



УДК 577.152.1 + 577.125.33

## ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ГИДРОПЕРОКСИ- И ГИДРОКСИПОЛИЕНОВЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, ДИГИДРОКСИЭЙКОЗАНОИДОВ И ЛИПОКСИНА В

*Белослудцев Ю. Ю., Кюн Г. \*, Флейшихакер М. \*,  
Визнер Р. \*, Ратман Д. \*, Шевер Т. \*,  
Мяжкова Г. И., Евстигнеева Р. П.*

*Московский институт тонкой химической технологии  
им. М. В. Ломоносова:*

*\*Институт биохимии Университета им. Гумбольдта, Берлин*

Осуществлен ферментативный синтез различных гидроперокси- и гидроксиполиеновых жирных кислот, дигидроксиэйкозаноидов и липоксина В с использованием липоксигеназ из ретикулоцитов кролика и клубней картофеля (описана методика выделения и очистки этих ферментов), а также коммерческой липоксигеназы соевых бобов. Полученные соединения охарактеризованы данными УФ-спектроскопии, масс-спектрометрии и ВЭЖХ-анализа.

Окисленные производные полиеновых жирных кислот привлекают внимание исследователей различных областей науки — биохимии, фармакологии, иммунологии, биологии клетки, физиологии растений и др. Метаболиты полиненасыщенных жирных кислот — простагландины, тромбоксаны, лейкотриены, гидроксиполиеновые кислоты, в особенности образующиеся из арахидоновой (гидроксиэйкозатетраеновые кислоты — HETE) и линолевой кислот (гидроксиоктадекадиеновые кислоты — HODE), существуют во многих клетках и тканях и обладают различной биологической активностью.

После высвобождения из фосфолипидов полиеновые жирные кислоты окисляются с участием липоксигеназ с образованием гидропероксиполиеновых жирных кислот, которые впоследствии восстанавливаются в соответствующие гидроксипроизводные.

Липоксигеназы представляют собой семейство ферментов, встречающихся, по-видимому, во всех клетках животных в активной или скрытой форме. Они отличаются позиционной и стерической специфичностью [1]. В соответствии с этим образуются различные позиционные и оптические изомеры гидроксиполиеновых кислот, например 5S-, 12S-, 15S-HETE и 9S-, 13S-HODE (схема 1).

Гидрокси- и гидропероксикислоты участвуют в различных ферментативных реакциях:

1) HPETE и HPODE — продукты липоксигеназной реакции и в то же время активаторы липоксигеназ [2, 3] и циклооксигеназы [4]. Активация гидропероксиполиеновыми кислотами имеет место и для гуанилатциклазы [5].

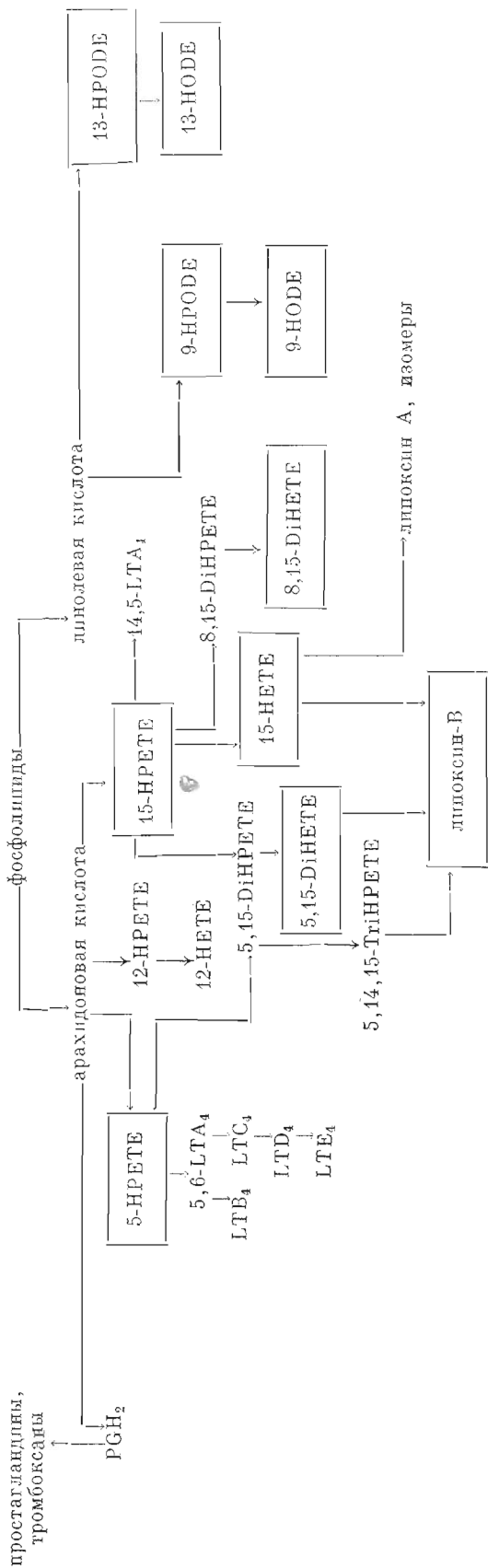
2) HPETE и HPODE при высоких концентрациях инактивируют различные ферменты, в том числе и липоксигеназы [6, 7]. Инактивация различных ферментов обнаружена и для 15-HETE [8—10].

