

УДК 593.3 612.6.03

## **N-АРАХИДОНОИЛДОФАМИН – ВОЗМОЖНЫЙ РЕГУЛЯТОР СКОРОСТИ ЗАКЛАДКИ ЩУПАЛЕЦ У ПРЕСНОВОДНОЙ ГИДРЫ ПРИ РЕГЕНЕРАЦИИ<sup>1</sup>**

© 2008 г. Л. Н. Маркова, Т. В. Остроумова\*, М. Г. Акимов\*\*, В. В. Безуглов\*\*

*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН  
119334 Москва, ул. Вавилова, д. 26*

*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова  
119992 Москва, ГСП-2, Ленинские горы*

*\*\*Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН  
117871 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10*

*E-mail: marlidus@yachoo.com*

Поступила в редакцию 05.04.07 г.  
Окончательный вариант получен 11.07.07 г.

Изучали влияние N-арахидоноилдофамина, галоперидола и их смеси на скорость закладки щупалец у пресноводной гидры при регенерации гастрального и базального фрагментов. Галоперидол в определенных концентрациях ингибирует закладку щупалец. В большей степени это касается базального фрагмента. N-арахидоноилдофамин ускоряет закладку щупалец у обоих фрагментов, особенно у базального (инверсия естественных различий в скорости закладки щупалец между гастральным и базальным фрагментами). При действии смесей этих веществ проявляется воздействие каждого из компонентов. Методом масс-спектрометрического анализа обнаружено присутствие эндогенного N-арахидоноилдофамина в гомогенате интактной гидры. Обсуждается возможное участие этого ацилнейротрансмиттера в регуляции скорости закладки щупалец у гидры при регенерации.

*Ключевые слова:* гидра, регенерация, щупальцы, морфогенез, N-арахидоноилдофамин.

В последние годы все больше внимания уделяется ацилнейротрансмиттерам – конъюгатам жирных кислот и нейротрансмиттеров – как эндогенным биорегуляторам (Безуглов и др., 1997, 1998). Один из таких конъюгатов – N-арахидоноилдофамин (AA-ДА) представляет собой производное арахидоновой кислоты и дофамина. Оба эти вещества обнаружены у гидры (Calberg, 1992; Muller et al., 1993; Маркова, Остроумова, 1995).

Известно, что нейромедиаторы и, в частности, дофамин функционируют не только как синаптические передатчики, но и как регуляторы разнообразных процессов, в том числе и процессов морфогенеза (Vuznikov, 1990). Ранее мы показали, что ингибиторы синтеза дофамина и его антагонисты влияют на процесс регенерации гидры и вызывают аномалии морфогенеза гастрального фрагмента (Остроумова, Маркова, 2000). Поскольку дофамин быстро инактивируется в инкубационной среде, мы использовали комплекс AA-ДА, действие которого представляло и самостоятельный интерес. В предыдущей нашей работе по изучению

влияния AA-ДА, галоперидола (блокатора дофаминовых рецепторов) и их смесей на регенерацию гидры было показано, что разные фрагменты гидры реагируют на эти воздействия по-разному (Маркова и др., 2004).

Одним из параметров, по которому можно судить о влиянии изучаемых веществ на морфогенез гидры, является число щупалец, возникающих в гастральном и базальном отделах в процессе регенерации. Наше исследование посвящено более детальному изучению этого процесса. Кроме того, представлялось интересным посмотреть, присутствует ли эндогенный AA-ДА у гидры, что и было сделано с помощью метода масс-спектрометрического анализа.

### **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА**

Морфологические исследования проводили на культуре *Hydra attenuata*. В биохимических исследованиях использовали, кроме того, *H. magnipapillata*. Животных содержали в искусственной среде, кормом служили личинки *Artemia* (Lenhoff, 1982). Для опыта отбирали животных, не имеющих почек, спустя сутки после кормления. В кон-

<sup>1</sup> Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 05-04-48293).

