансмиттеров [3], которая подтвердилась после обнаружения в головном мозге крысы и свиньи арахидоноилдофамина [6]. Ацилнейротрансмиттеры оказались удобными фармакологическими инструментами для изучения роли классических

нейротрансмиттеров в биологических системах. Так, с помощью этих веществ были получены новые сведения о функциональной необходимости донервных нейротрансмиттеров во время первых после оплодотворения клеточных делений (делений дробления) и при переключении генома с материнского на зародышевый уровень у морских беспозвоночных [7–9]. Фармакологические эксперименты на зародышах морских ежей, морских звезд и заднежаберных моллюсков показали, что жирнокислотные производные серотонина, дофамина и холина являются агонистами соответствующих нейротрансмиттеров [7, 10], по видимому, действующими на внутриклеточные рецепторные компоненты донервных нейротрансмиттерных систем [9, 11].

В связи с предположением о внутриклеточной локализации рецепторных компонентов было необходимо доказать, что липофильные производные нейротрансмиттеров действительно способны проникать через клеточные мембраны в цитоплазму эмбриональных клеток. С этой целью были синтезированы флуоресцентномеченные липофильные аналоги серотонина, дофамина и ацетилхолина и *N,N*-диметиламиноламина (рис. 1) и

Сокращения: AA – арахидоновая кислота; BODIPY-FL-C12 – 4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3 α ,4 α -диаза-*s*-индацен-3-додекановая кислота; BODIPY-Rd-C12 – 4,4-дифтор-5,7-дифенил-4-бора-3 α ,4 α -диаза-*s*-индацен-3-додекановая кислота; 5-HT – 5-гидрокситриптамин (серотонин); DA – 3-гидрокситирамин (дофамин); DMAE – *N,N*-диметиламиноэтанол; MS-ESI – масс-спектрометрия с ионизацией при атмосферном давлении распылением в электрическом поле; ИМВ – искусственная морская вода.

[#] Автор для переписки (факс: (095) 3357103; эл. почта: vvbez@oxylipin.ibch.ru).