3) Гидрокси- и гидропероксиэйкозаноиды также являются субстратами липоксигеназ; они окисляются в дигидрокси- и дигидропероксипроизводные или липоксины [11—13].

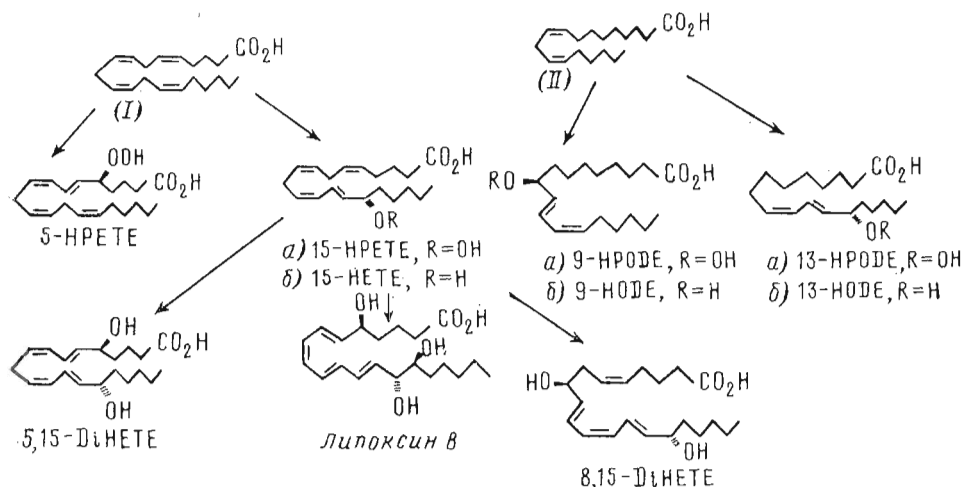
На клеточном уровне HETE обладают различными эффектами. Они модулируют рост эндотелиальных клеток аорты [14], клеток гладкой мускулатуры аорты [15], фибробластов [16], лимфоцитов [17], клеток эпидер-

Схема 1

Пути липоксигеназной трансформации арахидоновой и линолевой кислот



Простагландины—PG, лейкотриены—LT, гидрокси-(HETE) и гидропероксидытетраеновые (HETE) кислоты, гидроксипроде (HODE) и гидропероксидытетраеновые (HODE) кислоты; в рамках указаны соединения, способы получения которых приводятся в данной статье.



Окисленные полиненасыщенные жирные кислоты, полученные из арахидоновой (I) и линолевой (II) кислот при катализе липоксигеназами

миса [18] и раковых клеток [15, 19]. HETE ингибируют активацию тромбоцитов и их взаимодействие с другими клетками [20]. 13-HODE препятствуют адгезии тромбоцитов на стенках сосудов [21].

Липоксины, относительно недавно выделенные липоксигеназные продукты [22], образуются в результате многостадийных реакций липоксигеназ [12] и, как было показано, обладают различными биологическими эффектами [22—24].

Вследствие их важной биологической активности HETE, HODE, HPETE, HPODE, DiHETE и липоксины необходимы исследователям в качестве стандартов, агентов в фармакологическом и клеточно-физиологическом исследовании и субстратов, активаторов и ингибиторов в ферментативных исследованиях. Благодаря высокой активности этих соединений и высокой чувствительности современных аналитических методов во многих случаях достаточно микрограммов этих веществ. Хотя большинство их можно приготовить полным химическим синтезом, ферментативное получение имеет преимущество вследствие высокой специфичности и из-за того, что включает только несколько стадий. В данной работе мы описали ферментативное получение различных окисленных полиеновых жирных кислот (схема 2).

