

Разработка подхода и анализ физиологически активных гидрокси- и эпоксипроизводных арахидоновой и эйкозапентаеновой кислот

Киселев П.А.¹, Бовдей Н.А.¹, Шварц Д.², Шунк В.-Х.²

¹Институт биоорганической химии НАН Беларуси, г. Минск

²Центр молекулярной медицины им. М.Дельбрюка, г. Берлин, Германия
kiselev@iboch.bas-net.by

Исследования последних 20-ти лет позволяют отнести цитохром P450-зависимое превращение жирных кислот в гидрокси- и эпоксипроизводные к одному из важных путей синтеза эффективных биорегуляторов. Считается, что изменение уровня экспрессии и распределения ферментов, участвующих в биосинтезе эйкозаноидов, может оказывать серьезное влияние на тканевый гомеостаз и вносит ощутимый вклад в возникновение ряда патологий. В частности доказано, что цитохром P-4501A1, принимающий участие в превращении эстрогеновых стероидов, с высокой регио- и стереоспецифичностью образует из эйкозапентаеновой кислоты 17R;18S-эпоксиэйкозатетраеновую кислоту, являющуюся мощным эффектором сердечно-сосудистой деятельности. Однако, в целом потенциальная роль биорегуляторов, возникающих при окислении жирных кислот изоэнзимами цитохрома P-450 и особенно его полиморфными вариантами, остается невыясненной. Во многом это связано со сложностью анализа оксипроизводных жирных кислот. Целью настоящей работы стала разработка методов анализа регио- и стереоизомеров оксипроизводных арахидоновой (АК) и эйкозапентаеновой (ЭПК) кислот и характеристика на этой базе физиологической значимости полиморфизма цитохрома P-4501A1 человека. Для анализа использовали ВЭЖХ-систему, снабженную детектором радиоактивности и набором колонок: Nucleosil-100-5C18HD (250 мм × 4 мм) для обратной фазы и Nucleosil-100-5 (250 мм × 4 мм) в качестве нормальной ВЭЖХ-фазы и Chiralcel-OB (250 мм × 4.6 мм) для ВЭЖХ на колонке с хиральной фазой (фирмы Daicel, ФРГ). Обратнотазовую хроматографию проводили в линейном градиенте растворителей “ацетонитрил/вода/уксусная кислота” от 50 до 100% ацетонитрила за 40 мин при скорости тока 1 мл/мин. Фракции, содержащие такие продукты гидроксирования, как 19/20-ОН-АК, 19/20-ОН-ЭПК, а также 16/17/18-ОН-АК разделяли до индивидуальных соединений методом нормальнофазовой хроматографии, с использованием линейного градиента растворителей “гексан/2-пропанол/уксусная кислота” от 98,3:1,7:0.1 (по объему) до 99:1:0,1 за 40 мин при скорости тока 1 мл/мин. Для разделения энантиомеров 17,18-эпокси-эйкозатетраеновой кислоты использовалась колонка с хиральной фазой и линейный градиент растворителей “гексан/2-пропанол” от 99,7:0,3 (по объему) до “гексан/2-пропанол” 98:2 (по объему) при скорости тока 1 мл/мин. Перед ВЭЖХ-анализом на хиральной колонке энантиомеры эйкозатетраеновой кислоты этерефицировали диазометаном.

На основании проведенных экспериментов сделаны выводы о потенциальной роли точечных мутаций гена цитохрома P-450 1A1 в риске возникновения и развития химического канцерогенеза, а также других патологий, связанных с нарушением биосинтеза эйкозаноидов.