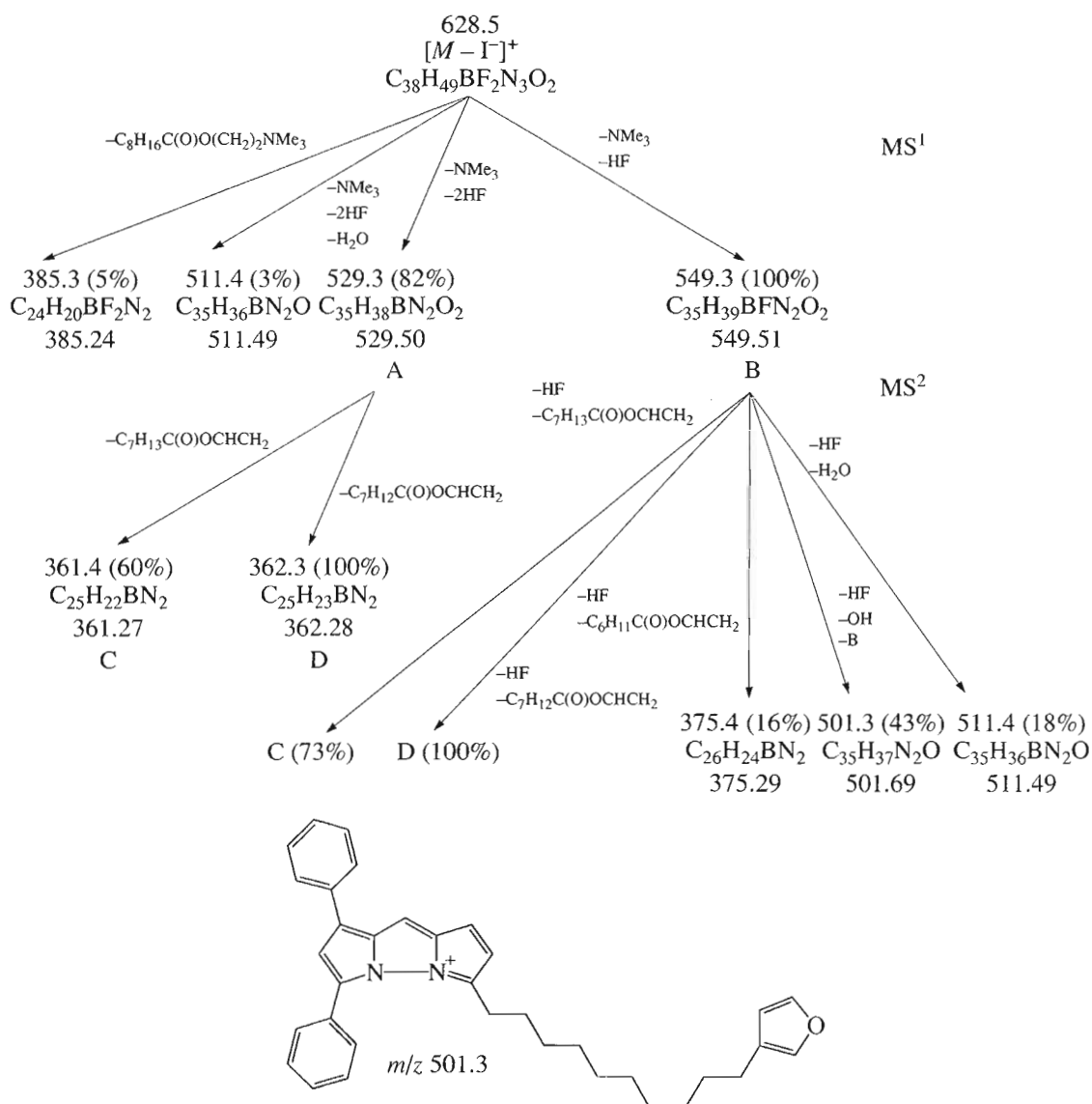


Рис. 1. Вторично-ионная масс-спектрометрия молекулярного иона в спектре MS-ESI соединения (II). Для каждого иона указаны: измеренная масса (*m/z*, а.е.м.), относительная интенсивность (в скобках, % от максимального), элементный состав и рассчитанная масса. MS¹, MS² – масс-спектры первого и второго порядков соответственно.

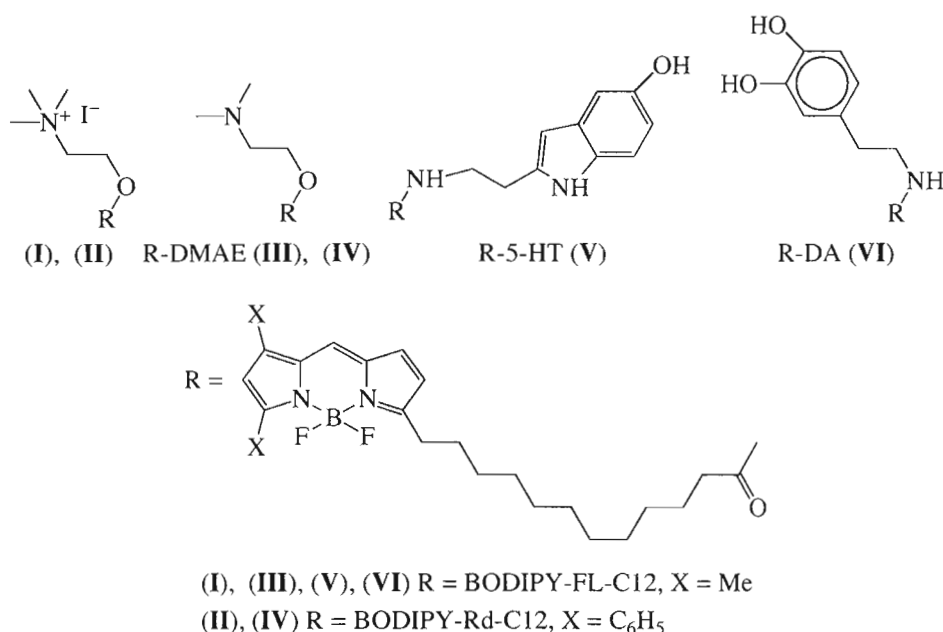
изучена их биологическая активность. Также впервые описаны масс-спектры ионизации при атмосферном давлении распылением в электрическом поле для новых соединений.

Выбор типа флуоресцентной метки в значительной степени определяет корректность результатов, получаемых с ее использованием. Для изучения проникновения флуоресцентного вещества в клетку и его внутриклеточного распределения важными параметрами являются хорошая фотостабильность зонда, нечувствительность к изменениям pH и полярности окружения, а также небольшие размеры его молекулы. Мы остановили свой выбор на известных производных 4,4-дифтор-4-бора-3*a*,4*a*-диаза-*s*-индацена (BODIPY), отвечаю-

щих большинству этих требований [12]. В качестве флуоресцентных зондов, имитирующих жирнокислотную часть ацилированных нейротрансмиттеров, были использованы 4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3*a*,4*a*-диаза-*s*-индацен-3-додекановая (BODIPY-FL-C12) и 4,4-дифтор-5,7-дифенил-4-бора-3*a*,4*a*-диаза-*s*-индацен-3-додекановая кислоты (BODIPY-Rd-C12), которые являются коммерческими продуктами (Molecular Probes, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Холиновые эфиры (I) и (II) синтезировали из соответствующих *N,N*-диметиламиноэтиловых (DMAE) эфиров (III) и (IV) обработкой избытком



иодистого метила в ацетоне. Эфиры (III) и (IV), в свою очередь, получали реакцией соответствующих флуоресцентных кислот с избытком *N,N*-диметиламиноэтанола в присутствии диизопропилкарбодиимида и диметиламинопиридина. Следует отметить, что в этих условиях флуоресцентная кислота быстро превращалась в продукт и другое малополярное вещество, предположительно, являющееся ангидридом, которое частично удалось перевести в целевое вещество добавлением избытка пиридина. Но даже после этого выход реакции не превышал 50%.