### Экспериментальная часть

Линолеовую кислоту (Союзреактив) очищали перегонкой на аппарате Kugelrohr (Aldrich, США) при  $145-150^{\circ}\text{C}/10^{-2}$  мм Hg. Арахидоновая кислота была выделена известным методом [25] из липидов поджелудочной железы крупного рогатого скота — отходов эндокринного производства. Использовали бис(триметилсилил)трифторацетамид (BSTFA) и липоксигеназу соевых бобов I (тип IV) (Serva, ФРГ), детергент Brij 35 (Fluka, Швейцария),  $\text{NaBH}_4$  (Ferak, Зап. Берлин).

Все растворители очищали перегонкой. Свободные жирные кислоты метилировали раствором  $\text{CH}_2\text{N}_2$  в эфире. Соединения гидрировали, пропуская  $\text{H}_2$  в течение 90 с через раствор 1—5 мкг гидроксикилот в 200 мкл этанола, содержащем 2 мг  $\text{PtO}_2$  в качестве катализатора. Перед масс-спектрометрией гидропероксиполиеновых кислот пероксигруппы восстанавливали, метилировали карбоксильные и силилировали гидроксильные группы реакцией с BSTFA в пиридине в течение 15 мин при  $20^{\circ}\text{C}$ . ВЭЖХ проводили на приборе Du Pont (США), снабженном УФ-детектором с меняющейся длиной волны, или на приборе Shimadzu (Япония) с многовол-

новым детектором Hewlett Packard (США). Для ВЭЖХ использовали следующие колонки: аналитические (4,6 × 250 мм; Du Pont, США) — Nucleosil (5 мкм, ВЭЖХ на прямой фазе) и Nucleosil ODS C-18 (5 мкм, обращенно-фазовая ВЭЖХ) со скоростью элюирования 1 мл/мин; препаративные (10 × 250 мм, Du Pont, США) — Nucleosil (7 мкм, ВЭЖХ на прямой фазе) и Nucleosil ODS C-18 (7 мкм, обращенно-фазовая ВЭЖХ) со скоростью элюирования 3 мл/мин; элюент (ВЭЖХ на прямой фазе): *n*-гексан — изопропанол — уксусная кислота, 100 : 1 : 0,1 (система А), 100 : 1,5 : 0,1 (система Б), 100 : 2 : 0,1 (система В). Для анализа оптической чистоты продуктов применяли ВЭЖХ на хиральной фазе (колонка с динитробензоилфенилглицином, соединенным ионной связью с силикагелем, 5 мкм (5 × 250 мм; Baker, США)) со скоростью элюирования 1 мл/мин; элюент: *n*-гексан — изопропанол, 100 : 0,5.

Для количественного определения методом УФ-спектроскопии использовали следующие молекулярные коэффициенты поглощения ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ): для сопряженных диенов  $\epsilon_{234}$  23 000 [26], для дважды сопряженных диенов  $\epsilon_{242}$  32 000 [26], для сопряженных триенов  $\epsilon_{268}$  40 000 [27], для сопряженных тетраенов  $\epsilon_{301}$  53 000 [12].

*Получение липоксигеназ. Липоксигеназу из ретикулоцитов кролика* получили модифицированным методом [28]. Фермент осаждали из свободного от строма гемолизата супернатанта суспензии клеток крови, обогащенной ретикулоцитами вследствие кровопотери, при степени насыщения сульфатом аммония 0,55.

Осадок был растворен в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4 (буфер А), и раствор фермента пропущен через гель-фильтрационную колонку (30 × 1200 мм) с сефадексом G-200. Фракции, содержащие липоксигеназу, собрали и использовали как источник ферментативной активности (оксигеназная активность по линолевой кислоте 4 нкат/мл).

*Липоксигеназа из клубней картофеля* была получена методом [29]. 250 г очищенных клубней картофеля гомогенизировали в аппарате Startix в 250 мл 0,1 М натрий-ацетатного буфера, pH 4,5, содержащего 3% детергента Brij 35 (Fluka). Супернатант гомогената диализовали в течение ночи против трех объемов 0,1 М трис-ацетатного буфера, pH 7,4, содержащего 0,1 М EDTA (буфер Б), и центрифугировали для удаления осажденного протеина. Липоксигеназной активностью обладал супернатант после фракционирования осаждения сульфатом аммония при степени насыщения 0,3—0,6. Часть этой фракции растворили в 20 мл буфера Б и использовали как источник липоксигеназы без дальнейшей очистки (оксигеназная активность по арахидоновой кислоте 0,2 нкат/мл).

*Липоксигеназа соевых бобов I* (тип IV) производства фирмы Serva (ФРГ).