троле и в каждом варианте опыта использовали по 50 особей. Гидру разрезали на три фрагмента: апикальную часть, гастральный и базальный отделы. Наблюдения вели за процессами, происходящими в последних двух отделах. Инкубировали по пять фрагментов в 2 мл среды при 18–20°C. Все измерения проводили в конце эксперимента, когда заканчивался процесс регенерации. Использовали блокатор дофаминовых рецепторов D<sub>1</sub> и D<sub>2</sub> – галоперидол (“Sigma”, США) и N-арахидоноилдофамин (Ин-т биоорганической химии РАН). Более подробно методика проведения опытов описана ранее (Остроумова, Маркова 2000). Достоверность различий определяли по *t*-критерию Стьюдента.

Экстракцию общих липидов из тканей гидры проводили по модифицированному методу Фолча (Folch et al., 1957) при температуре 4°C. Два образца смеси тканей гидры *H. magnipapillata* и *H. attenuata* (1.7 + 1.7 г), а также отдельный образец тканей гидры *H. magnipapillata* (1.5 г) гомогенизировали в 10 мл смеси хлороформ : метанол (2 : 1), добавляли 3 мл деионизованной воды и центрифугировали 10 мин при ускорении 1000 g. При этом к образцу *H. magnipapillata* перед экстракцией добавляли 50 мкл концентрированной уксусной кислоты. Нижнюю (хлороформенную) фазу отбирали, а остаток дважды реэкстрагировали указанной смесью хлороформ : метанол. Экстракт упаривали на роторном испарителе досуха и повторно растворяли в 500 мкл метанола.

Аликвоту (2 мкл) финального экстракта последовательно хроматографировали в системах хлороформ : метанол : уксусная кислота (4 : 1 : 0.1%) (до половины пластинки) и бензол : этилацетат : уксусная кислота (4 : 1 : 0.45%) (до конца пластинки) на пластинке Merck 5554.

Дорожку со стандартом обнаруживали опрыскиванием 10%-ным раствором фосфорномолибденовой кислоты в этаноле с последующим нагреванием при 120°C. Зону от N-арахидоноилдофамина до N-арахидоноил-3-О-метилдофамина включительно тщательно соскабливали и элюировали 2 мл смеси хлороформ : метанол (1 : 1). Полученный экстракт упаривали досуха с помощью аппарата Savant SpeedVac Concentrator (“Savant”, США) без нагревания и повторно растворяли в 100 мкл метанола.

Анализ полного экстракта, а также фракции с тонкослойной хроматограммы (ТСХ) проводили методом масс-спектрометрии с ионизацией методом распыления в электрическом поле (ESI).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