Флуоресцентные амиды (V) и (VI) были синтезированы по методу “смешанных ангидридов”, как описано ранее [10], с выходом ~60%. Все соединения были очищены до индивидуального состояния препаративной ТСХ. Спектры флуоресценции полученных производных имели максимумы, характерные для соответствующих флуорофоров:

λ 512 нм для соединений (I), (III), (V), (VI) и λ 554 нм для соединений (II), (IV) при $\lambda_{\text{возб}}$ 470 нм.

Структуры синтезированных соединений были подтверждены с помощью масс-спектрометрии. Была использована техника ионизации при атмосферном давлении распылением в электрическом поле (MS-ESI). В спектрах холиновых эфиров (I) и (II) 100%-ную интенсивность имели сигналы ионов типа $[M - I]^+$, тогда как спектры DMAE-эфиров (III) и (IV) содержали сигналы протонированных ионов $[M + H]^+$ 100%-ной интенсивности. В спектрах амидов серотонина (V) и дофамина (VI) максимальной интенсивностью обладали сигналы кластерных ионов состава $[M + Na]^+$, что связано, по-видимому, с кислотностью гидроксильной группы в индольном кольце и катехольных гидроксильных групп, что позволяет легко удерживать натрий (см. таблицу). Таким образом, в условиях MS-ESI все соединения сохраняли молекулярную структуру без фрагментации.

Ионы максимальной интенсивности в масс-спектрах MS-ESI и вторично-ионной масс-спектрометрии

Соединение	Тип иона; m/z , а.е.м.	Элементный состав; рассчитанная молекулярная масса		Ион в MS ¹ * первого порядка; m/z , а.е.м.		Элементный состав; рассчитанная молекулярная масса	
(I)	$[M - I]^+$ 504.3	C ₂₈ H ₄₅ BF ₂ N ₃ O ₂	504.49	$[M - I - NMe_3 - HF]^+$	425.3	C ₂₅ H ₃₅ BFN ₂ O ₂	425.37
(II)	$[M - I]^+$ 628.5	C ₃₈ H ₄₉ BF ₂ N ₃ O ₂	628.63	$[M - I - NMe_3 - HF]^+$	549.3	C ₃₅ H ₃₉ BFN ₂ O ₂	549.51
(III)	$[M + H]^+$ 490.3	C ₂₇ H ₄₃ BF ₂ N ₃ O ₂	490.46	$[M + H - C_4H_9N - 2HF]^+$	379.3	C ₂₃ H ₃₂ BN ₂ O ₂	379.32
(IV)	$[M + H]^+$ 614.5	C ₃₇ H ₄₇ BF ₂ N ₃ O ₂	614.61	$[M + H - C_4H_9N - 2HF]^+$	503.3	C ₃₃ H ₃₆ BN ₂ O ₂	503.29
(V)	$[M + Na]^+$ 599.6	C ₃₃ H ₄₃ BF ₂ N ₄ NaO ₂	599.52	$[M + Na - HF]^+$	579.3	C ₃₃ H ₄₂ BFN ₄ NaO ₂	579.53
(VI)	$[M + Na]^+$ 576.5	C ₃₁ H ₄₂ BF ₂ N ₃ NaO ₃	576.48	$[M + Na - 2HF]^+$	536.3	C ₃₁ H ₄₀ BN ₃ NaO ₃	536.47

* MS¹ – вторичный масс-спектр первого порядка.

Для получения более полной информации о структуре синтезированных веществ были сняты вторичные масс-спектры при активации столкновением с атомами гелия. Вторичные масс-спектры первого порядка (MS^1) содержали интенсивные сигналы ионов, образующихся отщеплением молекул фтористого водорода от молекулярных ионов (см. таблицу). Так, сигнал иона типа $[M + Na - 2HF]^+$ с m/z 536.3 в спектре MS^1 амида (VI) обладал максимальной интенсивностью, а интенсивность сигналов остальных фрагментных ионов не превышала 5%. Вторичный масс-спектр второго порядка (MS^2) этого иона также содержал практически единственный сигнал иона с m/z 524.8 состава $C_{31}H_{39}N_3NaO_3$ (вычислено: 524.65). В спектре MS^1 амида (V) максимальную интенсивность показывал ион $[M + Na - HF]^+$ с m/z 579.3, а ион с потерей двух атомов фтора ($[M + Na - 2HF]^+$; m/z 559.3) имел интенсивность 62%. Этот же спектр содержал еще один интенсивный сигнал (25%) иона с m/z 537.5 состава $C_{33}H_{42}BN_4O_2$ (вычислено: 537.53). Максимальную интенсивность в спектрах MS^1 DMAE-эфиров (III) и (IV) имели сигналы от дочерних ионов, не содержащих фтор (см. таблицу). Спектры MS^1 холиновых эфиров (I) и (II) содержали по 2 сигнала ионов, образующихся при отщеплении от исходного иона группы NMe_3 и одной или двух молекул фтористого водорода (35 и 82% соответственно).