#### *Получение липоксигеназных продуктов*

*15S-НРЕТЕ.* Раствор 15 мг липоксигеназы соевых бобов I в 200 мл 50 мМ трис-HCl-буфера (pH 8,5) насыщали  $O_2$  10 мин при 4° С. После этого добавляли 2 мл раствора арахидоновой кислоты в MeOH (25 мг/мл). Смесь перемешивали в атмосфере  $O_2$ , регистрируя увеличение поглощения при 235 нм. Как только поглощение становилось постоянным, реакцию останавливали подкислением реакционной массы серной кислотой до pH 4. Липиды экстрагировали диэтиловым эфиром. Экстракты сушили  $Na_2SO_4$ , упаривали, остаток растворяли в 1 мл смеси *n*-гексан — изопропанол, 100 : 5. 15S-НРЕТЕ очищали препаративной ВЭЖХ на прямой фазе, детекция при  $\lambda_{235}$  нм. Элюировали системой А. Время удерживания 15S-НРЕТЕ 18 мин. УФ-спектр: сопряженный диеновый хромофор с  $\lambda_{max}$  233,5 нм [30], ВЭЖХ: аналитические колонки — совместная хроматография с заведомым образцом при ВЭЖХ на прямой фазе (система Б), время удерживания 12,5 мин. Обработка 15S-НРЕТЕ двукратным молярным избытком  $Rh_3P$  привела к 15S-НРЕТЕ, как показано при ВЭЖХ на прямой фазе (система Б). Время удерживания 15 мин. При ВЭЖХ на хиральной фазе 15S-НРЕТЕ, полученная после восстановления  $Rh_3P$ , элюировалась вместе с *S*-изомером (оптическая чистота >99%). Масс-спектр,

$m/z$ : 406 ( $M^+$ ), 391 ( $M - 15$ ), 335, 316 ( $M - 90$ ), 225 (основной пик), 173 [31]. Масс-спектр гидрированного производного,  $m/z$ : 399 ( $M - 15$ ), 367 ( $M - 31$ ), 343, 173. Из 50 мг арахидоновой кислоты получили 15 мг 15S-НРЕТЕ с чистотой 99% (ВЭЖХ).

**15S-НЕТЕ.** 15S-НЕТЕ получили аналогично 15S-НРЕТЕ. После завершения ферментативной реакции промежуточную 15S-НРЕТЕ восстанавливали добавлением молярного избытка  $\text{NaBH}_4$ . Дальнейшая обработка аналогична обработке 15S-НРЕТЕ. Данные УФ-, масс-спектров и ВЭЖХ — см. 15S-НРЕТЕ. Время удерживания при ВЭЖХ на прямой фазе 13 мин. Из 50 мг арахидоновой кислоты получили 25 мг 15S-НЕТЕ с чистотой 99% (ВЭЖХ).

**Метилловые эфиры 15S-НРЕТЕ и 15S-НЕТЕ.** После метилирования 15S-НРЕТЕ или 15S-НЕТЕ растворитель упарили. Продукты растворяли в *n*-гексане — изопропанол (100 : 1,5), очищали ВЭЖХ на прямой фазе (препаративная колонка), элюировали системой А. Время удерживания 13 мин (метилловый эфир 15S-НРЕТЕ), 16 мин (метилловый эфир 15S-НЕТЕ). Спектральные данные — см. 15S-НРЕТЕ. Чистота соединений 97% (ВЭЖХ).

**13S-НРОДЕ.** Аналогично приготовлению 15S-НРЕТЕ с использованием липоксигеназы соевых бобов и линолевой кислоты вместо арахидоновой в качестве субстрата получили 13S-НРОДЕ, которую очищали ВЭЖХ на прямой фазе (препаративная колонка), элюируя системой Б. Детекция при 235 нм. Время удерживания 34 мин. УФ-спектр: сопряженный диеновый хромофор с  $\lambda_{\text{max}}$  233,5 нм [30]. ВЭЖХ (аналитическая колонка): совместная хроматография с заведомым образцом — ВЭЖХ на прямой фазе, элюирование системой Б (время удерживания 32 мин), и на обращенной, элюирование смесью метанол — вода — уксусная кислота (85 : 15 : 0,2; время удерживания 7,6 мин). Обработкой двукратным молярным избытком  $\text{Ph}_3\text{P}$  13S-НРОДЕ восстановили в 13S-НОДЕ: при ВЭЖХ на прямой фазе (система Б) время удерживания 25 мин. При ВЭЖХ на хиральной фазе 13-НОДЕ элюировалась вместе с *S*-изомером (оптическая чистота 99%). Масс-спектр,  $m/z$ : 382 ( $M^+$ ), 311, 292 ( $M - 90$ ), 225 (основной пик); масс-спектр гидрированного производного,  $m/z$ : 374 ( $M - 15$ ), 339, 315, 173 (основной пик). Из 50 мг линолевой кислоты получили 30 мг 13S-НРОДЕ с чистотой 99% (ВЭЖХ).