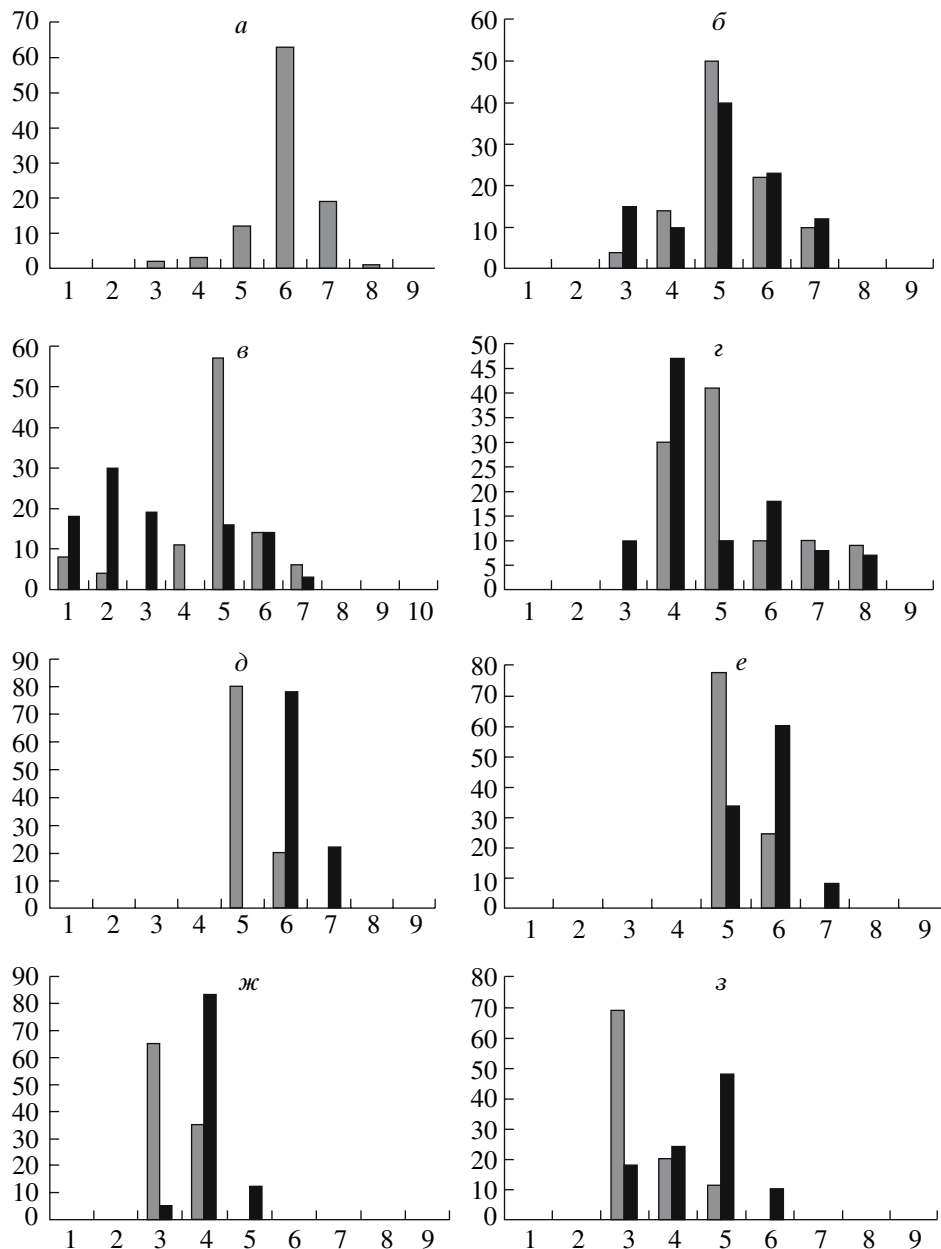
В норме в используемой нами культуре *H. attenuata* 63% взрослых интактных особей имеют шесть щупалец, около 20% – семь, незначитель-

ный процент составляют животные с тремя-четырьмя и восемью щупальцами (выборка представлена 100 гидрами) (рис. 1, а). При нормальной регенерации (контроль) на 6-е сут (регенерация завершена и дальнейшего прироста числа щупалец не происходит), основную группу составляют гидры с пятью щупальцами. При этом только в этой группе наблюдаются небольшие, но достоверные различия между гастральным и базальными отделами ( $p < 0.001$ ). В группе с шестью-семью щупальцами достоверных различий не наблюдается (рис. 1, б). Следует отметить, что в активной фазе регенерации (3–4-е сут) скорость регенерации гастральных фрагментов существенно опережает таковую базальных фрагментов.

*Действие галоперидола.* Галоперидол в концентрации 10 мкМ значительно тормозит скорость закладки щупалец обоих отделов, что выражается в появлении групп с одними-двумя щупальцами, чего не наблюдается в контроле, при этом большую долю (18 и 30%) в этих группах составляют базальные регенераты. Частота встречаемости гидр с пятью щупальцами достигает почти 60% у гастральных фрагментов, тогда как скорость закладки щупалец базальных продолжает отставать (16%), т.е. при такой концентрации галоперидола наблюдается значительное отставание скорости закладки щупалец базального отдела от гастрального и в еще большей степени – от контрольных базальных регенератов (рис. 1, в).

При концентрации 5 мкМ такое ингибирующее влияние галоперидола на закладку щупалец базального отдела выражено слабее – отсутствуют фрагменты с одними-двумя щупальцами, возрастает число базальных регенератов с четырьмя щупальцами, увеличивается доля гидр с шестью и семью щупальцами (рис. 1, г). Таким образом, галоперидол в концентрациях 10 и 5 мкМ тормозит закладку щупалец в обоих фрагментах, при этом процесс более выражен в базальном отделе.

