

ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ КАК УНИВЕРСАЛЬНЫЕ ЭНДОГЕННЫЕ БИОРЕГУЛЯТОРЫ

П.Е. Назаров, студент, Г.И. Мяжкова, профессор,

Н.В. Гроза, научный сотрудник

кафедра Химии и технологии биологически активных соединений

им. Н.А. Преображенского МИТХТ им. М.В. Ломоносова

e-mail: grozanv@gmail.com

Изучение физиологической роли природных полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) на новой ступени развития научно-технического прогресса является весьма актуальным. Настоящий обзор посвящен вопросам биосинтеза ПНЖК, их регуляторных функций, распределения в липидах тканей животного организма. В обзоре также рассмотрены новые эффективные методы выделения и идентификации ненасыщенных жирных кислот и их метаболитов из биообъектов, такие как экстракция под давлением, капиллярный ЯМР, жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией.

Ключевые слова: полиненасыщенные жирные кислоты, фосфолипиды, эйкозаноиды, экстракция под давлением, капиллярный ЯМР, ВЭЖХ/МС

1. ВВЕДЕНИЕ

Полиненасыщенным кислотам алифатического ряда принадлежит одно из важных мест среди природных биологически активных соединений. Особое значение среди них имеют полиеновые кислоты состава C20 – *цис*-8,11,14-эйкозатриеновая (дигомо-γ-линоленовая), *цис*-5,8,11,14-эйкозатетраеновая (арахидоновая), *цис*-5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая. Они являются не только структурными компонентами липидов клеточных мембран, липопротеидных комплексов головного и спинного мозга, сердца, печени и других органов, но и предшественниками целого ряда их биологически важных метаболитов – простагландинов, циклопентенонов, простациклинов, тромбоксанов, лейкотриенов, липоксинов, гепоксилинов [1].

В основе процесса образования этих метаболитов в живой клетке лежит ферментативное окисление полиеновых кислот с последующим биопревращением в конечные соединения. О тромбоксанах известны факты их взаимосвязи с процессами тромбообразования и кроветворения, о лейкотриенах – участие в аллергических (анафилактических) реакциях организма. Простагландины достаточно хорошо изучены и известны как внутриклеточные биорегуляторы многих физиологически важных процессов, в связи с чем простагландины, их биопредшественники – полиеновые кислоты, а также меченые аналоги этих соединений вызывают повышенный интерес со стороны специалистов различных областей знаний. Также актуальными являются исследования по изучению механизмов терапевтической активности ненасыщенных жирных кислот и их метаболитов, растительных и грибных липидов с целью поиска новых малотоксичных противовоспалительных, антимикробных и противоопухолевых лекарственных средств [2, 3].

Следует отметить, что фосфолипиды составляют значительную долю от общего количества веществ животных клеток. Например, фосфолипиды составляют 20–25% сухой массы мозга взрослого животного, а вместе с холестерином и гликолипидами этот показатель составляет 50–60% [4]. Различные группы фосфолипидов распределены неравномерно на внешнем и внутреннем слоях мембраны. Фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин в основном сосредоточены на внутренней поверхности, а фосфатидилхолин и сфинголипиды – на внешней поверхности мембраны [4, 5]. Это распределение стабильно и регулируется специальными белками-переносчиками: флиппазами (flippases), флоппазами (floppases), скрамблазами (scramblases). В нормальной мембране существует постоянное динамическое равновесие между синтезом и распадом фосфолипидов, которое меняется при активации клеток или при возникновении каких-либо патологических условий, например, апоптоза [5].

В отдельную группу выделяют фосфолипиды с алкенильноэфирной и простой эфирной связью – плазмалогены. Они обнаружены во всех тканях животных, но особенно важна их роль в мембранах клеток мышечной ткани и нервной системы. В этих соединениях цепь одной жирной кислоты связана с глицерином сложноэфирной связью, а другой – винилэфирной или простой эфирной.

2. ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ВЫСВОБОЖДЕНИЕ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЛИПИДАХ ЖИВОТНОЙ КЛЕТКИ

Арахидоновая кислота содержится в простых и сложных липидах в значительных

количествах. В клетках она главным образом включена в фосфолипиды, которые составляют 40–90% от всех липидов клеточных мембран. Клетки, принимающие участие в воспалительных процессах, могут содержать до 20 различных фосфолипидов, в состав которых входит арахидоновая кислота. Тем не менее, основная ее доля находится в 1-(алк-1-енил)-2-арахиноил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламине [6]. Так, в макрофагах и нейтрофилах арахидоновая кислота занимает положение *sn*-2 в 40% фосфатидилэтаноламинов. В нейтрофилах человека ~75% арахидоновой кислоты найдено в плазменилэтаноламине. В сердце примерно каждый третий фосфолипид – плазмалоген, при этом 75% плазменилэтаноламина содержит арахидоновую кислоту. Фосфатидилхолины печени содержат до 40–50% арахидоновой кислоты и 25–30% линолевой.

На сегодняшний день не существует точного описания механизмов включения арахидоновой кислоты в каждый из фосфолипидных пулов. Ранее исследования показали, что начальное включение арахидоновой кислоты в фосфолипиды клеток млекопитающих регулируется активностью КоА-зависимой ацилтрансферазы (КоА – коэнзим А). В конце 1960-х гг. было показано, что арахидоновая кислота не включается при синтезе фосфолипидов *de novo* (ацилирование глицеро-3-фосфата), а включается позже – на стадии ацилирования 1-ацил-2-лизо-*sn*-глицеро-3-фосфолипидов. Однако модель включения арахидоновой кислоты в различные глицеролипиды по единому механизму не может объяснить асимметричного распределения арахидоновой кислоты по фосфолипидам клеток [6]. Например, известно, что в клетках, участвующих в воспалении, арахидоновая кислота изначально включается только в определенные классы фосфолипидов и затем медленно перераспределяется в другие.

Для решения вопроса о метаболизме арахидоновой кислоты в клетках чаще всего используют методику предварительного включения в клетки меченой ^{14}C - или ^3H -кислоты. Обычно клетки инкубируют с радиоактивно-мечеными жирными кислотами в течение различных промежутков времени, а затем отмывают от избытка не включившейся меченой кислоты. В меченых клетках анализируют распределение арахидоновой кислоты по различным классам липидов и оценивают ее долю в каждом классе. Изотопное равновесие в таких экспериментах достигается к 5–120 мин в зависимости от типа клеток [6, 7].

Существенным моментом исследований является изучение кинетики передвижения арахидоновой кислоты по внутриклеточным

фосфолипидным пулам до момента достижения равновесия. К настоящему времени по этому вопросу накоплено большое количество данных. Так, в нейтрофилах экзогенная ^3H -арахионовая кислота в первый момент времени включается в фосфатидилхолин и фосфатидилинозит [6]. Уже через 2 ч происходит заметное уменьшение содержания радиоактивной метки в 1-ацил-фосфолипидах и соответствующее увеличение ее содержания в 1-алкил-2-арахиноил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолине и 1-алк-1-енил-2-арахиноил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилэтаноламине [6]. Похожее перемещение ^3H -арахионовой кислоты в 1-алкил(алкенил)-фосфолипиде наблюдается в альвеолярных макрофагах [7], перитонеальных макрофагах [8], фибробластах, тучных клетках [9]. Перераспределение между различными фосфолипидами наблюдается не только при добавлении к клеткам свободной арахидоновой кислоты, но и содержащих ее фосфолипидов. Например, после инкубации альвеолярных макрофагов и нейтрофилов с 1-ацил-2- ^{14}C -арахиноил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолином радиоактивную метку находили в фосфатидилхолине и фосфатидилэтаноламине. Более того, было показано, что меченая арахидоновая кислота включается в индивидуальные фосфолипиды с различными скоростями, которые не зависят от количества эндогенной арахидоновой кислоты [9]. На основе этих наблюдений была предложена модель, которая с некоторыми модификациями представлена на рис. 1. Последовательное перемещение арахидоновой кислоты по различным фосфолипидным пулам обеспечивается такими ферментами, как арахидоил-КоА-синтетаза (КФ 6.2.1.15), КоА-зависимая ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.148), КоА-независимая ацилтрансфераза (КФ 2.3.1.147). Арахидоил-КоА-синтетаза катализирует синтез арахидоил-КоА из арахидоновой кислоты и КоА [10], поэтому ее рекомендуется называть арахидоил-КоА-лигаза. КоА-зависимая ацилтрансфераза переносит остаток жирной кислоты из ацил-КоА на акцептор – лизофосфолипид [3]. КоА-независимая ацилтрансфераза переносит остаток жирной кислоты от донора-фосфолипида к акцептору-лизофосфолипиду, не используя КоА и не образуя промежуточного продукта – свободной жирной кислоты. Цикл ацилирования–деацилирования различных фосфолипидных пулов поддерживает баланс между свободной и этерифицированной арахидоновой кислотой, помогая сохранять низкий уровень лизофосфолипидов и свободной арахидоновой кислоты в клетках.