Рассмотрим более подробно фрагментацию холиновых эфиров на примере соединения (II) (рис. 1). Молекулярный ион с m/z 628.5 дает в масс-спектре первого порядка четыре иона с интенсивностью более 3%. Кроме ионов с m/z 529.3 (A) и 549.3 (B), это дефторированный ион с m/z 511.4, содержащий фурановый фрагмент, а также низкомолекулярный ион (m/z 385.3), представляющий собой фрагмент молекулы флуорофора. Корректность приписанной этому иону структуры подтверждается не только близостью измеренной и рассчитанной масс, но и отсутствием иона этого типа в MS^2 дефторированных ионов A и B. Спектр MS^2 иона A состоял всего из двух сигналов, соответствующих ионам C и D, которые образуются при отщеплении эфирного фрагмента молекулы (рис. 1). Наиболее информативным оказался спектр MS^2 иона B, который содержал 5 основных сигналов. Кроме интенсивных ионов C и D было отмечено образование еще одного гомологичного иона с m/z 375.4, а также двух ионов, возникающих при потере ионом B фрагментов молекул фтористого водорода и воды (m/z 511.4 и 501.3). Предполагаемая структура последнего иона, образующегося при отщеплении атома бора от иона с m/z 511.4, приведена на рис. 1. Таким образом, комбинация техники MS-ESI и вторично-ионной масс-спектрометрии однозначно подтверждает структуры всех синтезированных соединений.

Полученные вещества использовали для изучения их захвата развивающимися зародышами морского ежа. На всех стадиях развития, от одноклеточной стадии до личинок-плутеусов, все исследованные флуоресцентномеченные соединения очень быстро проникали в клетки из искусственной морской воды (ИМВ) и аккумуляровались в цитоплазме, но не в клеточных ядрах (рис. 2а, 3в, 3г). Причем максимальный уровень флуоресценции клеток, оцененный визуально, достигался не позднее, чем через 1 мин после внесения веществ. У живых развивающихся зародышей этот уровень заметно не изменялся, по крайней мере, в течение 24–48 ч. После фиксации зародышей или личинок 4% раствором параформа в ИМВ с последующей отмывкой 30 и 50% этанолом и дальнейшем хранении их в 70% этаноле при $-20^\circ C$ флуоресценция цитоплазмы сохранялась в течение нескольких месяцев. Так как BODIPY-аналоги являются окрашенными веществами, их накопление в цитоплазме эмбриональных клеток хорошо заметно и при регистрации изображений в проходящем свете (рис. 3в).

Минимальная концентрация BODIPY-производного в ИМВ, достаточная для заметной флуоресценции цитоплазмы, равна 0.2–0.4 мкМ. При 1–2 мкМ концентрации условия наблюдения являются оптимальными, а при более высоких концентрациях флуоресценция становится настолько яркой, что невозможно различить детали изображения. Судя по данным флюорографии [11], 5-НТ, в отличие от производного (V), проникает в цитоплазму из ИМВ гораздо медленнее, причем его основная часть аккумуляруется не в цитоплазме, а на внешней поверхности яйцевых оболочек и эмбриональных клеток (ср. рис. 2а и 2б).

Флуоресценция цитоплазмы, вызванная производными серотонина (V) и диметиламиноэтанола (III), заметно подавляется предынкубацией зародышей с арахидоилсеротонином (AA-5-НТ) или *N,N*-диметиламиноэтиларакхидонатом (AA-DMAE) соответственно, взятыми в эквимольных по отношению к исследуемым соединениям или более высоких концентрациях (данные не приведены). Этот эффект AA-5-НТ или AA-DMAE зависит от концентрации и может быть связан с конкуренцией рассматриваемых липофильных соединений за места внутриклеточного связывания. Предварительные опыты показали совпадение мест преимущественной аккумуляции флуоресцентного серотонина (V) и мест наибольшей экспрессии иммунохимически выявляемого эндогенного серотонина. Полученные данные позволяют предположить идентичность внутриклеточных мишеней для пар AA-5-НТ и соединения (V) и для AA-DMAE и соединения (III).

