



УДК 577.125.33

© 1990 г.

*А. Н. Гречкин, Н. В. Бухтина, Р. А. Куралшин,
Е. Ю. Сафонова, Ю. Я. Ефремов*, И. А. Гарчевский*

МЕТАБОЛИЗАЦИЯ $[1-^{14}\text{C}]$ КОРОНАРОВОЙ И $[1-^{14}\text{C}]$ ВЕРНОЛОВОЙ КИСЛОТ В ГОМОГЕНАТЕ ЭПИКОТИЛЕЙ ГОРОХА

*Казанский институт биологии Казанского филиала АН СССР;
* Институт органической и физической химии им. А. Е. Арбузова
Казанского филиала АН СССР, Казань*

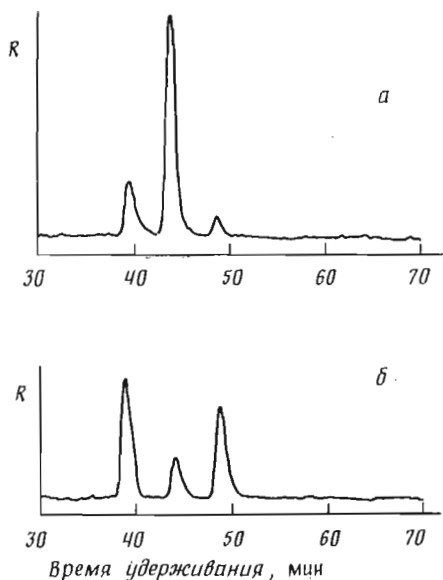
Изучали метаболизацию (Z)- $[1-^{14}\text{C}]$ -9,10-эпокси-12-октадеценовой (коронаровой) и (Z)- $[1-^{14}\text{C}]$ -12,13-эпокси-9-октадеценовой (верноловой) кислот в гомогенате эпикотилей проростков гороха. После очистки методом ВЭЖХ метаболиты были идентифицированы по данным прецизионной масс-спектрометрии как (9,10), (12,13)-дизпоксикоктадекановая (I), (Z)-9,10-дигидрокси-12-октадеценовая (II), (Z)-12,13-дигидрокси-9-октадеценовая (III), 9,10-дигидрокси-12,13-эпоксикоктадекановая (IV) и 9,10-эпокси-12,13-дигидроксиоктадекановая (V) кислоты. Из $[^{14}\text{C}]$ коронаровой кислоты метка включается в соединения (I), (II) и (IV), а из $[^{14}\text{C}]$ верноловой — в кислоты (I), (III) и (V). Соединения (I), (IV) и (V) не были ранее обнаружены в природных источниках. Обсуждаются пути образования кислот (I)–(V) и их возможная роль в эндогенной регуляции растений.

Результаты ряда работ последних лет [1] дают основание для предположения о существовании нового класса эндогенных регуляторов растений, а именно продуктов окислительного метаболизма C_{18} -полиеновых жирных кислот. К числу известных в настоящее время биорегуляторов этого класса относятся травматин и травматиновая кислота [2], а также жасмоновая кислота [3]. Биосинтез всех этих соединений опосредован активностью хорошо известных в растениях ферментов липоксигеназ.

Разнообразие обладающих регуляторной активностью окисгенированных метаболитов C_{18} -полиеновых кислот, по-видимому, далеко не исчерпывается вышеупомянутыми веществами. Так, проведенное нами исследование метаболизации экзогенного $[1-^{14}\text{C}]$ линолеата в проростках гороха выявило широкое разнообразие образующихся продуктов [4]. Среди них обнаружено неизвестное ранее природное соединение (Z)-12-гидрокси-9-додеценовая кислота [5], обладающая физиологической активностью. Методом ингибиторного анализа, а также в экспериментах с микросомами *in vitro* было показано, что в окислении линолеата наряду с липоксигеназой участвует цитохром P-450 [4]. Среди метаболитов $[1-^{14}\text{C}]$ линолеата были обнаружены два продукта монооксигеназного окисления, (Z)-9,10-эпокси-12-октадеценовая (коронаровая) и (Z)-12,13-эпокси-9-октадеценовая (верноловая) кислоты.