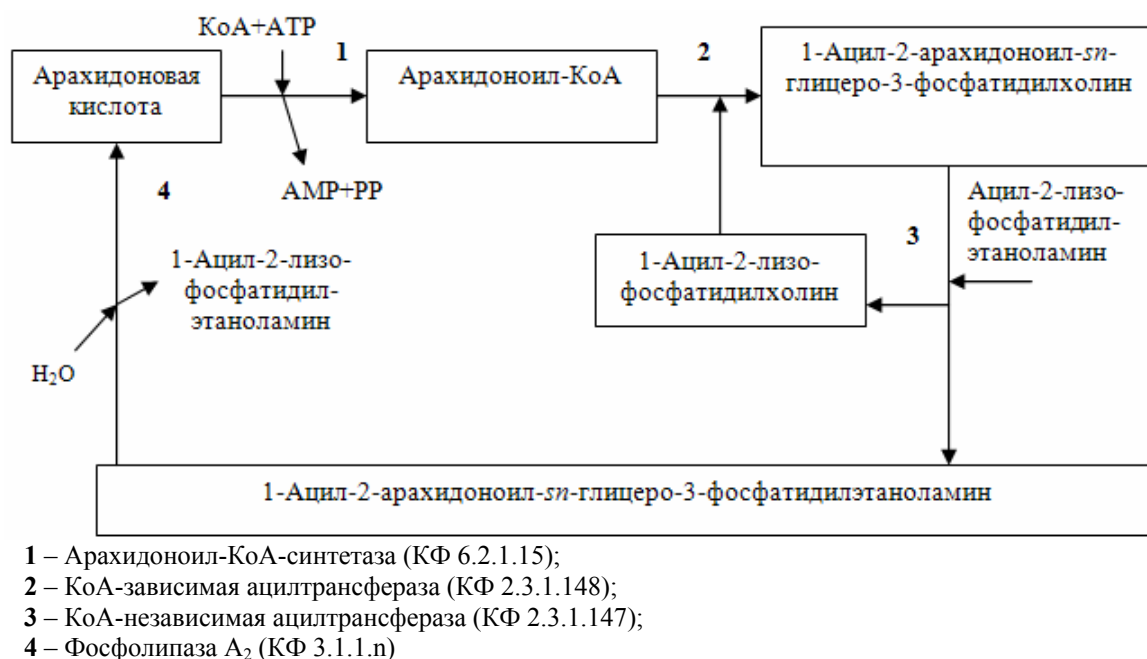


Рис. 1. Схема перераспределения арахидоновой кислоты между фосфолипидами клетки [9].

Установлено, что при активации клеток арахидоновая кислота быстро высвобождается и перераспределяется между пулами специфических фосфолипидов. Например, была определена активность ферментов, регулирующих концентрацию свободной арахидоновой кислоты в клетках макрофагальной линии P388D1. Показано, что активность арахидоноил-КоА-синтетазы составляет 10000, ацилтрансферазы – 3300, КоА-независимой трансацилазы – 115, а кальций-независимой фосфолипазы A₂ – 233 пмоль/ (мин × мг) [11]. Сопоставление этих данных показывает, как высока активность ферментативной системы обратной этерификации арахидоновой кислоты в мембранные фосфолипиды. Такой механизм позволяет поддерживать концентрацию свободной арахидоновой кислоты на низком уровне.

При стимуляции клеток возрастает их способность высвобождать арахидоновую кислоту из фосфолипидов, в то же время увеличивается способность многих клеток включать арахидоновую кислоту в фосфолипиды [9]. Эта повышенная скорость реацилирования может повлиять на регуляцию последующего выброса арахидоновой кислоты, так как происходит активное передвижение арахидоновой кислоты в фосфолипиды, доступные для фосфолипазы A₂. Действительно, вещества, которые ингибируют КоА-независимую трансацилазу, также являются ингибиторами выброса арахидоновой кислоты и синтеза лейкотриенов на уровне клеток [12]. Более того, при этом многие клетки перестают участвовать в клеточном цикле, и развивается апоптоз [13]. Следует отметить, что изомеры ингибиторов КоА-независимой трансацилазы,

которые не вызывали ингибирования фермента в опытах *in vitro*, были также не активны в опытах *in vivo* и не вызывали апоптоза. На основании этих данных логично предположить, что при блокировании КоА-независимой трансацилазы основной вклад в развитие апоптоза вносит арахидоновая кислота. В пользу этого предположения свидетельствуют данные, полученные для клеток линии HL-60, содержание арахидоновой кислоты в фосфолипидах которых снижено. Такие клетки менее чувствительны к развитию апоптоза при ингибировании КоА-независимой трансацилазы, при этом в клетках наблюдается значительное накопление свободной арахидоновой кислоты [13, 14]. В настоящее время активно обсуждается роль КоА-независимой трансацилазы в создании новых терапевтических методов лечения различных заболеваний, связанных с нарушениями пролиферативных процессов.

Специфичность включения внеклеточной, так называемой экзогенной арахидоновой кислоты в тот или иной липидный пул во многом определяется концентрацией самой арахидоновой кислоты. Существуют пути, по которым арахидоновая кислота, добавленная к клеткам в высоких концентрациях, может включаться в триацилглицерины [15]. По крайней мере, в опытах *in vitro* для нейтрофилов показано, что существует прямая зависимость между концентрацией экзогенной арахидоновой кислоты и ее количеством, появляющимся в триацилглицеринах. До сих пор точно не установлено, используется ли *in vivo* обнаруженный *in vitro* путь включения арахидоновой кислоты в триацилглицерины.

Известно лишь, что некоторые типы клеток содержат в триглицеридах заметное количество арахидоновой кислоты, например, это клетки, относящиеся к легочной системе, такие, как тучные клетки, альвеолярные макрофаги, нейтрофилы легких [16]. Повышенное содержание арахидоновой кислоты в триацилглицеринах считается маркером хронического воспаления. В таком случае триацилглицеринам отводится роль накопительного пула для арахидоновой кислоты, которая высвобождается при хроническом воспалении из активированных клеток. Связывание избыточной арахидоновой кислоты в триглицеридах позволяет поддерживать низкий уровень свободной внутриклеточной кислоты. Параллельно включению в триглицериды емкость клеток по арахидоновой кислоте может увеличиваться также за счет ее вхождения в уникальный фосфолипидный пул, представленный 1,2-диарахиноил-*sn*-глицеро-3-фосфатом [15]. Каким путем этот пул участвует в контроле содержания арахидоновой кислоты, пока неясно.

Таким образом, арахидоновая кислота включается в фосфолипиды не при синтезе их *de novo*, а только на стадии ацилирования 1-ацил-2-лизо-*sn*-глицеро-3-фосфолипидов. Необходимо отметить, что арахидоноил-КоА, который выступает в качестве ацилирующего агента, синтезируется при помощи селективных арахидоноил-КоА-синтетаз. В распределении арахидоновой кислоты по липидам принимает участие большое число различных ферментов. Можно предположить, что перераспределение жирных кислот по биохимическим маршрутам, представленным на рис. 1, существует только для полиненасыщенных жирных кислот. Так, показано, что фосфолипиды, содержащие в положении *sn*-2 насыщенные, мононенасыщенные и даже диненасыщенные кислоты (например, линолевую кислоту) не участвуют в этих процессах, так как не являются субстратами для КоА-независимой трансацилазы [17] и перемещаются между фосфолипидными пулами по другим маршрутам. Специфичность различных ферментов перераспределения арахидоновой кислоты относительно других полиненасыщенных жирных кислот до сих пор не исследована. В связи с этим остается открытым вопрос о влиянии полиненасыщенных жирных кислот на включение и метаболизм арахидоновой кислоты в клетках различных типов.

3. ПОЛИНЕНАСЫЩЕННЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ В ОРГАНИЗМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

3.1. Основные свойства ПНЖК

Поскольку физиологические свойства

ПНЖК определяются положением первой двойной связи относительно метильной группы алкильного конца цепи, часто используют обозначение вида М:Н (n-L), где М – число атомов углерода, N – число двойных связей, L – положение первой двойной связи при нумерации атомов углерода от алкильного конца молекулы.

Иногда местоположение двойной связи обозначают символом Δ , который ставят перед порядковым номером первого углеродного атома при двойной связи; нумерацию атомов углерода в таком случае начинают от наиболее окисленной группы (карбоксигруппы = C-1) [18].

Жирные кислоты семейства n-3. Наиболее важными представителями семейства α -линоленовой кислоты являются эйкозапентаеновая 20:5 (n-3) и докозагексаеновая 22:6 (n-3) кислоты, наибольшие количества которых находятся в коре головного мозга, сетчатке глаз, везикулярных железах и мышцах. Состав ПНЖК в липидах в значительной степени определяется рационом питания [19]. Существенное влияние на этот состав оказывают особенности обмена и метаболизма жирных кислот отдельных индивидуумов [20]. Потребление с пищей различных n-3 жирных кислот приводит к изменению пропорций жирных кислот в составе фосфолипидов мембран клеток. Это связано с тем, что остатки ПНЖК в основном занимают одно и то же *sn*-2-положение в фосфолипидах клеточных мембран, поэтому увеличение содержания n-3-кислот происходит за счет уменьшения количества n-6-кислот. Группы людей, получающих питание, обогащенное n-3-кислотами, менее подвержены ишемической болезни сердца и имеют меньшую свертываемость крови, что связывают с ослабленной агрегацией тромбоцитов, понижением кровяного давления, ослаблением циркуляции триацилглицеринов и холестерина. Обнаружены также положительные эффекты при артритах, нарушении функции почек [21] и других заболеваниях. В настоящее время различают эффекты различных n-3-кислот, в первую очередь линоленовой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот. Из эйкозапентаеновой кислоты образуются продукты, которые оказывают ингибиторное действие на провоспалительные вещества арахидонового каскада. Докозагексаеновая кислота имеет очень важное значение для центральной нервной системы, где содержание ее в позиции *sn*-2 фосфолипидов достигает 50% от общего количества ПНЖК. Содержание этой кислоты уменьшается при таких

заболеваниях, как болезнь Альцгеймера и ряде других нейродегенеративных болезней [4].

Жирные кислоты семейства n-6. Арахидоновая кислота 20:4 (n-6) – главный представитель n-6-семейства. Как в свободном виде, так и в составе различных фосфолипидов она встречается во всех органах и тканях млекопитающих. Наиболее богата арахидоновой кислотой печень. В нормальном состоянии из n-6-семейства только арахидоновая 20:4 (n-6) и линолевая 18:2 (n-6) кислоты присутствуют в организме в заметных количествах. В некоторых тканях, например, в везикулярных железах, количественно значимы также кислоты C-22 (22:4 (n-6) и 22:5 (n-6)) [21].

В ряду жирных кислот арахидоновая кислота является уникальным соединением. Она служит предшественником большого ряда физиологически активных веществ – эйкозаноидов. Эти вещества образуются при окислении арахидоновой кислоты с участием большого числа ферментов по циклооксигеназному (простагландины и тромбоксаны), липоксигеназному (гидроксикислоты и лейкотриены), эпоксигеназному (эпоксиэйкозатриеновые кислоты и гидроксикислоты) (рис. 2). Считается, что некоторые производные, например изопростаны, могут образовываться нефермен-

тативно.