*Действие N-арахидоноилдофамина.* При действии АА-ДА в концентрациях 5 и 2.5 мкМ наблюдается ускорение закладки щупалец у обоих регенератов по сравнению с контролем. В выборках, в отличие от контроля, не встречаются фрагменты с тремя-четырьмя щупальцами как у гастральных, так и у базальных регенератов. Основную массу составляют фрагменты с пятью щупальцами у гастральных и шестью – у базальных регенератов, т.е. наличие достоверный эффект стимулирования АА-ДА закладки щупалец по сравнению с контролем у обоих регенератов (рис. 1, д, е),  $p < 0.01$ . Так как не встречаются особи с увеличенным числом щупалец, речь идет именно об ускорении процесса их закладки. В большей степени эта стимуляция касается базального регенерата, если сравнивать его с гастральным. Так, при концентрации АА-ДА 5 мкМ



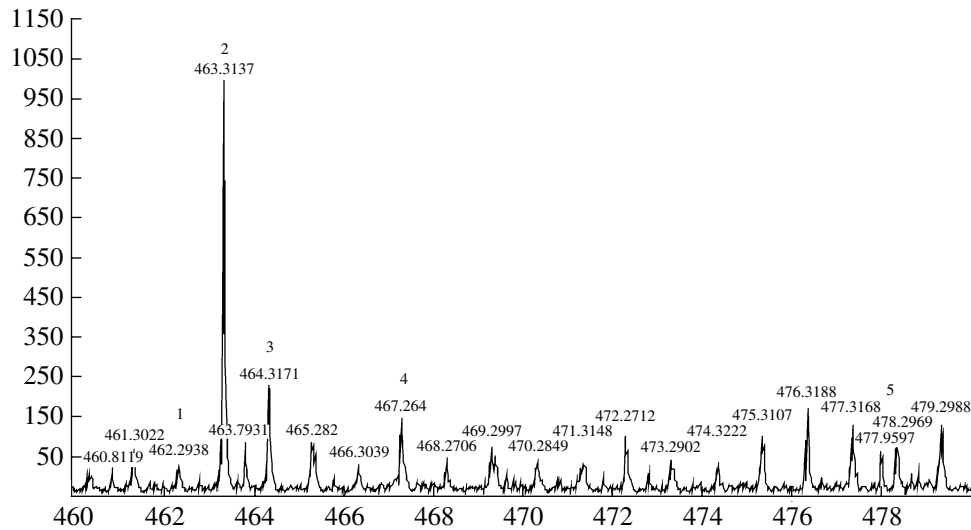
**Рис. 1.** Распределение групп регенератов с разным числом щупалец в конце регенерации (6–7-е сут) при действии галоперидола, АА-ДА и их смесей в разной концентрации, мкМ: *a* – интактная гидра; *б* – контроль, *в* – галоперидол (*в* – 10, *г* – 5); *д* – АА-ДА (*д* – 5, *е* – 2.5); *ж* – *з* – смесь галоперидола и АА-ДА соответственно (*ж* – 10 + 5, *з* – 10 + 2.5). По оси абсцисс – число щупалец; по оси ординат – регенераты, %.

Фрагменты: (■) – гастральный, (■) – базальный.

гастральных регенератов с пятью щупальцами наблюдается 80%, у базальных наибольшее число составляют гидры с шестью щупальцами, а также появляются группы с семью щупальцами (рис. 1, *д*). Следовательно, АА-ДА не только стимулирует закладку щупалец у обоих регенератов по сравнению с контролем, но и приводит к резкому увеличению скорости их закладки в базальном отделе. То есть в отличие от контроля, где в конце регенерации различия между двумя фрагментами в

числе щупалец становятся незначительными, при действии АА-ДА происходит инверсия скорости закладки щупалец гастрального и базального отделов. Этот эффект наблюдается при обеих концентрациях АА-ДА.

*Действие смесей галоперидола и АА-ДА.* При действии 5 мкМ АА-ДА + 10 мкМ галоперидола и 2.5 мкМ АА-ДА + 10 мкМ галоперидола проявляется действие каждого компонента. С одной стороны, сохраняется ингибирующее влияние галопери-



**Рис. 2.** Масс-спектр веществ из зоны ТСХ от N-арахидоноилдофамина до N-арахидоноил-3-O-метилдофамина для экстракта из тканей *H. magnipapillata* (фрагмент). Пики и их типы: 1 – N-арахидоноилдофамин,  $[M + Na]^+$ ; 2 – N-докозагексаеноилдофамин,  $[M]^+$ ; 3 – N-докозагексаеноилдофамин,  $[M + H]^+$ ; 4 – N-арахидоноилдофамин,  $[M + CO]^+$ ; 5 – N-арахидоноилдофамин,  $[M + K]^+$ .