С целью дальнейшего изучения монооксигеназного пути окисления линолеата был проведен частичный синтез $[1-^{14}\text{C}]$ верноловой и $[1-^{14}\text{C}]$ коронаровой кислот и изучена их метаболизация в гомогенате эпикотилей гороха, описанная в настоящей работе.

При метаболизации обеих эпоксикислот образуется по три основных продукта (рисунок а, б). Необходимо отметить, что скорость метаболизации обеих субстратов очень велика. Как видно из хроматограммы на рисунке а, б, экзогенные $[1-^{14}\text{C}]$ коронаровая и $[1-^{14}\text{C}]$ верноловая кислоты через 30 мин после внесения в гомогенат превращались в продукты практически полностью. Интересно отметить, что $[1-^{14}\text{C}]$ линолевая кислота метаболизируется в аналогичных условиях значительно медленнее.



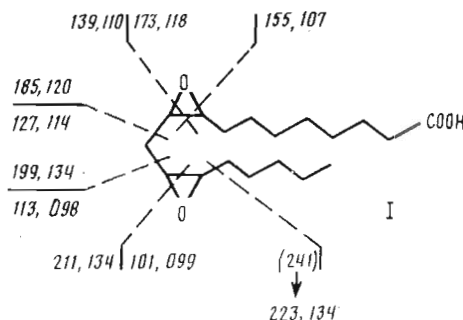
Разделение метаболитов $[1-^{14}\text{C}]$ верноловой (а) и $[1-^{14}\text{C}]$ коронаровой (б) кислот методом радио-ВЭЖХ на обращенной фазе. Условия анализа описаны в «Экспериментальной части». В хроматограмме на рисунке а пики в порядке их элюирования соответствуют метаболитам (V), (III) и (I); в хроматограмме на рисунке б — метаболитам (IV), (II) и (I).

Продукт, соответствующий пику с временами удерживания около 49 мин (далее — соединение I) при анализе методом ВЭЖХ в системе А (рисунок), при съемке масс-спектров в условиях химической ионизации образует квазимолекулярные ионы MH^+ при m/z 313,238 ($\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_4$), а также ионы $[\text{MH}-\text{H}_2\text{O}]^+$ и $[\text{MH}-2\text{H}_2\text{O}]^+$. В масс-спектре электронного удара метаболита (I) присутствует малоинтенсивный пик иона M^+ . На основании измеренного точного значения массы квазимолекулярного иона и по данным фрагментации в условиях электронного удара (схема 1) вещество (I) было идентифицировано как (9,10),(12,13)-диэпоксиктадекановая кислота.

Идентификация соединения (I) подтверждается полным соответствием его масс-спектров спектрам аутентичной (9,10),(12,13)-диэпоксиктадекановой кислоты, полученной окислением линолеата избытком надуксусной кислоты. Как природное, соединение (I) выделено в настоящей работе впервые. Недавно было описано образование отдаленных аналогов кислоты (I), изомерных диэпоксидов арахидоновой кислоты из ее 14,15-эпоксипроизводного, в изолированных микросомах из печени крыс [6].

Очевидно, кислота (I) образуется в результате эпоксидирования незамещенных двойных связей в коронаровой и верноловой кислотах.