Концентрацию арахидоновой кислоты в нестимулированных клетках обычно характеризуют как низкую. Данных о концентрации свободной арахидоновой кислоты внутри клеток крайне мало. Общую концентрацию арахидоновой кислоты в тромбоцитах оценивают как 5 мМ. Высвобождение 1% этого количества может создавать локальную концентрацию арахидоновой кислоты (до ее выброса во внеклеточную среду) 50 мкМ. В действительности выброс может достигать 10%. В псориазных бляшках концентрация свободной арахидоновой кислоты составляет 30 мкг/г (100 мкМ), при этом в нормальной коже этот показатель составляет около 4 мкг/г (13 мкМ). Нестимулированные лейкоциты содержат около 3×10^{-12} моль арахидоновой кислоты на 1 млн. клеток, что составляет около 0.5–1 мкМ. В изолированных островках Лангерганса концентрация арахидоновой кислоты равна примерно 15 мкМ [22]. Физиологической можно считать концентрацию свободной арахидоновой кислоты 1–10 мкМ, так как в этом диапазоне она оказывает специфическое влияние на клетки. В более высоких концентрациях арахидоновая кислота может оказывать неспецифическое повреждающее действие.

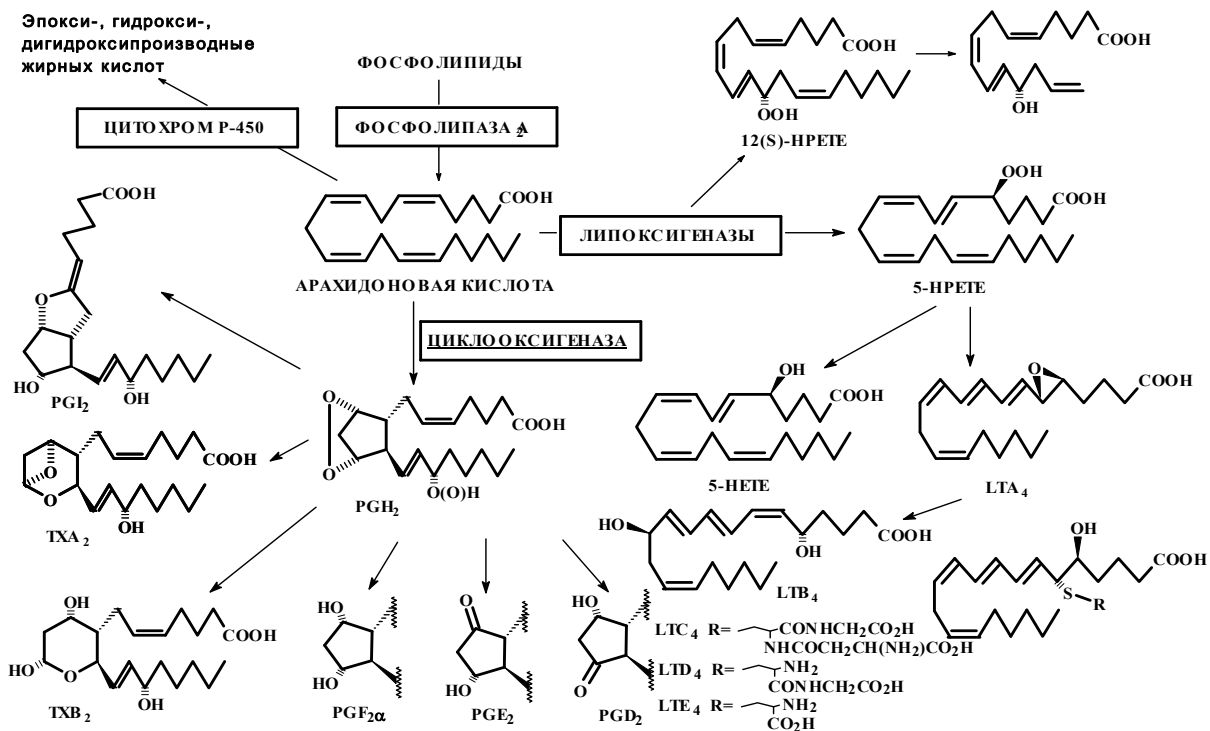


Рис. 2. Каскад окисления арахидоновой кислоты [20].

НЕТЕ – гидроксиейкозатетраеновая кислота; НРЕТЕ – гидропероксиейкозатетраеновая кислота; LT – лейкотриен; PG – простагландин; TX – тромбоксан.

Жирные кислоты семейства n-7. Из всех кислот n-7 в обычных условиях только пальми-

тоеновая кислота 16:1 (n-7) содержится в организме в заметных количествах. Однако в мозге

зародыша животных доля петроселеновой кислоты 18:1 (n-7) может доходить до 2.5–3% от общего количества ПНЖК. 4,7,10,13-Эйкозатетраеновая кислота 20:4 (n-7), имеющая сдвиг в положении двойных связей всего на один атом углерода по сравнению с арахидоновой кислотой 20:4 (n-6), образуется только при недостатке в организме кислот n-6 и n-3, и быстро замещается на них в фосфолипидах, когда эти кислоты становятся доступными [21].

Жирные кислоты семейства n-9. Самая распространенная кислота семейства n-9 – олеиновая 18:1 (n-9); кислоты, производные из нее – 18:2 (n-9), 20:2 (n-9) и 20:3 (n-9) – синтезируются в заметных количествах только при недостатке кислот n-6 и n-3 в организме и могут частично замещать их в мембранах, но не могут служить субстратами в синтезе эйкозаноидов. Повышенное содержание кислот 20:3 (n-9) может служить индикатором недостатка кислот n-6 и n-3 в организме [21, 23].

Таким образом, физиологические эффекты и метаболизм ПНЖК взаимосвязаны. Особую роль в организме играет соотношение кислот n-3 и n-6. Взаимодействие кислот этих двух классов на уровне клеток остается мало изученным.

3.2. Синтез ПНЖК в организме животных

Синтез длинноцепочечных жирных кислот n-6 и n-3 в организме требует наличия нескольких ферментов элонгации и десатурации (рис. 3). $\Delta 6$ -Десатураза превращает линолевую 18:2 (n-6) и α -линоленовую 18:3 (n-3) кислоту в γ -линоленовую 18:3 (n-6) и стеарионовую 18:4 (n-3) кислоту, соответственно. Система ферментов элонгации (включает четыре фермента) «добавляет» два углеродных атома к карбонильному концу молекулы и образуется дигомо- γ -линоленовая кислота 20:3 (n-6) из кислоты 18:3 (n-6) и эйкозатетраеновая кислота 20:4 (n-3) из кислоты 18:4 (n-3). Затем $\Delta 5$ -десатураза превращает жирные кислоты 20:3 (n-6) и 20:4 (n-3) в арахидоновую и эйкозопентаеновую кислоту, соответственно [24].

Ранее считали, что докозопентаеновая 22:5 (n-6) и докозагексаеновая 22:6 (n-3) кислоты образуются из кислот 22:4 (n-6) и 22:5 (n-3) под действием $\Delta 4$ -десатуразы, однако недавние исследования показали, что такой десатуразы в тканях животных нет. В ряде работ показано, что докозагексаеновая кислота в клетках животных образуется последовательными стадиями удлинения, десатурации и затем укорачивания цепи [26].

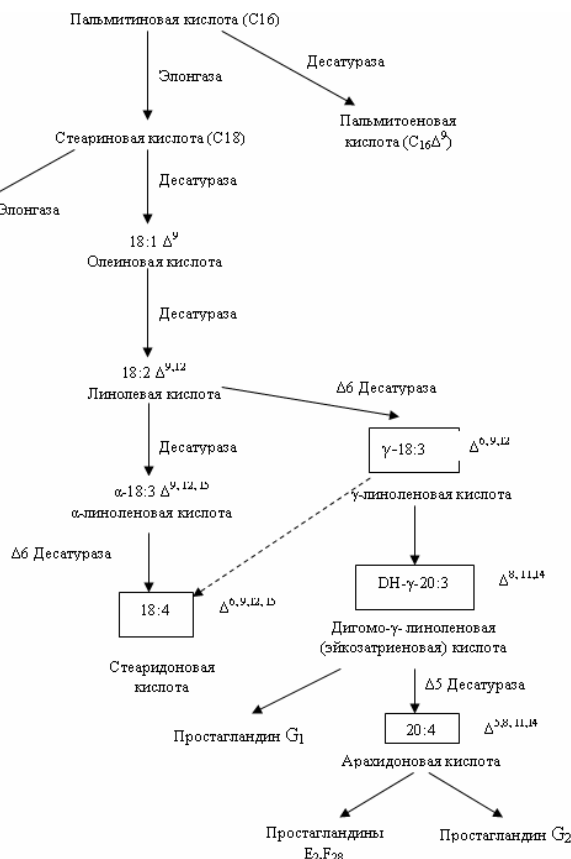


Рис. 3. Схема синтеза полиненасыщенных жирных кислот в организме животных [25].

Таким образом, работает трехступенчатая схема: (1) элонгация 20:4 (n-6) → 22:4 (n-6) →

24:4 (n-6) – для превращения кислот n-6 и 20:5 (n-3) → 22:5 (n-3) → 24:5 (n-3) для метаболизма

кислот n-3; (2) десатурация 24:4 (n-6) → 24:5 (n-6) для кислот n-6 и 24:5 (n-3) → 24:6 (n-3) для кислот n-3; затем (3) ретро-конверсия (от 24:5 (n-6) к 22:5 (n-6) и от 24:6 (n-3) к 22:6 (n-3) путем β-окисления в пероксисомах (рис. 4). Специфические к ПНЖК

ферменты элонгации находятся в микросомах [25].

Возможно, все три этапа элонгации катализируются различными ферментами. В настоящее время известно пять элонгаз.