По оси абсцисс – отношение массы вещества к заряду ( $m/z$ ), частей/млн; по оси ординат – относит. интенсивность каждого пика, усл. ед.

дола, что выражается в увеличении доли регенератов с меньшим количеством щупалец (три и четыре) по сравнению с контролем и одним АА-ДА. С другой стороны, сохраняется и феномен инверсии скорости закладки щупалец между гастральным и базальным отделами: под влиянием АА-ДА у базальных регенератов преобладают группы с пятью (при меньшей концентрации) (рис. 1, з) и четырьмя (при большей концентрации) щупальцами (рис. 1, ж), тогда как гастральные в большинстве своем имеют по три щупальца. Следовательно, при действии смесей в определенных сочетаниях каждая составляющая проявляет свое действие: галоперидол ингибирует скорость закладки щупалец по сравнению с АА-ДА и с контролем, а АА-ДА на этом фоне резко стимулирует закладку щупалец у базального регенерата и эффект инверсии скорости регенерации сохраняется. Таким образом, эффекты обоих компонентов не нивелируются, а сосуществуют, что говорит о независимых способах (путях) влияния галоперидола и АА-ДА на такой параметр, как скорость закладки щупалец у разных отделов гидры при регенерации.

**Идентификация эндогенного АА-ДА методом масс-спектрометрии.** Предварительные данные, полученные с помощью метода масс-спектрометрии, показали наличие ацилдофаминов трех жирных кислот, в том числе и арахидоновой, в гомогенатах *H. attenuata* и *H. Magnipapillata*.

С учетом данных масс-спектра веществ из соответствующей зоны ТСХ в экстракте гидры *H. magnipapillata* мы смогли уверенно детектировать N-докозагексаеноилдофамин, обнаружили АА-ДА

и метоксидофамины (продукты метаболического метилирования) всех трех кислот (рис. 2). Во всех случаях расхождение расчетной и измеренной масс не превышало 150 частей/млн. Имеются указания на наличие N-олеилдофамина, однако они нуждаются в дополнительной проверке. В экстракте смеси тканей гидры ситуация повторилась, однако сигнал АА-ДА в данном случае был менее четким, что может свидетельствовать о его низкой концентрации в тканях гидры *H. attenuata*. В обоих полных экстрактах нам удалось зафиксировать наличие ионов с массами, соответствующими свободным арахидоновой, олеиновой и докозагексаеновой кислотам.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Механизм закладки щупалец у гидры является многофакторным и до сих пор остается невыясненным. Число щупалец не жестко детерминировано и находится под влиянием режима питания, интенсивности деления эпителиальных клеток и длины окружности гипостома (Bode P., Bode H., 1987). Деление эпителиальных клеток, специфичных в том числе и для щупалец, как у интактных, так и у регенерирующих животных стимулируется головным активатором пептидной природы. Добавочные эпителиальные клетки образуют эктопические щупальца (Shaller et al., 1989, 1990; Hobmayer et al., 1997).

Эволюция теории физиологических градиентов Чайлда (Child, 1941) привела к созданию диффузионных моделей регуляции морфогенеза у гидры

(Wolpert et al., 1974; Meinhardt, 1993). Согласно диффузионной модели Майнхардта, образование головы, щупалец и подошвы гидры находится под влиянием активатор-ингибиторной системы. Активация образования щупалец происходит на некотором пороговом уровне, на котором уже не происходит активации образования гипостома.

В процессе закладки щупалец экспрессируются некоторые гены. Показано, что ген *HuAlx* (Smith et al., 2000), аналог гена млекопитающих *IQGAPI* (Venturelli et al., 2000), и пептид Нум-301 (Takahashi et al., 2005) экспрессируются во время образования щупалец и при регенерации. Последний регулирует число щупалец у гидры: повышение концентрации пептида приводит к увеличению числа щупалец. Как показали Смит с соавторами (Smith et al., 2000), экспрессия гена *HuAlx* свидетельствует в пользу реакционно-диффузионной модели.