Схема 1

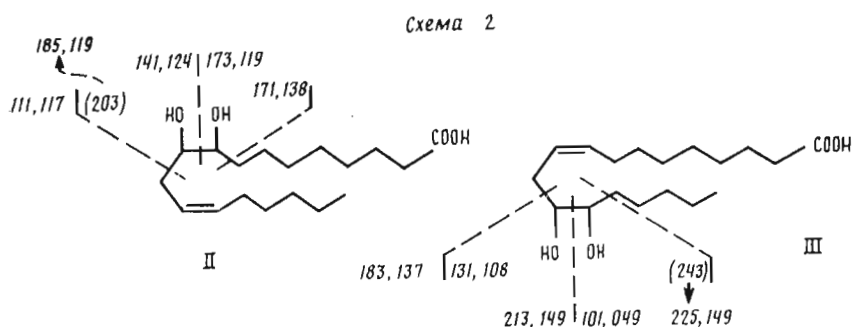


При этом из коронаровой кислоты метка включается в соединение (I) более активно, чем из верноловой. По-видимому, коронаровая кислота является предпочтительным субстратом для соответствующей оксигеназы. В этой связи интересно отметить, что при изучении окисления $[1-^{14}\text{C}]$ ли-

нолеата в гомогенате проростков гороха нами было обнаружено предпочтительное эпексидирование по положению 9, 10.

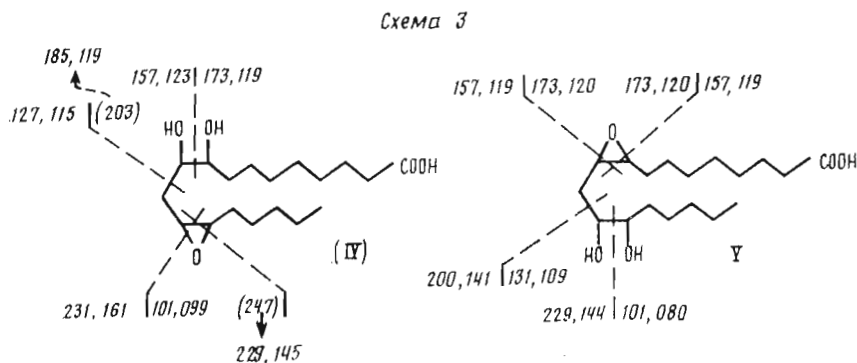
Метаболиты коронаровой и верноловой кислот (соответственно (II) и (III)) с временами удерживания 45 мин при анализе на обращенной фазе (рисунок) в условиях химической ионизации образуют интенсивные пики квазимолекулярных ионов MH^+ при m/z 315, 254 ($C_{18}H_{35}O_4$), а также ионы $[MH-H_2O]^+$ и $[MH-2H_2O]^+$. Фрагментам, образующимся при разрывах по этим и смежным углерод-углеродным связям, соответствуют интенсивные пики в масс-спектрах электронного удара кислот (II) и (III) (схема 2). Кроме того, в электроударных спектрах соединений (II) и (III) присутствовали пики молекулярных ионов M^+ при m/z 314, 246.

На основании данных масс-спектров кислот (II) и (III), а также по их соответствию спектрам аутентичных вицинальных диолов, полученных при гидролизе коронаровой и верноловой кислот, соединениям (II) и (III) приписано строение соответственно (Z)-9,10-дигидрокси-12-октадеценовой и (Z)-12,13-дигидрокси-9-октадеценовой кислот (схема 2). Вероятным



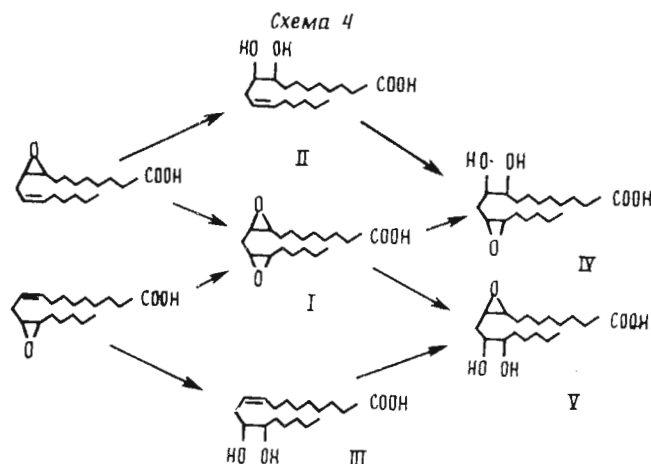
путем образования гидроксикислот (II) и (III) является ферментативный гидролиз. Ранее эти соединения были идентифицированы среди продуктов окисления линолеата в изолированных микросомах из печени кролика [7]. Как было показано [8], вицинальные диолы образуются в клетках печени при гидролизе эпексидов арахидоната цитозольной эпексид-лиазой.