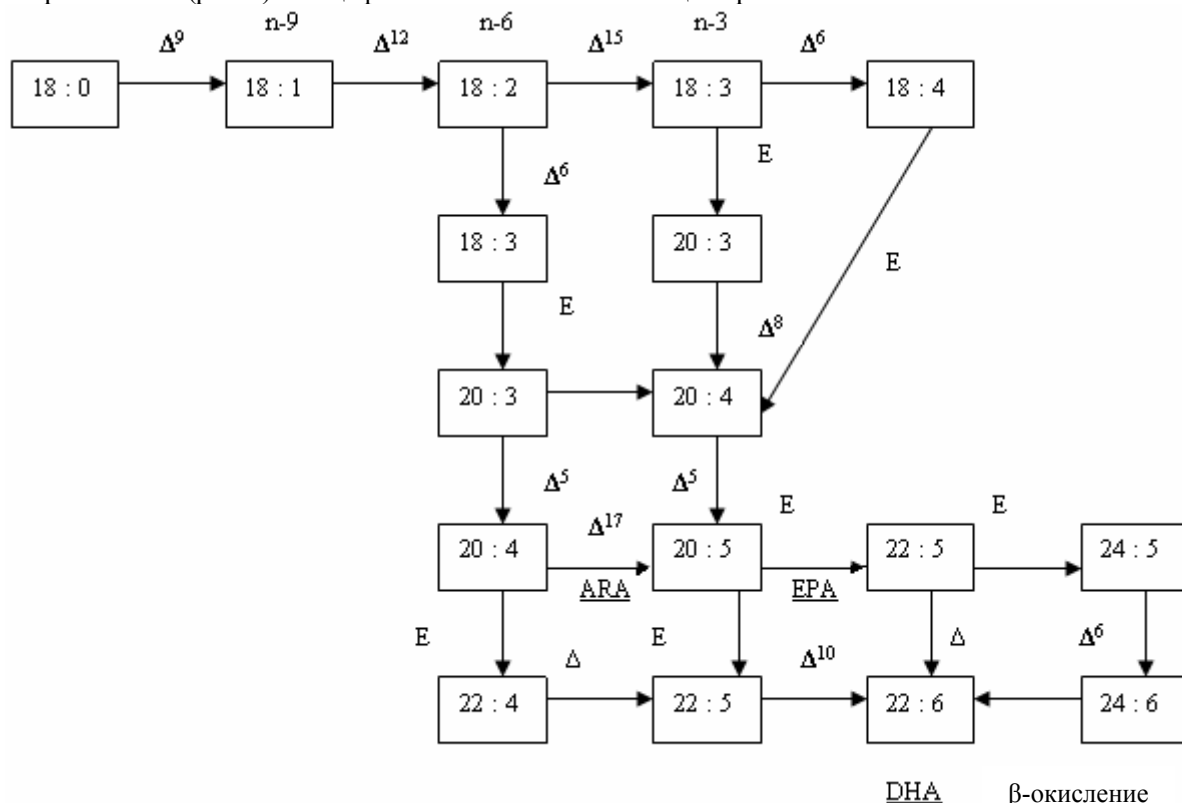


Рис. 4. Биосинтез длинноцепных ненасыщенных жирных кислот [26].

ARA – арахидоновая кислота; DHA – докозагексаеновая кислота; EPA – эйкозапентаеновая кислота; E – элонгаза; Δ – десатураза.

Длительное время было сложно изучать особенности синтеза ПНЖК *in vivo* из-за отсутствия специфических ингибиторов десатураз. Когда они были созданы (например, соединение SC-26196) и введены в состав пищи животных, выяснилось, что ингибирование десатураз приводит к понижению содержания арахидоновой и докозагексаеновой кислот в фосфатидилхолинах и эфирах холестерина, но в фосфатидилсеринах, фосфатидилинозитах, триацилглицеринах их количество не изменялось.

Показано, что активность Δ6- и Δ5-десатураз уменьшается при диабете, снижается и содержание арахидоновой кислоты в клетках. Экспрессия Δ5-десатуразы в значительных количествах обнаружена в печени, мозге, сердце, встречается она также во многих других тканях, включая легкие, почки, скелетные мышцы, плаценту. Высказано предположение, что аномалии в экспрессии Δ6- и Δ5-десатураз играют важную роль в развитии ожирения [27]. До недавнего времени транспорт длинноцепочечных жирных кислот в организме после их синтеза в определенных органах и тканях не

рассматривался. В настоящее время этому вопросу уделяется большое внимание. Пересмотрено первоначальное мнение, что длинноцепочечные жирные кислоты синтезируются преимущественно в печени. Обсуждаются вопросы перемещения синтезируемых кислот не только между различными участками клеток, но и между разными типами клеток. Нейроны не имеют возможности синтезировать арахидоновую кислоту и поэтому получают ее в результате транспорта из кровотока в свободной форме или в форме фосфолипидов через липопротеиновые рецепторы эндотелиальных клеток. Кроме того, важным источником арахидоновой кислоты для нейронов являются астроциты, которые способны синтезировать арахидоновую кислоту из линолевой [27].

4. ПНЖК КАК ЭНДОГЕННЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

4.1 Развитие понятия «незаменимые жирные кислоты»

Интерес к эффектам полиненасыщенных кислот как терапевтическому потенциалу основан на

результатах более чем 70-летних исследований и исключительно интересных данных, полученных за последние 20 лет. В какой-то степени сама идея использования каких-либо веществ, обычно потребляемых с пищей, в качестве терапевтических средств, отражает новые тенденции в фармакологии, заключающиеся в постепенном переключении от поисков химических соединений, которые являются точечными ингибиторами каких-либо конкретных биохимических процессов, к поискам «физиологических» регуляторов и модуляторов сложных биохимических систем.

Незаменимыми называют питательные вещества, которые необходимы для нормального развития и функционирования организма в течение всего жизненного цикла. Первоначально в это понятие включали только те вещества, синтез которых организмом невозможен и они должны быть получены с пищей. В настоящее время стало понятно, что ко-

личество необходимых организму незаменимых питательных веществ зависит от вида животных, пола, возраста, имеющих физиологических и патологических изменений (беременность, кормление грудным молоком, детство, старость, инфекционные болезни и т. д.).

Какие именно ПНЖК следует относить к незаменимым, до сих пор – предмет дискуссии (рис. 5) [24]. Это связано с тем, что к настоящему времени накопилось много данных для того, чтобы рассматривать биохимические процессы в организме как единую взаимосвязанную систему. В свете этого следует отметить опасную тенденцию упрощать «полезность» и «вредность» тех или иных веществ, которая характерна для «медицинских» текстов, обращенных к потребителю. Настораживает вольное использование ПНЖК как биологически активных добавок (БАД), что в действительности приводит к неконтролируемому употреблению населением физиологически активных веществ.

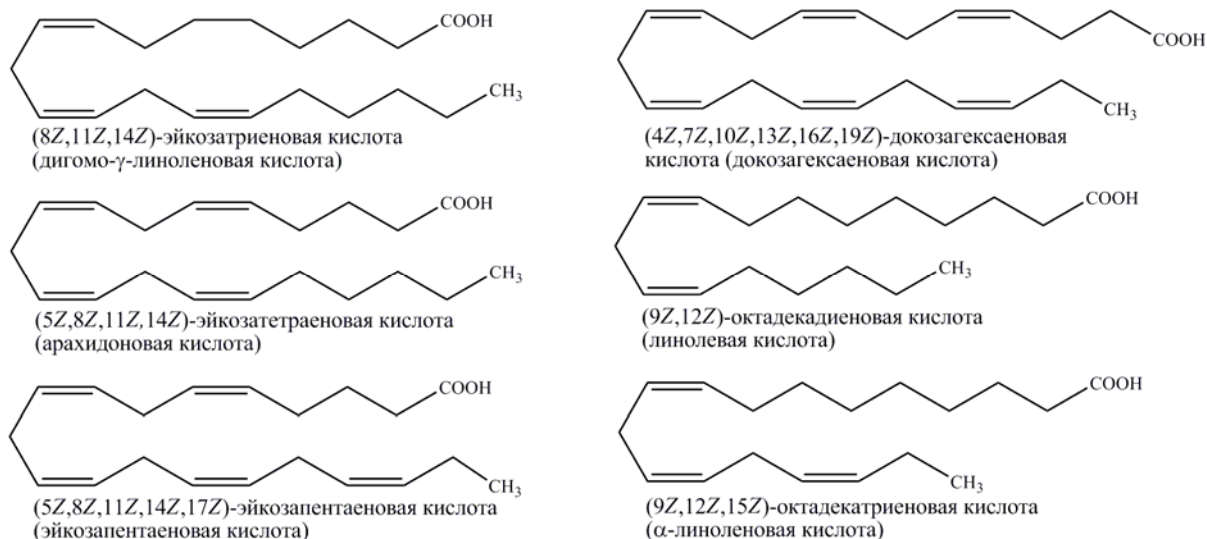


Рис. 5. Незаменимые жирные кислоты [24].

Первые сведения о том, что жиры пищи могут быть особенно важны для здоровья и роста животных, были получены Ароном в 1918 г. В 1929 г. было показано, что полное исключение жиров из рациона приводит к заболеваниям, и была выдвинута гипотеза о невозможности синтезировать необходимые количества определенных жирных кислот теплокровными животными [3]. Позже было показано, что введение в обезжиренную диету линолевой кислоты 18:2 (n-6) устраняет симптомы дефицита. Линолевая и α-линоленовая кислоты долгое время носили объединенное название «витамина F» [3]. Эти кислоты не могут быть синтезированы организмом человека *de novo*. Их дефицит приводит к изменениям кожных покровов, уменьшению скорости роста, карликовым размерам взрослых

животных и т.д. До начала 1950-х гг. исследования проводили по следующим направлениям: 1) изучение комбинаций кислот в диетах; 2) проведение «биопроб», т.е. моделирования на животных, по результатам которого можно отслеживать влияние питания на физиологические параметры; 3) развитие и совершенствование методов определения жирных кислот на основе газовой хроматографии [3].

Было предложено анализировать следующие биологические характеристики: изменение кожных покровов, скорость роста, размеры взрослых животных, стерильность животных, смертность эмбрионов и т.д. Интересным является тот факт, что хотя такие химически и биохимически различные вещества, как линолевая и α-линоленовая кислоты, известные еще в 1920-е гг., только спустя

30 лет стали обращать на себя внимание диетологов, а еще через 30 лет начались многочисленные исследования действия кислот $n-3$ и $n-6$, потребляемых с пищей, на организм животных и человека.

