

РЕГЕНЕРАЦИЯ

УДК 593.3 612.6.03

**ДОКОЗАГЕКСАЕНОИЛДОФАМИН У ПРЕСНОВОДНОЙ ГИДРЫ:
ВЛИЯНИЕ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ; МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ПРЕВРАЩЕНИЯ¹**

© 2010 г. Т. В. Остроумова, Л. Н. Маркова*, М. Г. Акимов**,
Н. М. Грецкая**, В. В. Безуглов**

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

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

** 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 26.10.09 г.

Окончательный вариант получен 22.12.09 г.

Изучали влияние докозагексаеноилдофамина и докозагексаеновой кислоты на процесс регенерации гастрального и базального фрагментов гидры. Докозагексаеноилдофамин вызывал аномалии морфогенеза в виде единичных эктопических щупалец в гастральном отделе, а также выростов в гастральном и базальном отделах. Докозагексаеновая кислота не оказывала никакого влияния на морфогенез, за исключением слабого торможения скорости регенерации. Поскольку в гомогенате гидры гидролиз докозагексаеноилдофамина не обнаружен, предполагается, что морфогенетический эффект может быть вызван дофаминовой составляющей этого комплекса.

Ключевые слова: гидра, регенерация, морфогенез, докозагексаеноилдофамин, докозагексаеновая кислота.

Имеются литературные данные о влиянии ненасыщенных жирных кислот (арахидоновой, эйкозатетраеновой) или их метаболитов на паттерн тела гидры, ее регенерацию, образование почки и щупалец (Muller et al., 1993; Di Marzo et al., 1993, 1994; Leitz et al., 1994). Кроме того, есть сведения о биологической активности конъюгатов биогенных аминов с полиеновыми жирными кислотами (Безуглов и др., 1997; Бузников, Безуглов, 2000). Мы показали, что конъюгат арахидоновой кислоты с дофамином – арахидоноилдофамин (AA-DA) – влияет на процесс регенерации гидры *Hydra attenuata* (Маркова и др., 2004, 2008). Масс-спектрометрический анализ показал наличие в гомогенате гидры ацилдофаминов трех жирных кислот – арахидоновой, докозагексаеновой (DHA) и олеиновой, при этом докозагексаеноилдофамин (DHA-DA) имел наибольший пик (Маркова и др., 2008). Представляло интерес проверить выраженность действия DHA-DA, а также DHA на регенерацию и морфогенез гидры. Кроме того, исследовали биосинтез DHA-DA в гомогенате пресноводной гидры.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Исследования проводили на пресноводной гидре *H. magnipapillata*. Морфологическая часть методики и порядок подбора концентраций испытуемых веществ описаны в предыдущих работах (Остроумова, Маркова, 2000; Маркова и др., 2004). Использовали концентрации, не вызывающие гибель и видимые повреждения регенератов. При действии ДНА обработку проводили в двух режимах: в пульсовом (ежедневная смена препарата и среды), по аналогии с экспериментами по действию арахидоновой кислоты (Muller et al., 1993), и в режиме однократного внесения ДНА в начале эксперимента. ДНА-DA использовали в концентрациях 5, 10 и 20 мкМ. При использовании ДНА протестировали ряд концентраций от 5 до 50 мкМ.

Изучение биосинтеза DHA-DA проводили на полном осветленном гомогенате пресноводной гидры (Маркова и др., 2008). Инкубационная смесь объемом 200 мкл содержала 50 мМ буфера *tris-HCl*, pH 7.4; 0.4 мг/мл белка гомогената, 1 мМ ЭДТА, 50 мкМ тирозина, тирамина или дофамина, а также по 50 мкМ меченных тритием ДНА (37 Бк/мкл), или арахидоновой кислоты C20:3n-6 (50 Бк/мл), или C20:3n-6-S-CoA (50 Бк/мкл). Инкубацию проводили в течение 1 ч при 37°C в анаэроб-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 08-04-00144).

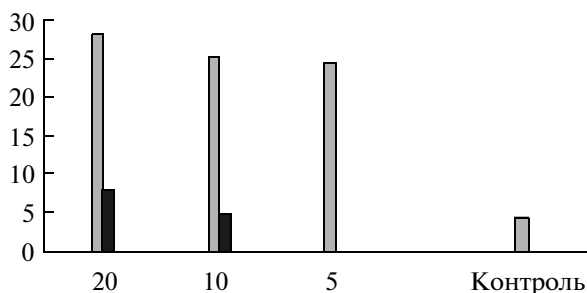


Рис. 1. Влияние докозагексаеноилдофамина на морфогенез гастрального (■) и базального (■) отделов гидры *H. magnipapillata*.