Наиболее полярные метаболиты коронаровой и верноловой кислот (соответственно (IV) и (V)) с временем удерживания 39 мин (рисунок) при съемке масс-спектров в условиях химической ионизации образуют протонированные квазимолекулярные ионы MH^+ при m/z 331, 248 ($C_{18}H_{35}O_5$) и три менее интенсивных иона, образующихся в результате дегидратации. На основании данных масс-спектров химической ионизации, а также спектров электронного удара (оба соединения дают молекулярные пики M^+ при m/z 330, 241) метаболитам (IV) и (V) приписано строение соответственно 9,10-дигидрокси-12,13-эпексидоктадекановой и 9,10-эпексид-12,13-дигидроксиоктадекановой кислот и приведенные на схеме 3 основные пути фрагментации.



Полученные результаты позволяют предложить схему основных путей метаболизации коронаровой и верноловой кислот в проростках гороха (схема 4). Вопрос о метаболических предшественниках для соединений (IV) и (V) решается не столь однозначно, как для кислот (I)–(III). Теоретически предшественниками соединений (IV) и (V) могут быть кислоты (II) и (III) соответственно. С другой стороны, кислота (I) может быть предшественником как соединения (IV), так и изомера (V). В действительности, по-видимому, реализуются оба пути — как эпексидирование вицинальных диолов, так и частичный гидролиз диэпоксида. Однако эпексидирование вицинальных диолов является основным путем, так как анализ данных электроноударных масс-спектров показывает, что при метаболизации коронаровой кислоты из двух изомерных эпексидиолов (IV) и (V) образуется преимущественно кислота (IV), а при метаболизации верноловой кислоты — преимущественно изомер (V). В природных источниках соединения (IV) и (V), так же как кислота (I), обнаружены впервые.

Направленность метаболизации коронаровой и верноловой кислот существенно различалась. Если основным продуктом верноловой кислоты



был вицинальный диол, то коронаровая кислота превращалась преимущественно в диэпоксид и эпексидиол. Фактором, определяющим направленность метаболизации изомерных эпексидиолов, очевидно, является их относительное сродство к двум различным ферментам — монооксигеназе и эпексид-лиаза. Коронаровая кислота, по-видимому, предпочтительный субстрат для монооксигеназы, поэтому значительная ее часть эпексидируется. Остальная часть коронаровой кислоты гидролизуется, превращаясь в дигидрокси-кислоту (II). Разница соотношений радиоактивностей в пиках метаболитов (IV) и (II) (рисунок б), с одной стороны, и в метаболитах (V) и (III) (рисунок а) — с другой, позволяет заключить, что кислота (II) эпексидируется более эффективно, чем изомер (III).

Ранее нами было показано, что коронаровая кислота образуется при монооксигеназном окислении линолеата в гомогенате проростков гороха [9]. С монооксигеназным механизмом окисления согласуются и результаты настоящей работы, а именно путь образования кислоты (I).