С начала 1950-х гг. газовая хроматография стала доступным методом исследования. Произошла также некоторая стандартизация методов экстракции и измерения содержания жирных кислот в тканях. Было введено так называемое отношение «триен»:«тетраен», которое являлось отношением концентрации медовой 20:3 ($n-9$) и арахидоновой 20:4 ($n-6$) кислот. Это соотношение связано с содержанием линолевой кислоты в пище. Исследования роли жирных кислот перешли от «биопроб» к количественным характеристикам. Основное внимание уделялось кислотам $n-6$. Такая ситуация сохранялась до начала 1980-х гг. [28].

В середине 1970-х - начале 1980-х гг. эпидемиологические исследования показали, что для Японии и Гренландии характерна пониженная смертность населения от сердечно-сосудистых заболеваний, и это коррелирует со значительным содержанием рыбы в пищевом рационе жителей данных регионов. Рыба обогащена жирными кислотами $n-3$. Было определено содержание арахидоновой и эйкозатетраеновой кислот в фосфолипидах тромбоцитов жителей Европы и США (I группа), Японии (II группа) и эскимосов Гренландии (III группа). Оказалось, что отношение концентрации арахидоновой кислоты к концентрации эйкозатетраеновой кислоты составляет 50, 12, 1 для первой, второй и третьей группы, соответственно. Смертность от сердечно-сосудистых заболеваний по отношению к общей смертности составляет 45, 12, 1 для первой, второй и третьей группы, соответственно, т.е. существует прямая зависимость между соотношением концентраций кислот $n-6$ и $n-3$ и смертностью от сердечно-сосудистых заболеваний. Это стимулировало развитие исследований роли жирных кислот $n-3$ в регуляции различных функций организма [28-30].

Теперь известно, что кислоты $n-3$ необходимы для роста и развития организма и играют важную роль в предотвращении и лечении ишемической болезни сердца, гипертонии, диабета [28], ревматоидного артрита, других воспалительных и иммунных заболеваний, а также рака [30]. Исследования проводились на культурах тканей, животных и человеке. Произошел значительный прогресс в знаниях о физиологических и молекулярных механизмах действия различных жирных кислот в норме и при развитии патологий.

Такое бурное развитие научных знаний происходит на фоне обратных тенденций в питании населения. Действительно, по оценкам ученых, пища древнего человека содержала гораздо меньше насыщенных жирных кислот, чем пища нашего современника. Более того, древняя пища содержала почти равные количества кислот $n-6$ и $n-3$ (в соотношении около 1.5 : 1) и меньше жирных кислот с *транс*-конфигурацией системы двойных связей, чем современная пища. В ходе эволюции общее содержание жиров в пище составляло чуть более 20%. Ситуация начала меняться с середины XIX в. в сторону увеличения этого показателя, и в настоящее время содержание жиров достигает почти 40%. Содержание *транс*-кислот было около 1% и выросло до 10% с середины XX в., соотношение кислот $n-6$ и $n-3$ стало (20-30) : 1 (питание жителей развитых стран). Такое резкое изменение вызвано рекомендацией заменять ненасыщенными жирными кислотами насыщенные жиры, для снижения концентрации холестерина в крови. По стечению обстоятельств этими ненасыщенными кислотами оказались преимущественно кислоты $n-6$, так как они более распространены в маслах, используемых в питании европейцев (табл. 1). Потребление кислот $n-3$ снизилось, кроме того, из-за уменьшения потребления рыбы и увеличения потребления мяса животных, выращенных на искусственных кормах, которые обогащены зерном, содержащим кислоты $n-6$. Такое питание животных привело к производству мяса, обогащенного кислотами $n-6$, с пониженным содержанием кислот $n-3$. То же верно для промышленно выращиваемых рыб и производства яиц. Даже культивируемые овощи содержат меньше кислот $n-3$, чем их дикие предки [28, 30].

В табл. 2 приведено содержание кислот $n-3$ в разных видах рыб – основном источнике кислот этого класса.

Линолевая 18:2 ($n-6$) и α -линоленовая 18:3 ($n-3$) кислоты и их длинноцепочечные производные – важные компоненты клеточных мембран растений и животных. Когда человек потребляет рыбу или рыбий жир, эйкозапентаеновая и пентаеновая и докозагексаеновая кислоты из пищи заменяют арахидоновую кислоту в клеточных мембранах, особенно в тромбоцитах, эритроцитах, нейтрофилах, моноцитах и клетках печени [31–34]. Это приводит к следующему:

1) уменьшается синтез простагландина E_2 и тромбоксана A_2 – веществ, стимулирующих агрегацию тромбоцитов и сужение сосудов;

Таблица 1. Содержание линолевой 18:2 (n-6) и α -линоленовой 18:3 (n-3) кислот в растительных маслах и орехах [24].

Продукт	Содержание кислоты, мол. %		Соотношение кислот n-6 и n-3
	18:2 (n-6)	18:3 (n-3)	
Касторовое масло	4.0	Следы	>4.0
Кокосовое масло	1.4		
Кукурузное масло	52.0	1.0	52.0
Хлопковое масло	50.5	Следы	>50.0
Конопляное масло	55.0	25.0	2.2
Льняное масло	14.2	59.8	0.24
Горчичное масло	8.9	10.4	0.85
Оливковое масло	7.3	0.6	12.2
Пальмовое масло	10.6	0.2	53.0
Рапсовое масло	23.5	14.0	1.7
Кунжутное масло	45.0	0.6	75.0
Соевое масло	53.0	7.5	7.1
Подсолнечное масло	68.5	0.1	685
Масло энотеры	74.9	-	-
Масло из виноградных косточек	67.0	0.9	74.4
Масло из зародышей пшеницы	57.9	5.1	11.4
Каштан	24.9	2.7	9.2
Грецкий орех	57.4	13.1	4.4

Таблица 2. Содержание α -линоленовой 18:3 (n-3), эйкозапентаеновой 20:5 (n-3) и докозагексаеновой 22:6 (n-3) кислот в различных морепродуктах [30].

Название продукта	Содержание кислоты, мол. %			Соотношение кислот 20:5 (n-3)/22:6 (n-3)
	18:3 (n-3)	20:5 (n-3)	22:6 (n-3)	
Мойва	нет свед.	8.6	4.8	1.8
Треска	0.1	17.7	37.5	0.5
атлантическая ¹				
Пикша	0.3	14.3	24.3	0.6
Палтус	нет свед.	12.6	19.2	0.7
Сельдь океаническая	0.6	8.6	7.6	1.1
Скумбрия (макрель)	1.3	7.1	10.8	0.7
Кефаль	1.4	7.5	13.4	0.6
Чавыча	0.9	8.2	5.9	1.4
Кета	1.0	6.7	16.1	0.4
Розовый лосось	1.1	13.5	18.9	0.7
Сардина	1.3	9.6	8.5	1.1
Морской окунь	нет свед.	3.7	33.8	0.1
Камбала	2.0	11.9	7.0	1.7
Форель радужная	5.2	5.0	19.0	0.3
Тунец	следы	6.4	17.1	0.4
Краб	1.2	13.4	11.0	1.2
Мидия	нет свед.	14.0	27.7	0.5
Устрица	1.6	21.5	20.2	1.1

¹ Треска является основным источником промышленного получения рыбьего жира и к потребителю может поставляться в частично обезжиренном виде.

2) уменьшается образование лейкотриена В₄ (ЛТВ₄), вызывающего воспаление, хемотаксис лейкоцитов и их адгезию;

3) увеличивается синтез тромбоксана А₃, который является по сравнению с тромбоксаном А₂ слабым эффектором агрегации

тромбоцитов и сужения сосудов;

4) растет концентрация простаглицина группы 3, без увеличения содержания простаглицина группы 2 (оба соединения являются активными сосудорасширяющими препаратами и ингибиторами агрегации тромбоцитов);

5) увеличивается концентрация LTB_5 – слабого провоспалительного агента.

Увеличение содержания арахидоновой кислоты в пище обуславливает повышение концентрации ее метаболитов, что в свою очередь приводит к росту риска тромбообразования, формированию атеросклеротических бляшек, развитию аллергических и воспалительных заболеваний, ускорению клеточной пролиферации, замедлению кровотока [3]. На протяжении ряда лет проф. А. Т. Мевх совместно с кафедрой клинической фармакологии Московского стоматологического университета им. Н.А. Семашко проводили исследования по определению концентрации ПНЖК n-3 и n-6 в плазме крови здоровых людей и больных ишемической болезнью сердца до и после применения пищевой добавки, обогащенной кислотами n-3. Месячное применение лечебной пищевой добавки «Эйконол» (с повышенным содержанием жирных кислот n-3) оказывало положительное клиническое действие. Концентрация докозагексаеновой и эйкозапентаеновой кислот значительно (в 2-3 раза) понижалась у больных по сравнению с группой здоровых людей. «Эйконол» достоверно снижал у больных концентрацию арахидоновой кислоты (примерно в 2 раза) и практически не влиял на содержание других жирных кислот, изменяя лишь долю каждой из них по отношению к общей сумме всех предшественников и ингибиторов синтеза тромбосана и простагличина, приближая эти значения к определяемым у контрольной группы практически здоровых людей [31].

Рекомендации для потребления жирных кислот сделать непросто, так как оптимальные потребности зависят не только от вида патологии, но и от возраста и пола индивидуума. В целом на 3-6% общего потребления жиров рекомендуется около 1% линолевой и 1% α -линоленовой кислоты и около 0.4% эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот. Следует отметить, что важно даже не общее количество потребляемых кислот n-6 и n-3, а их соотношение [24].

4.2 Роль ПНЖК в питании и поддержании баланса клеток кожи

Ведущую роль в поддержании водного баланса кожи отводят линолевой кислоте [29]. Действительно, основные симптомы дефицита линолевой кислоты в пище – появление чешуйчатости кожи и увеличение потери воды через кожу. Это свидетельствует об эпидермальной гиперпролиферации и изменении проницаемости кожи для воды. Введение линолевой кислоты в питание устраняет эти

дефекты, хотя механизм этого действия на клеточном уровне пока не установлен. Показано, что инкубация линолевой кислоты с 15-липоксигеназой, полученной из эпидермиса кожи, приводит к образованию преимущественно 13-HODE и 9-HODE (HODE – гидроксидекадекадиеновая кислота) в качестве минорных метаболитов [29]. Эпидермис кожи уникален в том смысле, что линолевая кислота преимущественно окисляется, а не превращается в дигомо- γ -линоленовую кислоту, как в других тканях. Введение в питание масел злаков приводит к увеличению содержания 13-HODE в коже, который преимущественно включен в положение sn-2 фосфатидилинозит-4,5-бисфосфата. При действии фосфолипазы C происходит образование специфического 1-ацил-2-13-HODE-глицерина, который ингибирует активность протеинкиназы C, что приводит к гиперпролиферации эпидермальных клеток.