План экспрессии генов в морфогенезе и при регенерации гидры может регулироваться и морфомеханическими факторами – изменениями механических напряжений в клеточных пластах (Белоусов, 2006).

Полученные нами данные говорят о том, что еще одним фактором, регулирующим морфогенез гидры, могут быть конъюгаты ненасыщенных жирных кислот с нейромедиаторами (Маркова и др., 2004). В нашей работе АА-ДА не только ускоряет закладку щупалец, но и инвертирует естественные различия в скорости закладки щупалец между гастральным и базальным отделами.

АА-ДА представляет собой конъюгат арахидоновой кислоты и дофамина. Имеются данные, что арахидоновая кислота является мощным морфогеном и вызывает появление эктопических голов и щупалец у гидры (Hassel et al., 1996). Мы не могли проверить прямого действия дофамина ввиду его быстрой инактивации в инкубационной среде, но ранее получили данные (Остроумова, Маркова, 2000) о том, что блокатор рецепторов дофамина галоперидол вызывает нарушение морфогенеза у гидры. Учитывая все сказанное выше, мы использовали АА-ДА, действие которого представляет и самостоятельный интерес. Неизвестно, какая из составляющих – арахидоновая кислота, дофамин или АА-ДА – как единое целое стимулирует регенерацию. Опыты по воздействию смесей АА-ДА и галоперидола показали, что при этом сохраняется как общее ингибирующее влияние на регенерацию блокатора дофаминовых рецепторов, так и специфическое влияние АА-ДА – инверсия скорости закладки щупалец между фрагментами гидры. Следовательно, скорее всего при действии АА-ДА обе его составляющие действуют синергично, воздействуя на несколько сигнальных систем. Поскольку имеются литературные данные о способности

АА-ДА регулировать экспрессию ряда генов в клетках млекопитающих (Sancho et al., 2004, 2005), крайне заманчивым выглядит предположение о том, что данный путь регуляции задействован и в рассматриваемом случае. Так, причиной увеличения скорости закладки щупалец может служить стимуляция АА-ДА экспрессии пептида Нум-301 (см. выше), однако эта гипотеза нуждается в дополнительном изучении.

Обнаружение дофаминидов жирных кислот вместе с их ближайшими метаболитами и с соответствующими свободными кислотами является достаточно явным указанием на наличие у гидры системы метаболизма как N-арахидоноилдофамина, так и его аналогов и может служить веским доводом в пользу того, что эндогенный АА-ДА может быть естественным регулятором ее морфогенеза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Безуглов В.В., Маневич Е.М., Арчаков А.В. и др. Искусственно функционализированные полиеновые жирные кислоты – новые липидные биорегуляторы // Био-орган. химия. 1997. Т. 23. С. 211–220.
- Безуглов В.В., Бобров М.Ю., Арчаков А.В. Биоактивные амиды жирных кислот // Биохимия. 1998. Т. 63. Вып.1. С. 27–37.
- Белоусов Л.В. Морфомеханический аспект эпигенеза // Генетика. 2006. Т. 42. № 9. С. 1165–1169.
- Маркова Л.Н., Остроумова Т.В. Биогенные моноамины у гидры *Hydra attenuata* // Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 1995. Т. 31. № 2. С. 141–146.
- Маркова Л.Н., Остроумова Т.В., Безуглов В.В. Влияние арахидоноилдофамина, галоперидола и их смесей на регенерацию пресноводной гидры *Hydra attenuata* // Онтогенез. 2004. Т. 35. № 5. С. 367–374.
- Остроумова Т.В., Маркова Л.Н. Влияние ингибиторов синтеза и антагонистов дофамина на регенерацию гидры *Hydra attenuata* // Рос. физиол. журн. 2000. Т. 86. № 10. С. 1246–1254.
- Bode P.M., Bode H.R. Formation of pattern in regenerating tissue pieces of *Hydra attenuata*. IV. Three processes combine to determine the number of tentacles // Development. 1987. V. 99. № 1. P. 89–98.
- Buznikov G.A. Neurotransmitters in embryogenesis. Chur: Harwood Acad. Publ., 1990. 526 p.
- Calberg M. Localization of dopamine in the freshwater hydrozoan *Hydra attenuata* // Cell Tis. Res. 1992 V. 270. P. 601–607.
- Child C.M. Patterns and problems of development. Chicago: Univer. Press, 1941. 326 p.
- Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. et al. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. № 1. P. 497–509.
- Hassel M., Leitz T., Muller W. Signals and signal-transduction systems in control of development in *Hydra* and *Hydractinia* // Int. J. Devel. Biol. 1996. V. 40. P. 323–330.