По оси абсцисс – концентрация, мкМ; по оси ординат – количество аномалий, %.

ных условиях. Реакцию останавливали добавлением 100%-ного CF_3COOH . Продукты экстрагировали по модифицированному методу Фолча (Folch et al., 1957) и анализировали с помощью метода ТСХ на пластинках Merck 5554 (“Merck”, Германия) в системах хлороформ : метанол : уксусная кислота – 4 : 1 : 0.2 (V : V : %) до половины пластинки и бензол : этилацетат : уксусная кислота – 4 : 1 : 0.4 (V : V : %) до конца пластинки. Радиоавтографию проводили с использованием фотопленки BioMax MS (“Kodak”, Германия). Изучение гидролитических процессов проводили на том же гомогенате, что и исследования биосинтеза. Смесь, содержащую 100 мкМ DHA-DA, 50 мМ буфера *tris*-HCl, pH 7.4; 0.4 мг/мл белка, 5 мМ MgCl_2 , инкубировали 1 ч при 37°C в анаэробных условиях. Реакцию останавливали добавлением концентрированной HCl. После экстракции (см. выше) продукты инкубации анализировали методом микроколоночной ВЭЖХ на хроматографе Милихром А-02 (“Эконова”, Россия); колонка Prontosil 120-5C18 AQ, подвижная фаза – 0.1% трифторуксусной кислоты : ацетонитрил с различными параметрами градиента.

Меченные тритием жирные кислоты ДНА и C20:3n-6, а также эфир последней с коферментом А (C20:3n-6-S-CoA) были предоставлены В.П. Шевченко (ИМГ РАН). Все реактивы, использованные в нашей работе, имели химически чистую степень очистки или выше. Тирозин, дофамин, S-аденозил-метионин, аденозин 5'-фосфат 3'-фосфосульфат, реактив Фолина – производства фирмы “Sigma-Aldrich”, США; *tris*-HCl – “Bio-Rad”, США.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Действие DHA-DA: влияние на морфогенез. Во всех испытанных концентрациях DHA-DA наблюдаются аномалии морфогенеза как в гастральном, так и в базальном фрагментах гидры (рис. 1). В гастральных фрагментах это выражается в появлении временных единичных эктопических щупалец и выростов (к концу эксперимента, через 7 сут, выростов и щупалец становится вдвое меньше). В базальных фраг-

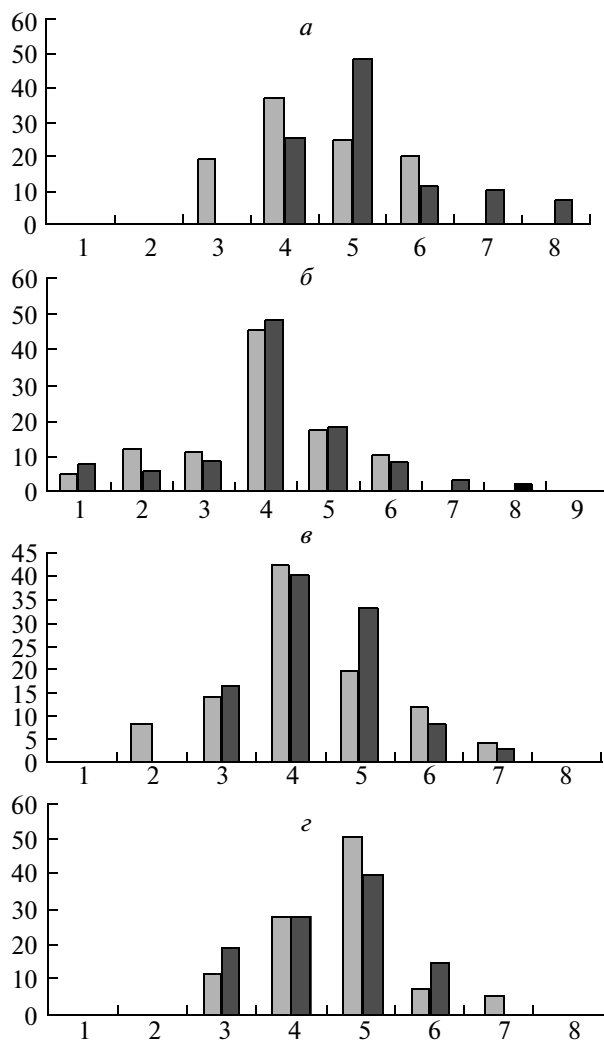


Рис. 2. Влияние концентрации докозагексаеноилдофамина на число щупалец (6–7-е сут эксперимента), мкМ: а – 20, б – 10, в – 5, г – контроль.