Следует отметить, что сама флуоресцентная кислота (BODIPY-FL-C12) также быстро прони-

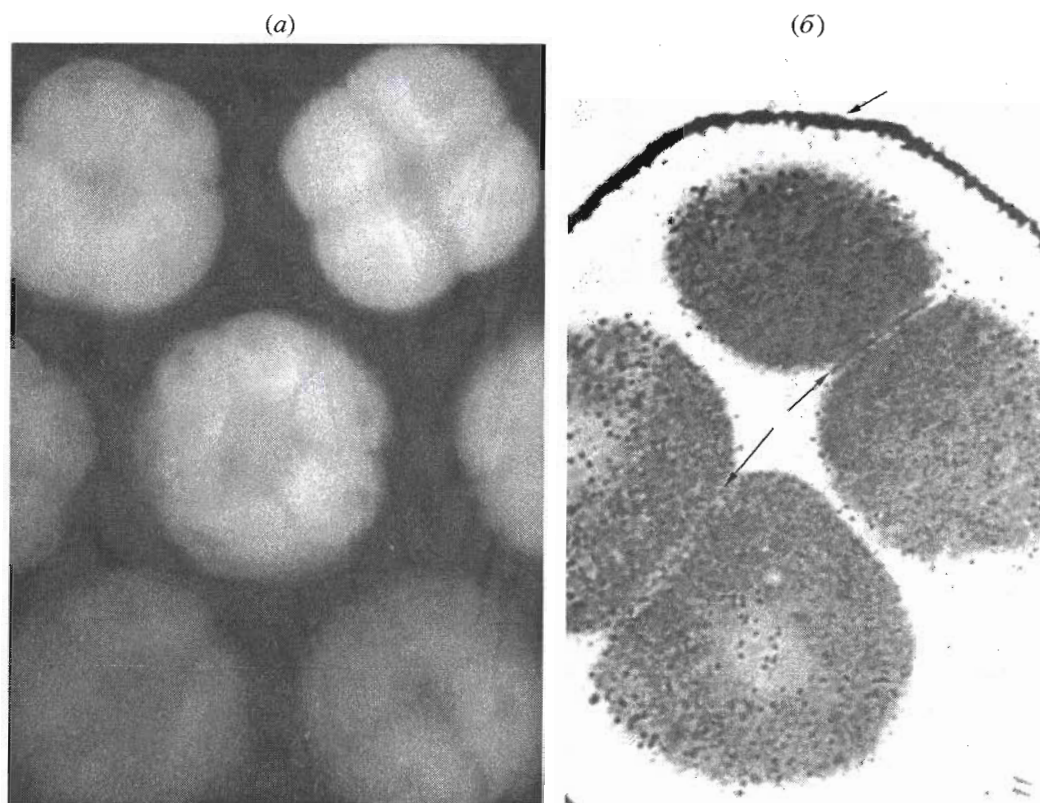


Рис. 2. Проникновение флуоресцентного серотонина (V) (a) и $[^3\text{H}]$ серотонина (б) в клетки дробящихся зародышей морских ежей. (a) *L. variegatus*; прижизненная регистрация через 2 мин после внесения вещества; (б) *Strongylocentrotus intermedius*; флюорография препарата (Г.А. Бузников, ИБР РАН, 1987), фиксация через 60 мин после внесения метки, стрелками отмечены места наибольшей концентрации гранул серебра (оболочка оплодотворения и поверхность бластомеров в области межбластомерных контактов).

кает в эмбриональные клетки и аккумулируется в цитоплазме, но ни AA-5-HT, ни AA-DMAE в данном случае не подавляют флуоресценцию, что можно рассматривать как дополнительное доказательство специфичности внутриклеточной аккумуляции липофильных аналогов 5-HT и ацетилхолина.

В заключительной группе опытов было найдено, что BODIPY-аналоги серотонина и ацетилхолина по своей фармакологической активности практически не отличаются от соответствующих производных арахидоновой, докозагексаеновой и других полиеновых жирных кислот. BODIPY-производные 5-HT и DMAE (III)–(V) в концентрациях до 100 мкМ совершенно не нарушают развитие зародышей, по крайней мере, до стадии раннего плутеуса 2. Флуоресцентное производное (I) в концентрации 10–20 мкМ, как и арахидоилхолин или холинэргический пестицид хлорпирифос [5], обладает характерным цитотоксическим и тератогенным действием, вызывая, в частности на стадиях средней бластулы, ранней и средней гаструлы, резкие изменения фенотипа эмбриональных клеток и их выселение с образованием внеличиночных клеточных скоплений в области ани-

мального полюса личинок. AA-DMAE и его флуоресцентный аналог (III) в равной степени предотвращают возникновение этих аномалий развития (данные не приведены). Аналогично, соединения (V), как и AA-5-HT, предотвращает нарушения развития, вызванные антагонистом 5-HT₂-рецепторов ритансерином (рис. 3). Флуоресцентные производные DMAE и холина с BODIPY-Rd-C12 (II) и (IV) по своей локализации, скорости проникновения и биологической активности не отличались от соответствующих производных BODIPY-FL-C12 (I) и (III) соответственно. Однако, в отличие от последних, фотостабильность производных BODIPY-Rd-C12 довольно низкая, и их флуоресценция во время наблюдения быстро гаснет в течение нескольких минут, непосредственно во время микроскопирования. Проникновение в клетки и распределение флуоресцентного производного дофамина (VI) в настоящее время изучается.