**13S-НОДЕ.** Получили аналогично 15S-НЕТЕ при использовании линолевой кислоты в качестве субстрата. Спектральные данные — см. 13S-НРОДЕ. Время удерживания 16 мин при ВЭЖХ на прямой фазе (система В). Из 50 мг линолевой кислоты получили 30 мг 13S-НОДЕ с чистотой 98% (ВЭЖХ).

**Метилловые эфиры 13S-НРОДЕ и 13S-НОДЕ.** После метилирования 13S-НРОДЕ и 13S-НОДЕ продукты очищали ВЭЖХ на прямой фазе (препаративная колонка). Элюент — система В. Время удерживания 12,5 мин (метилловый эфир 13S-НОДЕ), 10 мин (метилловый эфир 13S-НРОДЕ). Спектральные данные — см. 13S-НРОДЕ. Чистота 99% (ВЭЖХ).

**9S-НРОДЕ.** 9S-НРОДЕ получили с использованием липоксигеназы из томатов по известной методике [27]. 50 г красных плодов томатов очищали и после удаления семян мякоть плодов гомогенизировали в 150 мл 0,1 М натрий-ацетатного буфера, pH 5,5, на приборе Ultra-Turrax (ФРТ). До гомогенизации в качестве субстрата добавили линолевою кислоту (конечная концентрация 1,3 мМ). Реакционную смесь перемешивали 5 мин при 20° С, затем реакцию прекратили подкислением HCl до pH 4. Продукты реакции экстрагировали диэтиловым эфиром, экстракты промывали насыщенным раствором NaCl и сушили  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворитель упаривали, остаток растворяли в 1 мл смеси *n*-гексан — эфир (9 : 1) и очищали колоночной хроматографией на силикагеле, элюировали градиентом концентраций смеси *n*-гексан — эфир — уксусная кислота от 9 : 1 : 0,1 до 5 : 5 : 0,1. Фракции с 9S-НРОДЕ (ТСХ-контроль) промывали насыщенным раствором NaCl для удаления уксусной кислоты и сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Растворитель упаривали, продукты растворяли в *n*-гексане —

изопропанол (100 : 5), очищали ВЭЖХ на прямой фазе (препаративная колонка), элюируя системой В со скоростью 3 мл/мин. Время удерживания 9S-HPODE 18 мин. Использование замороженных в жидком азоте томатов вместо свежих плодов приводит к такому же выходу продуктов. УФ-спектр: сопряженный диеновый хромофор с  $\lambda_{\max}$  234 нм [30]. ВЭЖХ: аналитическая колонка — совместная ВЭЖХ на прямой фазе с заведомым образцом (система В, время удерживания 20,3 мин). Обработкой двукратным молярным избытком Ph<sub>3</sub>P 9S-HPODE восстановили в 9S-HODE (время удерживания 20,5 мин при ВЭЖХ на прямой фазе в тех же условиях). При ВЭЖХ на хиральной фазе 9-HODE элюируется вместе с S-изомером (оптическая чистота 95%). Масс-спектр,  $m/z$ : 382 ( $M^+$ ), 311, 292 ( $M - 90$ ), 225 (основной пик); масс-спектр гидрированного производного,  $m/z$ : 371 ( $M - 15$ ), 339, 259 (основной пик), 229. Масс-спектры 9S-HODE и 13S-HODE отличаются относительными интенсивностями некоторых ионов. Например, пик с  $m/z$  311 составляет 90% от основного пика в спектре 13S-HODE и 20% от основного пика в спектре 9S-HODE. 9S- и 13S-HODE можно идентифицировать по масс-спектрам гидрированных производных. Из 50 мг линолевой кислоты получили 5 мг 9S-HPODE с чистотой 98% (ВЭЖХ).

**9S-HODE.** 9S-HODE получили аналогично 9S-HPODE. До подкисления реакционной смеси добавили молярный избыток NaBH<sub>4</sub>. Очищали аналогично 9S-HPODE. Время удерживания 34 мин; система В для ВЭЖХ на прямой фазе (препаративная колонка). Спектральные данные — см. 9S-HPODE. Из 50 мг линолевой кислоты получили 8 мг 9S-HPODE с чистотой 97% (ВЭЖХ).