По оси абсцисс – число щупалец; по оси ординат – количество регенератов, %; ост. обозначения см. на рис. 1.

ментах эктопические щупальца не образуются, встречаются только выросты и почки. Таким образом, наблюдаются четкие региональные различия в характере аномалий между гастральным и базальным фрагментами. Помимо качественного различия обращает на себя внимание значительное преобладание аномалий в гастральном фрагменте гидры по сравнению с базальным. В контроле аномалии не превышают 4%, и только в гастральном отделе. По сравнению с действием AA-DA DHA-DA обладает более слабым морфогенетическим эффектом. Таким образом, несмотря на более высокое содержание DHA-DA в гомогенате гидры по сравнению с AA-DA, не наблюдается прямой корреляции между выраженностью морфогенетических эффектов и высокой концентрацией DHA-DA.

Действие DHA-DA: влияние на число щупалец (рис. 2). При действии DHA-DA во всех концентра-

циях происходит задержка закладки щупалец по сравнению с контролем. Это выражается или в отсутствии щупалец в базальном отделе (рис. 2, а, в), или в присутствии групп регенератов с одним-двумя щупальцами (2, б, в), но не наблюдается у контрольных особей (рис. 2, г). Кроме того, при концентрации ДНА-ДА 20 мкМ появляется небольшое количество базальных регенератов с увеличенным числом щупалец (семь—восемь), тогда как в контроле их максимальное число в этом отделе равно шести. При концентрации ДНА-ДА 10 мкМ количество регенератов с увеличенным числом щупалец становится незначительным (2—3%); таким образом, действие ДНА-ДА приводит к торможению закладки щупалец и в то же время к некоторому увеличению их числа в базальном отделе по сравнению с контролем. При действии концентрации 5 мкМ базальные регенераты с увеличенным числом щупалец у гидры отсутствуют. Таким образом, при действии всех концентраций ДНА-ДА обнаруживается торможение скорости закладки щупалец, в то же время высокая его концентрация стимулирует некоторое увеличение числа щупалец у базальных регенератов гидры. Эффект увеличения числа щупалец при действии ДНА-ДА выражен гораздо слабее, чем при действии АА-ДА.

Действие ДНА. ДНА в отличие от арахидоновой кислоты, обладающей мощным морфогенетическим эффектом, в различных концентрациях и при обоих режимах обработки не вызывала появления аномалий. Мы протестировали ряд концентраций от 5 до 50 мкМ. При действии больших концентраций (50 и 20 мкМ) наблюдалось лишь замедление скорости регенерации, следовательно, ДНА не обладает морфогенетическим эффектом.

Полученные нами ранее данные показали наличие мощного морфогенетического эффекта у гидры при действии АА-ДА (Маркова и др., 2004). По сравнению с ним ДНА-ДА обладает значительно более слабым эффектом; таким образом, не обнаружено прямой корреляции между высоким содержанием ДНА-ДА в гомогенате интактной гидры и выраженностью морфогенетического эффекта. Наблюдаемый морфогенетический эффект, скорее всего, может быть связан с дофаминовой составляющей комплекса, чем с самой ДНА, тем более что гидролиза комплекса ДНА-ДА в гомогенате не выявлено (см. ниже).