Арахидоновая кислота – вторая по распространенности полиненасыщенная жирная кислота кожи. Она составляет 6–10% всех жирных кислот в фосфолипидах эпидермальных клеток [29]. После высвобождения из фосфолипидов арахидоновая кислота превращается в простагличины PGE_2 , PGF_{2a} , PGD_2 и 15-гидроксиэйкозатетраеновую кислоту (15-HETE). В эпидермисе обнаружена также LTA_4 -гидролаза. Предполагают, что ее функция заключается в трансформации LTA_4 , синтезируемого нейтрофилами, в LTB_4 . Фермент 5-липоксигеназа в эпидермисе кожи практически отсутствует.

Дигомо- γ -линолевая кислота 20:3 (n-6) образуется как продукт элонгации γ -линолевой кислоты 18:3 (n-6) и может метаболизироваться как по циклооксигеназному, так и по 15-липоксигеназному пути. Показано, что эпидермальные клетки содержат активный фермент элонгации. Рацион питания, включающий растительные масла, в которых повышена концентрация дигомо- γ -линолевой кислоты (масла из энотеры *Oenothera genevensis* и бурачника *Borago officinalis*), увеличивает содержание PGE_1 и 15-HETrE (15-гидроксиэйкозатриеновой кислоты) в эпидермисе. Так как $\Delta 5$ -десатуразная активность в коже незначительна, образование арахидоновой кислоты затруднено. Возможно, этим объясняется успешное применение масла энотеры при лечении воспалительных гиперпролиферативных заболеваний кожи [32].

Эйкозапентаеновая и докозагексаеновая кислоты в нормальном эпидермисе не присутствуют. Однако при питании, обогащен-

ном рыбой, их метаболиты обнаруживают в коже [33]. Этими метаболитами являются 15-гидрокси-эйкозапентаеновая и 17-гидроксидокозагексаеновая кислоты, которые образуются под действием 15-липоксигеназы. Возможно, противовоспалительным эффектом этих соединений и объясняется положительное действие рыбных диет при воспалительных заболеваниях кожи, включая псориаз [34]. В эпидемиологических исследованиях показано, что эскимосы, основной рацион которых составляют рыбы холодных вод (жир этих рыб обогащен эйкозапентаеновой кислотой), практически не болеют псориазом.

5. МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И АНАЛИЗА ОКИСЛЕННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПНЖК В БИООБЪЕКТАХ

5.1. Методы анализа оксилипинов из морской микроводоросли *Thalassiosira rotula*

Было установлено, что некоторые морские диатомовые водоросли, в частности *Thalassiosira rotula*, способны продуцировать путем ферментативного окисления (в основном связанного с липоксигеназной активностью) жирных кислот хлоропластов (гексадекатриеновой и эйкозапентаеновой) физиологически важные альдегиды – октадиенали и декатриенали, обладающие антипролиферативной активностью по отношению к опухолям [35–37]. Актуальной задачей была разработка методов обнаружения и анализа кето- и гидроксипроизводных жирных кислот (оксилипинов), которые являются биосинтетическими предшественниками данных биологически активных альдегидов [35].

Кето- и гидроксипроизводные жирных кислот были выделены д'Ипполито с соавт. в виде метиловых эфиров **1–8** (рис. 6) после метилирования экстракта диатомовой водоросли газообразным диазометаном [35]. Структуры двух основных производных **1** и **2** были определены как метиловый эфир (7*E*)-9-кетогексадец-7-еновой кислоты и метиловый эфир (7*E*)-9-гидроксигексадец-7-еновой кислоты с помощью ESI-MS-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии [35]. *транс*-Конфигурация двойной связи была установлена на основе H7–H8-констант. Структурное подобие между двумя оксилипинами было доказано восстановлением соединения **1** с помощью DIBAL, с получением рацемического соединения **2** [36].

Химическое преобразование метилового эфира **2** с получением силильного производного и получение двух диастереомеров с

применением (*R*)- или (*S*)- α -(трифторметил)-бензилового спирта (PhTFE) позволило охарактеризовать производные при помощи ЯМР. Различия химических сдвигов ($\delta_R - \delta_S$) диастереомерных [α -(трифторметил)-бензилокси]-диметилсилилокси- (*R*- и *S*-PhTFE) производных **2a** и **2b** позволили установить *S*-конфигурацию вторичного спирта и идентифицировать соединение **2** как метиловый эфир (9*S*)-9-гидроксигексадец-7-еновой кислоты [35].

Для соединения **3** было характерно УФ-поглощение при $\lambda_{\max}$ 235 нм и образование псевдомолекулярного иона (ESI⁺-MS, m/z 303.5 для [C₁₇H₂₈O₃ + Na]⁺), что отвечает структуре гидроксипроизводного метилового эфира гексадекатриеновой кислоты (ННТРЕ). ¹H-ЯМР-спектр этого вещества после очистки подтвердил это предположение, показав типичные сигналы гидроксильной метиленовой группы (H-9, δ 4.05 м.д.), сопряженной с (*транс*-, *цис*)-диеновым звеном, и диастереотопные аллильные протоны. Другие ЯМР-сигналы также соответствовали структуре, отвечающей соединению **3** (9-ННТРЕ). Для подтверждения ферментативного происхождения данного соединения было решено определить его абсолютную конфигурацию. Восстановление 9*S*-спирта **2** на 5% палладии на угле давало *S*-энантиомер, а восстановление кетона **1** при помощи NaBH₄ приводило к рацемической смеси метилового эфира 9(*R/S*)-гидроксигексадекановой кислоты. Анализ этих продуктов при помощи хирально-фазовой АРСИ⁺-ВЭЖХ позволил получить индивидуальные пики двух энантиомеров [35]. Катализируемое же палладием восстановление соединения **3** приводило только к одному производному, которое было идентифицировано с помощью хирально-фазовой ВЭЖХ как *R*-изомер (вследствие обращения конфигурации) метилового эфира 9-гидроксигексадекановой кислоты. Таким образом, структура соединения **3** отвечает метилому эфиру (6*Z*,9*S*,10*E*,12*Z*)-9-гидроксигексадекатриеновой кислоты. Происхождение соединения **3** было подтверждено выращиванием гомогената *Thalassiosira* с *d*₆-НТРА. После экстракции и метилирования LC-анализ полученного масла показал наличие пика при 19.5 мин, что соответствовало гексадейтерированному аналогу метилового эфира 9*S*-ННТРЕ. Данный продукт не был получен инкубацией дейтерированного субстрата с кипяченым препаратом водоросли, что подтверждало энзиматическое происхождение соединения **3** [35].

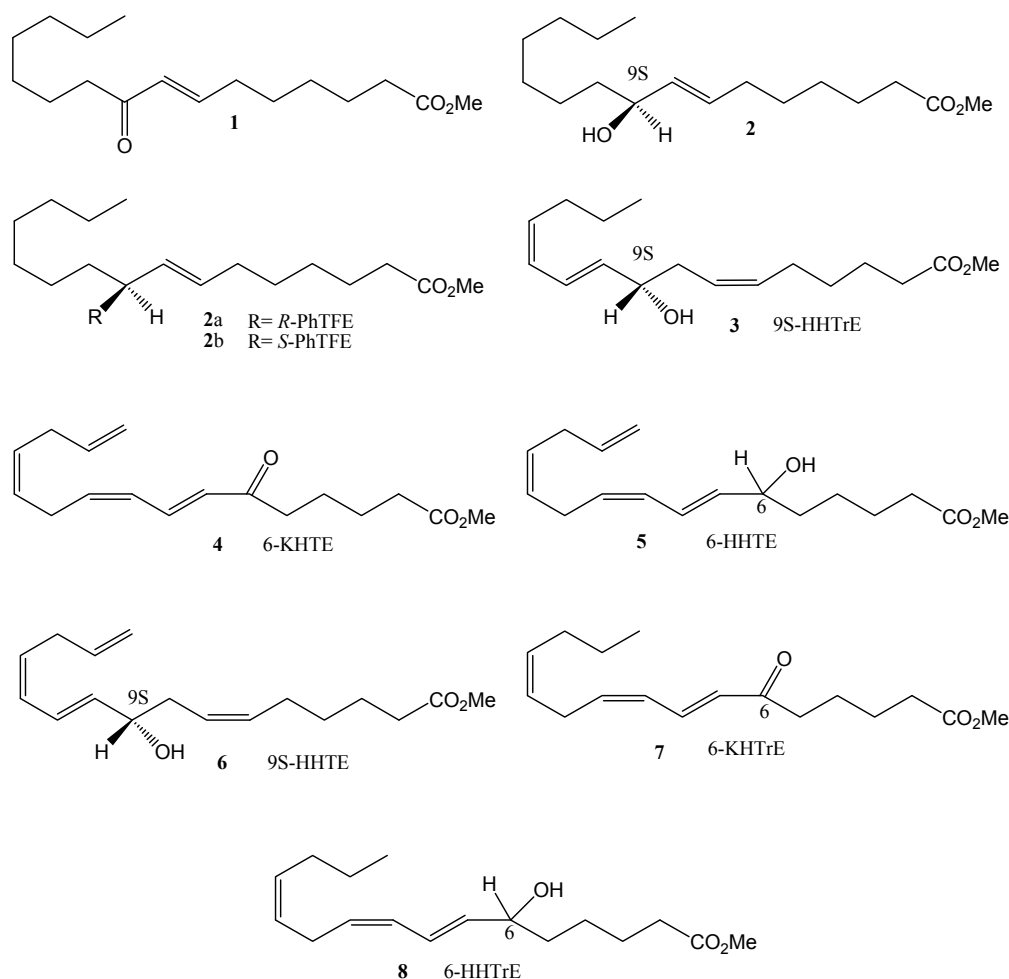


Рис. 6. Структура метиловых эфиров оксипинов, выделенных из диатомовой водоросли *Thalassiosira rotula* [35] (сокращения см. в тексте).