**Метилловые эфиры 9S-HPODE 9S-HODE.** После метилирования 9S-HPODE и 9S-HODE продукты очищали ВЭЖХ на прямой фазе (препаративная колонка), элюируя системой А. Время удерживания 22 мин (метилловый эфир 9S-HODE), 26 мин (метилловый эфир 9S-HPODE). Спектральные данные — см. 9S-HPODE. Чистота 98% (ВЭЖХ).

**5S-HPETE.** Липоксигеназу картофеля растворяли при 4° С в 500 мл 0,1 М калий-фосфатного буфера, рН 6,3, содержащего 0,2% хлорида натрия, и насыщали O<sub>2</sub>. При быстром перемешивании добавляли 1 мл раствора арахидоновой кислоты в MeOH до концентрации 80 мкМ. Реакционную смесь перемешивали 8 мин при 4° С. Увеличение поглощения регистрировали при 235 нм. Как только поглощение стало постоянным, реакционную смесь подкислили серной кислотой до рН 4. Продукты экстрагировали эфиром, экстракты промывали и сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Растворитель упаривали, продукты растворяли в *n*-гексане — изопропанол (100 : 5) и очищали ВЭЖХ на прямой фазе (препаративная колонка, система В). Время удерживания 26 мин. Были выделены небольшие количества 9- и 11-HPETE [29]. УФ-спектр: сопряженный диеновый хромофор с  $\lambda_{\max}$  234 нм [30]. ВЭЖХ: аналитические колонки — совместная ВЭЖХ на прямой фазе с заведомым образцом 5S-HPETE (система В; время удерживания 28 мин) и ВЭЖХ на обращенной фазе (MeOH — вода — уксусная кислота, 80 : 20 : 0,1; время удерживания 19 мин). Из 25 мг арахидоновой кислоты получили 1,5 мг 5S-HPETE с чистотой 98% (ВЭЖХ).

**8S,15S- и 5S,15S-DiHPETE.** 5S,15S-DiHPETE и 8S,15S-DiHPETE приготовили с использованием липоксигеназы соевых бобов по описанной методике [26]. 200 мл трис-НСl-буфера (50 мМ, рН 8,5), содержащего 30 мг/мл липоксигеназы соевых бобов, насыщали O<sub>2</sub> при 4° С. Добавляли 1 мл раствора арахидоновой кислоты в метаноле (конечная концентрация 280 мкМ). O<sub>2</sub> пропускали в реакционную смесь в течение всего периода инкубации. Образование DiHPETE регистрировали по УФ-спектру в области 200—300 нм. Появление типичного триенового хромофора с  $\lambda_{\max}$  268 нм указывало на образование 8S,15S-DiHPETE. Через 2 ч никаких дальнейших изменений в УФ-спектре не наблюдалось. Реакцию прекратили добавлением избытка NaBH<sub>4</sub>. Смесь подкисляли до рН 4 добавлением серной кислоты. Продукты экстрагировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Экстракты сушили Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и растворитель упаривали. Продукты растворяли в 2 мл смеси MeOH — вода — уксусная кислота (70 : 30 : 0,2) и очищали ВЭЖХ на

обращенной фазе (препаративная колонка; система растворителей MeOH — вода — уксусная кислота, 70 : 30 : 0,1). При этих условиях разделяли 5*S*,15*S*-DiHETE и 8*S*,15*S*-DiHETE. Хроматографию проводили при одновременной регистрации поглощения при 242 и 270 нм с помощью многоволнового детектора. Времена удерживания: 28 мин для 8*S*,15*S*-DiHETE и 32 мин для 5*S*,15*S*-DiHETE. Выделили также небольшие количества других изомеров DiHETE. УФ-спектр: 5*S*,15*S*-DiHETE — спектр двойного сопряженного диена с  $\lambda_{\max}$  242 нм [26]. 8*S*,15*S*-DiHETE — спектр сопряженной триеновой системы с  $\lambda_{\max}$  262, 268 и 278 нм. ВЭЖХ: аналитическая колонка — совместная ВЭЖХ на прямой фазе с заведомыми образцами (элюент: *n*-гексан — изопропанол — уксусная кислота, 95 : 5 : 0,1); времена удерживания: 11 мин для 5*S*,15*S*-DiHETE, 14 мин для 8*S*,15*S*-DiHETE. Оба изомера выделены с чистотой >98%. Масс-спектры для 5*S*,15*S*-DiHETE, *m/z*: 494 (*M*<sup>+</sup>), 479 (*M* — 15), 423, 404 (*M* — 90), 393, 203, 173 (основной пик); для 8*S*,15*S*-DiHETE, *m/z*: 494 (*M*<sup>+</sup>), 479 (*M* — 15), 423, 404 (*M* — 90), 353, 243, 173 (основной пик). Из 25 г арахидоновой кислоты получили 2,5 мг 5*S*,15*S*-DiHETE и 3 мг: 8*S*,15*S*-DiHETE.