Биосинтез N-ДНА-ДА. Полученные нами ранее масс-спектрометрические данные о наличии ДНА-ДА в тканях пресноводной гидры поставили вопрос о пути его образования в данном организме. Мы провели серию экспериментов по изучению биосинтеза ДНА-ДА. В качестве объекта исследования был выбран нефракционированный осветленный гомогенат гидры, поскольку данными о субклеточной локализации систем его биосинтеза мы не располагали. При исследовании млекопитающих выяс-

Доля радиоактивности в пятне N-ацилдофаминов радиоавтограмм ТСХ продуктов инкубации меченных тритием кислот докозагексаеновой, арахидоновой и C20:3n-6-S-CoA с гомогенатом гидры *H. magnipapillata*, % от суммы для дорожки

Жирная кислота	Амин		
	дофамин	тирозин	тирамин
C20:3n-6-S-CoA	10.3	8.3	13.4
Арахидоновая	1.7	1.7	0.6
Докозагексаеновая	1.5	2.9	3.7

Примечание. При инкубации с C20:3n-6 продукты не детектировались.

нили (Акимов и др., 2007), что исходными веществами при биосинтезе N-ацилдофаминов могут быть комбинации свободной жирной кислоты и тирозина, тирамина или дофамина; эти сочетания предшественников и были изучены. Поскольку литературные данные свидетельствуют в пользу низкой эффективности процессов биосинтеза, в опытах мы использовали ДНА, меченную тритием, и детектировали продукты инкубации с помощью метода радиоавтографии; для идентификации веществ использовали набор синтезированных ранее нерадиоактивных стандартов (Безуглов и др., 2006).

В результате проведенной работы было установлено, что накопление целевого N- ДНА-ДА происходит при инкубации всех комбинаций предшественников (рис. 3). По доле радиоактивности в пятне ДНА-ДА от суммарной активности дорожки ТСХ аминные субстраты можно выстроить в ряд: тирозин → тирамин → дофамин (таблица), что согласуется с таковым у млекопитающих (Акимов и др., 2007).

Исследования отдельных стадий биосинтеза N-ацилдофаминов у млекопитающих показали, что CoA-эфиры жирных кислот не являются предшественниками данных веществ, и потому было логично предположить аналогичную ситуацию и в организме пресноводной гидры. Для проверки этой гипотезы мы инкубировали меченные тритием арахидоновую кислоту, а также ее аналог C20:3n-6 в виде свободной кислоты и эфира с коферментом А с тирозином, тирамином и дофамином и проанализировали продукты, как указано выше. Оказалось, что производительность образования ацилдофамина из CoA-эфира жирной кислоты в два-три раза выше таковой для свободной кислоты (таблица). Следовательно, в организме пресноводной гидры действует именно этот путь активации жирной кислоты.

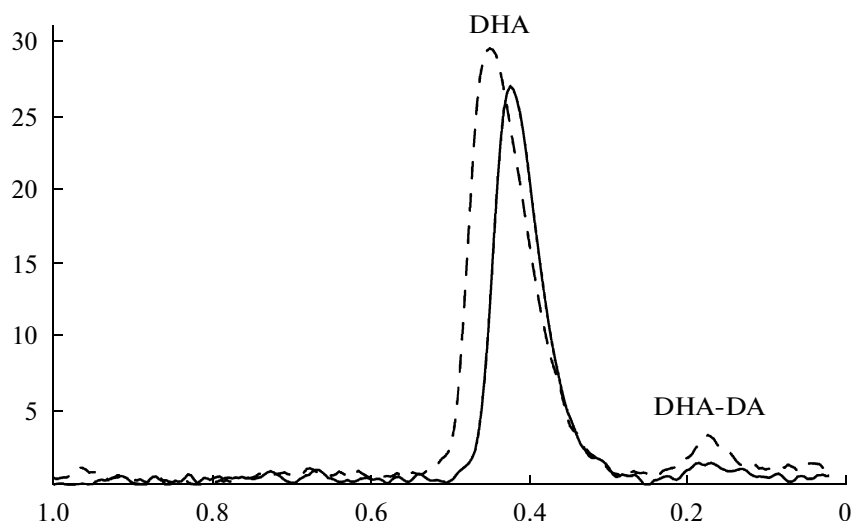


Рис. 3. Профили радиоавтограмм продуктов инкубации меченной тритием докозагексаеновой кислоты и тирозина с гомогенатом гидры *H. magnipapillata*: (—) — опыт, (—) — контроль. По оси абсцисс — интенсивность радиоактивности, усл. ед.; по оси ординат — отношение подвижности вещества к подвижности растворителя.

Таким образом, проведенное исследование показало, что: 1) максимальный пик содержания ДНА-ДА не коррелирует с выраженностью морфогенетического эффекта и 2) ДНА не обладает морфогенетическим влиянием на процесс регенерации гидры.