Известно, что коронаровая и верноловая кислоты — компоненты запасных липидов в семенах многих видов растений [10]. В то же время пути их образования и метаболизма до сих пор не были изучены. Неясна и функциональная роль, которую они могут выполнять в покоящихся и прорастающих семенах. В то же время продукты монооксигеназного пути окисления полиеновых жирных кислот представляют значительный интерес, так как появляется все больше данных, свидетельствующих об их физиологической активности. Так, эпексиди-кислоты вызывают сокращение гладкой мускулатуры [11], разобщают митохондриальное дыхание, ока-

зывают прямое ионофорное действие на мембраны [11], стимулируют освобождение пептидных гормонов [12]. По данным настоящей работы, а также Капдевилы с соавт. [6], время жизни эпоксикислот весьма непродолжительно. В этой связи проявляемая эпоксикислотами физиологическая активность может быть обусловлена не только ими самими, но и их метаболитами.

Экспериментальная часть

[1-¹⁴C]Коронаровую и [1-¹⁴C]верноловую кислоты получали неселективным окислением [1-¹⁴C]линолеата (5,08 Бк/ммоль) по модифицированному методу [13]. Эпоксикислоты, выход которых составлял около 45%, очищали методом ВЭЖХ на колонке Partisil 5 ODS-3 (4,6×250 мм), используя линейный градиент от 60:40:0,1 до 96:4:0,1 (по объему) в смеси метанол — вода — уксусная кислота в течение 55 мин, затем 25 мин в изократическом режиме. Скорость потока растворителя 0,4 мл/мин (система А). После полупрепаративного сбора пика эпоксикислот с временем удерживания 57 мин индивидуальные эпоксиды разделяли на колонке Partisil 5 (4,6×250 мм) при элюировании в изократическом режиме смесью гексан — изопропанол — уксусная кислота, 99:1:0,1 (по объему). Скорость потока растворителя 0,4 мл/мин (система В). Очищенные коронаровая и верноловая кислоты были идентифицированы по их масс-спектрам химической ионизации и электронного удара, условия съемки которых приведены ниже. При окислении линолеата избытком надуксусной кислоты был получен (9,10), (12,13)-дизпоксид и изомерные эпоксидиолы. Вицинальные диолы, (Z)-9,10-дигидрокси-12-октадеценую и (Z)-12,13-дигидрокси-9-октадеценую кислоты получали раскрытием оксирана в коронаровой и верноловой кислотах по модифицированному методу Кори [14].

Эксперименты по метаболизации коронаровой и верноловой кислот проводили на эпикотилиях 3-дневных проростков гороха. Эпикотили (8 г) гомогенизировали в 20 мл среды, содержащей 0,33 М сорбит, 1 мМ MgCl₂ и 50 мМ трис-HCl, pH 7,5. Гомогенат (по 10 мл) инкубировали с 201 кБк [1-¹⁴C]коронаровой и [1-¹⁴C]верноловой кислот в течение 30 мин в присутствии 1 мМ NADPH. Реакцию начинали с внесения меченого субстрата в 50 мкл этанола. По окончании инкубации реакционную смесь подкисляли уксусной кислотой до pH 3 и продукты экстрагировали бутаном-2.

Продукты разделяли обращенно-фазовой радио-ВЭЖХ (описанная выше система А) при детектировании проточным сцинтилляционным счетчиком Изофло 1 (Nuclear Enterprises, Англия) с гетерогенной кюветой (80 мкл), заполненной частицами твердого сцинтиллятора NE 901 (50 мкм). Собранные фракции дополнительно очищали на колонке Nucleosil 5-120 C₈ (4×250 мм) при элюировании линейным градиентом от 60:40:0,1 до 96:4:0,1 (по объему) в смеси метанол — вода — уксусная кислота в течение 80 мин. Скорость потока растворителя 0,4 мл/мин (система С).