Таким образом, можно считать установленным, что липофильные аналоги нейротрансмиттеров действительно проникают в цитоплазму эмбриональных клеток значительно эффективнее, чем сами нейротрансмиттеры, например, серотонин, и взаимодействуют с внутриклеточными

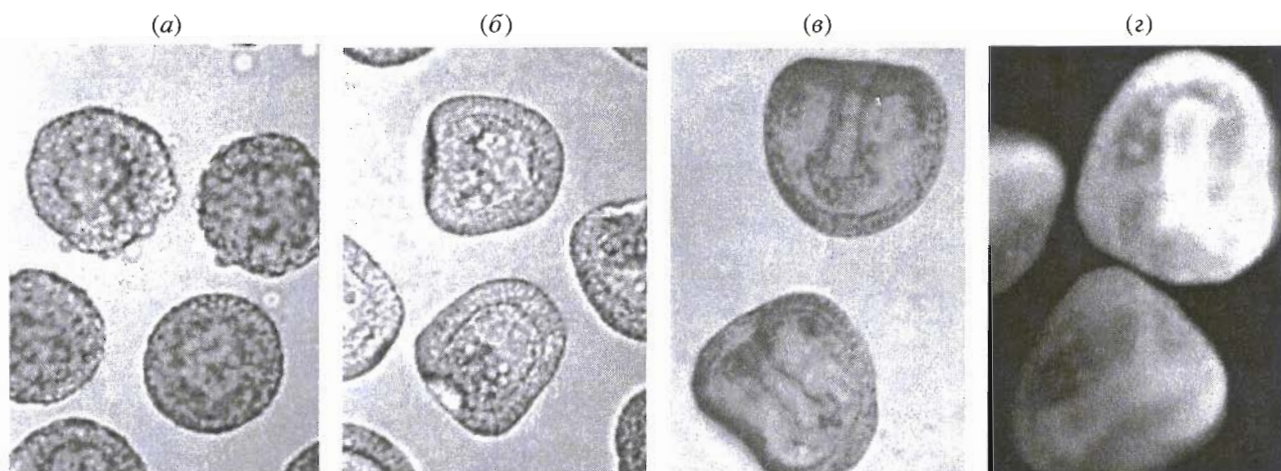


Рис. 3. Влияние АА-5-НТ и флуоресцентного серотонина (V) на чувствительность зародышей *L. variegatus* к ритансерину (10 мкМ). Вещества (10 мкМ) были внесены через 7 ч после оплодотворения (стадия средней бластулы 2). *а* – ритансерин; развитие блокировано; аномальные средние бластулы с характерно утолщенными многослойными стенками; *б* – ритансерин + АА-5-НТ; *в*, *з* – ритансерин + вещество (V): проходящий свет (*в*) и зеленая флуоресценция (*з*); полная нормализация развития в (*б*)–(*з*). Изображение зарегистрировано через 22 ч 30 мин (*б*) и через 24 ч 30 мин после оплодотворения (*в*), (*з*).

рецепторными компонентами донервных серотонин- или холинэргической систем. Полученные нами флуоресцентные производные нейротрансмиттеров обладали биологической активностью, сравнимой с активностью нейротрансмиттеров, ацилированных жирными кислотами, что позволяет использовать их для выявления локализации предполагаемых внутриклеточных рецепторов этих регуляторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали флуоресцентные кислоты BODIPY-FL-C12 и BODIPY-Rd-C12 (Molecular Probes, США), диизопропилкарбодиимид, диметиламинопиридин, *N,N*-диметиламиноэтанол, *N*-метилимидазол, изобутилхлорформиат, гидрохлорид 3-гидрокситирамина (Fluka, Швейцария), метилиодид (Acros, Германия), серотонин гидрохлорид (5-НТ), антагонист 5-НТ₂-рецепторов ритансерин (RBI-Sigma, США), холинэргический пестицид хлорпирифос (ChemService, США). Арахидоилсеротонин (АА-5-НТ) синтезировали как указано ранее [3]. Растворители очищали по стандартным методикам. Вещества выделяли препаративной тонкослойной хроматографией на готовых пластинках (DC Fertigplatten Kieselgel 60, Merck, Германия) в системе хлороформ–ацетон, 7 : 1 (в насыщенной камере). Зону, содержащую продукт, вырезали, вещество элюировали смесью хлороформ–метанол 1 : 1, элюат упаривали и остаток растворяли в этаноле. Концентрацию полученных растворов определяли по поглощению при λ 505 (ϵ 87000) или 534 нм (ϵ 76000) для производных BODIPY-FL-C12 и BODIPY-Rd-C12 соответ-

ственно. Для аналитической ТСХ (пластинки DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 Merck, Art 5554) использовали такую же систему растворителей.