Соединение **4** давало ESI-MS псевдомолекулярный ион m/z 299 ($[M + Na]^+$), соответствующий формуле $C_{17}H_{24}O_3$. Максимум УФ-поглощения 282 нм говорил о наличии сопряжения, соответствующего $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -ненасыщенным кетонам. По 1H -ЯМР-данным было видно наличие одной кетогруппы при δ 198.2 м.д. (C6), разделенной двумя независимыми спин-системами. Одна из них содержит наиболее отделенные сигналы, включая диеновый остаток H-7/H-10, одну отдельную двойную связь H-12/H-13 (δ 5.27 и 5.38 м.д.) и терминальный метилен H-15/H₂-16 (δ 5.70, 4.97 и 5.02 м.д.). Второй фрагмент находится между двумя метиленовыми группами δ 2.04 (H₂-2) и 2.13 (H₂-5), следовательно, два отдельных сигнала принадлежат H₂-3 (δ 1.48) и H₂-4 (δ 1.53). Стереохимия связей была определена как 7*E*,9*Z*,12*Z* на основании констант виниловых протонов (15.3, 11.5 и 7.5 Гц соответственно). Таким образом, структура соединения **4** соответствует метиловому эфиру (7*E*,9*Z*,12*Z*,15*Z*)-6-кетогексадекатетраеновой кислоты (6-KHTE) [35].

1H -ЯМР-данные для соединения **5** обна-

руживали сильное сходство с соединением **4**, что доказывает наличие (*цис*-, *транс*-)-диеновой системы, одного изомера по двойной связи и одного терминального олефина. Отличительные черты спектра соединения **5** обусловлены наличием аллильной гидроксильной группы (H-6, δ 3.88 м.д.). С учетом молекулярной формулы $C_{17}H_{26}O_3$ и гипсохромного сдвига УФ-поглощения (λ_{max} 236 нм), эти данные позволили идентифицировать структуру соединения **5** как метиловый эфир (7*E*,9*Z*,12*Z*,15*Z*)-6-гидрокси-гексадекатетраеновой кислоты (6-HNTE). Выделенное из *T. rotula* соединение **5** элюировали в виде одного энантиомера, используя хирально-фазовую ВЭЖХ, но недостаток упоминаний об этих соединениях и маленькое количество соединения не позволило определить его абсолютную конфигурацию [35].

В дополнение к соединениям **1–5**, лизис клеток *T. rotula* приводит к выделению комплекса групп минорных оксипинов. Хотя эти соединения встречаются в недостаточных для выделения количествах, комбинация LC-MS/MS и ЯМР-методик обеспечивает опре-

деление как минимум трех главных классов метаболитов, получающихся при окислении гексатриеновой (НТгА) и гексадекатетраеновой кислот (НТА). Химическое исследование сырого метилированного экстракта данной микроводоросли показало наличие метиловых эфиров (6Z,10E,12Z,15Z)-9-гидроксигексадекатетраеновой кислоты **6** (9-ННТЕ), (7E,9Z,12Z)-6-кетогексадекатриеновой кислоты **7** (6-КНТгЕ) и (7E,9Z,12Z)-6-гидроксигексадекатриеновой кислоты **8** (6-ННТгЕ) (рис. 6). Замечено, что синтез этих соединений ингибировался, когда диатомовые водоросли кипятили перед лизисом. НТгА-метаболизм был проанализирован и задокументирован как синтез в *T. rotula*. Ферментативный характер окисления был обнаружен получением дейтерированных соединений **3**, **7** и **8** после инкубации сырого гомогената и субклеточных фракций водоросли с *d*₆-НТгА [35].

Согласно гипотезе о том, что оксилипиновый профиль отражает LOX-запас (LOX – липоксигеназа), микросомальная фракция *T. rotula* была инкубирована с НТгА, и липоксигеназная активность была напрямую измерена специфическим спектрометрическим методом, описанным в литературе [37]. Одним из основных путей биосинтеза биологически активных жирнокислотных производных, как было установлено, является липоксигеназа-индуцированная конверсия С16-ПНЖК (16:3 или 16:4) в гидропероксиды и короткоцепные альдегиды [37]. Наличие в экстракте диатомовой водоросли других ферментных активностей делает выделение и характеристику липоксигеназы из *Thalassiosira* очень сложной.

В заключение можно сказать, что клетки *T. rotula* обладают окислительной активностью, способной превращать полиненасыщенные жирные кислоты в различные, ранее не описанные, оксилипины. Хотя некоторые минорные компоненты могут быть получены неферментативно *in vitro*, высокая стереоспецифичность соединений **2** и **3** (соединение **5** обычно встречается как отдельный энантиомер, но его полная стереохимия не была установлена) подразумевает, что в этих синтезах участвуют ферменты.

5.2. Методы выделения и анализа оксилипинов из высших растений

Были описаны методы идентификации новых производных ненасыщенных жирных кислот, выделенных из растения *Arabidopsis thaliana* с применением жидкостной экстракции под давлением при комнатной температуре [38]. В листьях растения механическим повреждением были индуцированы раны, т.к. известно, что раневые метаболиты (жасмо-

наты, травматин) обладают мощной биологической активностью на животных моделях [37]. Для исследования активности было необходимо выделение препаративных количеств данных соединений [38].

Чтобы получить информацию о слабо полярных и неполярных липидных компонентах сырого экстракта, были протестированы различные методики. Классическую экстракцию сравнили с жидкостной экстракцией под давлением (PLE) свежих или механически поврежденных образцов листьев в различных растворителях – дихлорэтано, метаноле и изопропанол. В качестве наилучшего экстрагента был выбран изопропанол. Предварительные ВЭЖХ-MS-эксперименты показали, что в данных условиях, кроме оксилипинов, экстрагировались и описанные ранее вторичные метаболиты *Arabidopsis thaliana* (флавоноиды, пигменты) [38].

Было показано, что для малых количеств образцов растительного материала и малой концентрации производных жирных кислот (как вторичных мессенджеров) предпочтительным методом экстракции является PLE, что было подтверждено воспроизводимостью результатов, полученных с использованием ВЭЖХ-УФ- и ВЭЖХ-MS-профилей выделяемых веществ [38].

Целевые соединения, индуцированные в ране листьев *Arabidopsis thaliana* (рис. 7), собирали и анализировали с помощью ВЭЖХ-ESI/MS-синхронизированного микрофракционирования [39].

Чтобы выделить все различия в интенсивности ионов между контрольными и механически поврежденными образцами, необходимо сравнение «лицом к лицу» ВЭЖХ-MS-данных, представленных двумя алгоритмами. Сравнение «лицом к лицу» MS-данных поврежденных и неповрежденных образцов было проведено с помощью программы ACD/Labs версии 6.0 [40]. Чтобы подтвердить точную структуру соединения **11**, фракция, соответствующая пику этого вещества на ВЭЖХ-хроматограмме, была выделена в микрограммовом количестве с помощью ВЭЖХ-MS-микрофракционирования для последующей ЯМР-характеристики в капиллярной ЯМР-пробе (CapNMR). Большое количество экстракта поврежденной листы (150 мг) отделили на 10 мм фенильной полупрепаративной колонке с тем же градиентом, который использовался для ВЭЖХ-APCI/MS в 2 стадии. Разделение контролировали отрицательной ионной ESI/MS. Поскольку многие пики при элюировании сливаются с пиками

компонента, имеющего m/z 327, было необходимо вторичное ВЭЖХ-MS-разделение на спаренных аналитических фенильных колонках 4.6 мм [39].

Метод ВЭЖХ-APCI/MS был использован для определения двух основных веществ, индуцируемых растением при раневом повреждении. Два соединения (**10** и **11**) давали депротонированные ионы $[M-H]^-$ (m/z 322, время удерживания (RT) 30.7 мин и m/z 327, RT 29.4 мин), на ВЭЖХ-MS-хроматограмме эти соединения элюировались близко к жасмоновой кислоте (JA) **9** (m/z 209, RT 27.3 мин) (рис. 7). Эти ионы найдены во всех

механически поврежденных образцах, тогда как в контрольных образцах растений они не обнаружены [39].

Ион $[M-H]^-$ соединения **10** (m/z 322) характерен для молекулы, содержащей добавочное количество атомов азота. Его молекулярный ион (m/z 322.2014) был определен после аналитического микрофракционирования целевого вещества и прямого закола в TOF-MS. Депротонированная молекулярная формула согласуется со структурой ($C_{18}H_{28}NO_4$, точная масса: 322.2018), которая интерпретирована как конъюгат JA с изолейцином – JA-Ile (**10**) [39].

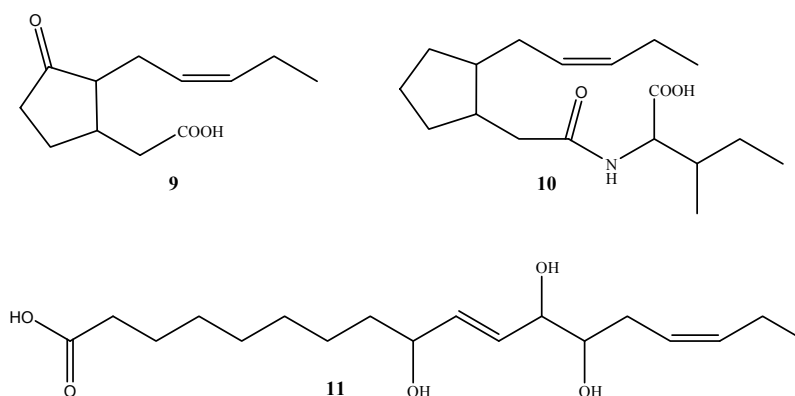


Рис. 7. Структура оксипинов, индуцируемых в ране высших растений [39].

Для подтверждения структуры этого соединения аналогичный конъюгат был получен из жасмоновой кислоты и изолейцина с использованием известного метода создания амидной связи [41]. Синтетическое соединение и соединение **10** элюировали вместе в условиях ВЭЖХ-APCI/MS, и результаты эксперимента подтвердили, что индуцируемый растением в ране оксипин **10** был действительно JA-Ile. Получение метилированных производных синтетического JA-Ile при помощи диазометана позволило детектировать его с помощью GC-EI/MS, который давал молекулярный ион m/z 337 ($323 + 14$).