*Метилловый эфир липоксина В.* Липоксин В получали по методике [12]. К 500 мл буфера А при 4° С добавляли 1 мл раствора метилового эфира 15-НЕТЕ в MeOH (конечная концентрация 24 мкМ) и 100 мл раствора линолевой кислоты в MeOH (конечная концентрация 17 мкМ). Этот раствор озвучивали с помощью ультразвукового облучателя Branson в течение 15 с. Реакцию инициировали добавлением липоксигеназы ретикулоцитов кролика. Смесь перемешивали при 4° С, регистрируя увеличение поглощения при 300 нм. Через 2 ч никаких изменений в поглощении не наблюдалось. Продукты восстанавливали добавлением NaBH<sub>4</sub>, экстрагировали CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, упаривали растворитель, вновь растворяли в 2 мл *n*-гексана, содержащего 10% изопропанола. Метилловый эфир липоксина В очищали ВЭЖХ на прямой фазе (препаративная колонка; система растворителей: *n*-гексан — изопропанол — уксусная кислота, 92 : 8 : 0,1). Время удерживания 44 мин. Выделили также метилловый эфир 15*S*-HETE, метилловые эфиры различных изомеров DiHETE и метилловый эфир 13*S*-HODE. УФ-спектр: сопряженный тетраеновый хромофор с  $\lambda_{\max}$  287, 301 и 315 нм. ВЭЖХ: аналитическая колонка — совместная хроматография с заведомым образцом при ВЭЖХ на обращенной фазе (система растворителей: MeOH — вода — уксусная кислота, 70 : 30 : 0,1); время удерживания 8,5 мин. Продукт содержал 5% полностью-(*E*)-изомера, который не определяется на ВЭЖХ на прямой и обращенной фазе. Масс-спектр, *m/z*: 575 (*M* — 15), 417, 203, 173 (основной пик). Из 10 мг метилового эфира 15*S*-HETE получили 0,5 мг метилового эфира липоксина В с чистотой 95% (5% полностью-(*E*)-изомер).

*Липоксин В.* 1 мг метилового эфира липоксина В гидролизovali при 20° С в смеси 100 мкл MeOH и 200 мкл 0,5 М раствора Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в течение 30 мин (контроль реакции с помощью ВЭЖХ на обращенной фазе). Полученный липоксин В очищали ВЭЖХ на обращенной фазе (условия такие же, как и для метилового эфира; время удерживания 13,5 мин), при этом отделяется (*E*)-изомер. Спектральные данные: см. метилловый эфир липоксина В. Из 1 мг метилового эфира липоксина В получили 0,5 мг свободной кислоты с чистотой >99%.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kühn H., Schewe T., Rapoport S. M. // Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol. 1986. V. 58. P. 273—311.
2. Vliegenthart J. F. G., Veldink G. A. // Free Radicals in Biology. V. 5. / Ed. Pryor W. A. N. Y.: Acad Press, 1982. P. 29—64.
3. Schewe T., Rapoport S. M., Kühn H. // Adv. Enzymol. Rel. Areas Mol. Biol. 1986. V. 58. P. 172—191.
4. Van der Ouderaa F. I. J., Buytenhek M. // Methods Enzymol. 1982. V. 86. P. 60—68.
5. Graff G., Stephenson J. H., Glass D. B., Haddox M. K., Goldberg N. D. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 21. P. 7662—7676.