Ранее мы показали, что ряд ингибиторов синтеза дофамина и блокаторов его рецепторов влияют на процесс регенерации гидры (Остроумова, Маркова, 2000). Мы предположили, что это может быть связано с нарушением функций эндогенного дофамина. Внесение экзогенного дофамина могло бы снять или ослабить эффекты этих нарушений. Поскольку дофамин нестабилен в инкубационной среде, мы использовали в своих дальнейших экспериментах его устойчивый липофильный аналог — ДНА-ДА. В нашей работе при исследовании биохимических превращений ДНА-ДА в гомогенате гидры гидролиза комплекса ДНА-ДА не обнаружено, поэтому мы предполагаем, что его морфогенетический эффект может быть связан с дофаминовой составляющей этого комплекса. Это в свою очередь может свидетельствовать об участии как самих медиаторов, так и их комплексов с жирными кислотами в регуляции морфогенеза гидры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Акимов М.Г., Грецкая К.В., Шевченко В.П. и др. Новые аспекты биосинтеза и метаболизма N-ацилдофаминов в тканях крысы // Биоорганическая химия. 2007. Т. 33. С. 648–652.

Безуглов В.В., Маневич Е.М., Арчаков А.В. и др. Искусственно функционализированные полиеновые жирные кислоты — новые липидные биорегуляторы // Там же. 1997. Т. 23. С. 211–220.

Безуглов В.В., Грецкая Н.М., Блаженова Е.Л. и др. От ацил-аминокислот к N-ацилпептидам // Там же. 2006. Т. 32. С. 258–267.

Бузников Г.А., Безуглов В.В. 5-Гидрокситриптамыды и 3-гидрокситирамиды полиеновых жирных кислот в изучении донервных функций биогенных моноаминов // Рос. физиол. журн. 2000. Т. 86. № 9. С. 1093–1108.

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.

Маркова Л.Н., Остроумова Т.В., Акимов М.Г. и др. N-арахидоноилдофамин — возможный регулятор скорости закладки щупалец у пресноводной гидры при регенерации // Там же. 2008. Т. 39. № 5. С. 66–71.

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.

Di Marzo V., de Petrocellis L., Gianfrani C. et al. Biosynthesis, structure and biological activity of hydroxyeicosatetraenoic acids in *Hydra vulgaris* // Biochem. J. 1993. V. 295 (Pt. 1). P. 23–29.

Di Marzo V., Gianfrani C., De Petrocellis L. et al. Polyunsaturated-fatty-acid oxidation in *Hydra*: regioselectivity, substrate-dependent enantioselectivity and possible biological role // Ibid. 1994. V. 300 (Pt. 2). P. 501–507.

Folch J., Lees M., Stanley G.S. 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.

Leitz T., Muller W., De Petrocellis L. et al. Enantiospecific synthesis of bioactive hydroxyeicosatetraenoic acids (HETEs) in *Hydra magnipapillata* // Biochem. Biophys. Acta. 1994. V. 1213. № 2. P. 215–223.

Muller W.A., Leitz T., Stephan M. et al. Arachidonic acid and control of body pattern in *Hydra* // Roux's Arch. Devel. Biol. 1993. V. 202. P. 70–76.

Docosahexaenoyl Dopamine in Freshwater Hydra: Effects on Regeneration and Metabolic Changes

T. V. Ostroumova^a, L. N. Markova^b, M. G. Akimov^c, N. M. Gretskaya^c, and V. V. Bezuglov^c

^a *Moscow State University, Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia*

^b *Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 26 ul. Vavilova, Moscow, 119334 Russia*

e-mail: marlidus@yahoo.com

^c *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,*

16/10 ul. Miklukho-Maklaya, Moscow, 117871 Russia

Abstract—The effects of docosahexaenoyl dopamine and docosahexaenoic acid on the regeneration of hydra gastric and basal fragments are studied. Docosahexaenoyl dopamine induced morphogenetic abnormalities such as single ectopic tentacles in the gastric region and projections in the gastric and basal regions. Docosahexaenoic acid had no effect on the morphogenesis except for a mild slowing of the regeneration rate. Since no hydrolysis of docosahexaenoyl dopamine was detected in hydra extract, it was assumed that the morphogenetic effect could be associated with the dopamine component of this complex.

Key words: hydra, regeneration, morphogenesis, docosahexaenoyl dopamine, docosahexaenoic acid