Масс-спектры химической ионизации снимали на приборе Finnigan MAT 212 в режиме прямого ввода, реактантный газ — изобутан, температура ионного источника и испарителя 25–50° С. Спектры электронного удара (70 эВ) снимали на масс-спектрометре MX-1310 в условиях прямого ввода при тех же температурных режимах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Паносян А. Г. // Раст. ресурсы. 1986. Т. 22. № 4. С. 441–449.
2. Zimmerman D. C., Coudron C. A. // Plant Physiol. 1979. V. 63. № 3. P. 536–541.
3. Vick B. A., Zimmerman D. C. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 111. № 2. P. 470–477.
4. Гречкин А. Н., Тарчевский И. А. // Биохимия. 1988. Т. 53. № 9. С. 1563–1568.
5. Гречкин А. Н., Королев О. С., Курашкин Р. А., Ефремов Ю. Я., Мусин Р. М., Нильсов А. В., Лагунцов Ш. К., Тарчевский И. А. // Докл. АН СССР. 1987. Т. 297. № 5. С. 1257–1260.
6. Capdevila J. H., Mosset P., Yadagiri P., Lumin S., Falck J. R. // Arch. Biochem. and Biophys. 1988. V. 261. № 1. P. 122–133.

7. *Oliv E. H.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 111. № 2. P. 644–651.
8. *Chacos N., Capdevila J., Falck J. R., Manna S., Martin-Wixtrom C., Gill S. S., Hammock B. D., Estabrook R. W.* // Arch. Biochem. and Biophys. 1983. V. 223. № 2. P. 639–648.
9. *Гречкин А. Н., Курамшин Р. А., Кухтина Н. В., Сафонова Е. Ю., Ефремов Ю. Я., Тарчевский И. А.* // Докл. АН СССР. 1989. Т. 305. № 3. С. 740–742.
10. *Smith C. R.* // Progr. Chem. Fats Other Lipids. 1971. V. 11. P. 137–177.
11. *Ozawa T., Hayakawa M., Takamura T., Sugiyama S., Suzuki K., Iwata M., Taki F., Tomita T.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1986. V. 134. № 3. P. 1071–1078.
12. *Snyder G., Lattanzio F., Yadagiri P., Falck J. R., Capdevila J.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1986. V. 139. № 3. P. 1188–1194.
13. *Физер Л., Физер М.* Реагенты для органического синтеза: Пер. с англ. М.: Мир, 1970. Т. 3. С. 60–61.
14. *Corey E. J., Nagata R.* // Tetrahedron Lett. 1987. V. 28. № 45. P. 5391–5394.

Поступила в редакцию

7.III.1989

После доработки

12.VI.1989

A. N. GRECHKIN, N. V. KUKHTINA, R. A. KURAMSHIN, E. Y. SAFONOVA,
Y. J. YEFREMOV*, I. A. TARCHEVSKY

THE METABOLIZATION OF EXOGENOUS [1-¹⁴C]CORONARIC AND [1-¹⁴C]VERNOLIC ACIDS IN HOMOGENATE OF PEA SEEDLINGS

*Kazan Institute of Biology; * A. E. Arbuzov Institute of Organic and Physical
Chemistry, Kazan Branch of Academy of Sciences of the USSR*

Metabolization of (Z)-[1-¹⁴C]-9,10-epoxy-12-octadecenoic (coronaric) and (Z)-[1-¹⁴C]-12,13-epoxy-9-octadecenoic (vernolic) acids in homogenate of epicotyls of pea seedlings was studied. After purification by HPLC, metabolites were identified by high resolution mass spectrometry as (9, 10), (12, 13)-diepoxyoctadecanoic (I); (Z)-9,10-dihydroxy-12-octadecenoic (II); (Z)-12,13-dihydroxy-9-octadecenoic (III); 9,10-dihydroxy-12,13-epoxy-octadecanoic (IV) and 9,10-diepoxy-12,13-dihydroxyoctadecanoic (V) acids. The label from [1-¹⁴C]coronaric acid was incorporated into compounds (I), (II) and (IV), and from [1-¹⁴C]vernolic acid into metabolites (I), (III) and (V). Compounds (I), (IV) and (V) have not been previously found in natural sources. The pathways of formation of acids (I) – (V) and their possible role in the endogenous regulation of plants are discussed.