6. *Rapoport S. M., Härtel B., Hausdorf G.* // *Eur. J. Biochem.* 1984. V. 139. № 3. P. 573—576.
7. *Moncada S., Gryglewski R. J., Bunting S., Vane J. R.* // *Prostaglandins.* 1976. V. 12. № 5. P. 715—733.
8. *Vanderhoek J. Y.* // *Biochemistry of arachidonic acid metabolism.* / Ed. Lands W. E. M. Boston: Martinus Nijhoff Publishing, 1985. P. 213—216.
9. *Setty B. N. Y., Stuart M. J.* // *J. Clin. Invest.* 1986. V. 77. № 1. P. 202—211.
10. *Chang J., Blazek E., Kreft A. F., Lewis A. J.* // *Biochem. Pharmacol.* 1985. V. 34. № 31. P. 1571—1575.
11. *Kühn H., Wiesner R., Alder L., Schewe T., Stander H.* // *FEBS Lett.* 1986. V. 208. № 2. P. 248—252.
12. *Kühn H., Wiesner R., Alder L., Fitzsimmons B. J., Rokach J., Brash A. R.* // *Eur. J. Biochem.* 1987. V. 169. № 3. P. 593—601.
13. *Serhan C. N., Nicolaou K. C., Webber S. E., Veale C. A., Dahlen S. E., Puustinen T. J., Samuelsson B.* // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. № 35. P. 16340—16345.
14. *Setty B. N. Y., Graeber J. E., Stuart M. J.* // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 262. № 35. P. 17613—17622.
15. *Smith D. L., Willis A. L., Mahmud I.* // *Prostaglandins Leukotr. Med.* 1984. V. 16. № 1. P. 1—10.
16. *Dodge W., Thomas M.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1985. V. 131. № 2. P. 731—735.
17. *Low C. E., Pupillo M., Bryant R. W., Bailey M. J.* // *J. Lipid Res.* 1984. V. 25. № 10. P. 1090—1095.
18. *Chan C. C., Duhamel L., Ford-Hutchinson A.* // *J. Invest. Dermatol.* 1985. V. 85. № 2. P. 333—334.
19. *Werner E. J., Dubowy R., Walenga R., Stuart M. J.* // *Cancer Res.* 1985. V. 45. № 2. P. 561—563.
20. *Coene M. C., Bult H., Claeys M., Laekman G. M., Herman A. G.* // *Thrombosis Res.* 1986. V. 42. № 2. P. 205—214.
21. *Buchanan M. R., Haas T. A., Lagarde M., Guichardant M.* // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 30. P. 16056—16059.
22. *Serhan C. N., Hamberg M., Samuelsson B.* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. № 17. P. 5335—5339.
23. *Ramstedt U., Ny J., Wigzell H., Serhan C. H., Samuelsson B.* // *J. Immunol.* 1985. V. 135. № 11. P. 3636—3638.
24. *Hansson A., Serhan C. N., Haeggström J., Ingelman-Sundberg M., Samuelsson B., Morris J.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1986. V. 134. № 3. P. 1215—1222.
25. *Якушева Л. А., Мягкова Г. И., Сарычева И. К., Евстигнеева Р. П.* // *Химия природ. соединений.* 1984. № 2. С. 233—241.
26. *Van Os C. P. A., Rijke-Schulder G. P. M., van Halbeek H., Verhagen J., Vliegenterhart J. F. G.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1981. V. 663. № 1. P. 177—193.
27. *Matthew J. A., Chan H. W. S., Galliard T.* // *Lipids.* 1977. V. 12. № 3. P. 324—326.
28. *Schewe T., Wiesner R., Rapoport S. M.* // *Methods Enzymol.* 1984. V. 71. P. 430—441.
29. *Mulliez E., Leblanc L. P., Girerd J. J., Rigaud M., Chottard J. C.* // *Biochim. et biophys. acta.* 1987. V. 916. № 1. P. 13—23.
30. *Ingram C. D., Brash A. L.* // *Lipids.* 1988. V. 23. № 4. P. 340—344.
31. *Boeynaems J. M., Brash A. R., Oates J. A., Hubbard C.* // *Anal. Biochem.* 1980. V. 104. № 2. P. 259—267.

Поступила в редакцию  
18.XI.1988  
После доработки  
22.III.1989

## AN ENZYMATIC SYNTHESIS OF HYDROPEROXY AND HYDROXY POLYENOIC FATTY ACIDS, DIHYDROXYEICOSANOIDS AND LIPOXIN B

BELOSLUDTSEV Yu. Yu., KÜHN H\*, FLEISCHACKER M\*, VIESNER R\*,  
RATHMAN D\*, SCHEWE T\*, MIAGKOVA G. I., EVSTIGNEEVA R. P.

*M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow;*  
*\* A. Humboldt University, Institute of Biochemistry, Berlin*

An enzymatic synthesis of various hydroperoxy and hydroxypolyenoic fatty acids, dihydroxyeicosanoids and lipoxin B based on the use of rabbit reticulocyte lipooxygenase, potato tuber lipooxygenase and commercial soya-bean lipooxygenase is reported. The compounds obtained were identified on the basis of UV- and mass-spectrometry data and HPLC analysis.