Известно, что конъюгат Ile с жасмонатом встречается в природе в листьях ячменя и также накапливается в течение осмотического стресса или последующего взаимодействия с микроорганизмами [42]. Этот конъюгат жасмоната играет роль биорегулятора в цветах томата. Он ингибировал рост корней,

и этот эффект уменьшался в JA-нечувствительных мутантах, что подтвердило гипотезу об активации растительных гормонов при помощи их конъюгирования с аминокислотами. Это соединение не описано, как индуцируемое растением в ране в *Arabidopsis thaliana*, но было обнаружено в листьях риса после повреждения. JA-Ile – главная биологически активная форма JA и может действовать как раневый сигнал. Возможность обнаружения данного конъюгата новым методом (ВЭЖХ-MS) показала его преимущество по сравнению с быстрым методом определения оксипинового профиля с помощью GC-MS, т.к. первый позволяет определить свободные и связанные оксипины в растительных источниках [39].

Работа выполнена при поддержке гранта № 2.1.1/2889 целевой ведомственной программы «Развитие научного потенциала высшей школы».

ЛИТЕРАТУРА:

1. Calder, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale / P. C. Calder // Biochimie. – 2009. – Vol. 91, № 6. – P. 791–795.
2. Степанов, А. Е. Физиологически активные липиды / А. Е. Степанов, Ю. М. Краснопольский, В. И. Швец. – М. : Наука, 1991. – 136 с.

3. Сергеева, М. Г. Каскад арахидоновой кислоты / М. Г. Сергеева, А. Т. Варфоломеева // М. : Народное образование, 2006. – 256 с.
4. Farooqui, A. A. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvements in neurological disorders / A. A. Farooqui, L. A. Horrocks, T. Farooqui // *Chem. Phys. Lipids*. – 2000. – Vol. 106, № 1. – P. 1–29.
5. Daleke, D. L. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipids asymmetry / D. L. Daleke // *J. Lipid Res*. – 2003. – Vol. 44, № 2. – P. 233–242.
6. Chilton, F. H. Remodeling of arachidonate-containing phosphoglycerides within the human neutrophil / F. H. Chilton, R. C. Murphy // *J. Biol. Chem*. – 1986. – Vol. 261, № 17. – P. 7771–7777.
7. Triggiani, M. Differential roles for triglyceride and phospholipids pools of arachidonic acid in human lung macrophages / M. Triggiani, A. Oriente, G. Marone // *J. Immunol*. – 1994. – Vol. 152, № 3. – P. 1394–1403.
8. Balsinde, J. Increased incorporation of arachidonic acid into phospholipids in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages / J. Balsinde, B. Fernandez, J.A. Solis-Herruso // *Eur. J. Biochem*. – 1994. – Vol. 221, № 3. – P. 1013–1018.
9. Fonteh, A. N. Rapid remodeling of arachidonate from phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine pools during mast cell activation / A. N. Fonteh, F. H. Chilton // *J. Immunol*. – 1992. – Vol. 148, № 6. – P. 1784–1791.
10. Wilson, D. B. Discovery of an arachidonoyl coenzyme A synthetase in human platelets / D. B. Wilson, S. M. Prescott, P. W. Majerus // *J. Biol. Chem*. – 1982. – Vol. 257, № 7. – P. 3510–3515.
11. Inhibition of calcium-independent phospholipase A₂ prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages / J. Balsinde [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1995. – Vol. 92, № 18. – P. 8527–8531.
12. Effects of CoA-independent transacylase inhibitors on the production of lipid inflammatory mediators / J.D. Winkler [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. – 1995. – Vol. 274, № 3. – P. 1338–1347.
13. Influence of coenzyme A-independent transacylase and cyclooxygenase inhibitors on the proliferation of breast cancer cells / A. J. Trimboli [et al.] // *Cancer Res*. – 1999. – Vol. 59, № 24. – P. 6171–6177.
14. Perturbations in the control of cellular arachidonic acid levels block cell growth and induce apoptosis in HL-60 cells / M.E. Surette [et al.] // *Carcinogenesis*. – 1999. – Vol. 20, № 5. – P. 757–763.
15. Arthur, G. Acylation of 1-alkenyl-glycerophosphocholine and 1-acyl-glycerophosphocholine in guinea pig heart / G. Arthur, P.C. Choy // *Biochem. J*. – 1986. – Vol. 236, № 2. – P. 481–487.
16. Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool / M. Triggiani [et al.] // *J. Exp. Med*. – 1995. – Vol. 182, № 5. – P. 1181–1190.
17. Robinson, M. Acylation of lysophospholipids by rabbit alveolar macrophages. Specificities of CoA-dependent and CoA-independent reactions / M. Robinson, Ml. Blank, F. Snyder // *J. Biol. Chem*. – 1985. – Vol. 260, № 13. – P. 7889–7895.
18. Poulos, A. Very long chain fatty acids in higher animals – a review / A. Poulos // *Lipids*. – 1995. – Vol. 30, № 1. – P. 1–14.
19. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis / J. Dyerberg [et al.] // *Lancet*. – 1978. – Vol. 2, № 8081. – P. 117–119.
20. Евстигнеева, Р. П. Лейкотриены – природные биологически активные метаболиты полиненасыщенных кислот / Р. П. Евстигнеева, Г. И. Мякова // *Успехи химии*. – 1986. – Т. LV, Вып. 5. – С. 843–878.
21. Bernardi, G. New comprehensive biochemistry. Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes / G. Bernardi. // Amsterdam : Elsevier, 1996. – Vol. 31. – P. 141–152.
22. Brash, A. R. Arachidonic acid as a bioactive molecule / A. R. Brash // *J. Clin. Invest*. – 2001. – Vol. 107, № 11. – P. 1339–1345.
23. Innis, S. M. Essential fatty acids in growth and development / S. M. Innis // *Prog. Lipid Res*. – 1991. – Vol. 30, № 1. – P. 39–103.
24. Cunnane, S. C. Problems with essential fatty acids: time for a new paradigm? / S. C. Cunnane // *Prog. Lipid Res*. – 2003. – Vol. 42, № 6. – P. 544–568.
25. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids / H. Sprecher, [et al.] // *J. Lipid Res*. – 1995. – Vol. 36, № 12. – P. 2471–2477.

26. European patent application, EP 1 598 422 A2. Methods and compositions for synthesis of long chain polyunsaturated fatty acids in plants / Knutzon [et al.]. – 2005.
27. Skeletal muscle membrane lipid composition is related to adiposity and insulin action / D. A. Pan [et al.] // J. Clin. Invest. – 1995. – Vol. 96, № 6. – P. 2802–2808.
28. The hypotriglyceridemic effect of fish oil in adult-onset diabetes without adverse glucose control / W.E. Connor [et al.] // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 1993. – Vol. 683. – P. 337–340.
29. Ziboh, V. A. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of antiinflammatory and antiproliferative metabolites / V. A. Ziboh, C. C. Miller, Y. Cho // Am. J. Clin. Nutr. – 2000. – Vol. 71, № 1 Suppl. – P. 361S–366S.
30. Simopoulos, A. P. The traditional diet of Greece and cancer / A. P. Simopoulos // Eur. J. Cancer Prev. – 2004. – Vol. 13, № 3. – P. 219–230.
31. Изменение уровней полиненасыщенных жирных кислот-субстратов и ингибиторов синтеза тромбоксана и простациклина в плазме крови человека при сердечно-сосудистых заболеваниях / А. Т. Мевх [и др.] // Кардиология. – 1990. – Т. 3. – С. 54–57.
32. Wright, S. Oral evening-primrose-seed oil improves atopic eczema / S. Wright, J. L. Burton // Lancet. – 1982. – Vol. 2, № 8308. – P. 1120–1122.
33. Dietary supplementation with ethyl ester concentrates of fish oil (n-3) and borage oil (n-6) polyunsaturated fatty acids induces epidermal generation of local putative anti-inflammatory metabolites / C.C. Miller [et al.] // J. Invest. Dermatol. – 1991. – Vol. 96, № 1. – P. 98–103.
34. Effects of dietary supplementation of fish oil on neutrophil and epidermal fatty acids. Modulation of clinical course of psoriatic subjects / V.A. Ziboh [et al.] // Arch. Dermatol. – 1986. – Vol. 122, № 11. – P. 1277–1282.
35. New C16 fatty-acid-based oxylipin pathway in the marine diatom *Thalassiosira rotula* / G. D'Ippolito [et al.] // Org. Biomol. Chem. – 2005. – Vol. 3. – P. 4065–4070.
36. New silyl ether reagents for the absolute stereochemical determination of secondary alcohols / R.T. Williamson [et al.] // Org. Lett. – 2003. – № 5. – P. 1745–1748.
37. Andreou, A. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals / A. Andreou, F. Brodhun, I. Feussner // Prog. Lipid Res. – 2009. – DOI: 10.1016.
38. Moreau, R. A. Pressurized liquid extraction of polar and nonpolar lipids in corn and oats with hexane, methylene chloride, isopropanol, and ethanol / R. A. Moreau, M. J. Powell, V. Singh // J. Am. Oil Chem. – 2003. – Vol. 80. – P. 1063–1067.
39. Thiocone, A. Screening for wound-induced oxylipins in *Arabidopsis thaliana* by differential HPLC-APCI/MS profiling of crude leaf extracts and subsequent characterization by capillary-scale NMR / A. Thiocone, E.E. Farmer, J.-L. Wolfender // Phytochem. Anal. – 2008. – Vol. 19, № 3. – P. 198–205.
40. Windig, W. A noise and background reduction method for component detection in liquid chromatography/mass spectrometry / W. Windig, J. M. Phalp A. W. Paine // Anal. Chem. – 1996. – № 8. – P.3602–3606.
41. Liquid chromatography of jasmonic acid amine conjugates / R. Kramell [et al.] // Chromatographia. – 1999. – № 49. – P. 42–46.
42. Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots / B. Hauze [et al.] // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 130. – P. 1213–1220.