Масс-спектры ионизации при атмосферном давлении распылением в электрическом поле (MS-ESI) получены на приборе MAT 9003 (Finnigan, США). Вещества вводили в виде спиртовых растворов с концентрацией 20–50 мкг/мл распылением с помощью приставки для микроинъекций. Масс-спектры первого (MS¹) и более высоких порядков получены с применением ионной ловушки фирмы “Finnigan”, подсоединенной к основному прибору.

Эфиры (III) и (IV). BODIPY-кислоту (1 мг, 2.39 и 1.85 мкмоль для BODIPY-FL-C12 и BODIPY-Rd-C12 соответственно) растворяли в 100 мкл хлористого метилена и при перемешивании последовательно прибавляли 4 экв. диизопропилкарбодиимида, диметиламинопиридина и диметиламиноэтанола в виде стандартных свежеприготовленных растворов в хлористом метилена (10 мг/мл). Реакционную смесь перемешивали 18 ч при 24°C. ТСХ показала полное отсутствие исходной кислоты, но значительная часть вещества превратилась в малополярный продукт, предположительно, ангидрид. Прибавляли избыток диметиламиноэтанола (2 мкл) и 4-кратный избыток пиридина. Перемешивали при комнатной температуре 3 ч. Вещество очищали препаративной ТСХ. Полученный продукт растворяли в 1 мл ацетона. Половину этого раствора использовали далее для получения холинового эфира. Оставшийся раствор упаривали, растворяли в этаноле и определяли концентрацию как указано выше. Масс-спектры см. в таблице.

Холиновые эфиры (I) и (II). Раствор диметиламиноэтилового эфира флуоресцентной кислоты (III) или (IV) в ацетоне, полученный на предыдущей стадии, обрабатывали 100-кратным избытком иодистого метила. Реакционную смесь выдерживали 30 мин при 24°C и упаривали досуха, остаток растворяли в этаноле и определяли концентрацию спектрофотометрически. Масс-спектры см. в таблице.

Амиды (V) и (VI). BODIPY-FL-C12 (1 мг, 2.39 мкмоль) растворяли в 180 мкл ацетонитрила, прибавляли раствор 4 экв. триэтиламина в ацетонитриле (7.2 мг/мл) и охлаждали до 5°C. При перемешивании прибавляли раствор 2 экв. изобутилхлорформиата в ацетонитриле (10 мг/мл) и перемешивали 2 ч при 24°C. По данным ТСХ (хлороформ–метанол, 10 : 1), исходная кислота практически полностью превратилась в смешанный ангидрид. Реакционную массу упаривали досуха и высушивали в вакууме масляного насоса. Остаток растворяли в 180 мкл ацетонитрила и в атмосфере аргона обрабатывали раствором 2 экв. амина в DMF (5 мг/мл), а затем раствором 3 экв. метилимидазола в DMF (17 мг/мл). Выдерживали 1 ч при 24°C и 18 ч при 5°C. Реакционную смесь упаривали досуха в вакууме масляного насоса. Остаток разбавляли этилацетатом, промывали 2 М бисульфатом натрия, водой и насыщенным раствором хлористого натрия, сушили сульфатом натрия, осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток растворяли в хлороформе и наносили на пластинку для препаративной хроматографии. Концентрацию амидов (V) и (VI) определяли спектрофотометрически. Масс-спектры см. в таблице.

Биологические эксперименты. Опыты (14 серий) проводили на зародышах и личинках морского ежа *Lytechinus variegatus*, полученных от 14 самок. Техника лабораторного содержания взрослых животных, получения гамет, искусственного оплодотворения и инкубации зародышей и личинок была стандартной; в качестве инкубационной среды использовалась ИМВ [13]. Температура во время опытов и при содержании взрослых животных поддерживалась около 22°C. Аликвоты суспензии зародышей или личинок (0.5 или 1 мл) вносили в гнезда кассет Costar 3524 для тканевых культур; густота суспензии составляла около 100 особей/мл и была одинаковой во всех вариантах данной серии опытов. Исследуемые вещества до конечной концентрации их в образце 0.2–2 мкМ для флуоресцентных измерений и 10 мкМ для биологических экспериментов в виде растворов в этаноле добавляли к суспензии зародышей через несколько минут после оплодотворения или на какой-либо из более поздних стадий развития, начиная от первых делений дробления и вплоть до стадии ранних плутеусов (подвижных личинок, уже имеющих нервную систему). Названия ста-

дий даны в соответствии с предложенной нами таблицей развития морских ежей [13, 14]. Контрольные зародыши и личинки инкубировали в ИМВ с добавлением соответствующих объемов этанола. Концентрация этанола не превышала 0.1% (объемн.); каких-либо нарушений развития у контрольных зародышей и личинок не наблюдали.