- Hobmayer B., Holstein T.W., David C.N.* Stimulation of tentacle and bud formation by the neuropeptide head activator in *Hydra magnipapillata* // *Devel. Biol.* 1997. V. 183. P. 1–8.
- Lenhoff N.M.* Water, culture solution, and buffers // *Hydra. Research methods* / Ed. Lenhoff O.O. N.Y.; L.: Plenum Press, 1982. P. 19–28.
- Meinhardt H.* A model for pattern formation of hypostome, tentacles, and foot in *Hydra* // *Devel. Biol.* 1993. V. 157. P. 321–333.
- Muller W.A., Leitz T., Stephan M. et al.* Arachidonic acid and the control of body pattern in *Hydra* // *Roux's Arch. Devel. Biol.* 1993. V. 202. P. 70–76.
- Sancho R., Macho A., de la Vega L. et al.* Immunosuppressive activity of endovanilloids: N-arachidonoyl-dopamine inhibits activation of the NF-kappa B, NFAT, and activator protein 1 signaling pathways // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 4. P. 2341–2351.
- Sancho R., de la Vega L., Macho A. et al.* Mechanisms of HIV-1 inhibition by the lipid mediator N-arachidonoyl-dopamine // *Ibid.* 2005. V. 175. № 6. P. 3990–3999.
- Shaller H.C., Hoffmeister A.H., Dubels S.* Role of the neuropeptide head activator for growth and development in hydra and mammals // *Development.* 1989. V. 107. Suppl. P. 99–107.
- Shaller H.C., Hofmann M., Javois L.C.* Effect of head activator on proliferation, head-specific determination and differentiation of epithelial cells in *Hydra* // *Differentiation.* 1990. V. 43. P. 157–164.
- Smith K.M., Gee L., Bode H.R.* HyAlx, an aristaless-related gene, is involved in tentacle formation in *Hydra* // *Development.* 2000. V. 127. № 22. P. 4743–4752.
- Takahashi T., Hatta M., Yum S. et al.* Hym-301, a novel peptide, regulates the number of tentacles formed in *Hydra* // *Ibid.* 2005. V. 132. № 9. P. 2225–2234.
- Venturelli C.R., Kuznetsov S., Salgado L. M. et al.* An IQGAP-related gene is activated during tentacle formation in the simple metazoan *Hydra* // *Devel. Genes Evol.* 2000. V. 210. № 8–9. P. 458–463.
- Wolpert L., Hornbruch A., Clark M.R.B.* Positional information and positional signalling in *Hydra* // *Amer. Zoologist.* 1974. V. 14. № 2. P. 647–663.

## N-Arachidonoyl Dopamine Is a Possible Factor of the Rate of Tentacle Formation in Freshwater Hydra

L. N. Markova<sup>a</sup>, T. V. Ostroumova<sup>b</sup>, M. G. Akimov<sup>c</sup>, and V. V. Bezuglov<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia

<sup>b</sup> Moscow State University, Leninskie Gory, Moscow, 119992 Russia

<sup>c</sup> Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia

E-mail: marlidus@yahoo.com

**Abstract**—The effect of N-arachidonoyl dopamine, haloperidol, and their mixture on the rate of tentacle formation was studied during regeneration of the gastral and basal fragments of freshwater hydra. Some concentrations of haloperidol inhibited the tentacle formation, which was more pronounced in the basal fragment. N-arachidonoyl dopamine accelerated the tentacle formation in both fragments, particularly, in the basal one (an inversion of the natural difference in the rate of tentacle formation between the gastral and basal fragments). After the exposure to the mixture of these drugs, the effects of each of them were observed. Mass spectrometry assay has demonstrated endogenous N-arachidonoyl dopamine in the intact hydra homogenate. The possible involvement of this acyl-neurotransmitter in the regulation of the rate of tentacle formation in regenerating hydra is discussed.

*Key words:* hydra, regeneration, tentacles, morphogenesis, N-arachidonoyl dopamine.