Результаты регистрировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leitz Wetzlar и цифровой цветной видеокамеры Spot (Diagnostic Instruments Inc., США), позволяющей записывать оцифрованные изображения как jpg-файлы. Для получения изображений использовали проходящий свет, а в опытах с флуоресцентно мечеными веществами регистрировали также и флуоресценцию зародышей или личинок. Регистрацию начинали с 1–3 мин после внесения флуоресцирующих веществ и в случае надобности продолжали и в последующие 12–24 ч. Регистрацию морфологического состояния подопытных и контрольных зародышей и личинок начинали с 3–4 ч после внесения исследуемых веществ и продолжали в течение последующих 12–48 ч с интервалом в 30 мин.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа частично поддержана грантами РФФИ (№ 02-04-48129 и 02-04-22002НЦНИ_a) и грантом NIEHS (P30ES10126).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vamvakides A.* // Ann. Pharm. Fr. 1987. V. 45. P. 389–400.
2. *Papadopoulou-Daifoti Z., Sakellariou A., Raftopoulos C., Vamvakides A.* // Ann. Pharm. Fr. 1992. V. 50. P. 229–236.
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.* // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 215–224.
4. *Shashoua V., Hesse G.W.* // Life Sci. 1996. V. 58. P. 1347–1357.
5. *Безуглов В.В., Зинченко Г.Н., Никитина Л.А., Бузников Г.А.* // Биоорган. химия. 2001. Т. 27. С. 227–230.
6. *Huang S.M., Bisogno T., Trevisani M., Al-Hayani, De Petrocellis L., Fezza F., Tognetto M., Petros T.J., Krey J.F., Chu C.J., Miller J.D., Davies S.N., Geppetti P., Walker J.M., Di Marzo V.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 8400–8405.
7. *Бузников Г.А., Безуглов В.В.* // Российский физиол. журн. 2000. Т. 86. С. 1093–1108.
8. *Бузников Г.А., Безуглов В.В., Никитина Л.А., Слоткин Т.А., Лаудер Дж. М.* // Российский физиол. журн. 2001. Т. 87. С. 1548–1556.
9. *Buznikov G.A., Lambert H.W., Lauder J.M.* // Cell Tissue Res. 2001. V. 305. P. 177–186.
10. *Bezuglov V., Bobrov M., Gretskeya N., Gonchar A., Zinchenko G., Melck D., Bisogno T., Di Marzo V.,*

- Kuklev D., Rossi J.-C., Vidal J.-P., Durand T. // Biomed. Chem. Letters. 2001. V. 11. P. 447–449.
11. Buznikov G.A. Neurotransmitters in Embryogenesis. Chur: Harwood Academic Press, 1990.
12. Karolin J., Johansson B.-A.L., Strandberg L., Ny T. // J. Am. Chem. Soc. 1994. V. 116. P. 7801–7806.
13. Buznikov G.A., Podmarev V.I. // Animal Species for Developmental Studies. V. 1. Invertebrates / Eds Detlaf T.A., Vassetzky S.G. New York: Consultants Bureau, 1990. Ch. 10. P. 253–285.
14. Buznikov G.A., Slotkin T.A., Lauder J.M. / Current Protocols in Toxicology. 2003. Suppl.16. Ch. 5. Unit 1.6–1.24.

Fluorescent-Labeled Lipophilic Analogues of Serotonin, Dopamine, and Acetylcholine: Synthesis, Mass Spectrometry, and Biological Activity

V. V. Bezuglov^{1#}, N. M. Gretskaya¹, S. E. Esipov¹, N. B. Polyakov¹,
L. A. Nikitina², G. A. Buznikov^{2,3}, and J. Lauder²

[#] Fax: +7 (095) 335-7103; e-mail: vvbez@oxylipin.ibch.ru

¹ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,

ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

² School of Medicine, University of North Carolina,
Chapel Hill, NC USA

³ Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 26, Moscow, 117808 Russia

4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoyl derivatives of serotonin, dopamine, choline, and *N,N*-dimethylaminoethanol, with the fluorescence maximum at 512 nm (λ_{exc} 470 nm), and 4,4-difluoro-5,7-diphenyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoyl derivatives of choline and *N,N*-dimethylaminoethanol, with the fluorescence maximum at 554 nm (λ_{exc} 470 nm), were synthesized. These compounds yield protonated molecular ions of 100% intensity upon mass spectrometry with electrospray ionization at atmospheric pressure. The fragmentation of molecular ions under the conditions of secondary mass spectrometry mainly proceeds through the elimination of hydrogen fluoride from the fluorescent core of the molecules. Experiments on sea urchin *Lytechinus variegatus* embryos and larvae showed that these compounds easily penetrate into the cells and are accumulated in the cytoplasm. They do not differ in their biological activity from similar derivatives of arachidonic acid described previously and are agonists of serotonin or acetylcholine or antagonists of nicotinic acetylcholine receptors. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: acylated neurotransmitters, BODIPY, choline esters, dopamine, nicotine, sea urchin, serotonin